

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 525599

(P2003 - 525599A)

(43)公表日 平成15年9月2日(2003.9.2)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 2 4
39/00		A 6 1 P 11/00	4 B 0 6 3
45/00		35/00	4 C 0 8 4
51/00		37/04	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全116数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 559891(P2001 - 559891)

(86)(22)出願日 平成13年2月20日(2001.2.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月19日(2002.8.19)

(86)国際出願番号 PCT/US01/05674

(87)国際公開番号 W001/061055

(87)国際公開日 平成13年8月23日(2001.8.23)

(31)優先権主張番号 60/183,188

(32)優先日 平成12年2月17日(2000.2.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ディアデクサス インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9408  
0、サウス サン フランシスコ、オイスタ  
ー ポイント ブルバード 343

(72)発明者 チェン, セイ - ヨ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9440  
4、フォスター シティ、ミラ ストリー  
ト 160

(72)発明者 スン, ヨンミン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9512  
8、サン ホセ、エス.ウィンチェスター  
ブルバード 869、アパートメント 260

(74)代理人 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肺癌特異的遺伝子による肺癌の診断、モニタリング、病期分類、イメージングおよび治療の方法

(57)【要約】

本発明は、L S Gポリペプチド、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特にこのポリヌクレオチドを発現することによる上記ポリペプチドの製造方法、ならびに上記ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストに関する。本発明はさらに、探索、診断および臨床技術に関連する部分を有する用途のための、かかるポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストを利用するための方法に関する。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** LSGであって、

(a) 配列番号1、2、5、もしくは6のポリヌクレオチド、またはそれらの変異体、

(b) 配列番号1、2、5、もしくは6のポリヌクレオチド、またはそれらの変異体により発現されるタンパク質、あるいは

(c) 配列番号1、2、5、もしくは6のアンチセンス配列に、ストリンジェントな条件下にてハイブリダイズすることが可能なポリヌクレオチド

を含む、前記LSG。

**【請求項2】** 配列番号3または4のタンパク質を含む、請求項1に記載のLSG。

**【請求項3】** 患者における肺癌の存在を診断する方法であって、

(a) 患者における細胞、組織または体液における請求項1に記載のLSGレベルを測定すること；および

(b) 正常ヒト対照由来の細胞、組織または体液におけるLSGレベルと、測定されたLSGレベルとを比較すること

とを含み、正常ヒト対照に対する患者における測定LSGレベルの変化が、肺癌の存在に関連する、前記方法。

**【請求項4】** 患者における肺癌の転移を診断する方法であって、

(a) 転移したことがわかっていない肺癌を有する患者を発見すること；

(b) 該患者由来の細胞、組織または体液の試料中の、請求項1に記載のLSGレベルを測定すること；および

(c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液におけるLSGレベルと、測定LSGレベルとを比較すること

とを含み、正常ヒト対照に対する患者における測定LSGレベルの増加が、転移した癌に関連する、前記方法。

**【請求項5】** 肺癌を有する患者における肺癌を病期分類する方法であって、

(a) 肺癌を有する患者を発見すること；

(b) 患者由来の細胞、組織または体液の試料中の請求項1に記載のLSGレベルを測定すること；および

(c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液におけるLSGレベルと、測定LSGレベルとを比較すること

とを含み、正常ヒト対照に対する患者における測定LSGレベルの増加が、進行している癌に関連し、測定LSGレベルの減少が、後退または寛解している癌に関連する、前記方法。

【請求項6】 転移の発症に関して、患者における肺癌をモニタリングする方法であって、

(a) 転移したことがわかっていない肺癌を有する患者を発見すること；

(b) 患者由来の細胞、組織または体液の試料中の請求項1に記載のLSGレベルを定期的に測定すること；および

(c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液におけるLSGレベルと、定期的に測定したLSGレベルとを比較すること

とを含み、正常ヒト対照に対する患者における定期的に測定したLSGレベルのいずれか1つの増加が、転移した癌に関連する、前記方法。

【請求項7】 患者における肺癌の病期の変化をモニタリングする方法であって、

(a) 肺癌を有する患者を発見すること；

(b) 患者由来の細胞、組織または体液における請求項1に記載のLSGレベルを定期的に測定すること；および

(c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液におけるLSGレベルと、定期的に測定したLSGレベルとを比較すること

とを含む、正常ヒト対照に対する患者における定期的に測定したLSGレベルのいずれか1つの増加が、病期が進行している癌に関連し、減少が、病期が後退または寛解している癌に関連する、前記方法。

【請求項8】 肺癌のイメージングおよび治療における使用のための潜在的治療薬を発見する方法であって、

潜在的治療薬の非存在下におけるLSGに対して請求項1に記載のLSGに結合

する能力またはその発現を減少させる能力に関して分子をスクリーニングすることを含み、LSGに結合する分子の能力またはLSGの発現を減少させる能力が、該分子が肺癌のイメージングおよび治療において有用であることを示す、前記方法。

【請求項9】 請求項1に記載のLSGによりコードされるポリペプチドを特異的に結合する抗体。

【請求項10】 請求項9に記載の抗体を患者に投与することを含む、患者における肺癌のイメージングの方法。

【請求項11】 抗体が、常磁性イオンまたは放射性同位体で標識される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 請求項1に記載のLSGの発現または活性をダウンレギュレートする分子を患者に投与することを含む、患者における肺癌の治療の方法。

【請求項13】 請求項1に記載のLSGを発現する標的細胞に対する免疫応答を誘発する方法であって、免疫応答が標的細胞に対して上昇するように、免疫原性的刺激量のLSGタンパク質をヒト患者に送達することを含む、前記方法。

【請求項14】 LSGタンパク質が、配列番号3または4を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 請求項1に記載のLSGを含む肺癌治療用ワクチン。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本出願は、その全体が参照により本明細書に援用される2000年2月17日提出の米国仮出願第60/183,188号についての優先権を主張する。

**【0002】****[発明の分野]**

本発明は、部分として、新たに同定されたポリヌクレオチドおよびポリペプチド、そのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの変異体ならびに誘導体、そのポリヌクレオチドおよびポリペプチドならびにそれらの変異体および誘導体を作製する方法、そのポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニスト、ならびにそのポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体、誘導体、アゴニストおよびアンタゴニストの使用に関する。特に、これらおよびその他の点において、発明は以後「L ng 103」および「l ng 104」と称されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関する。

**【0003】****[発明の背景]**

肺癌は米国において男女いずれについても2番目に主要な型の癌であり、男女共に癌死の最も一般的な原因である。肺癌は肺に発生した原発性腫瘍、または腸もしくは乳房といった別の器官から拡がった二次腫瘍の結果生じ得る。原発性肺癌は大きく3つの型：小細胞肺癌、非小細胞肺癌、および中皮腫に分類される。小細胞肺癌はその癌細胞が特有のオーツ麦の形状をしていることから、「燕麦細胞」肺癌とも呼ばれる。非小細胞肺癌には3つの型がある。これらは類似した挙動を示し、治療に対し小細胞肺癌とは異なった反応を示すことから、一つにまとめて分類されている。その3つの型は、扁平上皮癌、腺癌および大細胞癌である。扁平上皮癌は気道を裏打ちしている細胞から発生する。腺癌も気道を裏打ちする細胞から発生する。しかしながら、腺癌は粘液（粘液質）を産生する特定型の細胞から発生する。しかしながら、腺癌は粘液（粘液質）を産生する特定型の細胞から発生する。大細胞肺癌は、細胞を顕微鏡で見たとき巨大で円形をしていると思われることから名付けられている。中皮腫は稀な型の癌であり、胸膜と呼ばれる肺の被膜を冒す。中皮腫はアスベストへの曝露を原因とすることが多い。

## 【0004】

二次性肺癌は体内の他所（例えば乳房または腸）で発生し、肺に広がった癌である。二次性肺癌の治療選択は、癌がどこで発生したかに依存する。換言すれば、乳房から広がった癌は乳癌の治療に反応し、腸から広がった癌は腸癌の治療に反応するはずである。

## 【0005】

癌の病期は、癌がどの程度拡大したかを示す。病期分類は、癌の病期に従って治療が決定されることが多いことから重要である。病期分類は肺の非小細胞癌と小細胞癌で異なっている。

## 【0006】

非小細胞癌は4つの病期に分類できる。病期Ⅰは極めて局在性の癌であり、リンパ節に癌は認められない。病期Ⅱの癌は、冒された肺の頂部にあるリンパ節まで広がっている。病期Ⅲの癌は、癌が発生した場所近くまで広がっている。これは、胸壁、肺の被膜（胸膜）、胸部中央（縦隔）またはその他リンパ節に達することがある。病期Ⅳの癌は、体の別の所まで広がっている。

## 【0007】

小細胞肺癌は病気の発生の極めて初期に拡大することがあるため、小細胞肺癌は2群にのみ分類されている。これらは、一方の肺と近接するリンパ節にのみ癌が認められる限定疾患、および肺の外の胸郭、または他の体部まで癌が拡大した拡張性疾患群である。さらにスキャンで拡大が認められない場合でさえ、幾つかの癌細胞が離脱し、血流またはリンパ系によって運ばれることが考えられる。したがって、安全のために、二次性癌が確認されているか否かにかかわらず、小細胞肺癌はそれらが拡大しているものとして治療することが好ましい。小細胞癌の治療には手術を利用することは、極初期の例を除いては典型的ではないため、幾つかの他の型の癌の場合ほど病期分類は重要ではない。放射線治療を用いた、または用いない化学療法が多く用いられる。最初に行われるスキャンおよび検査は、治療に対する患者の反応の度合いを知るために後で用いられるであろう。

## 【0008】

したがって、かかる癌が転移しているか否かを決定するための、より高感度で

あり、正確な、ヒトの癌を病期分類する方法、および転移の発生に関して、転移していないヒトの癌の進行をモニタリングする方法が強く求められている。

【0009】

今回、肺癌、特に肺の扁平上皮癌について2つの診断マーカーが同定された。これら診断マーカーは、本明細書中では一般に肺特異的遺伝子、またはLSG、より具体的にはLng103およびLng104と称する。

【0010】

本発明では、本明細書中でLSGsと呼ばれる肺特異遺伝子による肺癌の検出、診断、モニタリング、病期分類、予後判定、イメージングおよび治療の方法が提供される。本発明の目的に関しては、LSGはとりわけ配列番号1、2、5または6のポリヌクレオチド配列を含む遺伝子により発現される未変性(native)タンパク質を表す。配列番号1のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列は、配列番号3に示されている。配列番号4のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列は、配列番号2に示されている。本明細書中では、「LSG」は、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、2、5または6に比べヌクレオチド配列中に変化を含むが、依然として同一タンパク質をコードするポリヌクレオチドを意味する。あるいは、本明細書中での用いられるLSGが意味するものは、配列番号1、2、5または6のポリヌクレオチド配列、または配列番号1、2、5または6のアンチセンス配列に、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイゼーションが可能なレベルのポリヌクレオチドを含む、配列番号1、2、5または6レベルのポリヌクレオチド配列を含む遺伝子にコードされる未変性mRNAを意味する。

【0011】

本発明の他の目的、特徴、利点および側面は、以下の説明より当業者に明らかになるだろう。しかしながら、以下の説明および具体的な実施例は、発明の好ましい態様を示すものではあるが、例示のみ目的として描写されたものであることが理解されるべきである。以下の記述を読むことにより、そして本開示のその他の部分を読むことにより、開示の発明の精神および範囲内の各種変更および改良は当業者にとって容易に明らかになるだろう。

## 【0012】

## [発明の概要]

これらの目的、およびその他の問題に対し、本発明の目的は、配列番号1、2、5または6のポリヌクレオチドを含むLSG、配列番号1、2、5または6のポリヌクレオチドにより発現されるタンパク質、あるいはそのタンパク質を発現するそれらの変異体、またはストリンジェントな条件下にて配列番号1、2、5または6のアンチセンス配列にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを提供することである。好ましいLSGタンパク質は、配列番号3および4に示されている。

## 【0013】

本発明の別の目的は、細胞、組織または体液中のLSCレベルの変化を、正常ヒト対照の、好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGのレベルと比較して分析することにより、肺癌の存在を診断する方法であって、正常ヒト対照に対する患者におけるLSGレベルの変化が肺癌に関連する方法を提供することである。

## 【0014】

さらに転移した肺癌を有することが疑われるヒト患者を同定し、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料をLSGについて分析し、かかる細胞、組織または体液中のLSGレベルを正常ヒト対照の、好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGレベルと比較することにより、転移をしたことがわかっていない肺癌を有する患者における転移性肺癌を診断する方法が提供であって、正常ヒト対照に対する患者におけるLSGレベルの増加が、転移をした肺癌に関連する方法が適用される。

## 【0015】

発明はさらに、肺癌を有するヒト患者を発見し、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料を分析し、かかる細胞、組織または体液中のLSGレベルを、正常ヒト対照試料の、好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGレベルと比較することにより、肺癌を有するヒトにおける肺癌を病期分類する方法もであって、正常ヒト対照に対する患者におけるLSGレベルの増加が、後退または寛

解している癌に関連する方法を提供する。

【0016】

さらに、転移の発生について、肺癌を有するヒトの肺癌をモニタリングする方法が提供される。この方法は、転移したことがわかっていないような癌を有する患者を同定することと、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料をLSGについて定期的に分析することと、かかる細胞、組織または体液中のLSGレベルを、正常ヒト対照試料の、好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGレベルと比較することとを含み、この場合正常ヒト対照に対する患者におけるLSGレベルの増加が、転移した癌に関連している。

【0017】

さらに、肺癌を有するヒトにおけるLSGレベルを観察することにより、肺癌を有するの肺癌の病期の変化をモニタリングする方法が提供される。この方法は、かかる癌を有するヒト患者を発見することと、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料をLSGについて定期的に分析することと、この様なかかる細胞、組織または体液中のLSGレベルを、正常ヒト対照試料の、好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGレベルと比較することとを含み、この場合正常ヒト対照に対する患者におけるLSGレベルの増加が、進行している癌に関連し、そのLSGレベルの減少が、後退または寛解している癌に関連する。

【0018】

さらに、肺癌のイメージングおよび治療に使用するための、LSGを標的とする新たな治療薬を設計する方法を提供する。例えば、一態様では、LSGを標的とする抗体、またはかかる抗体の断片のような治療薬を用い、疾患もしくは症状を検出または診断することを目的とし、患者におけるLSGの局在性を治療、検出またはイメージングすることができる。この態様では、正常組織に比して検出される標識抗体量の増加が腫瘍転移または成長の指標となるであろう。かかる抗体は、ポリクローナル、モノクローナルまたはオムニクローナルであってもよく、あるいは分子生物学的技術により調製できる。本発明にて、および本明細書全体にわたって用いられる場合、「抗体」という用語はまた、SELEXと呼ばれ、当業者に既知である*in vitro*進化プロトコルに由来するようなアブ

タマーおよび一本鎖オリゴヌクレオチドを含むことを意味する。抗体は放射性同位体および常磁性金属を含むが、これらに限定されない各種の検出可能でかつ治療的標識体で標識することができる。LSGの濃度および/または活性を下げる小分子および抗体のような治療薬もまたLSGの過剰発現を特徴とする疾患の治療に使用できる。かかる薬剤は本明細書中の教示に従い容易に同定できる。

#### 【0019】

本発明の他の目的、特徴、利点および側面は、以下の説明から当業者に明らかになるだろう。しかしながら、以下の説明および具体的な実施例は、発明の好ましい態様を示しているが、例示のみを目的としていると理解されるべきである。以下の説明を読むこと、および本開示のその他の部分を読むことから、開示の発明の精神および範囲内の各種変更および改良は当業者に容易に明らかになるだろう。

#### 【0020】

##### [用語解説]

以下の例示の説明は本明細書中、特に実施例中に頻繁に使用されるある種の用語の理解を助けるために提供される。説明は、便宜的に提供されるものであり、発明を限定するものではない。

#### 【0021】

DNAの「消化」とは、DNA中のある配列のみに作用する制限酵素でDNAを触媒的に切断することを指す。本明細書中に参照される各種制限酵素は市販されており、それらの反応条件、補因子および使用に関するその他の要件は当業者に既知かつ日常的である。

#### 【0022】

分析を目的とする場合、典型的にはプラスミドまたはDNA断片1 $\mu$ gは、約20 $\mu$ lの反応緩衝液中で、約2ユニットの酵素で消化される。プラスミドの構築のためのDNA断片の単離の場合には、典型的には5~50 $\mu$ gのDNAがそれに比例したより大きい容積中で、20~250ユニットの酵素で消化される。

#### 【0023】

特定制限酵素に関する適切な緩衝液および基質量は、以下に参照されるような

標準的研究室マニュアル中に記載されており、それらは販売業者によって明記されている。

【0024】

37 で、約1時間のインキュベーション時間が通常用いられるが、条件は標準的方法、販社の取扱説明書および反応の詳細により変化し得る。消化後、当業者にとって日常的である既知の方法を用いて、反応物は分析され、断片はアガロースまたはポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法により精製され得る。

【0025】

「遺伝的要素」とは一般に、ポリペプチドをコードする領域、または宿主細胞における転写もしくは翻訳またはポリペプチドの発現にとって重要な他のプロセスを調節する領域を含むポリヌクレオチド、あるいはポリペプチドをコードする領域、およびそれに作動可能に(operably)連結された、発現を調節する領域の両方を含むポリヌクレオチドを意味する。

【0026】

遺伝的要素はエピソーム要素として、すなわち宿主細胞ゲノムとは物理的に独立した分子として複製するベクター内に含まれ得る。それらは真核生物細胞でのメトトレキセート選択によるトランスフェクトされたDNAの増幅中に生じるような、ミニ染色体内に含まれてもよい。遺伝的要素はまた自然状態ではなく、あるいは、その他に、以下の単離、クローニングおよび精製DNAの形態でのまたはベクターでの宿主細胞への導入といった操作状態で、宿主細胞ゲノム中に含まれてもよい。

【0027】

「単離された」とは、その自然状態から「人工的」に変更されること、すなわち自然界で生じる場合、それはその本来の環境から変更されたか、または取り出されたか、あるいはその両方を意味する。

【0028】

その用語が本明細書中で使用されるように、例えば、生きている動物に、その自然な状態で自然に存在しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その自然状態の共存物質から分離された同一ポリヌク

レオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものである。例えば、ポリヌクレオチドに関しては、単離されたという用語は、それが天然に存在する染色体および細胞から分離されていることを意味する。

【0029】

単離の一部として、または単離に続いて、かかるポリヌクレオチドを、例えば、突然変異誘発、融合タンパク質を形成させること、および宿主内での増殖または発現のための、DNAのような他のポリヌクレオチドに結合することができる。単独またはベクターのような他のポリヌクレオチドと結合させて、単離ポリヌクレオチドは、培養液または生体全体にて、宿主細胞に導入することができる。培養液または生体全体にて、宿主細胞へ導入する場合、その用語が本明細書中で用いられるように、かかるDNAは、自然の形態または環境にないことから、単離されている。同様に、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、培地配合物、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの、例えば細胞への導入用の溶液、化学または酵素反応のための組成物もしくは溶液のような組成物中に現れてもよく、例えばそれらは、自然に存在しない組成物ではなく、そこにまた本明細書中で用いられるような用語の意味での単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチドがとどまる。

【0030】

「連結」は、最も多くは二本鎖DNAである、2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド間にホスホジエステル結合を形成するプロセスである。連結に関する技術は当該技術分野で既知であり、連結のプロトコルは例えば以下引用される Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)、および Maniatis et al., pg.146のような標準的研究室マニュアルおよび参考資料に記述されている。

【0031】

「オリゴヌクレオチド(複数可)」は、比較的短いポリヌクレオチドを指す。多くの場合、この用語は一本鎖デオキシリボヌクレオチドを指すが、とりわけ、同様に一本鎖または二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド、お

よび二本鎖DNAも指すことができる。

【0032】

一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドは、自動オリゴヌクレオチド合成装置にて実行されるもののような化学的方法により合成される。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、例えば*in vitro*組換えDNA媒介技術にて、ならびに細胞および生体でのDNA発現による、各種のその他の方法により作製することができる。

【0033】

まず化学的に合成したDNAは、典型的に、5'ホスフェートなしで得られる。かかるオリゴヌクレオチドの5'末端は、組換えDNA分子形成に典型的に用いられるDNAリガーゼを使用する連結反応によるホスホジエステル結合形成の基質ではない。かかるオリゴヌクレオチドの連結が望ましい場合には、キナーゼおよびATPを使用するような標準的技術によりリン酸を付加することができる。

【0034】

化学的に合成したオリゴヌクレオチドの3'末端は、遊離の水酸基を一般的に有しており、T4DNAリガーゼのようなりガーゼの存在下にて、容易に別のオリゴヌクレオチドのような別のポリヌクレオチドの5'ホスフェートとホスホジエステル結合を形成するだろう。周知の様に、この反応は、望ましい場合、連結前に他のポリヌクレオチド(複数可)の5'リン酸を除去することで選択的に阻止することができる。

【0035】

本明細書中では「プラスミド」は一般に、当業者には精通した標準的命名法にしたがって一般に小文字の「p」で始まり、および/またはその後大文字および/もしくは数字が続く形で命名される。本明細書に開示した開始プラスミドは、市販されているか、非制限的に公的に入手可能であるか、または入手可能なプラスミドから既知の公開された方法をルーチンに応用して構築できる。本発明により使用可能な多くのプラスミドならびにその他のクローニングおよび発現ベクターは、当業者に既知であり、容易に入手できる。さらに、当業者は、本発明での

使用に適切ないかなる多くのその他プラスミドを容易に構築し得る。本発明でのかかるプラスミドならびにその他ベクターの特性、構造および使用は、本開示より当業者に容易に明らかになるだろう。

【0036】

「ポリヌクレオチド(複数可)は一般に、未修飾RNAもしくはDNA、または修飾RNAもしくはDNAであり得るポリリボヌクレオチドあるいはポリデオキシリボヌクレオチドを指す。すなわち、例えば、本明細書中で用いるポリヌクレオチドは、とりわけ一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖DNAであり得るか、あるいはより一般的には二本鎖または一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を表す。さらに、本明細書中で用いるポリヌクレオチドは、RNAまたはDNA、あるいはRNAとDNAの両方を含む三重鎖領域を指す。かかる領域内の鎖は同一分子または異なる分子由来であってもよい。この領域には、1つまたはそれ以上の分子全てを含んでもよいが、より一般的には分子の一部の領域のみが含まれる。三重螺旋領域の分子の1つは、オリゴヌクレオチドであることが多い。

【0037】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドという用語には、1つまたはそれ以上の修飾塩基を含有する上記DNAまたはRNAが含まれる。すなわち、安定性またはその他理由から修飾されたバックボーンを持つDNAまたはRNAは、本明細書中でその用語が意図されるような「ポリヌクレオチド」である。さらに、イノシンのような稀な塩基あるいはトリチル化塩基のような修飾塩基を含むDNAまたはRNAも、2例のみ挙げたが、本明細書中でその用語が使用されるようなポリヌクレオチドである。

【0038】

当業者に既知の有益な用途を提供する様々な修飾がDNAおよびRNAに対してなされることが理解されるだろう。本明細書中で使用されるポリヌクレオチドという用語には、化学的、酵素的または代謝的に修飾された形のポリヌクレオチ

ド、ならびにとりわけ単純および複雑な細胞を含む、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学形態が包含される。

