

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500833

(P2005-500833A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	G 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	4 B O 6 3
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C O 7 6
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 370 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-507309 (P2003-507309)	(71) 出願人	504000650
(86) (22) 出願日	平成14年6月19日 (2002.6.19)		ブアズーボ・アンパルトセルスカブ
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月25日 (2003.12.25)		B u a d b o A p S
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/003534		デンマーク、デーコーー2450コペンハーゲン・エスヴェ、バーデンハヴンスギャーゼ12番、マーコダン・アクティーゼルスカブ内
(87) 国際公開番号	W02003/000928		
(87) 国際公開日	平成15年1月3日 (2003.1.3)	(74) 代理人	100068526
(31) 優先権主張番号	PA 2001 00992		弁理士 田村 恭生
(32) 優先日	平成13年6月25日 (2001.6.25)	(74) 代理人	100098925
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 上田 敏夫
(31) 優先権主張番号	60/301,818	(74) 代理人	100126778
(32) 優先日	平成13年7月2日 (2001.7.2)		弁理士 品川 永敏
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍学薬物の革新

(57) 【要約】

本発明は、非悪性細胞と比較して癌細胞の細胞表面で異なったレベルで発現される分子を同定する方法、並びに、癌治療のための治療用遺伝子の運搬および発現のために単独でまたは組み合わせて使用する癌特異的プロモーターを同定する方法に関する。本発明はさらに、本発明方法により同定される細胞表面分子にターゲッティングするターゲッティング複合体に関する。本発明の態様では、該ターゲッティング複合体は本発明方法により同定されるプロモーターを含む。加えて、本発明は、細胞表面分子のための結合パートナーを同定する方法、および該結合パートナー自体に関する。該ターゲッティング複合体を使用する治療方法、および薬物製造のための該ターゲッティング複合体の使用もまた本発明で開示する。さらに、本発明はワクチン製造のための該細胞表面分子またはそのフラグメントの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

正常細胞と比較して悪性細胞中で異なったレベルで発現する多数の細胞表面分子を同定するための方法であって、

i) CPH 54 A、CPH 54 B、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DM S 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI H69、NCI N417、MAR H24、MAR 86 MI、SHP-77、NCI-H2171、NCI-H2195、NCI-H2196、NCI-H2198、NCI-H2227、NCI-H2286、NCI-H2330、NCI-H735、NCI-H1339、NCI-H1963、NCI-H2107、NCI-H2108、NCI-H1304、NCI-H1341、NCI-H1417、NCI-H1436、NCI-H1522、NCI-H1618、NCI-H1672、NCI-H1694、NCI-H1836、NCI-H1870、NCI-H1876、NCI-H1882、NCI-H1926、NCI-H1930、NCI-H1994、NCI-H2029、NCI-H2059、NCI-H2066、NCI-H2081、NCI-H2141、NCI-H2111、NCI-H220、NCI-H250、NCI-H524、NCI-H592、NCI-H711、NCI-H719、NCI-H740、NCI-H748、NCI-H774、NCI-H841、NCI-H847、NCI-H865、NCI-H1048、NCI-H1059、NCI-H1092、NCI-H1105、NCI-H1184、NCI-H1238、NCI-H1284、NCI-H1688、NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H660、NCI-H889、NCI-H60、NCI-H196、NCI-H446、NCI-H209、NCI-H146、NCI-H82、NCI-H460、NCI-H345、NCI-H510A、NCI-128、NCI-446、SW 1271からなる群から選ばれる少なくとも3個の悪性セルラインを提供し；

ii) 肝臓、心臓、腎臓、肺、副腎、結腸、膀胱、小腸、脾臓、骨格筋、気管、前立腺、胎盤、唾液腺、精巣、白血球、脳、脂肪組織、膀胱、乳房、頸、食道、喉頭、卵巣、直腸、皮膚、脊髄、胃、胸腺、甲状腺および子宮からなる群から選ばれる正常組織から誘導される少なくとも3個の全RNA試料を提供し；

iii) 工程 i) に記載のセルラインと工程 ii) に記載の組織試料における mRNA の発現を比較し；

iv) 核酸配列を同定し、ここで、

a) i) に記載の1またはそれ以上のセルライン中で発現される mRNA の量と ii) に記載の1またはそれ以上の組織で発現される mRNA の量の間には差違があり；および/または、

b) i) に記載の少なくとも2個のセルライン中で発現される mRNA の量には本質上差違がなく；および/または、

c) ii) に記載の少なくとも2個の組織試料中で発現される mRNA の量には本質上差違がなく；および、

v) iv) に記載の核酸配列の中から、可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列を選択する、