【0039】

「ポリペプチド」は、本明細書中で使用される場合、以下に記載の全てのポリペプチドが含まれる。ポリペプチドの基本構造は既知であり、当該分野の多くの教本およびその他の刊行物に記載されている。この状況では、本明細書中ではその用語は、ペプチド結合により直鎖状に相互に結合された2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を指すのに用いられる。本明細書中で用いる場合、その用語は一般には例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖型、および当該分野において一般にタンパク質と呼ばれる、多くの型がある長鎖型の両方を指す。ポリペプチドが20種類の天然アミノ酸と一般に呼ばれる20種類のアミノ酸以外のアミノ酸を含むことが多々あること、および末端アミノ酸を含む多くのアミノ酸が既定のポリペプチドにおいて、プロセシングやその他の翻訳後修飾のような自然のプロセスにより、また当該技術分野で既知の化学的修飾技術によって修飾されてもよいことが理解されるだろう。ポリペプチド中に自然に生ずる一般的修飾でさえ、あまりに多すぎて、本明細書中にその全体を列挙することはできないが、それらは基礎的テキスト、および詳細なモノグラフ、ならびに多くの研究文献に十分に記載されており、それらは当業者にとって既知である。

【0040】

本発明のポリペプチド中に存在する既知の修飾の幾つかを例示すると、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋形成、システイン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、 $\alpha$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセシング、ホスホリル化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質への転移RNAを介したアミノ酸付加、

およびユビキチン化が挙げられる。

【0041】

かかる修飾は当業者に既知であり、科学文献に詳細記載されている。幾つかの特に一般的な修飾、例えばグリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン残基の - カルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP - リボシル化は、最も基本的なテキスト、例えばタンパク質構造および分子特性(PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES), 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993)に記載されている。例えばタンパク質の翻訳後共有修飾 (POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS), B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983)の中の、Wold, F., 翻訳後タンパク質修飾 (Posttranslational Protein Modifications): 展望と予想 ( Perspectives and Prospects ), pgs, 1-12、Seifter et al., タンパク質修飾および非タンパク質性補因子の分析 ( Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors ), Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)、およびRattan et al., タンパク質合成: 翻訳後修飾とエイジング ( Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging ), Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)のような、多くの詳しいレビューが本件に利用できる。

【0042】

ポリペプチドは必ずしも完全な直線ではないということは、よく知られており、また上記のように、理解されるであろう。例えば、ポリペプチドはユビキチン化の結果により分枝され、それらは、一般に自然のプロセッシング現象を含む翻訳後事象、および自然には起こらない人工的な操作によりもたらされる現象結果として、分岐を伴った、または伴わない、環状であってもよい。環状、分枝状、および分枝環状ポリペプチドは、非翻訳的自然プロセスにより、および完全な合成的方法によっても合成され得る。

【0043】

修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含むポリペプチド中のいかなる場所でも起こり得る。実際に、共有結合的修飾によるポリペプチド中のアミノまたはカルボキシル基、あるいは両方の遮蔽は天然

および合成ポリペプチドにおいて一般的であり、かかる修飾は、本発明のポリペプチド中にも同様に存在し得る。例えば、タンパク質分解プロセッシング前に大腸菌で作られたポリペプチドのアミノ末端残基は、大部分が不変的にN - ホルミルメチオニンであろう。

【0044】

ポリペプチド中に見られる修飾は、多くの場合それが作製される条件を反映するであろう。例えば、宿主内でクローニングした遺伝子を発現することにより作製されたポリペプチドでは、大部分の修飾の性質および程度が宿主細胞の翻訳後修飾能力およびポリペプチドのアミノ酸配列中に存在する修飾シグナルにより決定されるであろう。例えば、周知のように、グリコシル化は大腸菌のような細菌性宿主ではたいてい起こらない。したがって、グリコシル化が望まれる場合には、ポリペプチドはグリコシル化用宿主、一般には真核生物細胞で発現させるべきである。しばしば昆虫細胞は、哺乳動物細胞と同一の翻訳後グリコシル化を行うことから、とりわけ自然なパターンのグリコシル化を有する哺乳動物タンパク質を効率的に発現させるために、昆虫細胞発現系が開発されている。他の修飾にも同様の考案が適用される。

【0045】

同一型の修飾は、所定のポリペプチド中の複数の部位にて同一程度または様々な程度で存在し得ることが理解されるだろう。また所定のポリペプチドは多くの型の修飾を含んでもよい。

【0046】

一般に、本明細書中で使用される場合には、ポリペプチドという用語は、かかる全ての修飾、特に宿主細胞中にてポリヌクレオチドを発現させることにより合成されたポリペプチド中に存在する修飾を包含する。

【0047】

本明細書中で用いられる場合、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの「変異体（複数可）」は、それぞれ参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。この意味での変異体は以下、または本開示中の他所に詳述される。

## 【0048】

別の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なるポリヌクレオチド。一般にその差は、参照と変異体のヌクレオチド配列が全体としては極めて類似しており、多くの領域で同一であるように制限される。

## 【0049】

以下記載するように、変異体のヌクレオチド配列の変化はサイレント(silent)であり得る。すなわち、それらはポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸を変化させないだろう。変化がこの型のサイレントな変化に限定される場合、変異体は参照と同一のアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードするだろう。同様に以下に記載するように、変異体のヌクレオチド配列中の変化は、参照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を改変してもよい。かかるヌクレオチドの変化は、以下に記載するように、参照配列によりコードされるポリペプチド中にアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および切断を生じ得る。

## 【0050】

別の参照ポリペプチドとアミノ酸配列が異なるポリペプチド。一般にその差は、参照と変異体の配列が全体としては極めて類似しており、多くの領域で同一であるように制限される。

## 【0051】

変異体と参照ポリペプチドは、1つまたはそれ以上の、置換、付加、欠失、融合および切断によりアミノ酸配列が異なってもよく、それらは、いかなる組み合わせで存在してもよい。

## 【0052】

本明細書中で用いる「受容体分子」は、本発明のLSGSポリペプチド、好ましくはLn<sub>g</sub>103およびLn<sub>g</sub>104と特異的に結合または相互作用する分子を指し、好ましい典型的な受容体だけでなく、発明のポリペプチドと特異的に結合または相互作用するその他分子も包含する(それらはまたそれぞれ「結合分子」および「相互作用分子」、ならびに「LSG結合または相互作用分子」、「Ln<sub>g</sub>103およびLn<sub>g</sub>104結合分子」、およびLn<sub>g</sub>103およびLn<sub>g</sub>104相互作用分子」とも呼ばれる)。発明のポリペプチドと、受容体または結合

もしくは相互作用分子を含むかかる分子との結合は、発明のポリペプチドに限定され得る（それは非常に好ましい）か、または発明のポリペプチドに高度に特異的であり得る（それは非常に好ましい）か、または本発明のポリペプチドを含むタンパク質のグループに高度に特異的であり得る（それは好ましい）か、あるいはその内の少なくとも1つが発明のポリペプチドを含むタンパク質の複数のグループに特異的であり得る。

#### 【0053】

受容体はまた、発明のポリペプチドに結合する、抗体および抗体由来試薬のように、非天然でもあってもよい。

#### 【0054】

##### [ 発明の詳細な説明 ]

本発明は、とりわけ以下に詳述するように、本明細書中でLSGと称する、新規肺特異的ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。特に、発明は、本明細書中では、ヒトLng103およびLng104と称される新規LSGポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関し、それはアミノ酸配列相同性により、ラット前立腺ステロイド結合タンパク質に関連される。発明は特に、配列番号1～6に記載のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を有するLng103およびLng104、および本明細書中で「寄託クローン」または「寄託クロンのcDNA」と称されるATCC寄託番号PTA-3032およびPTA-3033のヒトcDNAのLng103およびLung104ヌクレオチドおよびアミノ酸配列に関する。配列番号1～6に記載のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、寄託クロンのcDNAを配列決定することで得たことが理解されるだろう。したがって、寄託クロンの配列は、2者間の任意の不一致に関して支配し、配列番号1、2、5および6の配列に対する参照は、寄託クロンのヒトcDNAの配列に対する参照を含む。

#### 【0055】

##### ポリヌクレオチド

本発明の一側面によれば、配列番号3および4のアミノ酸配列を有するLng103およびLng104ポリペプチドをコードする単離LSGポリヌクレオチ

ドが提供される。

【0056】

配列番号1、2、5および6に記載のポリヌクレオチド配列のような本明細書中に提供された情報を用いて、ヒトLng103およびLng104ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドは、出発原料としてヒト腫瘍細胞由来のmRNAを用いたcDNAのクローニング法のような標準的クローニングおよびスクリーニング手法を用いて得られ得る。

【0057】

本発明のポリヌクレオチドは、mRNAのようなRNAの形態、あるいはクローニングにより得た、もしくは化学合成技術により、またはその組み合わせにより生産されたcDNAやゲノムDNAを含むDNAの形態であってもよい。DNAは二本鎖でも一本鎖でもよい。一本鎖DNAは、センス鎖としても知られるコード鎖であるか、またはそれはアンチセンス鎖とも呼ばれる非コード鎖でもよい。

【0058】

ポリペプチドをコードするコード配列は、配列番号1、2、5または6のポリヌクレオチドのコード配列と同一であってもよい。またそれは、遺伝コードの重複性(縮重)の結果として、配列番号3または4のポリペプチドをコードするような、異なる配列を持つポリヌクレオチドであってもよい。

【0059】

これらのポリペプチドをコードする、配列番号1、2、5および6のような本発明のポリヌクレオチドとしては、成熟ポリペプチド用コード配列単独、成熟ポリペプチド用コード配列およびタンパク質、もしくはプロタンパク質、またはプレタンパク質配列のような、リーダー配列あるいは分泌配列をコードする配列のようなさらなるコード配列、上記のさらなるコード配列を伴って、または伴わずに、例えばイントロンならびに非コード非コード5'および3'配列を含むが、これらに限定されないさらなる非コード配列(例えば、転写、スプライシングおよびポリアデニル化シグナルを含むmRNAプロセッシング、例えば、mRNAのリボソーム結合および安定性の役割を果たす転写された非翻訳配列、さらな

る機能性を提供するような、さらなるアミノ酸をコードするさらなるコード配列が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、例えば、ポリペプチドは、融合ポリペプチドの精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列と融合してもよい。発明のこの側面のある好ましい実施例では、マーカー配列はとりわけ p Q E ベクター (Qiagen, Inc.) に備えられているタグのようなヘキサ - ヒスチジンペプチドであり、その多くが市販されている。Gentzet al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 821-824(1989)に記載されるように、例えばヘキサヒスチジンは融合タンパク質の便利な精製を提供する。H A タグは、インフルエンザ血球凝集素タンパク質由来のエピトープであり、例えばWilson et al., Cell 37: 767 (1984)に記載されている。

#### 【0060】

上記によれば、本明細書中で使用される「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」という用語は、本発明のポリペプチド、特に配列番号3および4に記載のアミノ酸配列を有するヒト L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 のポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含する。この用語は、ポリペプチド(例えばイントロンにより中断された)をさらなる領域とともにコードする単一連続領域または不連続領域を含み、さらにコードおよび/または非コード配列を含有してもよいポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0061】

本発明は、さらに配列番号3および4のアミノ酸配列を有するポリペプチドdの断片、類縁体および誘導体をコードする、本明細書中で上述したポリヌクレオチドの変異体に関する。ポリヌクレオチドの変異体は、天然の対立遺伝子変異体のような天然型変異体であってもよく、またはそれは天然に生ずることが知られていない変異体でもよい。かかる非天然型のポリヌクレオチド変異体は、ポリヌクレオチド、細胞または生体に適用される技術を含む突然変異誘発技術により作製され得る。

#### 【0062】

この観点の変異体としては、ヌクレオチド置換、欠失または付加により上記ポリヌクレオチドとは異なる変異体である。置換、欠失または付加は、1つまたは

それ以上のヌクレオチドを包含する。変異体はコードまたは非コード領域、あるいはその両方が変更され得る。コード域内の変更は、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失または付加を生じてよい。

#### 【0063】

この観点における発明の特に好適態様としては、配列番号3および4に記載のL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4のアミノ酸配列を有するポリペプチド、それらの変異体、類縁体、誘導体および断片、ならびに変異体、類縁体および誘導体の断片をコードするポリヌクレオチドである。

#### 【0064】

さらにこの観点で特に好適なものは、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の変異体、類縁体、誘導体および断片、ならびに配列番号3および4のL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4ポリペプチドのアミノ酸配列を有する断片の変異体、類縁体および誘導体をコードするL S Gポリヌクレオチドであって、その中で幾つか、数個、5～10、1～5、1～3、2、1個または0個のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、欠失または付加されており、それはL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の特性および活性を変化させないものである。またこの点で特に好ましいものは、置換を持たない配列番号3および4のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

#### 【0065】

本発明のさらに好ましい態様は、配列番号3および4に記載のアミノ酸配列を有するL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるL S Gポリヌクレオチド、およびかかるポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチドである。あるいは、最も非常に好ましいものは、寄託クローンのcDNAのL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも80%同一である領域を含むL S Gポリヌクレオチド、およびそれに相補的なポリヌクレオチドである。この点に関して、同一物と少なくとも90%同一であるL S Gポリヌクレオチドが特に好ましく、これらの特に好ましいL S Gポリヌクレオチドの中でも、少なくとも95%が同一であるものが特に好ましい。さらに、少なくとも95%が同一

であるものの中でも、少なくとも97%が同一であるものが非常に好ましく、これらの中でも、少なくとも98%および99%が同一であるものが特に非常に好ましく、少なくとも99%が同一であるものがより好ましい。

【0066】

この点に関して、特に好適な態様は、ヒトcDNAによりコードされる配列番号3または4の成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0067】

本発明はさらに、上記LSG配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この観点では、本発明は特に、ストリンジェントな条件下にて本明細書中で上述したポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本明細書中で用いる場合、「ストリンジェントな条件」という用語は、少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在する場合のみ、ハイブリダイゼーションが起こるであろうことを意味する。

【0068】

発明のポリヌクレオチドアッセイに関して本明細書中でさらに記載するように、例えば上記発明のポリヌクレオチドは、L ng 103またはL ng 104をコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離し、ヒトL ng 103またはL ng 104遺伝子と高い配列類似性を有する他遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離するために、cDNAおよびゲノムDNA用ハイブリダイゼーションプローブとして使用してもよい。かかるプローブは一般に、少なくとも15塩基を含むだろう。好ましくは、かかるプローブは、少なくとも30塩基を含み、少なくとも50塩基を含んでもよい。

【0069】

例えば、L ng 103およびL ng 104遺伝子のコード領域は、オリゴヌクレオチドプローブを合成するために、既知のDNA配列を用いてスクリーニングすることにより単離されてもよい。次に、本発明の遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識オリゴヌクレオチドは、どのライブラリーの成員にプローブがハイブリダイズするかを決定するために、ヒトcDNA、ゲノムDNAまたはmRN

Aのライブラリーをスクリーニングするのに用いられる。

【0070】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、特にポリヌクレオチドアッセイに関して、本明細書中にさら記載するように、研究用試薬およびヒトの疾患に対する治療薬や診断薬発見のための材料として用いられ得る。

【0071】

ポリヌクレオチドは、成熟タンパク質およびさらなるアミノまたはカルボキシル末端アミノ酸、あるいは成熟ポリペプチド内部のアミノ酸であるポリペプチドをコードしてもよい（例えば成熟形態は、1つよりも多いポリペプチド鎖を有する場合）。かかる配列は特に、前駆体からのタンパク質の成熟形態へのプロセシングの役割を果たしてもよく、タンパク質輸送を促進してもよく、タンパク質の半減期を延長または短縮してもよく、あるいはアッセイまたは生産に関するタンパク質の操作を容易にしてもよい。一般にその場で場合として、さらなるアミノ酸は、細胞酵素により成熟タンパク質から加工される。

【0072】

1つまたはそれ以上のプロ配列に融合したポリペプチドの成熟形態を持つ前駆体タンパク質は、ポリペプチドの不活性体であり得る。プロ配列が取り除かれると、かかる不活性前駆体は一般に活性化される。活性化の前にプロ配列の幾らかまたは全てが取り除かれてもよい。一般に、かかる前駆体は、プロタンパク質と呼ばれる。

【0073】

まとめると、本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質、成熟タンパク質にリーダー配列を加えたもの（プレタンパク質と称してもよい）、プレタンパク質のリーダー配列ではない1つまたはそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、またはプロタンパク質の前駆体であり、ポリペプチドの活性かつ成熟体を生ずるプロセシング工程中に一般には取り除かれる、1つまたはそれ以上のプロ配列を有するプレプロタンパク質をコードし得る。

【0074】

寄託材料

LSGヒトL ng 103およびL ng 104のcDNAを含む寄託物は、上記のようにアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) に寄託されている。同様に上記のように、cDNA寄託物は、本明細書中では「寄託クローン」または「寄託クローンのcDNA」と称する。

#### 【0075】

寄託クローンは、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USAに2001年2月12日に寄託され、ATCC寄託番号PTA-3032およびPTA-3033が割り当てられた。

#### 【0076】

寄託材料は、完全長L ng 103およびL ng 104 cDNAを含むpCMV-XL4およびpED-21dプラスミド (Invitrogen, LaJolla, CA) である。

#### 【0077】

寄託物は、特許手続きを目的とした微生物の寄託に関する国際承認に関するブダペスト条約の約定に従い成された。この株は、特許発行時に、変更されずに、無制限あるいは無条件で公開されるであろう。寄託は単に当業者の利便性を目的として提供されるものであり、35 U.S.C § 112に基づき要求されるように、寄託が実施可能要件であることを認めるものではない。

#### 【0078】

寄託材料に含まれるポリヌクレオチドの配列、ならびにそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書中にあらゆる記載とのあらゆる矛盾について調整中である。寄託材料の製造、使用または販売にはライセンスが必要である場合があり、それよってかかるライセンスを承諾するものではない。

#### 【0079】

##### ポリペプチド

本発明はさらに、LSGポリペプチド、好ましくは配列番号3および4の演繹アミノ酸配列を有するヒトL ng 103およびL ng 104ポリペプチドに関する。発明はまた、これらポリペプチドの断片、類縁体および誘導体にも関する。配列番号3および4のポリペプチドを参照する場合、「断片」、「誘導体」およ

び「類縁体」という用語は、かかるポリペプチドと実質同一の生物学的機能または活性を保持するポリペプチドを意味する。したがって、類縁体は、プロタンパク質部分の切断により活性化され、活性成熟ポリペプチドを産生することができるプロタンパク質を含む。

【0080】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチドであってもよい。ある好ましい態様では、それは組換えポリペプチドである。

【0081】

配列番号3および4のポリペプチドの断片、誘導体、または類縁体は、(i) 1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が保存的あるいは非保存的アミノ酸残基(好ましくは保存的アミノ酸残基)で置換され、かかる置換アミノ酸残基は遺伝的コードによりコードされるものであってもよく、またはそうでなくてもよいもの、または(ii) 1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii) 成熟ポリペプチドが別の化合物、例えばポリペプチドの半減期を延長する化合物(例えばポリエチレングリコール)と融合しているもの、または(iv) 成熟ポリペプチドに、リーダーまたは分泌配列あるいは成熟ポリペプチドもしくはプロタンパク質の精製に利用される配列といったさらなるアミノ酸が融合されているものであってもよい。かかる断片、誘導体および類縁体は、本明細書中の技術より、当業者の範囲内であると考えられる。

【0082】

好ましい変異体としては、保存的アミノ酸置換によって参照体から変化したものである。かかる置換は、ポリペプチド中の所定のアミノ酸を同様の特性を持つ別のアミノ酸により置換するものである。典型的に保存的置換とし捉えられるのは、脂肪族アミノ酸Ala、Val、LeuおよびIle間でのあるものから別のものへの置換、ヒドロキシル残基SerとThrの相互交換、酸性残基AspとGluの交換、アミド残基AsnとGln間の置換、塩基性残基LysとArgの交換、ならびに芳香族残基Phe、Tyr間の置換である。

【0083】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好ましくは単離形態で提供され、好ましくは均一になるまで精製される。

【0084】

本発明のポリペプチドは、配列番号3または4のポリペプチド（特に、成熟ポリペプチド）ならびに配列番号3または4のポリペプチドと少なくとも75%の類似性（好ましくは少なくとも75%の同一性）、より好ましくは配列番号3または4のポリペプチドと少なくとも90%の類似性（好ましくは少なくとも90%の同一性）、さらに好ましくは配列番号3または4のポリペプチドと少なくとも95%の類似性（好ましくは少なくとも95%の同一性）を有するポリペプチドを包含し、また一般に少なくとも30個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも50個のアミノ酸を含むポリペプチドのかかる部分を持つかかるポリペプチド部分を包含する。

【0085】

当該技術分野にて既知のように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、アミノ酸配列を比較し、一方のポリペプチド配列のその保存的アミノ酸置換と第2のポリペプチドの置換とを比較することで決定される。

【0086】

本発明のポリペプチドの断片または部分は、ペプチド合成により対応する完全長ポリペプチドを産生するために用いてもよい。したがって、断片は完全長ポリペプチド産生のための中間体として使用してもよい。本発明のポリヌクレオチドの断片または部分は、本発明の完全長ポリヌクレオチドを合成するのに使用してもよい。

【0087】

断片

また本発明のこの側面の好ましい別態様としては、L ng 103およびL ng 104の断片、最も特には配列番号3および4に記載のアミノ酸配列を有するL ng 103およびL ng 104の断片、ならびに配列番号3および4のL ng 103およびL ng 104の変異体および誘導体の断片を含むポリペプチドである。

。

## 【0088】

この観点では、断片は上記L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4ポリペプチド、およびそれらの変異体または誘導体のアミノ酸配列と部分的には完全に同一であるが、全てが同一ではないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

## 【0089】

かかる断片は、「独立体(free-standing)」(すなわち他のアミノ酸またはポリペプチドの一部でもなく、融合されてもない)であってもよく、またそれらが大型ポリペプチドの中に含まれてもよく、それらは、その大型ポリペプチドの一部または領域を形成する。大型ポリペプチド内に含まれる場合には、本明細書中に記載の断片は最も好ましくは単一連続領域を形成する。しかしながら、複数の断片が単一の大型ポリペプチド内に含まれてもよい。例えば、ある好ましい実施例は、宿主内での発現用に設計した前駆体ポリペプチド内に含まれ、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4断片アミノ末端に融合された異種のプレおよびプロポリペプチド領域、および断片のカルボキシル末端に融合されたさらなる領域を有する本発明のL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4ポリペプチドの断片に関する。したがって、本明細書中に意図する意味の一側面の断片は、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4に由来する融合ポリペプチドまたは融合タンパク質の部分(単数または複数)に関する。

## 【0090】

発明のポリペプチド断片の代表例としては、約15~約139個のアミノ酸を有する上記断片が存在し得る。

## 【0091】

この状況においては、「約」とは、特に引用される範囲、および一方の極値または両極値においていくつか、数個、5、4、3、2または1個のアミノ酸だけ広い、または狭い範囲を含む。この観点において非常に好ましいものは、引用範囲から一極値または両極値が5アミノ酸程度増減する範囲である。特に非常に好ましいものは、引用範囲から一極値または両極値が3アミノ酸程度増減する範囲である。特に好ましいものは、引用範囲から一極値または両極値が1アミノ酸増減する範囲である。この観点においてすべてのうち最も非常に好ましいのは、約

15～約45アミノ酸からなる断片である。

【0092】

発明の特に好ましい断片としては、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の切断突然変異体である。切断突然変異体としては、アミノ末端を含む連続残基（すなわち連続領域、部分、または一部）またはカルボキシル末端を含む連続残基の欠失、あるいは二重切断突然変異体の場合には、一方がアミノ末端を含み、もう一方がカルボキシル末端を含む2つの連続残基の欠失を除く、配列番号3および4のアミノ酸配列を有するL n g 1 0 3ならびにL n g 1 0 4ポリペプチド、またはそれらの変異体もしくは誘導体が挙げられる。上述のサイズ範囲を有する断片もまた、切断断片の好ましい態様であり、一般には断片の中で特に好ましい。

【0093】

また本発明のこの側面において好ましいのは、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の構造的または機能的特質を特徴とする断片である。この観点で本発明の好ましい態様としては、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4のヘリックスおよびヘリックス形成領域（「領域」）、シートおよびシート形成領域（「領域」）、回転および回転形成領域（「回転領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、フレキシブル領域、表面形成領域および高抗原性指数領域を含む断片が挙げられる。

【0094】

これら観点におけるある好ましい領域は、配列番号3および4に記載されており、配列番号3および4に記載のアミノ酸配列の分析より同定された上記型の領域を含むが、これに限定されない。配列番号3および4に記載するように、かかる好ましい領域には、ガルニエ - ロブソン（Garnier-Robson）領域、領域、回転領域およびコイル領域、チョウ - ファスマン（Chou-Fasman）領域、領域および回転領域、カイト - ドリトル（Kyte-Doolittle）親水性領域および疎水性領域、アイゼンベルク（Eisenberg）および両親媒性領域、カルパス - シュルツ（Karplus-Schulz）フレキシブル領域、エミニ（Emini）表面形成領域およびジャムセン - ウォルフ（Jamsen-Wolf）高抗原性指数領域が含まれる。

## 【0095】

この観点において非常に好ましい断片としては、上記特徴の幾つかのような複数の構造的特徴を組み合わせるL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の領域を含む断片である。この点に関し、配列番号3および4の残基により規定される領域は、その全てが回転領域、親水性領域、フレキシブル領域、表面形成領域および高抗原性指数領域を特徴とし、特に非常に好ましい領域である。かかる領域は、大型ポリペプチド内に含まれてもよく、または上記のような本発明の好ましい断片そのものでもよい。この項で用いられる「約」という用語は、断片に関して一般的に記載した上記の意味を有することが理解されるであろう。

## 【0096】

さらに好ましい領域は、L n g 1 0 3またはL n g 1 0 4の活性を媒介する領域である。この観点における最も非常に好ましいのは、同様の活性または改良された活性を有するか、あるいは望ましくない活性が低減された断片を含む、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の化学的、生物学的、またはその他の活性を有する断片である。この観点において非常に好ましいのは、配列番号3および4に記載の関連ポリペプチドのような、肺特異結合タンパク質を含む、関連ポリペプチドの活性領域に関し、配列または位置にて、あるいはその両方にて、相同的である領域を含む断片である。これら観点において特に好ましい断片としては、上記の切断突然変異体である。

## 【0097】

本発明はまたとりわけ、上記断片をコードするポリヌクレオチド、断片をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチド、特にストリンジェントな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチド、およびPCRプライマーのような、断片をコードするポリヌクレオチドを増幅するためのポリヌクレオチドに関することが理解されるであろう。これらの観点において、好ましいポリヌクレオチドは上記好ましい断片に対応するものである。

## 【0098】

診断アッセイ

本発明はまた、正常ヒト対照でのL S Gのレベルと、ヒト患者のL S Gレベル

を比較することにより、癌を検出、診断、モニタリング、病期分類、および予後判定する定量的および定性的の両方の診断アッセイならびに方法に関する。本発明の目的に関しては、LSGレベルが意味するものは、特に配列番号1、2、5、または6のヒトLng103およびLng104ヌクレオチド配列を含む遺伝子により発現される未変性タンパク質を意味する。配列番号1のポリヌクレオチド配列によりコードされるLSGタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号3に記載されている。配列番号2のポリヌクレオチド配列によりコードされるLSGタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号4に記載されている。本明細書中で「LSG」とはまた、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、2、5または6に記載するようなヒトLng103およびLng104と比較した場合にヌクレオチド配列に変化を含むが、依然として同一のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを意味する。検出される未変性タンパク質は、完全体、分解生成物、分子複合体または化学的修飾体であってもよい。あるいは、本明細書中で用いられる場合、LSGが意味するものは、配列番号1、2、5または6のポリヌクレオチド配列を含むLng103またはLng104遺伝子によりコードされる未変性mRNA、配列番号1、2、5または6のポリヌクレオチドを含むLng103またはLng104遺伝子のレベル、またはストリンジェントな条件下にて配列番号1、2、5または6のアンチセンス配列にハイブリダイズが可能なポリヌクレオチドのレベルを意味する。かかるレベルは、好ましくは、正常および異常レベルの測定を含む、細胞、組織および/または体液の少なくとも1つについて決定される。したがって、例えば正常対照体液、細胞、または組織試料に比較したLSGタンパク質の過剰発現を診断するための本発明による診断アッセイは、肺癌の存在の診断に使用され得る。

#### 【0099】

本発明のすべての方法は、任意に他の癌マーカーおよびLSGのレベルを決定することを含んでもよい。LSGの以外の本発明に有益な他の癌マーカーは、試験される癌に依存しており、当業者に既知である。

#### 【0100】

本発明は、好ましくは同一型の正常ヒト対照由来の細胞、組織または体液中の

L S Gレベルと比較した、細胞、組織または体液中のL S Gレベルの変化を分析することにより、肺癌、特に扁平上皮癌の存在を診断する方法であって、正常ヒト対照に対する患者におけるL S Gレベルの増加が、肺癌の存在に関連する方法を提供する。

【0101】

本発明を限定するものではないが、典型的に、定量的診断アッセイにおいて、試験される患者が癌を有することを示す陽性の結果は、L S Gのような癌マーカーの細胞、組織または体液レベルが、正常ヒト対照の好ましくは同一細胞、組織または体液中により、少なくとも2倍高く、最も好ましくは少なくとも5倍高い結果である。

【0102】

本発明はまた、転移の発症に関して、いまだ転移していない肺癌を有する患者での、転移性肺癌を診断する方法も提供する。本発明の方法では、転移した肺癌を持つと疑われる（しかしそれまでに転移したことはわかっていない）ヒト癌患者が同定される。このことは当業者に既知の各種手段により達成される。

【0103】

本発明では、細胞、組織または体液中のL S Gレベルの存在を決定することは、特に転移をしていない肺癌と転移をしている肺癌とを区別するのに有用である。従来技術は、転移をしている肺癌と転移をしていない肺癌とを区別することが難しく、適切な治療選択はかかる知識に依存することが多い。

【0104】

本発明では、かかる細胞、組織または体液にて測定される癌マーカーレベルはL S Gであり、正常ヒト対照の好ましくは同一細胞、組織または体液型中のL S Gレベルと比較される。すなわち、観察される癌マーカーがまさに血清中のL S Gである場合、このレベルは好ましくは、正常ヒト対照の血清中のL S Gレベルと比較される。正常ヒト対照に対する患者におけるL S Gの増加は、転移を有する肺癌に関連する。

【0105】

本発明を限定するものではないが、典型的に、定量的診断アッセイにおいて試

験またはモニターされる患者における癌が転移していることを示す陽性結果は、LSGのような癌マーカーの細胞、組織または体液レベルが、正常患者の好ましくは同一細胞、組織または体液中よりも、少なくとも2倍高く、最も好ましくは少なくとも5倍高い。

#### 【0106】

本明細書中で用いる正常ヒト対照には、癌を持たないヒト患者および/または患者由来の非癌性試料が含まれ、転移を診断またはモニタリングする方法では、正常ヒト対照はまた、好ましくは、信頼性の高い方法により転移していない肺癌を有することが決定されているヒト患者由来の試料が含まれてもよい。

#### 【0107】

##### 病期分類

本発明はまた、ヒト患者における肺癌を病期分類する方法も提供する。この方法は、かかる癌を持つヒト患者を同定することと、かかるヒト患者由来の細胞、組織または体液をLSGについて分析することを含む。次に、患者において決定されたLSGレベルを、正常ヒト対照の好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGレベルと比較し、ここで、正常ヒト対照に対するヒト患者のLSGレベルの増加が進行している癌に関連し、LSGレベルの低下(それでも真の正常レベルよりは高い)が、後退または寛解している癌に関連する。

#### 【0108】

##### モニタリング

さらにかかる癌を持つヒト患者において、転移の発症に関して肺癌をモニタリングする方法を提供する。この方法は、転移がしていることがわかっていないような癌を持つヒト患者を同定することと、かかる患者由来の細胞、組織または体液を定期的にLSGレベルについて分析することと、ヒト患者において決定されたLSGレベルを、正常ヒト対照の好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGレベルと比較することを含み、ここで正常ヒト対照に対するヒト患者のLSGレベルの増加が、転移している癌に関連する。この方法では、正常ヒト対照試料にはまた以前の患者試料も含まれ得る。

#### 【0109】

さらに本発明は、かかる癌この方法は、かかる癌を有するヒト患者を同定することと、かかるヒト患者由来の細胞、組織または体液をLSGについて定期的に分析することと、ヒト患者において決定されたLSGレベルを、正常ヒト対照の好ましくは同一細胞、組織または体液型中のLSGレベルと比較することとを含み、ここで正常ヒト対照に対するヒト患者におけるLSGレベルの増加が、病気期において進行している癌に関連し、LSGレベルの減少が、後退または寛解している癌に関連する。この方法では、正常ヒト対照試料には、以前の患者試料も含まれる得る。

#### 【0110】

転移の発症に関し患者をモニタリングすることは、定期的であり、好ましくは4半期ごとに実施される。しかしながら、これは、癌、特定患者および癌の病期に依存して、より高頻度で、またはより低頻度で実施されてもよい。

#### 【0111】

##### 予後試験および臨床試験モニタリング

本明細書中に記載の方法はさらに、LSGレベル増加に関連した疾患または障害を発症する対象、またはその危険性を有する対象を同定するための予後アッセイとしても利用できる。本発明は、試験試料をヒト患者より得て、LSGを検出する方法を提供する。正常ヒト対照に比べ高レベルのLSGの存在は、癌、特に肺癌を発症する危険性があるヒト患者のための診断である。

#### 【0112】

本発明のLSGの発現または活性を低下させる治療薬の有効性は、臨床試験中における、またはヒト細胞におけるような*in vitro*スクリーニングアッセイにおける、ヒト患者のLSGの発現レベルを分析することによりモニタリングすることもできる。このようにして、遺伝子発現パターンは、ヒト患者、場合によっては細胞の、試験される薬剤に対する生理学的応答を示すマーカーとして利用できる。

#### 【0113】

##### 遺伝的障害および突然変異の検出

本発明の方法はまた、LSGにおける遺伝的障害、または突然変異の検出にも

使用することができ、これにより遺伝的障害を持つヒトが肺癌に対する危険性を有するか、または肺癌を有するかどうかを決定することができる。遺伝的障害は例えば、本発明のLSGからの1つまたはそれ以上のヌクレオチドの欠失、および/または付加および/または置換の存在、LSGの染色体再配列、LSGの異常修飾(例えばゲノムDNAのメチル化パターン)、LSGのmRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、LSGの対立遺伝子により検出することができる。本発明のLSGにおけるかかる障害を検出する方法は、当業者に既知である。

#### 【0114】

##### アッセイ技術

患者由来の試料における、本発明のLSGのような遺伝子の発現(タンパク質レベルを含む)レベルを決定するのに使用可能なアッセイ技術は、当業者に既知である。かかるアッセイ方法としては、ラジオイムノアッセイ、逆転写酵素PCR(RT-PCR)アッセイ、免疫組織化学アッセイ、インサイチュハイブリダイゼーションアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、ELISAアッセイおよびプロテオミクスアプローチ、二次元ゲル電気泳動法(2D電気泳動)およびマススペクトロメトリーまたはタンパク質相互作用プロファイリングのような非ゲルベースのアプローチが挙げられるが、これらに限定されない。これらの中でも、ELISAは生物学的液体中の遺伝子の発現タンパク質の診断に好まれることが多い。

#### 【0115】

ELISAアッセイはまず、市販源から容易に入手できない場合には、LSGに特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を調製することを含む。さらにLSGに特異的に結合するレポーター抗体が一般には調製される。レポーター抗体は、検出可能な試薬、例えば放射性、蛍光または酵素試薬(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素あるいはアルカリホスファターゼ)に結合される。

#### 【0116】

ELISAを実施するには、LSGに特異的な抗体を、抗体を結合する固体支持体、例えばポリスチレンディッシュ上でインキュベートする。次に、ディッシ

ユの上のフリーなタンパク質結合部位をウシ血清アルブミンのような非特異的タンパク質とインキュベートすることにより覆う。次に、分析する試料をこのディッシュにてインキュベートし、その間にLSGはポリスチレンディッシュに結合した特異抗体に結合する。未結合試料は緩衝液により洗い流される。LSGに対し特異的であり、かつ西洋ワサビペルオキシダーゼのような検出可能試薬に結合しているレポーター抗体をディッシュに載せ、その結果レポーター抗体はLSGに結合しているいずれのモノクローナル抗体に結合する。次に未結合のレポーター抗体が洗い流される。次に、比色基質を含むペルオキシダーゼ活性用試薬をディッシュに添加する。LSG抗体に結合した固定化ペルオキシダーゼが着色反応産物を生ずる。所定時間中に発色した色の量は、試料中に存在するLSGタンパク質の量に比例する。定量的な結果は典型的に、標準曲線を参照することで得られる。

#### 【0117】

競合アッセイもまた使用されるが、この場合LSGに特異的な抗体は、固体支持体に結合され、標識LSGおよび宿主由来の試料を固体支持体の上を通過させる。固体支持体に結合した検出される標識量は試料中のLSG量に相関する。

#### 【0118】

また、本発明のLSGの核酸配列の全て、または一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、核酸法を、肺癌に関するマーカーとしてのLSGのmRNAの検出に使用することもできる。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびその他の核酸法、例えばリガーゼ連鎖反応(LCR)および核酸配列ベースの増幅法(NASBA)は、各種悪性腫瘍の診断およびモニタリングについて悪性細胞を検出するのに使用できる。例えば、逆転写酵素PCR(RT-PCR)は、数千の他のmRNA種の複雑な混合物中において特異的なmRNA集団の存在を検出するのに使用可能な強力な技術である。RT-PCRでは、mRNA種はまず、酵素、逆転写酵素を用いて相補的DNA(cDNA)に逆転写され、次にcDNAは標準的PCR反応で増幅される。したがって、RT-PCRは増幅することにより、単一のmRNA種の存在を示すことができる。したがって、mRNAがそれを産生する細胞に非常に特異的である場合、RT-PCRを用いて、

特定型の細胞の存在を同定することができる。

#### 【0119】

固体支持体上に配列された(すなわちグリidding)クローンまたまオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションは、その遺伝子の発現の検出、およびその発現レベルの定量化の両方に使用できる。このアプローチでは、LSG遺伝子をコードするcDNAは、基板上に固定される。この基板はガラス、ニトロセルロース、ナイロンまたはプラスチックを含むが、これらに限定されない任意の適切な型であり得る。LSG遺伝子をコードするDNAの少なくとも一部がこの基板に結合され、次にRNAまたはRNAの相補的DNA(cDNA)コピーであり得る、当該組織から単離された分析体とインキュベーションされる。基板に結合したDNAと分析体との間のハイブリダイゼーションは、分析体の放射性標識または蛍光標識、またはハイブリッドを検出するために設計した二次分子を含むが、これらに限定されない複数の手段により検出および定量化することができる。遺伝子発現レベルの定量化は、分析体からのシグナル強度を既知の標準物質から決定されたシグナル強度と比較することで実施できる。標準物質は標的遺伝子の*in vitro*転写により得ることができ、その収量を定量化し、次にその物質を使って標準曲線を作成する。

#### 【0120】

プロテオミクスアプローチのうち、2D電気泳動法が当業者に既知の技術である。血清をどの試料からの個別のタンパク質の単離は、通常ポリアクリルアミドゲル上での異なる特性により、タンパク質を順次分離することで達成される。まずタンパク質は、電流を用い大きさで分離される。電流は全てのタンパク質に均一に作用し、その結果小型のタンパク質ほど大型のタンパク質に比べゲル上を遠くへ移動する。第二の次元は、第一の次元に対し垂直方向に電流を作用させ、タンパク質の大きさに基づいてではなく、各タンパク質の持つ特異的電荷により分離する。異なる配列を持つ2つのタンパク質は、大きさと電荷の両方に基づいて、同一であることはないので、2D分離の結果は、各タンパク質が特有のスポットを占有する方形のゲルである。このスポットの化学的または抗体プローブによる分析、あるいは続くタンパク質のマイクロシーケンシングにより、試料中の

所定のタンパク質の相対量を明らかにし、および該タンパク質を同定することができる。

#### 【0121】

上記試験は各種細胞、体液および/または組織抽出物(例えば患者より得たホモジネートまたは可溶化組織)由来の試料について実施できる。組織抽出物は、組織生検および剖検材料から常法により得られる。本発明に有用な体液には、血液、尿、唾液またはそれらの任意の他の体分泌物または派生物が含まれる。血液とは、全血、血漿、血清または血液の任意の派生物を含むことを意味している。

#### 【0122】

##### LSGのin vitroターゲティング/肺癌治療

このLSGの同定はまた、癌、特に肺癌のイメージングおよび治療のための新規治療物質の合理的設計において有用である。例えば、一側面では、LSGに特異的に結合する抗体を産生し、肺癌を患うことが疑われる患者にin vivoで使用することができる。LSGを特異的に結合する抗体は、診断および/または治療目的で肺癌が疑われる患者に注射することができる。したがって、本発明の別の側面は、ヒト患者に対し有効量の抗体を投与することにより、かかる治療を必要としている患者の肺癌の発症を防止し、治療するための方法に関する。「有効量」とは、腫瘍上に発現した標的抗原に結合し、外科的除去のための腫瘍の退縮または腫瘍の消失をもたらすのに必要な抗体量または濃度を意味する。過剰発現されたLSGへの抗体の結合は、かかるLSGを発現する癌細胞に死をもたらすと考えられる。in vivo診断および治療のための抗体の調製および使用は、当該技術分野で既知である。例えば、インジウム-111で標識された抗体-キレーターは、癌胎児抗原発現腫瘍のラジオイムノシンチグラフィイメージングでの使用について記載されている(Sumerdon et al., Nucl. Med. Biol. 1990 17:247-254)。特に、これらの抗体-キレーターは、再発性結腸直腸癌が疑われる患者における腫瘍検出に使用されている(Griffin et al., J. Clin. Onc. 1991 9:631-640)。磁気共鳴イメージングにおける使用のための標識として常磁性イオンを持つ抗体も記載されている(Lauffer, R. B. Magnetic Resonance in Medicine 1991 22: 339-342)。LSGに対する抗体は、同様に使用すること

ができる。LSGを特異的に結合する標識抗体は、患者の疾患状態の診断または病期分類を目的として、肺癌が疑われる患者に注射することができる。使用される標識は、使用すべきイメージング様式に応じ選択されるであろう。例えば、インジウム - 111、テクネチウム - 99mまたはヨウ素 - 131のような放射性標識体が平面スキャンまたは単光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) に使用できる。フッ素 - 19のような陽電子放射標識は、陽電子放射断層撮影法に使用できる。ガドリニウム (III) またはマンガン (II) のような常磁性イオンは、磁気共鳴イメージング (MRI) に使用できる。正常組織のイメージングと比べた標識の存在から、癌の広がりを決定することができる。器官または組織内の標識量からはまた、その器官または組織中の癌の有無を決定できる。

#### 【0123】

*in vivo*の方法で使用可能な抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびオムニクローナル抗体、ならびに分子生物学的技術により調製される抗体が含まれる。抗体断片およびアプトマー、ならびにSELEXと呼ばれる、当業者に既知のインビトロ進化プロトコルより得た一本鎖オリゴヌクレオチドも利用できる。

#### 【0124】

##### スクリーニングアッセイ

本発明はまた、LSGタンパク質に結合するか、またはLSGタンパク質の発現あるいは活性に対する調節効果を持つモジュレータを同定するための方法を提供する。LSGタンパク質の発現または活性を低下させるモジュレータは、肺癌の治療に有用であると考えられる。かかるスクリーニングアッセイは、当業者に既知であり、細胞ベースアッセイおよび無細胞アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0125】

コンピュータイメージングによりLSGの領域に特異的に結合することが推測される小分子もまた、肺癌のイメージングおよび治療での使用のために、設計、合成、および試験することができる。さらに、分子ライブラリーを、本発明で同定されたLSGに対する分子の結合能力について評価することにより、潜在的な

抗癌剤をスクリーニングすることができる。ライブラリーにてLSGに結合できるものとして同定された分子は、肺癌治療での使用を目的としたさらなる評価のための重要な候補体である。好ましい態様では、これら分子は、細胞中のLSG発現および/または活性をダウンレギュレーションするだろう。

#### 【0126】

##### 養子免疫治療およびワクチン

癌の養子免疫治療は、細胞が、定着した腫瘍の後退を直接または間接的に媒介することを目的として、抗腫瘍応答性を持つ免疫細胞を、腫瘍を持つ宿主に投与する治療的アプローチである。リンパ球、特にTリンパ球の輸血は、この治療分類に入るものであり、国立癌研究所(NCI)の研究者等は、末梢血リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、皮下リンパ節の生検材料由来のT細胞培養物の自己再注入を複数のヒト癌患者の治療に使用している(Rosenberg, S. A., 米国特許第4,690,914号、1987年9月1日発行; Rosenberg, S. A., et al., 1988, N. England J. Med. 319: 1676-1680)。

#### 【0127】

本発明は、抗原性LSG分子に対し感作されたマクロファージを用いた、熱ショックタンパク質(hsp)の非共役複合体ありまたはなしでの、原発性および転移性肺癌の防止および/または治療のための養子免疫治療の組成物および方法に関する。LSGの抗原性または免疫原性は、LSGタンパク質またはその断片の抗体を産生する能力、またはナイーブなエフェクター細胞を養う能力、換言すれば抗原(またはエピトープ)発現標的細胞を溶解する能力から容易に確認できる。

#### 【0128】

癌細胞は、定義によれば、異常であり、正常組織には存在しないので、免疫系により外来物質として認識されるべきタンパク質を含む。しかしながら、免疫系はしばしばこの異常に気づかず腫瘍の攻撃をしないようである。癌細胞により産生される外来性LSGは、それらの存在を示すのに使用できる。LSGは腫瘍抗原と呼ばれる短い断片に分解され、細胞表面に提示される。これらの腫瘍抗原はクラスIおよびクラスIIの2つの型が存在するMHCと呼ばれる分子により、

細胞表面に保持または提示される。MHCクラスI分子と会合する腫瘍抗原は、細胞障害性T細胞によって認識されるが、一方抗原-MHCクラスII複合体はヘルパー細胞と呼ばれる第2のT細胞サブセットにより認識される。これらの細胞はサイトカインを分泌し、これが腫瘍の増殖を遅らせるか、または停止させ、別の型の白血球、B細胞が腫瘍細胞に対する抗体を作るのを助ける。

#### 【0129】

養子免疫治療では、T細胞またはその他の抗原提示細胞(APC)は、腫瘍特異的LSG抗原を用いて、体外(ex vivo)で刺激される。次に、刺激された細胞は、患者に再注入され、そこでそれらは癌細胞を攻撃する。研究から、細胞障害性およびヘルパーT細胞の両方を使用すると、いずれか一方のサブセットのみを使用した場合に比べはるかに効果的であることが示されている。さらに、LSG抗原は、米国特許第5,985,270号に記載されるように、熱ショックタンパク質と複合体を形成し、APCを刺激し得る。

#### 【0130】

APCは、マクロファージ、樹状細胞、Bリンパ球およびそれらの組合せを含むが、これらに限定されない当該技術分野で既知の抗原提示細胞から選択でき、好ましくはマクロファージである。細胞がその個体に対して自己のものである好ましい使用では、養子移植のための免疫細胞のドナー選択の問題を回避するために、リンパ球、マクロファージ、またはその他のAPC等の自己免疫細胞が用いられる。

#### 【0131】

遺伝子治療を用いた養子免疫治療では、LSGのDNAを従来の遺伝子治療同様にしてエフェクター細胞内に導入することができる。これによりエフェクター細胞が抗原性タンパク質を産生するように操作されると、腫瘍細胞に対するこれら細胞の細胞障害性が高められ、結果として養子免疫治療が改善される。

#### 【0132】

本発明のLSG抗原はまた、肺癌ワクチン構成成分としても有用である。ワクチンは、免疫原的刺激量のLSG抗原を含む。免疫原的刺激量とは、肺癌の改善または治療を目的としてレシピエント内に所望の免疫応答を惹起することができ

る抗原量を表す。有効量は、当業者に既知の標準的方法により経験的に決定され得る。

#### 【0133】

L S G 抗原は、所望の型の免疫応答、例えば抗体および/または細胞媒介性の応答を誘発するために設計された多くのワクチン配合物のいずれか一つとして提供され得る。かかる配合物は、当該技術分野で既知であり、例えば米国特許第5,585,103号に記載されている配合物を含むが、これに限定されるものではない。免疫応答を刺激するのに使用される本発明のワクチン配合物はまた、薬学的に許容されるアジュバントも含むことができる。

#### 【0134】

##### ベクター、宿主細胞、発現

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝的に操作される宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生にも関する。

#### 【0135】

宿主細胞は、ポリヌクレオチドを組み込み、本発明のポリペプチドを発現するように遺伝的に操作することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、感染、形質導入、トランスフェクション、トランスベクション(transvection)および形質転換の周知技術を用いて、宿主細胞内に導入され得る。ポリヌクレオチドは、単独または他のポリヌクレオチドとともに導入されてもよい。かかる他のポリヌクレオチドは、単独で導入されてもよく、同時導入されてもよく、または本発明のポリヌクレオチドと結合して導入されてもよい。

#### 【0136】

したがって、例えば、本発明のポリヌクレオチドは、例えば哺乳動物における、同時トランスフェクションおよび選択に関する標準的技術を用いて、選択可能マーカーをコードする他の分離したポリヌクレオチドを用いて、宿主細胞内にトランスフェクトされてもよい。この場合、ポリヌクレオチドは一般に、宿主細胞ゲノム内に安定的に組み込まれるであろう。

#### 【0137】

あるいは、ポリヌクレオチドは、宿主内での増殖用の選択可能マーカを含むベクターに結合されてもよい。ベクター構築物は、上記技術により宿主細胞内に導入されてもよい。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿物のような沈殿物中に、または荷電脂質との複合体中にて、DNAとして導入される。エレクトロポレーションもまた宿主内へのポリヌクレオチド導入に利用され得る。ベクターがウイルスの場合には、それは*in vitro*でパッケージングされてもよく、またはパッケージング細胞内に導入され、パッケージングされたウイルスが細胞内に形質導入されてもよい。本発明のこの側面によるポリヌクレオチドの作製およびポリヌクレオチドの細胞内導入に適切な非常に多様な技術が、当業者に既知であり、日常的である。かかる技術は、上記Sambrook et al. に詳細に参照されているが、これはこれらの技術を詳述する多くの研究用マニュアルの例示である。発明のこの側面によれば、ベクターは、例えばプラスミドベクター、一本鎖または二本鎖ファージベクター、一本鎖または二本鎖RNAあるいはDNAウイルスベクターであり得る。かかるベクターは、細胞内へのDNAおよびRNA導入に関する既知の技術により、細胞内にポリヌクレオチドとして、好ましくはDNAとして導入され得る。ベクターは、ファージおよびウイルスベクターの場合、好ましくは、感染および形質導入に関する既知の技術によりパッケージされたウイルス、またはキャプシド形成されたウイルスとして細胞内に導入される。ウイルスベクターは、複製適格性または複製欠損性であり得る。後者の場合、ウイルスの増殖は一般に、補体宿主細胞内でのみ生ずる。

#### 【0138】

ある観点において、ベクターのうちで好ましいものは、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に適したものである。一般に、かかるベクターは、発現されるべきポリヌクレオチドに作動可能に連結された、宿主細胞での発現に効果的なシス作用性の制御領域を含む。適切なトランス作用性因子は、宿主により供給されるか、補完ベクター(complementing vector)により供給されるか、または宿主導入時にベクター自体により供給される。

#### 【0139】

この観点において、ある好ましい側面では、ベクターは特異的発現を提供する

。かかる特異的発現は、誘発性発現またはある型の細胞でのみの発現、もしくは誘発性および細胞特異的発現の両方であり得る。誘発性ベクターのうち特に好ましいのは、温度および栄養添加物といった操作が容易である環境因子により発現が誘発できるベクターである。原核生物および真核生物宿主での使用のための構成的および誘発的発現ベクターを含めた本発明のこの態様に適切な各種ベクターが既知であり、当業者により常法として使用されている。

#### 【0140】

操作された宿主細胞は、通常の栄養培地中で培養でき、培地はとりわけプロモーターを活性化すること、形質転換体を選択すること、または遺伝子を増幅することに関して適切ないように改良してもよい。発現のために選択された宿主細胞とともに従来使用される温度、pH等の培養条件は、当業者にとって明らかであるように、本発明のポリペプチドの発現に適切であろう。

#### 【0141】

本発明のポリペプチドの発現には非常に多様な発現ベクターが使用可能である。かかるベクターには、染色体、エピソームおよびウイルス由来ベクター、例えばバクテリアプラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソーム、酵母染色体要素、バキュロウイルス、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のようなウイルスに由来するベクター、およびそれらの組合せに由来するベクター、例えばプラスミドとコスミドおよびファージミドのようなバクテリオファージ遺伝的要素とに由来するベクターが含まれ、これらは全て本発明のこの態様による発現に使用され得る。一般に、宿主内でポリペプチドを発現させるためのポリヌクレオチドの維持、増殖、または発現に適切でないかなるベクターもこの観点での発現に使用してもよい。

#### 【0142】

適切なDNA配列は、各種既知の、かつ日常的な技術のいずれかによりベクター内に挿入される。一般に発現のためのDNA配列は、DNA配列および発現ベクターを1つまたはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで切断し、次にT4DNAリガーゼを使い制限断片を一つに結合させることで、発現ベクターに結合され

る。この目的に使用できる制限および結合の手法は当業者にとって既知かつ常法である。この観点に適切な手法、および別の方法を用い発現ベクターを構築する手法は、当業者にとって既知かつ常法であり、本明細書の他所に引用したSambrookらに詳細記載されている。

#### 【0143】

発現ベクター内のDNA配列は、例えばmRNA転写に対するプロモーターを含む適切な発現制御配列（複数可）に作動可能に連結されている。かかるプロモーターの代表として既知のものを幾つか列挙すると、ファージラムダPLプロモーター、大腸菌lac、trpおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーターが挙げられる。発明のこの側面での使用に適切である多くの記載外のプロモーターが既知であり、本発明での論議および実施例に例示される様式によって当業者により容易に使用され得ることが理解されるだろう。

#### 【0144】

一般に発現構築体物は転写の開始および終止に関する部位、および転写領域内には翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。構築物により発現される成熟転写体のコード部分は、開始部位に翻訳を開始するAUGを、および翻訳されるポリペプチドの末端に適切に位置する終止コドンを含む。

#### 【0145】

さらに構築物は発現を制御しかつ発現をもたらす制御領域を含んでもよい。一般には、多くの一般的に実施されている手法によれば、かかる領域は、とりわけリプレッサー結合部位やエンハンサーのように、転写を制御することで作動するであろう。

#### 【0146】

増殖および発現用のベクターは、一般には選択マーカを含むだろう。かかるマーカはまた増幅にも適切であり、あるいはベクターはこの目的のためのさらなるマーカを含んでもよい。この観点では、好ましくは発現ベクターは1つまたはそれ以上の選択マーカ遺伝子を含み、形質転換した宿主細胞の選択に関する表現型の特徴を提供する。好ましいマーカとしては、真核生物細胞培養につ

いてはジヒドロ葉酸還元酵素あるいはネオマイシン耐性を、大腸菌やその他の細菌の培養についてテトラサイクリンあるいはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。

#### 【0147】

本明細書の他所に記載のような適切なDNA配列、ならびに適切なプロモーター、およびその他の適切な制御配列を含むベクターは、その中での所望ポリペプチドの発現に適切である各種既知の技術を用い、適切な宿主内に導入される。適切な宿主の代表例としては、大腸菌、放線菌およびネズミチフス菌細胞のような細菌細胞、酵母細胞のような真菌細胞、ショウジョウバエS2およびハスモンヨトウ (*Spodoptera*) sf9細胞のような昆虫細胞、CHO、COSおよびボーズ黒色腫細胞などの動物細胞、ならびに植物細胞が挙げられる。非常に多様な発現構築物のための宿主がよく知られており、当業者は本開示により発明のこの側面によりポリペプチドを発現させるのに適した宿主を容易に選択することができるだろう。

#### 【0148】

より具体的には本発明はまた、発現構築物のような1つまたはそれ以上の上記配列を含む組換え構築物も包含する。構築物には、本発明のかかる配列が挿入されている、プラスミドまたはウイルスベクターのようなベクターが含まれる。配列は前向き、または逆向きに挿入され得る。この観点に関し、特定の好ましい態様では、構築物は、例えばプロモーターのような配列に作動可能に連結された制御配列をさらに含む。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者に知られており、本発明での使用に適切なベクターが多く市販されている。

#### 【0149】

以下市販のベクターを例示する。細菌での使用にとりわけ好ましいベクターは、Qiagenで市販されているpQE70、pQE60およびpQE-9、Stratageneより入手可能なPBSベクター、ファージスクリプト (Phagescript)ベクター、ブルースクリプト (Bluescript)ベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、およびPharmaciaより入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5である。とりわ

け好ましい真核細胞ベクターは、Stratageneより入手可能なPWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG、およびPharmaciaより入手可能なpSKV3、pBPV、pMSGおよびpSVLである。これらベクターは、本発明のこの側面での使用に関し、当業者が利用可能な多くの市販されている既知のベクターから例示することのみを目的とし掲載されている。例えば宿主内での、発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの形質導入、維持、増殖または発現に適切なその他のプラスミドまたはベクターは、本発明のこの側面に使用できることが理解されるであろう。

#### 【0150】

プロモーター領域は、プロモーター領域を欠くレポーター転写単位、例えばコロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(「cat」)転写ユニット、候補プロモーター断片、すなわちプロモーターを含み得る断片を導入するために、1または2以上の下流制限部位などを含むベクターを用いて、所望遺伝子より選択することができる。周知のように、cat遺伝子上流にある制限部位の、プロモーターを含む断片をベクターに導入すると、標準的なCATアッセイにより検出することができるCAT活性が発生する。この目的に適切なベクターは既知であり、容易に入手できる。かかる2種類のベクターはpKK232-8およびpCM7である。すなわち、本発明のポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターには、既知、かつ容易に入手可能なプロモーターだけでなく、レポーター遺伝子を使用した上記技術により容易に入手可能なプロモーターも含まれる。

#### 【0151】

とりわけ知られている、本発明によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に適切な細菌プロモーターは、大腸菌lacIとlacZおよびプロモーター、T3およびT7プロモーター、gptプロモーター、ラムダPR、PLプロモーター、およびtrpプロモーターである。本観点に適切な、とりわけ知られている真核生物プロモーターは、CMV最初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(「RSV」)のようなレトロウイルスのLTRプロモーター、およびマウスメタロチオネイン-Iプロモーターのようなメタロチオネインプロモーターであ

る。

【0152】

宿主細胞での発現に適切であるベクターおよびプロモーターを選択することは既知の手法であり、発現ベクター構築、宿主内へのベクターの導入および宿主での発現に必要な技術は、当該技術分野で日常の技術である。

【0153】

本発明はまた、上記構築物を含む宿主細胞にも関する。宿主細胞は哺乳動物細胞のような高等真核生物細胞、または酵母細胞のような下等真核生物細胞であるか、あるいは宿主細胞は細菌細胞のような原核細胞である。

【0154】

宿主細胞内への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介性トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染またはその他の方法により実行できる。かかる方法は、Davis et al., 分子生物の基礎的方法 (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY), (1986)のような標準的研究室マニュアルに記載されている。

【0155】

宿主細胞内の構築物は従来の様式で用いられ、組換え配列にコードされる遺伝子産物を産生できる。あるいは、発明のポリペプチドは従来のペプチド合成装置により合成的に作製ことができる。

【0156】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下において、哺乳動物細胞、酵母、細菌またはその他の細胞中で発現させることができる。無細胞翻訳系は、本発明のDNA構築物に由来するRNAを利用することで、かかるタンパク質の産生に利用することができる。原核生物および真核生物宿主とともに使用することに適したクローニングおよび発現ベクターは、Sambrook et al., 分子クローニング：研究室マニュアル (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL), 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されている。

## 【0157】

一般に、組換え発現ベクターは複製起点、下流の構造配列の転写を指示するための高発現遺伝子由来プロモーター、およびベクター暴露後にベクター含有細胞を単離できるようにする選択マーカを含むだろう。特に適切なプロモーターは、とりわけ3-ホスホグリセレートキナーゼ(「PGK」)のような糖分解酵素、 $\lambda$ -因子、酸性ホスファターゼ、および熱ショックタンパク質をコードする遺伝子に由来するプロモーターである。選択マーカとしては、大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子および*S.cerevisiae*の

## 【0158】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することで高められる。エンハンサーはDNAのシス作用性要素であり、通常約10~300bpであり、所定の宿主細胞型においてプロモーターの転写活性を高める。エンハンサーの例としては、pb100ないし270にある複製起点の後方に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後方にあるポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

## 【0159】

発明のポリペプチドの異種構造配列をコードする発明のポリヌクレオチドは、標準的技術を用いることで、発現のためのプロモーターと作動可能に連結されるようにベクター内に挿入されるだろう。ポリヌクレオチドは、転写開始部位がリボソーム結合部位に対しほぼ5'側に位置するように配置される。リボソーム結合部位は発現されるべきポリペプチドの翻訳を開始するAUGに対して5'側になる。一般に通常AUGである1つの開始コドンから開始し、リボソーム結合部位と開始AUGの間に存在するような他のオープンリーディングフレームは存在しない。また一般にポリペプチドの末端には翻訳停止コドンがあり、さらに転写領域の3'末端に適切に配置されたポリアデニル化シグナルおよび転写終止シグナルが存在するだろう。

## 【0160】

小胞体内腔内、細胞周辺腔、または細胞外環境に翻訳タンパク質を分泌するた

めには、発現ポリペプチド中に適切な分泌シグナルを組み込むことができる。シグナルはポリペプチドに対し同種でも、あるいは異種シグナルでもよい。

#### 【0161】

ポリペプチドは融合タンパク質のような修飾型として発現されてもよく、分泌シグナルだけでなくさらなる異種機能領域を含んでもよい。すなわち、例えば宿主細胞内、精製中、あるいはその後の取り扱いや保存中での安定性および持久性を改善するために、さらなるアミノ酸領域、特に荷電アミノ酸をポリペプチドのN末端に付加してもよい。さらに、精製を容易にするためにポリペプチドに領域を付加してもよい。かかる領域は、ポリペプチドの最終調製前に取り除かれるだろう。分泌または排出を起こさせるために、あるいは安定性を向上させ、とりわけ精製を容易にするために、ポリペプチドにペプチド部分を加えることは、当該分野に一般的であり、日常的な技術である。

#### 【0162】

発明によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの増殖、維持または発現に適切な原核動物宿主には、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) やネズミサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) が挙げられる。シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、放線菌 (*Streptomyces*) およびブドウ球菌 (*Staphylococcus*) の数種はこの観点における適切な宿主である。さらに、当業者に既知のその他の多くの宿主も、この観点において使用できるだろう。

#### 【0163】

例示の代表的であるが、非限定例としては、細菌での応用に有用な発現ベクターは、選択マーカーおよび既知のクローニングベクターである pBR322 の遺伝要素を含む市販プラスミド由来の細菌複製起点を含むことができる。かかる市販ベクターとしては、例えば pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) および GEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., USA) が挙げられる。これらの pBR322 「バックボーン」部分は適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と合わせられる。

#### 【0164】

適切な宿主株を形質転換し、宿主株を選択したプロモーターが誘発可能な適切

な細胞密度まで増殖させた後に、適切な手段でプロモーターを誘発し（例えば温度変化、または化学的誘発物質に曝す）、細胞はさらなる期間培養される。

【0165】

次に細胞は一般には、遠心分離により集められ、物理的または化学的手段により破壊され、そして得られた粗製抽出物はさらなる精製のために保持される。タンパク質の発現に用いた微生物細胞は凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む任意の従来の方法により破壊することができ、かかる方法は当業者に既知である。

【0166】

同様に、発現には様々な哺乳動物細胞培養系が使用できる。哺乳動物発現系の例としては、Gluzman et al., Cell 23: 175 (1981)に記載されている、サル腎臓線維芽細胞のCOS-7細胞系が含まれる。適合性ベクターを発現させることができるその他の細胞系には、例えばC127、3T3、CHO、HeLa、ヒト腎臓293およびBHK細胞系が挙げられる。

【0167】

哺乳動物発現ベクターは複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、さらに発現に必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終止配列、および5'フランキング非転写配列を含むだろう。この観点におけるある好ましい態様では、SV40スプライス部位に由来するDNA配列およびSV40ポリアデニル化部位がこれらの型の必須非転写遺伝要素として利用される。

【0168】

Lng103およびLng104ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む、既知の方法により組換え細胞培養物より回収および精製され得る。最も好ましくは、精製には高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が用いられる。単離または精製中にポリペプチドが変性させら

れた場合には、活性立体構造を再生するためにタンパク質のリフォールディングに関する既知の技術が利用されるてもよい。

#### 【0169】

本発明のポリペプチドには、天然精製産物、化学合成産物、および例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物を含む原核生物または真核生物宿主から組換え技術により生産された産物が含まれる。組換え体の産生手法に用いた宿主に応じて、本発明のポリペプチドはグリコシル化されていてもよく、あるいはグリコシル化されていなくてもよい。さらに、発明のポリペプチドはさらに幾つかの例では宿主媒介性プロセスの結果である初期修飾メチオニン残基を含んでもよい。

#### 【0170】

L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは本発明によれば、各種用途、特に L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 の化学的および生物学的に特性を利用する用途に使用され得る。さらなる用途は、細胞、組織および生物体の障害の診断および治療に関する。これらの発明の側面は、以下の論議によってさらに例示される。

#### 【0171】

##### ポリヌクレオチドアッセイ

本発明はまた、例えば診断薬として相補的ポリヌクレオチドを検出することを目的とした L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 ポリヌクレオチドの使用に関する。機能不全に関連した L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 の突然変異体の検出は、L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 の過少発現、過剰発現または発現の変化の結果生ずる疾患または疾患に対する感受性、例えば遺伝性肺癌に対する感受性の診断を追加または規定することができる診断ツールを提供するだろう。

#### 【0172】

ヒト L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 遺伝子に突然変異を持つ個体は、各種技術により DNA レベルで検出されるだろう。診断に適した核酸は、血液、尿、唾液、組織生検および剖検材料からのように、患者細胞から得られる。ゲノム DNA は検出に直接用いられるか、または分析前に PCR を使い酵素的に増幅される

。PCR (Saiki et al., Nature, 324: 163-166(1986))。RNAまたはcDNAもまた同様に使用される。例えばL ng 1 0 3およびL ng 1 0 4をコードする核酸に相補的なPCRプライマーは、L ng 1 0 3およびL ng 1 0 4発現および突然変異の同定および分析に使用できる。例えば欠失および挿入は、正常遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズ変化により検出できる。点突然変異は、増幅DNAを放射線標識したL ng 1 0 3およびL ng 1 0 4 RNAまたは放射線標識したL ng 1 0 3およびL ng 1 0 4 アンチセンスDNA配列にハイブリダイズすることで同定できる。完全一致配列は、RNase A消化または融解温度の差より、不一致型二本鎖と識別することができる。

#### 【0173】

参照遺伝子と変異を持った遺伝子との配列の差はまた、直接DNA配列分析からも示される。さらにクローニングしたDNA断片をプローブとして使用して、特定のDNA断片を検出してもよい。かかる方法の感度は、PCRまたはその他の増幅法を適切に利用することで大きく高めることができる。例えば、配列分析用プライマーは、変法PCRにより作成された二本鎖PCR産物または一本鎖鋳型分子とともに用いられる。配列決定は、放射線標識ヌクレオチドを用いた従来の方法、または蛍光タグを用いた自動配列決定方法によって実施される。

#### 【0174】

DNA配列の差に基づく遺伝子検査は、変性剤が存在する、または存在しないゲル中でのDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することで達成され得る。小配列の欠失および挿入は、高解像度ゲル電気泳動法により視覚化することができる。異なる配列のDNA断片は変性ホルムアミド勾配ゲル上で識別されるが、その場合、異なるDNA断片の移動度はそれらの特異的融解温度または部分融解温度に従ってゲル中の異なる点で遅くなる(例えば、Myers et al., Science, 230: 1242 (1985)参照)。

#### 【0175】

特異的位置における配列の変化はまた、RNaseおよびS1保護または化学的切断法(例えばCotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 4397-4401 (1985)参照)などのヌクレアーゼ保護アッセイによっても明らかとなり得る

。

#### 【0176】

したがって、特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNAase保護、化学的切断、直接DNA配列分析または制限酵素の使用（例えば制限酵素長多型（「RFLP」）およびゲノムDNAのサザンブロットングといった方法により達成できる。

#### 【0177】

従来型のゲル電気泳動法およびDNA配列分析法に加えて、突然変異は、インサイチュ分析によっても検出できる。

#### 【0178】

##### 染色体アッセイ

本発明の配列はさらに、染色体同定にも有用である。配列は個々のヒト染色体上の特定位置を特異的に標的化し、それとともにハイブリダイズすることができる。さらに染色体上の特定部位を同定することが現在求められている。実際の配列データに基づいた（反復多型）幾つかの染色体マーキング試薬が、現在染色体位置をマーキングするために利用できる。発明により染色体にDNAをマッピングすることは、これらの配列を疾患関連遺伝子と相関させる上での重要な第1段階である。

#### 【0179】

この観点に関するある好ましい態様では、本明細書中に開示されたcDNAはLng103およびLng104遺伝子のゲノムDNAをクローニングするのに用いられる。これは、各種既知の技術と、一般に市販されているライブラリーを用いて達成できる。このゲノムDNAは、その目的のための既知の技術を使用したインサイチュ染色体マッピングに用いられる。典型的には良好なインサイチュハイブリダイゼーションシグナルを与えるゲノムプローブを同定するには、染色体マッピングに関する日常的な手法に従って、幾つかの試行錯誤が必要であり得る。

#### 【0180】

幾つかの例では、さらに配列はPCRプライマー（好ましくは15～25bp

)をcDNAから調製することで、染色体にマッピングできる。遺伝子の3'非翻訳領域のコンピューター分析を使用することで、ゲノムDNA中の1つより多いエクソンに及ばないプライマーが迅速に選択されて、すなわち増幅工程を複雑にする。次にこれらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに用いられる。プライマーに対応したヒト遺伝子を含むハイブリッドだけが増幅断片を生ずる。

#### 【0181】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定DNAを特定の染色体に割りふる迅速な手法である。同一オリゴヌクレオチドプライマーとともに本発明を使用すれば、特異的染色体またはより大型ゲノムクローンのプールに由来する断片のパネルを使用し、同様にしてサブローカリゼーションを行うことができる。その染色体へのマッピングに同様に使用できるその他のマッピング戦略としては、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フロー選別染色体によるプレスクリーニング、および染色体特異的cDNAライブラリーの構築のためのハイブリダイゼーションによる前選別が挙げられる。

#### 【0182】

展開した中期染色体へのcDNAクローンの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(「FISH」)は、1段階で正確な染色体位置決めを提供するために使用され得る。本技術は50または60といった短いcDNAとともに用いられる。本技術のレビューについては、Verma et al., ヒト染色体:基本技術マニュアル(HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES), Pergamon Press, New York (1988)を参照されたい。

#### 【0183】

いったん配列を染色体位置に正確にマッピングできれば、染色体における配列の物理的位置と遺伝地図データとを関連付けることができる。かかるデータは、例えばジョンホプキンス(Johns Hopkins)大学、ウエルチ(Welch)医学図書館よりオンラインで入手可能なV.McKusick、ヒトのメンデル遺伝(MENDELIAN INHERITANCE IN MAN)に見いだされる。次に、連鎖分析(物理的に近接する遺伝子の随伴遺伝)により、遺伝子と同一の染色体領域にマッピングされた疾患との間の

関連性が同定される。

【0184】

次に、病気に罹った個体と罹っていない個体との間のcDNAまたはゲノム配列の差を決定する必要がある。もし変異が病気にかかった個体の一部または全部に観察され、正常個体には観察されない場合、その変異はおそらく病気の原因物質である可能性がある。

【0185】

現時点の物理的マッピング技術および遺伝子マッピング技術の解像度では、疾患関連染色体領域に正確に位置決定されるcDNAは、50ないし500の潜在的原因遺伝子のうちの1個であろう。(これは1メガ塩基マッピングの解像度であり20kb当たり1つの遺伝子と仮定)。

【0186】

ポリペプチドアッセイ

本発明はさらに、正常および異常レベルの決定を含む、細胞および組織、および例えば血液や尿といった生物学的液体中の $Lng 10^3$ および $Lng 10^4$ タンパク質のレベルを検出する定量および診断アッセイのような診断アッセイに関する。したがって、例えば正常組織試料と比較した $Lng 10^3$ および $Lng 10^4$ タンパク質の過剰発現または過少発現に関する発明による診断アッセイは、例えば新生物の存在を検出するのに用いられる。宿主由来試料中の、本発明の $Lng 10^3$ および $Lng 10^4$ タンパク質のようなタンパク質のレベルの決定に使用できるアッセイ技術は、当業者に既知である。かかるアッセイ法としては、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイが挙げられる。とりわけELISAが好ましい場合が多い。ELISAアッセイはまず、 $Lng 10^3$ または $Lng 10^4$ に特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を調製することを含む。さらに一般的には、そのモノクローナル抗体に結合するレポーター抗体が調製される。レポーター抗体には放射性、蛍光または酵素物質、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素のような検出可能試薬が結合される。

【0187】

E L I S Aを実施するには、宿主から試料が取り出され、例えばポリスチレンディッシュのような固体支持体とインキュベートされ、支持体は試料中のタンパク質と結合する。次に、ディッシュ上のフリーなタンパク質結合部位は、ウシ血清アルブミンのような非特異的タンパク質とインキュベートされることにより覆われる。次に、モノクローナル抗体をディッシュにてインキュベートし、この間にモノクローナル抗体はポリスチレンディッシュに結合したL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4タンパク質に結合する。未結合モノクローナル抗体は緩衝液により洗い流される。西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したレポーター抗体をディッシュに載せ、L n g 1 0 3またはL n g 1 0 4に結合したモノクローナル抗体へのレポーター抗体の結合が起こる。次に、未結合レポーター抗体が洗い流される。次に、着色反応基質を含むペルオキシダーゼ活性に関する試薬がディッシュに添加される。一次および二次抗体を介してL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4に結合した固定化ペルオキシダーゼが着色反応産物を生ずる。一定時間内に発色した色の量が、試料中に存在するL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4の量を示す。定量結果は、一般には標準曲線を参照することで得られる。

#### 【0188】

固体支持体に結合したL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4に特異的な抗体および標識されたL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4、ならびに宿主由来の試料が固体支持体上を通過させられ、固体支持体に結合し検出される標識量が、試料中のL n g 1 0 3またはL n g 1 0 4の量に相関し得る、競合アッセイが実施される。

#### 【0189】

##### 抗体

ポリペプチド、それらの断片またはその他の誘導體、もしくはその類縁似体、あるいはそれらを発現する細胞は、それらに対する抗体を生ずるための免疫原として使用できる。これらの抗体は、例えばポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得る。本発明はまたキメラ、単鎖およびヒト化抗体ならびにF a b断片、またはF a b発現ライブラリーの産物も含む。かかる抗体および断片の産生のための当該技術分野で既知の様々な手法が使用できる。

#### 【0190】

本発明の配列に対応するポリペプチドに対し作製された抗体は、ポリペプチドを動物に直接注射するか、ポリペプチドを動物、好ましくはヒト以外の動物に投与することで得られる。次に、こうして得た抗体は、ポリペプチド自体に結合するだろう。このようにすれば、ポリペプチドの断片のみをコードする配列でも、これを用いて全未変性ポリペプチドに結合する抗体を生成することができる。次にかかる抗体を用いてそのポリペプチドを発現している組織から、ポリペプチドを単離できる。

#### 【0191】

モノクローナル抗体の調製では、連続細胞系培養により産生された抗体を提供する技術が使用できる。例としては、ハイブリドーマ技術 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975))、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., Immunology Today 4: 72(1983))およびヒトモノクローナル抗体を産生するEBV-ハイブリドーマ技術 (Cole et al., モノクローナル抗体と癌治療 (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY), Alan R. Liss, Inc. pg.77-96 (1985))が挙げられる。

#### 【0192】

単鎖抗体の生成に関し記載された技術 (米国特許第4,946,778号)は本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対する単鎖抗体精製に採用することができる。さらにトランスジェニックマウス、またはその他の哺乳動物のような他の生物もまた、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対するヒト化抗体の発現に使用され得る。

#### 【0193】

上記抗体は、アフィニティークロマトグラフィーによる単離および/または精製のために、固体支持体に抗体を結合させることで、発明のポリペプチドを発現しているクローンを単離または同定すること、またはポリペプチドを精製することに使用され得る。

#### 【0194】

したがって、とりわけ本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、炎症、喘息、鼻炎、嚢胞性線維症、気道疾患の予防および/または治療、新生物、ア

トピーの予防および/または治療、ホスホリパーゼA、sub.2.の阻害、ポリ塩化ビフェニルを結合すること、外来性タンパク質の抗原性を低下させること、単球および好中球走化性および貪食反応の阻害、血小板凝集の阻害、ヒト子宮中のエイコサノイドレベルの制御、子宮内膜細胞細胞の増殖の制御に利用され得る。

#### 【0195】

##### Lng103およびLng104結合分子およびアッセイ

本発明はまた、受容体分子のようなLng103およびLng104を結合する分子の同定に関する方法も提供する。受容体タンパク質のようなLng103およびLn104を結合するタンパク質をコードする遺伝子は、リガンドパニング法(Ligand panning)およびFACSソーティングのような当業者に既知の様々な方法によって同定できる。かかる方法は、例えばColigan et al., Current Protocols in Immunology 1(2); 5章(1991)のような多くの研究用マニュアルに記載されている。

#### 【0196】

例えば、発現クローニングはこの目的に利用できる。そのためには、Lng103およびLng104に反応する細胞からポリアデニル化RNAを調製し、このRNAからcDNAライブラリーを作成し、このライブラリーをプールに分け、このプールをLng103およびLng104に反応しない細胞に個別にトランスフェクトする。次にトランスフェクトした細胞を標識Lng103およびLng104に曝す(Lng103およびLng104は、放射性ヨウ素化法、または部位特異的プロテインキナーゼに対する認識部位を含めること等の標準的方法を含めた各種既知の技術により標識できる)。暴露後、細胞は固定され、サイトスタチンの結合が決定される。これら方法はガラススライド上で好都合に実行される。

#### 【0197】

Lng103およびLng104結合細胞を生じたcDNAのプールが同定される。これらの陽性体からサブプールが調製され、上記と同様に宿主細胞内にトランスフェクトされ、スクリーニングされる。サブプールプロセスとスクリーニ

ングプロセスを繰り返すことで、例えば受容体分子のような結合分子候補をコードする1つまたはそれ以上の単一クローンを単離することができる。

【0198】

あるいは標識リガンドは、例えば受容体分子のような結合分子を発現する細胞から調製された、例えば膜あるいは膜抽出物のような細胞抽出物にフォトアフィニティー結合することができる。架橋した物質はポリアクリルアミドゲル電気泳動(「PAGE」)により分析され、X線フィルムに感光させられる。リガンド-受容体を含む標識複合体は切り出され、ペプチド断片に解像され、タンパク質マイクロシーケンシングにかけることができる。マイクロシーケンシングより得たアミノ酸配列を使用することで、候補受容体分子をコードする遺伝子を同定するためのcDNAライブラリースクリーニングのための固有または縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計することができる。

【0199】

発明のポリペプチドはまた、受容体分子のようなLgn103およびLgn104結合分子の、細胞内または無細胞調製物中でのLgn103およびLgn104結合能の評価に使用できる。

【0200】

アゴニストおよびアンタゴニスト-アッセイおよび分子

本発明はまた、例えば受容体分子などのLgn103およびLgn104-結合分子との相互作用といった、細胞上におけるLgn103およびLgn104の作用を高める、または阻止するような化合物をスクリーニングする方法も提供する。アゴニストはLgn103およびLgn104の天然の生物学的機能を増加させるか、またはLgn103およびLgn104に似た様式で機能する化合物であり、一方アンタゴニストはかかる機能を低下または排除するものである。

【0201】

例えば、膜または膜調製物のようなそれらの調製物といった細胞コンパートメントは、Lgn103およびLgn104により調節されるシグナル伝達または制御経路の分子のような、Lgn103およびLgn104を結合する分子を発現している細胞から調製され得る。この標本はLgn103およびLgn10

4 アゴニストまたはアンタゴニストであり得る候補分子非存在下または存在下にて標識 L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 とインキュベートされる。候補分子の結合分子を結合する能力は、標識リガンドの結合低下になって現れる。自由に結合する分子、すなわち L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 結合分子の結合に対する H E S F I、I I および I I I の影響を誘発しない分子が最も良好なアンタゴニストであろう。

#### 【0202】

十分に結合し、L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 と同一または密接に関係した効果を惹起する分子はアゴニストである。潜在的アゴニストよびアンタゴニストの L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 類似の効果は、例えば候補分子を細胞または適切な細胞調製物と相互作用させた後に、第2メッセンジャー系の活性を決定すること、およびその効果を L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 の効果、あるいは L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 と同一の効果を惹起する分子の効果と比較することで測定される。この観点に関して有用であり得る第2メッセンジャー系としては、AMPグアニレートシクラーゼ、イオンチャネル、またはホスホイノシチド加水分解第2メッセンジャー系が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0203】

L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 アンタゴニストに関するアッセイの別の例は、競合阻害アッセイに適切な条件の下にて L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 ならびに潜在的アンタゴニストを、膜結合 L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 受容体分子または組換え L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 受容体分子とを組み合わせる競合アッセイである。L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 は、受容体分子に結合した L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 分子の数を正確に決定し、潜在的アンタゴニストの有効性を評価できるように、例えば放射能で標識することができる。

#### 【0204】

潜在的アンタゴニストには本発明のポリペプチドに結合し、それによりその活性を阻害または無力化する小有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。潜在的アンタゴニストはまた、L n g 1 0 3 および L n g 1 0 4 誘発活性を誘発することなく受容体分子などの小有機分子、ペプチド、結合分子上の同

一部位に結合し、それによりL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4を結合から排除することによりL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の作用を阻害する、密接に関連するタンパク質または抗体などのポリペプチドであってもよい。

潜在的アンタゴニストは、ポリペプチドの結合部位に結合し、これを占有することで受容体分子などの細胞結合分子への結合を阻害し、その結果正常な生物学的活性が阻害される小分子を含む。小分子の例としては、小有機分子、ペプチドまたはペプチド様分子が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0205】

その他の潜在的アンタゴニストとしてはアンチセンス分子が挙げられる。アンチセンス技術は、アンチセンスDNAまたはRNAを通じ、あるいは三重螺旋形成を通じて遺伝子発現を制御するのに使用できる。アンチセンス技術は、例えばOkano, J. Neurochem, 56: 560 (1991); 遺伝子発現のアンチセンス阻害剤としてのオリゴヌクレオチド (OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)の中で論じられている。三重螺旋形成は、例えばLee et al., Nucleic Acids Research 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988)、およびDervan et al., Science 251: 1360 (1991)の中で論じられている。上記方法はポリヌクレオチドの相補的DNAまたはRNAへの結合に基づく。例えば本発明の成熟型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'コード部分は、約10ないし40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用され得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写物に含まれる遺伝子の領域に相補的に設計されており、それによりL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の転写ならびに生成を妨げる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、*in vivo*にてmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子のL n g 1 0 3およびL n g 1 0 4ポリペプチドへの翻訳を阻止する。また上記オリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNAまたはDNAが*in vivo*で発現され、L n g 1 0 3およびL n g 1 0 4の産生を阻害するように細胞内に送達することもできる。

#### 【0206】

アンタゴニストは薬学的に許容可能なキャリア、例えば以下に記載のキャリア

一とともに組成物中で使用されてもよい。アンタゴニストは、例えば喘息に対する遺伝的感受性の治療に使用されてもよい。

#### 【0207】

##### 組成物

本発明はまた、上記ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物に関する。したがって、本発明のポリペプチドは細胞、組織または生体への使用に適した非無菌的または無菌的あるいはキャリアー群、例えば対象体への投与に適切な薬学的キャリアと併用されてもよい。かかる組成物は、例えば媒体添加物または治療上有効量の本発明のポリペプチドおよび薬学的に許容可能なキャリアまたは賦形剤を含む。かかるキャリアとしては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。配合物は投与様式に適していなければならない。

#### 【0208】

##### キット

本発明はさらに、発明の上記組成物の1または2以上の成分が充填された1つまたはそれ以上の容器を含む、薬学的パックおよびキットに関する。1または2以上のかかる容器には、医薬品または生物製品の製造、使用または販売を管轄する政府機関が定めた形式で書かれた、ヒトへの投与に関する製品の製造、使用または販売を管轄する機関により承認されたことを示す通知を添付することができる。

#### 【0209】

##### 投与

本発明のポリペプチドおよびその他の化合物は単独または、治療化合物のなどのその他の化合物とともに使用される。

#### 【0210】

薬学的組成物は、例えばとりわけ局所、経口、肛門、腔、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻内または皮内経路による投与を含む効果的かつ便宜的な方法で投与され得る。

## 【0211】

薬学的組成物は一般に、特定の適用または適用群の治療あるいは予防に有効な量で投与される。一般には、組成物は少なくとも約10  $\mu$ g / 体重kgの量で投与される。多くの場合では、それらは約8  $\mu$ g / 体重kg / 日を越えない量で投与されるだろう。好ましくは、多くの場合、用量は、1日当たり約10  $\mu$ g / kgないし約2  $\mu$ g / 体重kgの範囲である。最適投与量は、適応、その重症度、投与経路、合併症状等を考慮しながら、各治療の様式および適応に関する標準的方法により決定されるだろう。

## 【0212】

遺伝子治療

Lng103およびLng104ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペプチドであり得るアゴニストおよびアンタゴニストは、しばしば「遺伝子治療」と称される治療様式において、かかるポリペプチドを*in vivo*で発現させることにより、本発明により使用されてもよい。

## 【0213】

したがって、例えば、患者由来の細胞は、*ex vivo*でポリペプチドをコードするDNAまたはRNAのようなポリヌクレオチドにより操作されてもよく、次に操作された細胞は、ポリペプチドによる治療されるべき患者に与えられ得る。例えば、細胞は本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターを用いて、*ex vivo*で操作することができる。かかる方法は、当該技術分野で既知であり、本発明でのそれらの使用は本発明中の教示より明らかになるだろう。

## 【0214】

同様に細胞は、当分野既知の方法により*in vivo*でのポリペプチド発現のため*in vivo*で操作され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、上記の複製欠失レトロウイルスベクターでの発現のための操作され得る。次にレトロウイルス発現構築物が単離され、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入されたパッケージング細胞内に、そのパッケージング細胞が次に所望遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生す

るように導入され得る。これらの産生細胞は、*in vivo*で細胞を操作し、*in vivo*にてポリペプチドを発現させることを目的として、患者に投与され得る。これらおよびその他の本発明のポリペプチドを投与するための方法は、本発明の教示より当業者に明らかになるはずである。

#### 【0215】

本明細書中で上述したレトロウイルスプラスミドベクターが得られるレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルスのようなレトロウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、鳥類白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および哺乳動物腫瘍ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、レトロウイルスプラスミドベクターはモロニー Maus 白血病ウイルスより得られる。

#### 【0216】

かかるベクターは、ポリペプチドを発現させるためのプロモーターを1つまたはそれ以上含むだろう。使用され得る適切なプロモーターとしては、レトロウイルスLTR、SV40プロモーター、およびMiller et al., Biotechniques 7: 980-990 (1989)記載のヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、またはその他のプロモーター(例えばヒストン、RNAポリメラーゼIIIおよびアクチンプロモーターを含むがこれらに限定されない真核生物細胞性プロモーターなどの細胞性プロモーター)が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るその他のウイルスプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーター、およびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。適切なプロモーターの選択は、本明細書中に含入される教示より当業者に明らかになるだろう。

#### 【0217】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、適切なプロモーターの制御下に置かれるだろう。用いられ得る適切なプロモーターとしては、アデノウイルス主要後期プロモーターなどのアデノウイルスプロモーター、またはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターなどの異種プロモーター、呼吸器合包体ウイル

ス(RSV)プロモーター、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーターなどの誘導性プロモーター、熱ショックプロモーター、アルブミンプロモーター、ApoAⅠプロモーター、ヒトグロビンプロモーター、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーターなどのウイルスチミジンキナーゼプロモーター、レトロウイルスLTR(本明細書にて上述した修飾レトロウイルスLTRも含む)、アクチンプロモーター、およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。プロモーターは、ポリペプチドをコードする遺伝子を制御する未変性プロモーターでもよい。

#### 【0218】

レトロウイルスプラスミドベクターは、生産細胞系を形成するパッケージング細胞系の誘導に使用される。感染に用いられ得るパッケージング細胞の例としては、PE501、PA317、Y-2、Y-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、YCRE、YCRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびMiller, A., Human Gene Therapy 1: 5-14 (1990)記載のDNA細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、当該技術分野に既知の方法によりパッケージング細胞内に導入される。かかる方法としては、エレクトポレーション、リポソームの利用、およびCaPO<sub>4</sub>沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。あるいはレトロウイルスプラスミドベクターはリポソーム内にカプセル封入されるか、または脂質に結合された後に宿主に投与されてもよい。

#### 【0219】

産生細胞系は、ポリペプチドをコードする核酸配列を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生するだろう。次にかかるレトロウイルスベクター粒子を利用して、真核生物細胞を*in vitro*または*in vivo*にて形質導入され得る。形質導入された真核生物細胞は、ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するだろう。形質導入される真核生物細胞としては、胚幹細胞、胚性腫瘍細胞、ならびに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋原細胞、ケラチノ細胞、内皮細胞、および気管支上皮細胞が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0220】

## 〔実施例〕

本発明は以下の実施例によりさらに詳細に説明される。本実施例は具体的な態様を参照することで発明を例示するためにのみ提供される。これら例示は発明のある特定の側面を記述するものの、開示された発明の範囲を限定あるいは制限するものではない。本明細書中で使用される特定の用語は、上記用語解説の項にて説明されている。

## 【0221】

全ての実施例は、特に詳細記載された場合を除き、当業者にとって既知、かつ日常的である標準的な技術を用いて実施された。以下の実施例の日常的な分子生物学的技術は、例えばここでは「Sambrook」として参照されるSambrook et al., 分子クローニング；ラボラトリーマニュアル(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL), 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されるように実施された。

## 【0222】

特に指定のない限り、以下の実施例中に記載の全ての部および量は重量によるものである。

## 【0223】

特に記載のない限り、以下の実施例中の断片のサイズ分離は、Sambrookおよび、例えばGoeddel et al., Nucleic Acids Res. 8: 4057 (1980)等の数多いその他の参考資料のアガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動(「PAGE」)の標準的技術を用いて実行された。

## 【0224】

特に記載ない限り、連結は、標準的緩衝液、インキュベーション温度および時間、ほぼ当モル量の連結されるべきDNA断片、および0.5 μgのDNA当たり10ユニットのT4 DNAリガーゼ(「リガーゼ」)を用いて行われた。

## 【0225】

実施例1：遺伝子発現の相対的定量化

蛍光性タックマン(Taqman)プローブを用いたリアルタイム定量的PCRは、Taq DNAポリメラーゼの5' - 3'ヌクレアーゼ活性を利用する定量検出

システムである。この方法は、5'をレポーター色素で、下流の3'をクエンチャー色素で標識した内部蛍光オリゴヌクレオチドプローブ(タックマン)を用いる。PCRの間にTaq DNAポリメラーゼの5'-3'ヌクレアーゼ活性がレポーターを放出し、次にその蛍光がモデル7700シーケンス検出システム(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)のレーザー検出器により検出することができる。

#### 【0226】

内因性対照の増幅を使用し、反応に添加された試料RNAの量が標準化され、逆転写酵素(RT)の効率が正規化される。シクロフィリン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、ATPase、または18SリボソームRNA(rRNA)のいずれかが内部対照として用いられる。研究される全試料間の相対定量化を計算するために、1つのサンプル試料のための標的RNAレベルを結果比較のためのベース(キャリブレーター)として用いた。「キャリブレーター」に対する定量化は、標準曲線法または比較法(User Bulletin #2: ABI PRISM 7700シーケンス検出システム)を用いて得ることができる。

#### 【0227】

標的遺伝子の組織分布およびレベルを、正常組織および癌組織の全ての試料について評価した。全RNAは、正常組織、癌組織、および癌とそれに対応する対応隣接組織から抽出された。続いて逆転写酵素を用いて第1鎖cDNAが調製され、各標的遺伝子に特異的なプライマーとタックマンプローブとを用いてポリメラーゼ連鎖反応が行われた。結果は、ABI PRISM 7700シーケンス検出装置を用いて分析された。無名数は、キャリブレーター組織と比較した場合の特定組織中にある標的遺伝子の相対発現レベルである。

#### 【0228】

クローンID2798946; 遺伝子ID26723(Lng103)の発現:

LSG Lng103に関して、リアルタイム定量的PCRは次のプライマーを用い、実行された:

前向きプライマー：

5' GGCGTTGTGGTCCTTCAG3' (配列番号7)

逆向きプライマー：

5' ACTTGCTGCCCTCTGACAC3' (配列番号8)

【0229】

表1に記載の無名数は12の正常組織における、Lng103と称するLSGの相対発現レベルである。値は全て、正常胸腺(キャリブレーター)と比較されている。これらRNA試料は、種々の個体由来の特定組織の試料をプールすることにより得られた市販のプールである。

【0230】

【表1】

表1：プール試料におけるLSG Lng103発現の相対レベル

組織	正常
脳	0
心臓	0
腎臓	0
肝臓	11
肺	10587
乳腺	19
筋肉	3
前立腺	56
小腸	0
精巣	61
胸腺	1
子宮	29

【0231】

表1の発現の相対レベルは、Lng103 mRNAの発現が、その他全ての分析された正常組織に比べて、肺(10587)で非常に高いことを示している。肺組織でのLng103 mRNAの発現は精巣組織でのそれに比べ約175倍である。これらの結果は、Lng103 mRNAの発現が肺に対して特異性が高いことを示している。

【0232】

表1の無名数は、種々の個体由来の特定組織試料のプールを分析して得たものである。それらは、表2の単一個体の組織試料より得たRNAに由来する無名数

とは比較できない。

【0233】

表2に記載の無名数は、63対の対応試料および、1つの癌性子宮組織および1つの正常/正常隣接子宮組織中のLng103の発現の相対レベルである。全ての値が正常胸腺（キャリブレーター）と比較されている。対応ペアは、特定組織に関する癌試料に由来するmRNA、および同一個体由来の同一組織に関する正常隣接試料に由来するmRNAにより形成される。

【0234】

【表2】

表 2： 個々の試料におけるLSG Lng103発現の相対レベル

試料ID	癌の型	組織	癌	対応する正常隣接
LngAC82	腺癌	肺 1	49	198
Lng60XL	腺癌	肺 2	1032	8473
LngAC66	腺癌	肺 3	1	157
LngAC69	腺癌	肺 4	197	395
LngAC88	腺癌	肺 5	440	1050
LngAC11	腺癌	肺 6	50	628
LngAC39	腺癌	肺 7	132	12
LngAC32	腺癌	肺 8	144	188
LngAC90	腺癌	肺 9	194	249
LngAC94	腺癌	肺 10	74	2
LngBA641	細気管支肺胞癌	肺 11	235	65
LngSQ45	扁平上皮癌	肺 12	2531	251
LngSQ14	扁平上皮癌	肺 13	4	560
LngSQ9X	扁平上皮癌	肺 14	214	9
LngSQ80	扁平上皮癌	肺 15	204	7
LngSQ32	扁平上皮癌	肺 16	56	99
LngSQ16	扁平上皮癌	肺 17	20	99
LngSQ79	扁平上皮癌	肺 18	451	391
LngC20X	扁平上皮癌	肺 19	548	2463
Lng47XQ	扁平上皮癌	肺 20	15	357

【 0 2 3 5 】

【表 3】

LngSQ44	扁平上皮癌	肺 21	196	0
LngBR94	扁平上皮癌	肺 22	33	12
Lng90X	扁平上皮癌	肺 23	6	308
LngLC80	大細胞癌	肺 24	25	215
LngLC71	大細胞癌	肺 25	895	299
LngLC109	大細胞癌	肺 26	5	118
LngMT67	腎細胞癌からの転移	肺 27	1	6
LngMT71	黒色腫からの転移	肺 28	0	206
Bld32XK		膀胱 1	0	0
Bld66X		膀胱 2	0	0
CvxKS52		子宮頸管 1	0	0
CvxNK23		子宮頸管 2	54	0
ClnAS45		結腸 1	0	0
ClnRC24		結腸 2	0	0
Endo28XA		子宮内膜 1	3	0
Endo68X		子宮内膜 2	1	2
Endo10479		子宮内膜 3	2	0
Kid106XD		腎臓 1	0	0
Kid109XD		腎臓 2	0	0
Liv94XA		肝臓 1	0	0
Liv15XA		肝臓 2	0	0
Mam162X		乳腺 1	9	1

【0236】

【表4】

Mam19DN		乳腺 2	14	1
MamA06X		乳腺 3	1	0
Ovr108B		卵巣 1	0	-
Ovr103X		卵巣 2	0	0
Ovr18GA		卵巣 3	-	0
Pan71XL		膵臓 1	0	0
Pan92X		膵臓 2	122	0
Pro90XB		前立腺 1	31	4
Pro101XB		前立腺 2	2	1
Skn248S		皮膚 1	0	0
SmIntH89		小腸 1	0	0
StoAC44		胃 1	459	15
StoAC93		胃 2	459	86
Sto115S		胃 3	0	381
Sto531S		胃 4	0	2
Sto261S		胃 5	173	35
Tst39X		精巣 1	29	0
Tst647T		精巣 2	31	0
Tst663T		精巣 3	1	0
Thr145T		甲状腺 1	1	0
Thy143N		胸腺 1	0	0
Utr135XO		子宮 1	0	0
Utr141XO		子宮 2	1	1

0 = 陰性

### 【0237】

対応試料の分析では、発現レベルは肺でより高く、肺組織に対して高い組織特異性を示した。これらの結果は、正常プール試料で得た組織特異性に関する結果（表1）を確認するものである。

### 【0238】

さらに同一個体の癌試料および同質遺伝的な正常隣接組織におけるmRNA発現のレベルを比較した。この比較は、癌の病期に関する特異性の指標（例えば正

常隣接試料に比べ癌試料でmRNAの発現レベルが高い)を与える。表2は、10個の肺癌組織(肺試料#7、10、11、12、14、15、18、21、22および25)が、それぞれの正常隣接組織に比べLng103を過剰発現していることを示している。したがって、試験された肺の対応試料の36%(合計28個の肺対応試料)について、癌組織における過剰発現が認められた。

【0239】

表3に記載の無名数は、肺扁平上皮癌の12対の対応試料におけるLng103の相対発現レベルを示している。

【0240】

【表5】

表 3 : 対応試料対におけるLSG Lng103 発現の相対レベル

試料ID	癌の型	組織	癌	対応する 正常隣接
0 LngSQ45	扁平上皮癌	肺 1	2531	251
LngSQ14	扁平上皮癌	肺 2	4	560
LngSQ9X	扁平上皮癌	肺 3	214	9
LngSQ80	扁平上皮癌	肺 4	204	7
LngSQ32	扁平上皮癌	肺 5	56	99
5 LngSQ16	扁平上皮癌	肺 6	20	99
LngSQ79	扁平上皮癌	肺 7	451	391
LngC20X	扁平上皮癌	肺 8	548	2463
Lng47XQ	扁平上皮癌	肺 9	15	357
LngSQ44	扁平上皮癌	肺 10	196	0
LngBR94	扁平上皮癌	肺 11	33	12
Lng90X	扁平上皮癌	肺 12	6	308

表3は、6個の癌組織（肺試料#1、3、4、7、10および11）が、それぞれの隣接正常組織に比べLng103が過剰発現していることを示す。したがって、肺扁平上皮細胞癌（合計12個の対応ペア）のうちの50%の癌組織でLng103が過剰発現している。

【0242】

まとめると、高いレベルの組織特異性に加えて、試験した肺扁平上皮細胞癌対応試料の50%でmRNAが過剰発現していることから、Lng103が肺癌、特に扁平上皮細胞癌の診断マーカーであることが示唆された。

【0243】

クローンID126263；遺伝子ID221807（Lng104）の発現：

LSG Lng104に関し、リアルタイム定量的PCRは次のプライマーを用いて実行された：

前向きプライマー：

5' ATCACAGGGGCACTGCTTCT3'（配列番号9）

逆向きプライマー：

5' GACCGAGGCCAGGCTTCTA3'（配列番号10）

【0244】

表4に記載の無名数は、12個の正常組織中のLng104の相対発現レベルである。全ての値は、正常小腸（キャリブレーター）と比較されている。これらRNA試料は、種々の個体から得た特定組織の試料をプールすることにより得られる市販のプールである。

【0245】

【表6】

表4：プール試料におけるLSG Lng104発現の相対レベル

組織	正常
脳	0
心臓	0
腎臓	2
肝臓	0
肺	7617
乳腺	113
筋肉	5
前立腺	171
小腸	1
精巣	3
胸腺	8
子宮	11

## 【0246】

表4の発現の相対レベルは、L n g 1 0 4 m R N Aの発現が、その他全ての分析された正常組織に比べて、肺(7617)で非常に高いことを示している。肺組織でのL n g 1 0 4 m R N Aの発現は、前立腺組織でのそれに比べ約45倍である。これらの結果は、L n g 1 0 4 m R N Aの発現が肺で特異的に高いことを示している。

## 【0247】

表4の無名数は、種々の個体由来の特定組織試料のプールを分析したものである。それらは、表5の単一個体の組織試料より得たR N Aに由来する無名数とは比較できない。

## 【0248】

表5に記載の無名数は、64対の対応試料、および1個の子宮癌組織および1個の正常/正常隣接子宮組織中のL n g 1 0 4の発現相対レベルである。全ての値が正常精巣(キャリブレーター)と比較されている。対応ペアは特定組織に関する癌試料に由来するm R N A、および同一個体由来の同一組織に関する正常隣接試料に由来するm R N Aにより形成される。

## 【0249】

## 【表7】

表5 : 個々の試料におけるLSG Lng104発現の相対レベル

試料ID	癌の型	組織	癌	対応する 正常隣接
LngAC82	腺癌	1	4111	28333
Lng60XL	腺癌	2	244	7887
LngAC66	腺癌	3	2927	23991
LngAC69	腺癌	4	13081	24241
LngAC88	腺癌	5	2304	27270
LngAC11	腺癌	6	503	12232
LngAC39	腺癌	7	8800	8842
LngAC32	腺癌	8	3020	11346
LngAC90	腺癌	9	5257	14412
LngAC94	腺癌	10	7156	8422
LngBA641	細気管支肺胞癌	11	25709	22304
LngSQ9X	扁平上皮癌	12	25009	18757
LngSQ45	扁平上皮癌	13	21552	1841
LngSQ14	扁平上皮癌	14	509	13523
LngSQ32	扁平上皮癌	15	1292	19336
LngSQ80	扁平上皮癌	16	204	7
LngSQ16	扁平上皮癌	17	5542	3754
LngSQ79	扁平上皮癌	18	1365	10662
Lng47XQ	扁平上皮癌	19	11388	23660
LngC20X	扁平上皮癌	20	16997	5583

【0250】

【表8】

LngSQ44	扁平上皮癌	肺 21	4798	233
LngBR94	扁平上皮癌	肺 22	33	12
Lng90X	扁平上皮癌	肺 23	570	3386
LngLC80	大細胞癌	肺 24	5631	10886
LngLC71	大細胞癌	肺 25	19690	19827
LngLC109	大細胞癌	肺 26	14666	41338
LngMT67	腎細胞癌からの転移	肺 27	117	13449
LngMT71	黒色腫からの転移	肺 28	615	6818
Bld32XK		膀胱 1	349	1214
Bld66X		膀胱 2	2740	1337
ClnAS45		結腸 1	1	0
ClnRC24		結腸 2	5	0
CvxKS52		子宮頸管 1	7282	3154
CvxNK23		子宮頸管 2	15614	7602
Endo10479		子宮内膜 1	131	24
Endo12XA		子宮内膜 2	823	172
Endo8911		子宮内膜 3	1967	76
Endo28XA		子宮内膜 4	22152	67
Endo68X		子宮内膜 5	183	190
Kid106XD		腎臓 1	0	24
Kid109XD		腎臓 2	15	2
Liv15XA		肝臓 1	2	1

【0251】

【表9】

Liv94XA		肝臓 2	0	0
Mam162X		乳腺 1	51	13
Mam19DN		乳腺 2	5	177
MamA06X		乳腺 3	151	69
Ovr103X		卵巣 1	299	0
Ovr180B		卵巣 2	30	-
Ovr18GA		卵巣 3	-	2
Pan71XL		膵臓 1	17	9
Pro20XB		前立腺 1	73	1607
Pro90XB		前立腺 2	58	28
Pro101XB		前立腺 3	83	157
Skn248S		皮膚 1	6	1
SmInt21XA		小腸 1	3	0
SmIntH89		小腸 2	4	0
Sto115S		胃 1	60	17805
Sto261S		胃 2	589	1592
Sto531S		胃 3	2	5803
StoAC44		胃 4	273	8813
StoAC93		胃 5	4683	7767
Tst39X		精巣 1	541	4
Tst647T		精巣 2	203	0
Thy143N		胸腺 1	169	16
Utr135XO		子宮 1	74	73
Utr141XO		子宮 2	82	3

0 = 陰性

### 【0252】

対応試料の分析では、発現レベルは肺でより高く、肺組織に対して高い組織特異性を示した。これらの結果は、正常プール試料で得た組織特異性に関する結果（表4）を確認するものである。

### 【0253】

さらに同一個体由来の癌試料および同質遺伝子的な正常隣接組織におけるmRNA発現のレベルを比較した。この比較は、癌の病期に関する特異性の指標（例えば正常隣接試料に比べ癌試料でmRNAの発現レベルが高い）を提供する。表5は、8個の肺癌組織（肺試料#11、12、13、16、17、20、21および22）が、それぞれの正常近接組織に比べLng104を過剰発現していることを示している。したがって、試験された肺の対応試料の28%（合計28組の肺対応試料）について、癌組織に過剰発現が認められた。

【0254】

表6に記載の無名数は、肺扁平上皮癌の12対の対応試料におけるLng104の相対発現レベルを示している。

【0255】

【表10】

表6：対応試料対におけるLSG Lng104発現の相対レベル

試料ID	癌の型	組織	癌	対応する 正常隣接
LngSQ45	扁平上皮癌	肺 1	25009	18757
LngSQ14	扁平上皮癌	肺 2	21552	1841
LngSQ9X	扁平上皮癌	肺 3	509	13523
LngSQ80	扁平上皮癌	肺 4	1292	19336
LngSQ32	扁平上皮癌	肺 5	204	7
LngSQ16	扁平上皮癌	肺 6	5542	3754
LngSQ79	扁平上皮癌	肺 7	1365	10662
LngC20X	扁平上皮癌	肺 8	11388	23660
Lng47XQ	扁平上皮癌	肺 9	16997	5583
LngSQ44	扁平上皮癌	肺 10	4798	233
LngBR94	扁平上皮癌	肺 11	33	12
Lng90X	扁平上皮癌	肺 12	570	3386

## 【0256】

表6は、7個の癌組織（肺試料#1、2、5、6、9、10および11）が、それぞれの隣接正常組織に比べLng104が過剰発現していることを示す。肺扁平上皮細胞癌（合計12個の対応対）のうちの58%の癌組織でLng104が過剰発現している。

## 【0257】

まとめると、高いレベルの組織特異性に加えて、試験した肺扁平上皮細胞癌対応試料の58%でmRNAが過剰発現していることから、Lng104が肺癌、

特には扁平上皮細胞癌の診断マーカーであることが示唆された。

#### 【0258】

##### 実施例2：タンパク質発現

L n g 1 0 4 はポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) により増幅され、L n g 1 0 4 のアミノ酸番号16 ( L e u <sup>16</sup> ) ないしアミノ酸番号119 ( L e u <sup>119</sup> ) をコードする増幅DNA断片が大腸菌での発現のためのpET-21d内にサブクローニングされた。L n g 1 0 4 DNAコード配列 ( L e u <sup>16</sup> - L e u <sup>119</sup> ) に加え、L n g 1 0 4 のNH<sup>2</sup>末端に隣接する2個のアミノ酸、M e t - A l a およびL n g 1 0 4 のCOOH末端に隣接する6個のヒスチジンが、それぞれ開始M e t / 制限部位および精製タグとして用いるために組み込まれた。約13kDa ( 翻訳分子量、13.2kDa ) の過剰発現タンパク質バンドが、クマシーブルー染色されたポリアクリルアミドゲル上で容易に観察された。このタンパク質バンドは、6×ヒスチジンタグに対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット分析により確認された。

#### 【0259】

L n g 1 0 4 の大規模な精製は、6リットルの細菌培養物から得た細胞ペーストを用いて達成され、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー ( I M A C ) を使用して精製された。全細胞溶解産物より分離された可溶性分画はニッケルキレート樹脂とともにインキュベートされた。カラムを充填し、カラム容量の5倍量の洗浄緩衝液で洗浄した。L n g 1 0 4 は、各種濃度のイミダゾール緩衝液により段階的に溶出された。

#### 【0260】

同様にしてL n g 1 0 3 も発現および精製される。

#### 【0261】

##### 実施例3：タンパク質融合

本発明のポリペプチドは、好ましくは他のタンパク質に融合される。これらの融合タンパク質は様々な応用できる。例えば、本発明のポリペプチドをH i s タグ、H A タグ、プロテインA、I g G ドメインおよびマルトース結合タンパク質に融合すると精製が容易になる ( E P A 394, 827、Traunecker et a

l. , Nature 331: 84-86 (1988)も参照)。同様に I g G - 1、I g G - 3およびアルブミンへの融合は、i n v i v oでの半減期を延長する。本発明のポリペプチドに融合させられた核局在シグナルは、特定の細胞内局在性へタンパク質を標的にすることができ、一方共有結合ヘテロダイマーまたはホモダイマーは融合タンパク質の活性を増加または低下させることができる。融合タンパク質はまた1つより多い機能を持つキメラ分子を作り出すこともできる。最後に、融合タンパク質は、非融合タンパク質に比べ、融合タンパク質の溶解度および/または安定性を高めることができる。上記の全てのタイプの融合タンパク質は、I g G分子へのポリペプチドの融合を概略する以下のプロトコール、または上記プロトコールを変更することで作製することができる。

#### 【0262】

簡単に述べると、I g G分子のヒトF c部分(配列番号11)は、下記配列の5'および3'末端に及ぶプライマーを用い、P C R増幅することができる。これらプライマーはまた、発現ベクター、好ましくは哺乳動物発現ベクターへのクローニングを容易にするのに好都合な制限酵素部位を持つべきである。

#### 【0263】

例えば、p C 4(受託番号209646)を用いる場合、ヒトF c部分はB a m H Iクローニング部位に連結できる。3' B a m H I部位が破壊されるべきであることに留意されたい。次に、ヒトF c部分を含むベクターはB a m H Iにより再度制限処理され、ベクターは直線化され、実施例1に記載のP C R法により単離された本発明のポリヌクレオチドがこのB a m H I部位に連結される。このポリヌクレオチドは終止コドンなしにクローニングされ、さもなければ融合タンパク質は産生されないことに留意されたい。

#### 【0264】

天然に存在するシグナル配列を用いて分泌タンパク質を産生する場合には、p C 4は第2シグナルペプチドを必要としない。あるいは、天然に存在するシグナル配列を使用しない場合には、ベクターは異種シグナル配列を含むように改変することができる(国際公開第96/34891号参照)。

#### 【0265】

ヒトIgGFc領域は、配列番号11で表される。

【0266】

実施例4：ポリペプチド由来の抗体の産生

本発明の抗体は、様々な方法により調製することができる (Current Protocols, Chapter 2を参照)。例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞を動物に投与して、ポリクローナル抗体を含有する血清の生産を誘発する。好ましい方法では、分泌タンパク質調製物を調製し、それを天然の夾雑物を実質的に含まないように精製する。次に、より高い特異的活性を有するポリクローナル抗血清を産生するために、かかる調製物を動物に導入する。

【0267】

最も好ましい方法では、本発明の抗体は、モノクローナル抗体 (またはそれらのタンパク質結合断片) である。かかるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を用いて調製することができる (Kohler et al., Nature 256: 495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6: 292 (1976); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., pp. 563-681 (1981))。一般に、かかる手法は、ポリペプチド、またはより好ましくは分泌ペプチド発現細胞で、動物 (好ましくは、マウス) を免疫化することを包含する。かかる細胞は、任意の適切な組織培養培地にて培養されてもよいが、10%のウシ胎児血清 (約56にて不活性化される) で、ならびに非必須アミノ酸約10g/l、ペニシリン約1,000U/ml、およびストレプトマイシン約100μg/mlを補充したアール変法イーグル培地にて細胞を培養することが好ましい。

【0268】

かかるマウスの脾細胞を摘出し、適切な骨髓腫細胞系と融合させる。本発明によれば、いかなる適切な骨髓腫細胞系を用いてもよいが、ATCCから入手可能な親骨髓腫細胞系 (SP20) を用いることが好ましい。融合後、得られたハイブリドーマ細胞は、HAT培地にて選択的に保持され、続いてWands等 (Gastroenterology 80: 225-232 (1981)) に記載されるように、限界希釈によりクローニングされる。次に、かかる選択により得られたハイブリドーマ細胞をアッセイして

、ポリペプチドを結合することが可能な抗体を分泌するクローンを同定する。

【0269】

あるいは、ポリペプチドに結合することが可能なさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を用いた二段階手法にて産生することができる。かかる方法は、抗体自身が抗原であるという事実を利用するものであり、したがって、二次抗体に結合する抗体を得ることが可能である。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を用いて、動物、好ましくはマウスを免疫化する。次に、かかる動物の脾細胞を用いて、ハイブリドーマ細胞を生産し、ハイブリドーマ細胞をスクリーニングして、タンパク質特異的抗体に結合する能力が、ポリペプチドにより阻止され得る抗体を産生するクローンを同定する。かかる抗体は、タンパク質特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、それを用いて、動物を免疫化し、さらなるタンパク質特異的抗体の形成を誘発することができる。

【0270】

本発明の抗体のFabおよびF(ab')<sub>2</sub>ならびに他の断片は、本明細書に開示する方法に従って用いてもよいことは理解されるであろう。かかる断片は、典型的に、(Fab断片を産生するための)パパインまたは(F(ab')<sub>2</sub>断片を産生するための)ペプシンのような酵素を用いて、タンパク質分解性切断により産生される。あるいは、分泌タンパク質結合断片は、組換えDNA技術の適用により、または合成化学により産生され得る。

【0271】

ヒトにおける抗体の*in vivo*使用に関して、「ヒト化」キメラモノクローナル抗体を使用することが好ましい場合がある。かかる抗体は、上述のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝構築物を用いて産生することができる。キメラ抗体を産生する方法は、当該技術分野で既知である(参考として、Morrison, Science 229: 1202 (1985)、Oi et al., BioTechniques 4: 214 (1986)、Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号、Taniguchi et al., 欧州特許第171496号、Morrison et al., 欧州特許第173494号、Neuberger et al., 国際公開第8601533号、Robinson et al., 国際公開第8702671号、Boulianne et al., Nature 312: 643 (1984)、Ne

uberger et al., Nature 314: 268 (1985)を参照)。

#### 【0272】

実施例5：ポリヌクレオチドに対応する遺伝子における変化を決定する方法  
所定の表現型(疾患のような)を示す全集団または個々の患者から単離したRNAは、単離される。次に、当該技術分野にて既知のプロトコルを用いて、これらのRNA試料からcDNAが生成される(Smabrookを参照)。次に、cDNAを、配列番号1、2、5、および6において所定の領域を取り囲むプライマーを用いるPCR用の鋳型として使用する。提案するPCR条件は、Sidransky, D., et al., Science 252: 706 (1991)に記載される緩衝溶液を用いて、95 での30秒間、52~58 での60~120秒、および70 での60~120秒の35サイクルから構成される。

#### 【0273】

次に、SequiThermポリメラーゼ(Epicentre Technologies)を用いて、T4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端にて標識したプライマーを使用して、PCR産物を配列決定する。選択エキソンのイントロン-エキソン境界もまた決定され、ゲノムPCR産物を分析して、結果を確認する。次に、突然変異が疑われるPCR産物をクローニングして、配列決定して、直接的な配列決定の結果を確証する。

#### 【0274】

Holton T. A. and Graham, M. W., Nucleic Acids Research, 19: 1156 (1991)に記載されるように、PCR産物をT尾状(tailed)ベクターにクローニングし、T7ポリメラーゼ(United States Biochemical)を用いて配列決定する。病気に冒されていない個体に存在しない突然変異により、病気に冒された個体を同定する。

#### 【0275】

ゲノム再配列もまた、ポリヌクレオチドに対応する遺伝子における変化を決定する方法として観察される。ゲノムクローンを、ジゴキシゲニンデオキシ-ウリジン5'-トリリン酸塩(Boehringer Mannheim)でニックトランスレーションし、Johnson, C, et al., Methods Cell Biol. 35: 73-99 (1991)に記載されるよう

に、FISHを実施する。標識プローブを用いたハイブリダイゼーションは、対応するゲノム座への特異的ハイブリダイゼーションのための、大過剰のヒトc o t - 1 DNAを用いて行われる。

【0276】

4, 6 - ジアミノ - 2 - フェニドールおよびヨウ化プロピジウムで染色体を対比染色し、CおよびRバンドの組合せを生じさせる。正確なマッピングのための整列画像は、冷却電荷結合素子カメラ(Photometrics, Tucson, AZ)および可変励起波長フィルターを併合したトリプルバンドフィルターセット(Chroma Technology, Brattleboro, VT)を用いて得られる(Johnson, Cv. et al., Genet. Anal. Tech. Appl., 8: 75 (1991))。画像収集、分析および染色体分画長測定は、I See Graphicalプログラムシステム(Inovision Corporation, Durham, NC)を用いて実施される。プローブによりハイブリダイズされるゲノム領域の染色体変化は、挿入、欠失および転座として同定される。これらの変化は、関連疾患用診断マーカーとして用いられる。

【0277】

実施例6：生物試料におけるポリペプチドの異常レベルを検出する方法

本発明のポリペプチドは、生物試料中で検出することができ、ポリペプチドレベルの増加または減少が検出される場合、このポリペプチドは、特定の表現型用のマーカーである。検出方法は数多く、したがって、当業者は、以下のアッセイを改変して、特定の必要性に合わせることができることが理解される。

【0278】

例えば、抗体 - サンドイッチELISAを用いて、試料中、好ましくは生物試料中のポリペプチドを検出する。マイクロタイタープレートのウェルを、最終濃度0.2 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、特異的抗体で被覆する。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり、上述の方法により産生される。ウェルへのポリペプチドの非特異的結合が低減するように、ウェルをブロックする。

【0279】

次に、被覆したウェルを、ポリペプチドを含有する試料とともに、室温にて2時間より長い時間インキュベートする。好ましくは、試料の連続希釈物を用いて

、結果を確証すべきである。次に、プレートを開イオン水または蒸留水で3回洗浄して、未結合のポリペプチドを除去する。

【0280】

次に、25～400 ngの濃度の特異的抗体 - アルカリホスファターゼ複合体50 µlを添加して、室温にて2時間インキュベートする。

【0281】

再びプレートを開イオン水または蒸留水で3回洗浄し、未結合の複合体を除去する。

【0282】

各ウェルに、4 - メチルウンベリフェリルホスフェート (MUP) または p - ニトロフェニルホスフェート (NPP) 基質溶液75 µlを添加し、室温にて1時間インキュベートする。マイクロタイタープレートリーダーにより、反応を測定する。対照試料の連続希釈物を用いて、標準曲線を作成し、X軸上にポリペプチド濃度を (対数目盛)、Y軸上に蛍光または吸光度 (均等目盛) をプロットする。

【0283】

標準曲線を用いて、試料中のポリペプチド濃度を内挿する。

【0284】

実施例7：ポリペプチドの配合

分泌ポリペプチド組成物は、個々の患者の臨床状態 (特に、分泌ポリペプチド単独での治療の副作用)、送達部位、投与方法、投与のスケジューリング、および開業医に既知の他の要素を考慮して、優れた医療行為と調和した様式で、処方されて、投薬される。したがって、本明細書の目的に関する「有効量」は、かかる考慮により決定される。

【0285】

一般的な提案として、1回用量あたり非経口的に投与される分泌ポリペプチドの全薬学的有効量は、約1 µg / kg (患者の体重) / 日 ~ 10 mg / kg (患者の体重) / 日の範囲であろうが、上述するように、これは治療上の判断に支配されるであろう。より好ましくは、この用量は、少なくとも0.01 mg / kg

／日であり、ヒトに関して最も好ましくは、ホルモンに関して約0.01～1mg/kg／日である。連続的に与えられる場合、分泌ポリペプチドは、典型的に、1日あたり1～4回の注射により、または連続皮下注入により（例えば、ミニポンプを用いて）、約1μg/kg／時間～約50mg/kg／時間の用量速度にて投与される。静脈バッグ溶液もまた、用いてもよい。変化を観察することが必要な治療の期間、および応答が生じるための治療後の間隔は、所望の効果に依存して様々なようである。

#### 【0286】

本発明の分泌タンパク質を含有する薬学的組成物は、経口的に、直腸的に、非経口的に、槽内的に、鞘膜内的に、腹腔内的に、局所的に（パウダー、軟膏、ジェル、滴薬または経皮パッチによるような）、バツカル的に、または口腔もしくは鼻スプレーのように、投与される。「薬学的に許容可能なキャリア」は、無毒性の固形、半固形または液体充填剤、希釈剤、被包用材料または任意の型の配合助剤を指す。本明細書で使用する「非経口」という用語は、静脈内、筋内、腹腔内、胸骨下、皮下、および関節内注射ならびに注入を含む投与様式を指す。

#### 【0287】

分泌ポリペプチドはまた、持続放出系により適切に投与される。持続放出性組成物の適切な例としては、造形品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態にある半透性ポリマーマトリックスが挙げられる。持続放出性マトリックスとしては、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、欧州特許第58,481号）、L-グルタミン酸およびε-エチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidman, U. et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983)）、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)（R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981)）、およびR. Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982)）、エチレンビニルアセテート（R. Langer et al.）、またはポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133,988号）が挙げられる。持続放出性組成物はまた、リポソームエンタラップポリペプチドを包含する。分泌ポリペプチドを含有するリポソームは、本質的に既知の方法により調製される：DE Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-3692 (1985)、Hwang et al.

, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030-4034 (1980)、欧州特許第52,322号、欧州特許第36,676号、欧州特許第88,046号、欧州特許143,949号、欧州特許第142,641号、日本国特許出願第83-118008号、米国特許第4,485,045号および第4,544,545号、ならびに欧州特許第102,324号。通常、リポソームは、小さい(約200~800オングストローム)単層型であり、そこで脂質含量は、約30(mol%)コレステロールよりも高く、選択比率は、最適な分泌ポリペプチド治療に関して調節される。

#### 【0288】

非経口投与に関して、一態様では、分泌ポリペプチドは、一般的に所望の純度にて、単位投与量の注射可能な形態(溶液、懸濁液、または乳濁液)で、薬学的に許容可能なキャリア(すなわち、使用する投与量および濃度にてレシピエントに無毒性であり、配合物の他の成分と相溶性であるもの)と混合することにより配合される。

#### 【0289】

例えば、配合物は、好ましくは、酸化剤およびポリペプチドにとって有害であると知られている他の化合物を含まない。

#### 【0290】

一般に、配合物は、液体キャリアまたは微細固体キャリア、あるいはその両方と、均一かつ緊密にポリペプチドを接触させることにより調製される。

#### 【0291】

次に、必要な場合には、生成物を所望の配合物に形造る。好ましくは、キャリアは、非経口キャリア、より好ましくは、レシピエントの血液と等張である溶液である。かかるキャリア媒質の例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液、およびブドウ糖溶液が挙げられる。不揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性媒質、ならびにリポソームもまた、本発明に有用である。

#### 【0292】

キャリアは適切に、等張性および化学的安定性を高める物質のような、少量の添加剤を含有する。かかる物質は、用いる投与量および濃度にて、レシピエント

に対して無毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸、および他の有機酸またはそれらの塩のような緩衝液、アスコルビン酸のような酸化防止剤、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド）、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質、ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのようなアミノ酸、セルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリンを含めた単糖、二糖、および他の炭化水素、EDTAのようなキレート剤、マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール、ナトリウムのような対イオン、および/またはポリソルベート、ポロクサマー、またはPEGのような非イオン性界面活性剤が挙げられる。

#### 【0293】

分泌ペプチドは、典型的に、約0.1mg/ml～100mg/ml、好ましくは1～10mg/mlの濃度で、約3～8のpHにて、かかる媒質(vehicle)中で配合される。先述の賦形剤、キャリアまたは安定剤の幾つかの使用は、結果としてポリペプチド塩の形成を生じる結果となるであろうことは理解されるであろう。

#### 【0294】

治療用投与のために使用されるべきポリペプチドはいずれも無菌であり得る。無菌状態は、滅菌濾過膜（例えば、0.2ミクロンの膜）を通した濾過により容易に達成される。治療用ポリペプチド組成物は一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、皮下注射針により突き刺すことが可能なストッパーを有する静脈溶液バッグまたはバイアル）に入れられる。

#### 【0295】

ポリペプチドは通常、単回または複数回用量容器（例えば、密封アンプルまたはバイアル）中に、水溶液として、または再構成用凍結乾燥配合物として、保管されるであろう。凍結乾燥配合物の例として、10mlバイアルを滅菌濾過した1%（w/v）ポリペプチド水溶液5mlで充填し、得られた混合物を凍結乾燥する。注入溶液は、注射用静菌水を用いて、凍結乾燥ポリペプチドを再構成する

ことにより調製される。

#### 【0296】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の1つもしくはそれ以上の成分を充填した1つまたはそれ以上の容器を含む薬学的パックあるいはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する行政機関が規定する形態における通告は、かかる容器（複数可）に関連し得て、その通告は、ヒト投与に関する製造、使用または販売の政府機関による承認を反映する。さらに、本発明のポリペプチドは、他の治療化合物と併用してもよい。

#### 【0297】

##### 実施例8：ポリペプチドレベル低下を治療する方法

個体において分泌タンパク質の標準的または一般的発現レベルの減少により引き起こされる症状は、好ましくは分泌形態にある、本発明のポリペプチドを投与することにより治療することができることが理解されるであろう。したがって、本発明はまた、ポリペプチドレベルの増加を必要とする個体を治療する方法であって、かかる個体においてポリペプチドの活性レベルを増加させるためのポリペプチド量を含む薬学的組成物を、かかる個体に投与することを含む方法を提供する。

#### 【0298】

例えば、減少したポリペプチドレベルを有する患者に、1日用量0.1~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のポリペプチドを6日間連続で与える。好ましくは、ポリペプチドは、分泌形態である。投与および処方に基づく投薬計画の詳細は上記に提供する。

#### 【0299】

##### 実施例9：ポリペプチドレベル増加を治療する方法

アンチセンス技術を用いて、本発明のポリペプチドの産生を抑制する。この技術は、癌のような様々な病因に起因するポリペプチド（好ましくは分泌形態）のレベルを減少させる方法の一例である。

#### 【0300】

例えば、異常に増加したポリペプチドレベルを有すると診断された患者は、0

. 5、1. 0、1. 5、2. 0および3. 0 mg / k g / 日にて、21日間、アンチセンスポリヌクレオチドを静脈内に投与される。この治療が十分に耐えられた場合、治療は7日の静止期間後に繰り返される。アンチセンスポリヌクレオチドの配合は上記に提供する。

#### 【0301】

##### 実施例10：遺伝子治療を用いた治療方法

遺伝子治療の一方法は、ポリペプチドを発現することが可能な線維芽細胞を、患者上へ移植する。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により対象体から得られる。得られた組織を組織培養培地に置き、小片に分離する。組織の小片を組織培養フラスコの湿った表面上へ載せ、各フラスコにおいて約10片を載せる。フラスコを上下ひっくり返し、きつく閉めて、室温で一晩放置する。室温にて24時間後、フラスコをひっくり返し、組織片をフラスコの底に固定させたままで、新鮮な培地（例えば、Ham's F12培地、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを有する）を添加する。次に、フラスコを37℃にて約1週間インキュベートする。

#### 【0302】

この時点で、新鮮な培地を添加し、続いて数日毎に取り換える。さらに2週間の培養の後、線維芽細胞の単層が現れる。単層をトリプシン処理し、大きなフラスコへはがし取る。モロニーマウス肉腫ウイルスの末端反復配列に隣接したpMV-7 (Kirschmeier, P. T. et al., DNA, 7: 219-25 (1988))をEcoRIおよびHindIIIで消化した後、子ウシ腸ホスファターゼで処理する。アガロースゲル上で線状ベクターを分画し、ガラスビーズを用いて精製する。

#### 【0303】

本発明のポリペプチドをコードするcDNAを、実施例1に記載のように、それぞれ5'および3'末端配列に相当するPCRプライマーを用いて増幅することができる。好ましくは、5'プライマーは、EcoRI部位を含有し、3'プライマーは、HindIII部位を含む。等量のモロニーマウス肉腫ウイルス線状バックボーンならびに増幅したEcoRIおよびHindIII断片を、T4 DNAリガーゼの存在下、一緒に添加する。得られた混合物を、2つの断片の連結

に適した条件下にて保持する。次に、連結混合物を用いて、バクテリアHB 101に形質転換した後、ベクターに所定の遺伝子が適切に挿入されたことを確認する目的で、カナマイシンを含有する寒天上に蒔く。

#### 【0304】

両栄養性pA317またはGP+am12パッケージング細胞を、10%の子ウシ血清(CS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを有するダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で、コンフルエント密度に、組織培養で成長させる。次に、遺伝子を含有するMSVベクターを培地に添加し、パッケージング細胞にベクターを形質導入する。いまやパッケージング細胞は、遺伝子を含有する感染ウイルス粒子を生産する(パッケージング細胞は、現在プロデューサー細胞と称される)。

#### 【0305】

形質導入したプロデューサー細胞に、新鮮な培地を添加し、続いて、コンフルエントなプロデューサー細胞の10cmプレートから、培地を収集する。ミリポアフィルターを通して感染ウイルス粒子を含有する使用済培地を濾過し、剥離したプロデューサー細胞を除去し、続いてこの培地を用いて、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから、培地を除去し、プロデューサー細胞からの培地とすばやく入れ換える。この培地を除去し、新鮮な培地と入れ換える。

#### 【0306】

ウイルスの力価が高い場合、実質的にすべての線維芽細胞は感染され、選択は必要ない。力価が非常に低い場合、neoまたはhisのような選択マーカを有するレトロウイルスベクターを使用する必要がある。線維芽細胞がいったん効果的に感染されたら、線維芽細胞を分析して、タンパク質が産生されるかどうかを確定する。

#### 【0307】

次に、操作した線維芽細胞を、cyto dex 3マイクロキャリアビーズ上に、単独で、またはコンフルエンスに成長させた後に、宿主上に移植する。

#### 【0308】

### 実施例11: *in vivo* 遺伝子治療を用いた治療方法

本発明の別の側面は、障害、疾患および症状を治療するために、*in vivo* 遺伝子治療方法を使用することである。遺伝子治療方法は、ポリペプチドの発現を増加または減少させるための、裸の核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA)配列の動物への導入に関する。

#### 【0309】

本発明のポリヌクレオチドは、プロモーターまたは標的組織によるポリペプチド発現に必要な任意の他の遺伝的要素に作動可能に連結されてもよい。かかる遺伝子治療ならびに送達技術および方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、国際公開第90/11092号、国際公開第98/11779号、米国特許第5,693,622号、第5,705,151号、第5,580,859号、Tabata H. et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35 (3): 470-479、Chao J et al. (1997) *Pharmacol. Res.* 35(6): 517-522、Wolff J. A. (1997) *Neuromuscul. Disord.* 7 (5): 314-318、Schwartz B. et al. (1996) *Gene Ther.* 3 (5): 405-411、Tsurumi Y. et al. (1996) *Circulation* 94 (12): 3281-3290 (参照により本明細書に援用される)を参照されたい。

#### 【0310】

ポリヌクレオチド構築物は、組織(心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸等)の間質腔への注射のように、動物細胞へ注入可能な物質を送達するいかなる方法により送達されてもよい。ポリヌクレオチド構築物は、薬学的に許容可能な液体または水性キャリア中で送達することができる。

#### 【0311】

「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAという用語は、細胞への侵入を補佐、促進または助長するよう作用するいかなる送達媒体(ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム配合物、リポフェクチンまたは沈殿剤等を含む)を含まない配列を指す。しかしながら、本発明のポリヌクレオチドはまた、当業者に既知の方法により調製され得るリポソーム配合物(例えば、Felgner P. L. et al. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772: 126-139、およびAbdallah B. et al. (1995) *Biol. Cell* 85 (1): 1-7に教示されるもの)にて送達されてもよい。

## 【0312】

遺伝子治療方法にて使用されるポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれない構築物であり、またそれらは、複製が可能な配列を含有しないであろう。当業者に既知のいかなる強力なプロモーターも、DNA発現を駆動するために使用することができる。他の遺伝子治療技術と異なり、標的細胞へ裸の核酸配列を導入することの1つの主要な利点は、細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究により、非複製DNA配列が細胞に導入されて、最大6ヶ月の期間、所望のポリペプチドの産生を提供することができることがわかった。

## 【0313】

ポリヌクレオチド構築物は、筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を含む、動物内組織の間質腔へ送達され得る。組織の間質腔は、細胞間液、器官組織の細網線維間のムコ多糖マトリックス、管または房の壁における弾性線維、線維組織のコラーゲン線維、または筋細胞を覆う結合組織内もしくは骨小腔中にある同じマトリックスを含む。循環血漿およびリンパチャネルのリンパ液により占有される腔も同様である。筋組織の間質腔への送達は、以下に記述する理由のため好ましい。それらは、これらの細胞を含む組織への注射により利便性よく送達され得る。送達および発現は、未分化または完全には及ばない分化細胞（例えば、血液または皮膚線維芽細胞の幹細胞のような）にて達成され得るが、それらは、好ましくは、分化した永続性の非分裂細胞に送達され、そこで発現される。in vivo筋細胞は特に、ポリヌクレオチドを取り込み、発現するそれらの能力に適格である。

## 【0314】

裸のポリヌクレオチド注射に関して、有効投与量のDNAまたはRNAは、約0.05 µg/kg体重～約50 mg/kg体重の範囲であろう。好ましくは、投与量は、0.005 mg/kg～約20 mg/kgであり、より好ましくは約0.05 mg/kg～約5 mg/kgであろう。当然のことながら、当業者が理解するように、この投与量は、注射の組織部位により変化するであろう。適切か

つ有効な投与量の核酸配列は、当業者により容易に決定することができ、それは、治療される症状および投与経路に依存し得る。好ましい投与経路は、組織の間質腔への注射の非経口経路によるものである。しかしながら、特に肺もしくは気管支組織、咽喉または鼻の粘膜への送達用のエアロゾル配合物の吸入のような、他の非経口経路もまた使用してもよい。さらに、裸のポリヌクレオチド構築物は、処置にて使用されるカテーテルにより、血管形成中に動脈へ送達することができる。

#### 【0315】

*in vivo*での筋肉中の注射されたポリヌクレオチドの用量応答効果は以下のように決定される。本発明のポリペプチドをコードするmRNAの産生のための適切な鋳型DNAを、標準的な組換えDNA方法論に従って調製する。鋳型DNAは、環状または線状のいずれであってもよく、それは裸のDNAとして用いられるか、あるいはリポソームと複合体を形成する。次に、マウスの四頭筋に、様々な量の鋳型DNAを注射する。

#### 【0316】

5～6週齢の雌および雄Balb/cマウスを、2.5%アベルチン0.3mlで腹腔内注射により麻酔する。腹側の大腿上に1.5cmの切開をして、四頭筋を直接見えるようにする。筋肉の遠位挿入部位から膝へ向かって約0.5cmかつ約0.2cmの深さで、1分にわたり、27ゲージ針を通じて、1ccの注射器におけるキャリア0.1ml中の鋳型DNAを注射する。将来の位置確認のために注入部位にわたって縫合を設置し、皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

#### 【0317】

適切なインキュベーション時間後（例えば、7日）、四頭筋全体を切除することにより、筋肉摘出物を調製する。個々の四頭筋のすべての5番目の15μm断面を、タンパク質発現のために組織化学的に染色する。タンパク質発現に関する時間的経過は、種々のマウス由来の四頭筋は異なる時間にて収集されることを除いて、同様の様式にて行われ得る。注射後の筋肉中のDNAの永続性は、注射したマウスおよび対照マウスから全細胞DNAおよびHIRT上清を調製した後に

、サザンブロット分析により確定されてもよい。

【0318】

マウスでの上記実験の結果を用いて、裸のDNAを用いた、ヒトおよび他の動物における適切な投与量および他の治療パラメータを推定することができる。

【0319】

実施例12：トランスジェニック動物

本発明のポリペプチドはまた、トランスジェニック動物にて発現することもできる。マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、小型ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、および非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、サル、およびチンパンジー）が含まれるが、これらに限定されないあらゆる種の動物を用いて、トランスジェニック動物を発生させてもよい。具体的な態様では、本明細書中に記載するか、そうでなければ当該技術分野で既知の技法を用いて、遺伝子治療プロトコルの一部として、ヒトにおいて本発明のポリペプチドを発現させる。

【0320】

当該技術分野で既知のいかなる技法を用いて、動物に導入遺伝子（すなわち、本発明のポリペプチド）を導入して、トランスジェニック動物の創始系統を生産してもよい。かかる技法としては、前核マイクロインジェクション（Paterson et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 691-698 (1994)、Carver et al., Biotechnology (NY) 11:1263-1270 (1993)、Wright et al., Biotechnology (NY) 9: 830-834 (1991); およびHoppe et al., 米国特許第4,873,191号(1989)）、生殖系列（Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152 (1985)）、線維芽細胞または胚のレトロウイルス媒介性遺伝子移入、胚幹細胞における遺伝子ターゲティング（Thompson et al., Cell 56: 313-321 (1989)）、細胞または胚へのエレクトロポレーション（Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3: 1803-1814 (1983)）、遺伝子銃を用いた本発明のポリヌクレオチドの導入（例えば、Ulmer et al., Science 259: 1745 (1993)を参照）、胚多能性幹細胞への核酸構築物の導入および線維芽細胞への幹細胞の移し戻しおよび精子媒介性遺伝子移入（Lavitrano et al., Cell 57: 717-723 (1989)）等が挙げられるが、これらに限定されない。かかる技法の参考として、Gordon, 「トランスジ

エニック動物(Transgenic Animals)」, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229 (1989)を参照されたい(それは、全体として参照により本明細書に援用される)。

#### 【0321】

当該技術分野において既知のいかなる技法を用いて、本発明のポリヌクレオチドを含有するトランスジェニッククローンを生産してもよい(例えば、静止状態へ誘導された培養胚細胞、胎児性細胞または成人細胞からの核の、脱核卵母細胞への核移入(Campell et al., Nature 380: 64-66 (1966), Wilmut et al., Nature 385: 810813 (1997))。

#### 【0322】

本発明は、すべての動物細胞において導入遺伝子を運搬するトランスジェニック動物、ならびに、幾つかの動物細胞であり、すべてではない動物細胞(すなわちモザイク動物またはキメラ)において導入遺伝子を運搬する動物を提供する。導入遺伝子は、単一導入遺伝子として、またはコンカテマー(例えば、頭-頭タンデム、もしくは頭-尾タンデム)のような多重コピーとして、組み込まれてもよい。導入遺伝子はまた、以下のような例えば、Lasko等の教示(Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236 (1992))による特定の細胞型に選択的に導入されて、そこで活性化されてもよい。かかる細胞型特異的な活性化に必要な調節遺伝子は、所定の特定細胞型に依存し、それは当業者には明らかであろう。ポリヌクレオチド導入遺伝子が内因性遺伝子の染色体部位に組み込まれることが望ましい場合、遺伝子ターゲティングが好ましい。簡潔に述べると、かかる技法が利用され得る場合、内因性遺伝子に相動的な幾つかのヌクレオチド配列を含有するベクターを、内因性遺伝子のヌクレオチド配列へ、染色体配列との相同組換えにより組み込み、その機能を崩壊させる目的で設計する。導入遺伝子はまた、特定の細胞型へ選択的に導入されてもよく、したがって、以下の例えばGu等の教示(Gu et al., Science 265: 103-106 (1994))により、その細胞型のみで内因性遺伝子を不活性化させる。かかる細胞型特異的な不活性化に必要な調節配列は、所定の特定細胞型に依存し、それは当業者には明らかであろう。

#### 【0323】

トランスジェニック動物がいったん発生されれば、組換え遺伝子の発現は、標

準的な技法を利用してアッセイされ得る。初期スクリーニングは、導入遺伝子の組み込みが起ったことを確証するために動物組織を分析するために、サザンブロット分析またはPCR技法により達成され得る。トランスジェニック動物の組織における導入遺伝子のmRNA発現レベルはまた、動物から得られる組織試料のノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、および逆転写酵素PCR (rt-PCR) が含まれるが、これらに限定されない技法を用いて評価してもよい。トランスジェニック遺伝子発現組織の試料はまた、導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いて、免疫細胞化学的に、または免疫組織化学的に評価してもよい。

#### 【0324】

創始動物がいったん生産されれば、それらは、繁殖、同系交配、異系交配、または交雑させて、特定の動物コロニーを生産してもよい。かかる繁殖戦略の例としては、別個の系統を樹立するために、1つよりも多い組み込み部位で創始動物を異系交配すること、各導入遺伝子の付加的発現の効果が理由で、高いレベルで導入遺伝子を発現する複合遺伝子導入をもたらすために、別個の系統を同系交配させること、発現を増大させ、かつDNA分析による動物のスクリーニングの必要性をなくすために、既定の組み込み部位に関してホモ接合性動物を生産するために、ヘテロ接合性トランスジェニック動物を交雑させること、複合ヘテロ接合性またはホモ接合性系統を生産するために、別個のホモ接合性系統を交雑させること、および所定の実験モデルに適切な明瞭なバックグラウンドに導入遺伝子を配置させるために繁殖させることが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0325】

本発明のトランスジェニック動物は、本発明のポリペプチドの生物機能を高め、異常発現に関連した症状および/または障害を研究し、かかる症状および/または疾患を回復するのに効果的な化合物をスクリーニングするのに有用な動物モデル系を含むが、これに限定されない使用を有する。

#### 【0326】

実施例13：ノックアウト動物

内因性遺伝子の発現はまた、標的相同組換えを用いて、遺伝子および/もしくは

はそのプロモーターを不活性化または「ロックアウト」することにより低減することができる(例えば、Smithies et al., Nature 317: 230-234 (1985)、Thomas & Capecchi, Cell 51: 503512 (1987)、Thompson et al., Cell 5: 313-321 (1989)を参照、それらはそれぞれ、全体として、参照により本明細書に援用される)。例えば、内因性ポリヌクレオチド配列(遺伝子のコード領域または調節領域)に相動的なDNAに隣接した突然変異体である本発明の非機能性ポリヌクレオチド(または完全に非関連のDNA配列)を、選択マーカーおよび/またはネガティブ選択マーカーを用いて、あるいは用いずに使用して、*in vivo*で本発明のポリペプチドを発現する細胞をトランスフェクションすることができる。別の態様では、当該技術分野にて既知の技法を用いて、所定の遺伝子を含有するが、発現はしない細胞におけるロックアウトを生成する。標的相同組換えを介したDNA構築物の挿入は、結果として標的遺伝子の不活性化を招く。かかるアプローチは、探索および農業の分野に特に適しており、そこで胚幹細胞の改変を用いて、不活性な標的遺伝子を有する動物の子孫を発生させることができる(例えば、上述のThomas & Capecchi 1987、およびThompson 1989を参照)。しかしながら、組換えDNA構築物が当業者には明らかであろう適切なウイルスベクターを用いて、*in vivo*にて必要とされる部位に直接的に投与されるか、または標的にされるという条件で、このアプローチはヒトにおける使用にルーチンで適合され得る。

#### 【0327】

本発明のさらなる態様では、本発明のポリペプチドを発現するように遺伝子操作された細胞、あるいは本発明のポリペプチドを発現しないように遺伝子操作された(例えば、ロックアウト)細胞を、*in vivo*にて患者に投与する。かかる細胞は、患者(すなわち、ヒトを含めた動物)、またはMHC適合ドナーから得られてもよく、線維芽細胞、骨髄細胞、血液細胞(例えば、リンパ球)、脂肪細胞、筋細胞、内皮細胞等を挙げることができるが、これらに限定されない。細胞は、組換えDNA技法を用いて、*in vitro*にて遺伝子操作され、細胞に本発明のポリペプチドのコード配列を導入するか、あるいは例えば形質導入(ウイルスベクター、好ましくは細胞ゲノムに導入遺伝子を組み込むベクターを

用いて)またはプラスミド、コスミド、YAC、裸のDNA、エレクトロポレーション、リポソーム等の使用を含むが、これらに限定されないトランスフェクション手法により、本発明のポリペプチドに関するコード遺伝子および/または内因性調節配列を崩壊させる。

【0328】

本発明のポリペプチドのコード配列は、強力な構成もしくは誘導プロモーターまたはプロモーター/エンハンサーの制御下に置くことにより、本発明のポリペプチドの発現、好ましくは分泌を達成することができる。本発明のポリペプチドを発現、好ましくは分泌する操作細胞を全身的に(例えば、循環にて、または腹腔内にて)患者に導入することができる。

【0329】

あるいは、細胞をマトリックス中に組み込み、体内へ移植することができ、例えば、遺伝子操作した線維芽細胞は、皮膚移植片の一部として移植することができ、遺伝子操作した内皮細胞は、リンパ管または血管移植片の一部として移植することができる(例えば、Anderson et al. 米国特許第5,399,349号、およびMulligan & Wilson, 米国特許第5,460,959号(それら各々は全体として、参照により本明細書に援用される)を参照)。

【0330】

投与されるべき細胞が非自系または非MHC適合細胞である場合、それらは、導入細胞に対する宿主免疫応答の発生を防ぐ既知の技法を用いて、投与され得る。例えば、細胞は、じかに接している細胞外環境との構成成分の交換が可能であるものの、導入細胞が宿主免疫系により認識されることが不可能な被包性の形態で導入されてもよい。

【0331】

本発明のトランスジェニックおよび「ノックアウト」動物は、本発明のポリペプチドの生物機能を高め、異常発現に関連した症状および/または障害を研究し、かかる症状および/または疾患を回復するのに効果的な化合物をスクリーニングするのに有用な動物モデル系を含むが、これらに限定されない使用を有する。

【0332】

本発明は、上述の説明および実施例に特に記載するのとは違って実施されてもよいことは明らかであろう。上記の教示に鑑みて、本発明の数多くの変更および変形が可能であり、したがってそれらは、併記の特許請求の範囲内である。

**【0333】**

本発明の背景、詳細な説明および実施例において引用した各文書（特許、特許出願、論文、要約、実験室マニュアル、書物、または他の開示を含めた）の開示全体は、参照により本明細書に援用される。さらに、本明細書とともに提出する配列表のハードコピーおよび相当するコンピュータ読取り可能な形態の両方が、全体として参照により本明細書中に援用される。

**【配列表】**

## SEQUENCE LISTING

<110> diaDexus, Inc.  
Chen, Sei Yu  
Sun, Yongming  
Macina, Roberto

<120> Method of Diagnosing, Monitoring, Staging, Imaging and  
Treating Lung Cancer

<130> DEX-0139

<140>

<141>

<150> 60/183,188

<151> 2000-02-17

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1680

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gggtgtgcagg atataagggtt ggacttccag acccactgcc cgggagagga sgggagcggg 60
ccgaggactc cagcgtgccc aggtctggca tcttgcactt gctgcoctct gacacctggg 120
aagatggccg gcccggtggac cttcacocctt ctctgtgggt tgctggcagc caccttgatc 180
caagccacc ctagtcccac tgcagttctc atcctcggcc caaaagtcac caaagaaaag 240
ctgacacagg agctgaagga ccacaacgcc accagcatcc tgcagcagct gccgctgctc 300
agtgccatgc gggaaaagcc agccggagga tcctgtgctt gggcagcctg gtgaacaccg 360
tcctgaagca catcatctgg ctgaaggcca tcacagctaa catcctccag ctgcagggtga 420
agccctcggc caatgaccag gagctgctag tcaagatccc cctggacatg gtggctggat 480
tcaaacacgcc cctggccaag accatcgtgg agttccacat gacgactgag gcccaagcca 540
ccatccgcat ggacaccagt gcaagtggcc ccaccgcctt ggtcctcagt gactgtgcca 600
ccagccatgg gagcctgcgc atccaactgc tgcataagct ctccttcctg gtgaacgcct 660
tagctaagca ggtcatgaac ctccctagtgc catccctgcc caatctagtg aaaaaccagc 720
tgtgtcccgt gatcgaggct tccttcaatg gcatgtatgc agacctcctg cagctgggtga 780
aggtgcccct tccctcagc attgaccgtc tggagtttga ccttctgtat cctgccatca 840
agggtgacac cattcagctc tacctggggg ccaagttggt ggactcacag ggaaaggtga 900
ccaagtgggt caataactct gcagcttccc tgacaatgcc caccctggac aacatcccgt 960
tcagcctcat cgtgagtcag gacgtggtga aagctgcagt ggctgctgtg ctctctccag 1020
aagaattcat ggtcctggtg gactctgtgc ttcctgagag tgcccatcgg ctgaagtcaa 1080
gcatcgggct gatcaatgaa aaggctgcag ataagctggg atctaccag atcgtgaaga 1140
tcctaactca ggacactccc gagtttttta tagaccaagg ccatgcccaag gtggcccaac 1200

```

tgatcgtgct ggaagtgttt ccctccagtg aagccctccg ccctttgttc accctgggca 1260  
 tcgaagccag ctcggaagct cagttttaca ccaaaggtga ccaacttata ctcaacttga 1320  
 ataacatcag ctctgatcgg atccagctga tgaactctgg gattggctgg ttccaacctg 1380  
 atgtttctgaa aaacatcctc actgagatca tccactccat cctgctgccg aaccagaatg 1440  
 gcaaattaag atctggggtc ccagtgatcat tggatgaaggc cttgggattc gaggcagctg 1500  
 agtcctcact gaccaaggat gcccttgtgc ttactccagc ctccttgtgg aaaccagct 1560  
 ctctgtctc ccagtgaaaga cttggatggc agccatcagg gaaggctggg tcccagctgg 1620  
 gagtatgggt gtgagctcta tagaccatcc ctctctgcaa tcaataaaca cttgcctgtg 1680

<210> 2

<211> 895

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ctaatctggt acgtaacagc aagacagcgt cacctcacct gttctcgccc tcaaattggga 60  
 acgctggcct gggactaaag catagaccac caggctgagt atcctgacct gaggcatccc 120  
 cagggatcag gagcctccag cagggaaacct tccattatat tcttcaagca acttacagct 180  
 gcaccgacag ttgcatgaa agttctaatc tcttccctcc tctgttggct gccactaatg 240  
 ctgatgtcca tggctctctag cagcctgaat ccaggggtcg ccagaggcca cagggaccga 300  
 ggccaggcct ctaggagatg gctccaggaa ggccggccaag aatgtgagtg caaagattgg 360  
 ttcttgagag ccccgagaag aaaattcatg acagtgtctg ggctgccaaa gaagcagtg 420  
 ccctgtgatc atttcaaggg caatgtgaag aaaacaagac accaaaggca ccacagaaa 480  
 ccaacaagc attccagagc ctgccagcaa tttctcaaac aatgtcagct aagaagcttt 540  
 gctctgcctt tgtaggagct ctgagcgccc actcttccaa ttaaacattc tcagccaaga 600  
 agacagtgag cacactacc agacactctt cttctccac ctcactctcc cactgtacc 660  
 acccctaaat cattccagtg ctctcaaaaa gcattgtttt caagatcatt ttgtttgtg 720  
 ctctctctag tgtctctctc tctctcagc cttagcctgt gccctccct taccaggct 780  
 taggcttaat tacctgaaag attccaggaa actgtagctt cctagctagt gtcatttaac 840  
 cttaaattgca atcaggaaag tagcaaacag aagtcaataa atatttttaa atgtc 895

<210> 3

<211> 484

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Gly Pro Trp Thr Phe Thr Leu Leu Cys Gly Leu Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

Thr Leu Ile Gln Ala Thr Leu Ser Pro Thr Ala Val Leu Ile Leu Gly  
 20 25 30

Pro Lys Val Ile Lys Glu Lys Leu Thr Gln Glu Leu Lys Asp His Asn  
 35 40 45

Ala Thr Ser Ile Leu Gln Gln Leu Pro Leu Leu Ser Ala Met Arg Glu  
50 55 60

Lys Pro Ala Gly Gly Ile Pro Val Leu Gly Ser Leu Val Asn Thr Val  
65 70 75 80

Leu Lys His Val Ile Trp Leu Lys Val Ile Thr Ala Asn Ile Leu Gln  
85 90 95

Leu Gln Val Lys Pro Ser Ala Asn Asp Gln Glu Leu Leu Val Lys Ile  
100 105 110

Pro Leu Asp Met Val Ala Gly Phe Asn Thr Pro Leu Val Lys Thr Ile  
115 120 125

Val Glu Phe His Met Thr Thr Glu Ala Gln Ala Thr Ile Arg Met Asp  
130 135 140

Thr Ser Ala Ser Gly Pro Thr Arg Leu Val Leu Ser Asp Cys Ala Thr  
145 150 155 160

Ser His Gly Ser Leu Arg Ile Gln Leu Leu His Lys Leu Ser Phe Leu  
165 170 175

Val Asn Ala Leu Ala Lys Gln Val Met Asn Leu Leu Val Pro Ser Leu  
180 185 190

Pro Asn Leu Val Lys Asn Gln Leu Cys Pro Val Ile Glu Ala Ser Phe  
195 200 205

Asn Gly Met Tyr Ala Asp Leu Leu Gln Leu Val Lys Val Pro Ile Ser  
210 215 220

Leu Ser Ile Asp Arg Leu Glu Phe Asp Leu Leu Tyr Pro Ala Ile Lys  
225 230 235 240

Gly Asp Thr Ile Gln Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Leu Leu Asp Ser Gln  
245 250 255

Gly Lys Val Thr Lys Trp Phe Asn Asn Ser Ala Ala Ser Leu Thr Met  
260 265 270

Pro Thr Leu Asp Asn Ile Pro Phe Ser Leu Ile Val Ser Gln Asp Val  
275 280 285

Val Lys Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Ser Pro Glu Glu Phe Met Val  
290 295 300

Leu Leu Asp Ser Val Leu Pro Glu Ser Ala His Arg Leu Lys Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Gly Leu Ile Asn Glu Lys Ala Ala Asp Lys Leu Gly Ser Thr Gln  
 325 330 335  
 Ile Val Lys Ile Leu Thr Gln Asp Thr Pro Glu Phe Phe Ile Asp Gln  
 340 345 350  
 Gly His Ala Lys Val Ala Gln Leu Ile Val Leu Glu Val Phe Pro Ser  
 355 360 365  
 Ser Glu Ala Leu Arg Pro Leu Phe Thr Leu Gly Ile Glu Ala Ser Ser  
 370 375 380  
 Glu Ala Gln Phe Tyr Thr Lys Gly Asp Gln Leu Ile Leu Asn Leu Asn  
 385 390 395 400  
 Asn Ile Ser Ser Asp Arg Ile Gln Leu Met Asn Ser Gly Ile Gly Trp  
 405 410 415  
 Phe Gln Pro Asp Val Leu Lys Asn Ile Ile Thr Glu Ile Ile His Ser  
 420 425 430  
 Ile Leu Leu Pro Asn Gln Asn Gly Lys Leu Arg Ser Gly Val Pro Val  
 435 440 445  
 Ser Leu Val Lys Ala Leu Gly Phe Glu Ala Ala Glu Ser Ser Leu Thr  
 450 455 460  
 Lys Asp Ala Leu Val Leu Thr Pro Ala Ser Leu Trp Lys Pro Ser Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Val Ser Gln

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Lys Val Leu Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Met Leu  
 1 5 10 15  
 Met Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Asn Pro Gly Val Ala Arg Gly His  
 20 25 30



```

cagttttaca ccaaagggtga ccaacttata ctcaacttga ataacatcag ctctgatcgg 1380
atccagctga tgaactctgg gattggctgg ttccaacctg atgttctgaa aaacatcacc 1440
actgagatca tccactccat cctgctgccg aaccagaatg gcaaattaag atctggggtc 1500
ccagtgatca tgggtgaaggc cttgggattc gaggcagctg agtcctcact gaccaaggat 1560
gcccttgtgc ttactccagc ctccctgtgg aaaccagct ctccctgtctc ccagtgaaga 1620
cttgatggc agccatcagg gaaggctggg tcccagctgg gagtatgggt gtgagctcta 1680
tagaccatcc ctctctgcaa tcaataaaca ctggcctgtg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaaa ctcgactcta gattgcggcc ggggtcatag ctgtttcctg aacagatccc 1800
gggtggcatc cctgtgacct ctcccagtg cctctcctgg ccttgggaagt tgccactcca 1860
gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctagggtgcc 1920
ttctataata ttatgggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcaagt tgggaagaca 1980
acctgtaggg cctgcgggggt ctattgggaa ccaagctgga gtgcagtggt acaatc      2036

```

<210> 6

<211> 1171

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

gattcccata aagcacatgg tctaactctgt tacgtaacag caagacagcg tcacctcacc 60
tgttctcgcc ctcaaatggg aacgctggcc tgggactaaa gcatagacca ccaggctgag 120
tacctgacc tgagtcaccc ccagggatca ggagcctcca gcagggaaacc ttccattata 180
ttcttcaagc aacttacagc tgcaccgaca gttgcatga aagttctaact ctcttccctc 240
ctcctgttgc tgccactaat gctgatgtcc atgggtctcta gcagcctgaa tccaggggtc 300
gccagaggcc acagggaccg agggcaggct tctaggagat ggctccagga aggcggccaa 360
gaatgtgagt gcaaagattg gttcctgaga gcccagaaa gaaaattcat gacagtgtct 420
gggctgccaa agaagcagtg cccctgtgat catttcaagg gcaatgtgaa gaaaacaaga 480
caccaaaggc accacagaaa gccaaacaag cattccagag cctgccagca atttctcaaa 540
caatgtcagc taagaagctt tgctctgctt ttgtaggagc tctgagcgc cactcttcca 600
atataacatt ctacccaag aagacagtga gcacacctac cagacactct tcttctccca 660
cctcactctc cactgtacc caccctaaa tcattccagt gctctcaaaa agcatgtttt 720
tcaagatcat tttgtttgtt gctctctcta ggtcttctt ctctcgtcag tcttagcctg 780
tgccctccc ttaccaggc ttaggcttaa ttacctgaaa gattccagga aactgtagct 840
tactagctag tgcatttaa ccttaaatgc aatcaggaaa gtagcaaca gaagtcaata 900
aatattttta aatgtcacag atcaaaattg tttccttcaa atggggtctg ccaattcaca 960
accagatgac ccattttacc ctattcactg cagactgaat ccagattcta cacatactta 1020
tccccaccaa gaccctcact ctgtctccat tggcctactt gttcatcttt cactcattcg 1080
acaaatcttt ttgaggtaag agcaggtggg gacaaaaaaaa aaaagcatab caatgaacca 1140
gacccgtctc tattaagat aatataggtt t      1171

```

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 7

ggcgttgtag tccttcag

18

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 8

acttgctgcc ctctgacac

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 9

atcacagggg cactgcttct

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 10

gaccgaggcc aggcttcta

19

<210> 11

<211> 733

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

gggatccgga gcccaaatct tctgacaaaa ctacacacatg cccacccgtgc ccagcacctg 60
aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga 120
tctccgggac tcctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt aagccacgaa gaccctgagg 180
tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagcccgagg 240
aggagcagta caacagcacg taccggtggtg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctocca accccatcg 360
agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac accctgccc 420
catccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480
atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga 540
ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctgg 600
acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc 660
acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc 720
gactctagag gat 733

```

## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/05674
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 60160 A (DIADEXUS LLC ;SUN YONGMING (US); YANG FEI (US); MACINA ROBERTO A ( ) 25 November 1999 (1999-11-25) the whole document	1-15
X	WO 00 01821 A (INCYTE PHARMA INC ;PATTERSON CHANDRA (US); CORLEY NEIL C (US); YUE) 13 January 2000 (2000-01-13) page 67; claim 7; table 1	1, 2, 9, 15
A	WO 99 34017 A (ABBOTT LAB) 8 July 1999 (1999-07-08) the whole document	1-15
A	US 5 939 265 A (ROBERTS-RAPP LISA ET AL) 17 August 1999 (1999-08-17) the whole document	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  23 May 2002		Date of mailing of the international search report  29/05/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Reuter, U

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210**

## Continuation of Box I.1

Although claims 10 and 11 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 12-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 01/05674

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9960160	A	25-11-1999	CA	2328138 A1	25-11-1999
			EP	1082459 A1	14-03-2001
			WO	9960160 A1	25-11-1999
WO 0001821	A	13-01-2000	AU	4857999 A	24-01-2000
			EP	1092026 A2	18-04-2001
			WO	0001821 A2	13-01-2000
WO 9934017	A	08-07-1999	CA	2316017 A1	08-07-1999
			EP	1042506 A1	11-10-2000
			WO	9934017 A1	08-07-1999
			US	2002045165 A1	18-04-2002
US 5939265	A	17-08-1999	WO	9820143 A1	14-05-1998

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト'(参考)
A 6 1 P 11/00		A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 H 0 4 5
35/00		C 0 7 K 16/32	
37/04		C 1 2 Q 1/68	A
43/00	1 1 1	G 0 1 N 33/15	Z
C 0 7 K 16/32		33/50	Z
C 1 2 Q 1/68		33/53	M
G 0 1 N 33/15		33/566	
33/50		33/574	A
33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		A 6 1 K 49/02	A
33/574		37/02	

(72)発明者 スン, ヨンミン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
 95128、サン ホセ、エス・ウィンチェス  
 ター ブルバード 869、アパートメント  
 260

(72)発明者 マチーナ, ロベルト アー.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
 95136、サン ホセ、クレッセンド アベ  
 ニュー 4118

F タ-ム(参考) 2G045 AA26 AA29 AA40 BA13 BB03  
 BB20 BB24 CA25 CA26 CB01  
 CB03 CB07 CB17 CB21 DA12  
 DA13 DA14 DA36 DA78 FB02  
 FB03 FB04 FB05 FB07  
 4B024 AA01 AA12 BA36 CA04 DA02  
 EA02 FA02 GA11 HA17  
 4B063 QA19 QQ58 QR32 QR55 QS25  
 QS34  
 4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA21  
 BA22 BA23 CA25 DC50 NA14  
 ZA592 ZB262 ZC022  
 4C085 AA03 BB11 HH03 KA03 KA28  
 KA29 LL09 LL18  
 4H045 AA11 AA30 CA41 EA28 EA51  
 FA74

专利名称(译)	肺癌特异性基因诊断，监测，分期，成像和治疗肺癌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003525599A</a>	公开(公告)日	2003-09-02
申请号	JP2001559891	申请日	2001-02-20
申请(专利权)人(译)	Diadokusasu公司		
[标]发明人	チェンセイユ スンヨンミン マチーナロベルトアー		
发明人	チェン,セイ-ユ スン,ヨンミン マチーナ,ロベルト アー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61K49/00 A61K51/00 A61P11/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/32 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K49/0008 A61P11/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/136		
FI分类号	A61K39/00.H A61K45/00 A61P11/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00.111 C07K16/32 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A C12N15/00.ZNA.A A61K49/02.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB05 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA25 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/HH03 4C085/KA03 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/LL09 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/183188 2000-02-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及LSG多肽，编码该多肽的多核苷酸，特别是通过表达该多核苷酸来生产上述多肽的方法，以及上述多肽的激动剂和拮抗剂。本发明进一步涉及利用这样的多核苷酸，多肽，激动剂和拮抗剂进行具有与发现，诊断和临床技术有关的的部分的应用的方法。

組織	正常
脳	0
心臓	0
腎臓	0
肝臓	11
肺	10587
乳腺	19
筋肉	3
前立腺	56
小腸	0
精巣	61
胸腺	1
子宮	29