という工程を含む、該方法。

【請求項 2】

工程 i) は少なくとも5個の悪性セルラインを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

工程 ii) は、肺、肝臓、心臓および腎臓から誘導される組織試料を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

工程 iii) は、少なくとも5個の全RNA試料を提供することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

工程 iii) は、

i) 悪性セルライン由来の mRNA を含む RNA を単離し；

ii) 該 RNA から cDNA 個体群を調製し（ここで、1つのcDNA個体群は1つのセルラインまたは1つの組織試料から単離したRNAから調製する）；

iii) 各cDNA個体群を検出可能な標識で標識し；

iv) 公知の核酸配列のアレイを固定化した固体支持体を提供し；

v) 各cDNA個体群を、ハイブリダイゼーション可能な条件下で固体支持体と一緒にイ

10

20

30

40

50

ンキュベートし；

v i) 固体支持体上の検出可能標識を検出する；

という工程を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

検出可能標識は蛍光標識である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

固体支持体はガラスプレートである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも 1 0 0 0 個の公知の核酸配列を固体支持体に固定化する、請求項 5 記載の方法。

10

【請求項 9】

工程 i v)、a) における差違は、少なくとも 2 倍の m R N A の発現である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 0】

工程 i v)、a) における差違は、原則的に無限数倍である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 1】

工程 i v)、b) は、少なくとも 3 個の悪性セルラインを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 2】

工程 i v)、c) は、少なくとも 3 個の R N A 試料を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

工程 v) に記載の可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列は、PubMed (NCBI)、Nucleotide (NCBI)、Protein (NCBI)、Structure (NCBI)、OMIM (NCBI) および Locu sLink (NCBI) からなる群から選ばれる商業的に入手可能なデータベースにおいて入手可能な情報に従って選ばれる、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 1 4】

工程 v) に記載の可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列は、少なくとも 2 0 % の配列一致が存在する、公知の細胞表面分子との配列相同性に従って選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

工程 v) に記載の可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列は、公知の細胞表面分子内に含まれるドメインとの配列相同性に従って選ばれる、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 1 6】

工程 v) に記載の可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列は、疎水性領域および可能性あるグリコシル化部位からなる群から選ばれるドメインを含む可能性ある細胞表面分子を選ばれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 7】

第 1 の核酸配列に機能的に連結した第 2 の核酸配列の発現を指令することができる第 1 の核酸配列を同定する方法であって、該発現のレベルは正常細胞と比較して悪性細胞中で異なり、該方法は、

i) CPH 54 A、CPH 54 B、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DM S 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI H69、NCI N417、MAR H24、MAR 86 MI、SHP-77、NCI-H2171、NCI-H2195、NCI-H2196、NCI-H2198、NCI-H2227、NCI-H2286、NCI-H2330、NCI-H735、NCI-H1339、NCI-H1963、NCI-H2107、NCI-H2 108、NCI-H1304、NCI-H1341、NCI-H1417、NCI-H1436、NCI-H1522、NCI-H1618、NCI-H1672、NCI-H1694、NCI-H1836、NCI-H1870、NCI-H1876、NCI-H1882、NCI-H1926、NCI-H1930、N CI-H1994、NCI-H2029、NCI-H2059、NCI-H2066、NCI-H2081、NCI-H2141、NCI-H211、NCI-H 220、NCI-H250、NCI-H524、NCI-H592、NCI-H711、NCI-H719、NCI-H740、NCI-H748、NCI-H 774、NCI-H841、NCI-H847、NCI-H865、NCI-H1048、NCI-H1059、NCI-H1092、NCI-H1105、N CI-H1184、NCI-H1238、NCI-H1284、NCI-H1688、NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H66 0、NCI-H889、NCI-H60、NCI-H196、NCI-H446、NCI-H209、NCI-H146、NCI-H82、NCI-H460

40

50

、NCI-H345、NCI-H510A、NCI-128、NCI-446、SW 1271からなる群から選ばれる少なくとも3個の悪性セルラインを提供し；

i i) 肝臓、心臓、腎臓、肺、副腎、結腸、膀胱、小腸、脾臓、骨格筋、気管、前立腺、胎盤、唾液腺、精巣、白血球、脳、脂肪組織、膀胱、乳房、頸、食道、喉頭、卵巣、直腸、皮膚、脊髄、胃、胸腺、甲状腺および子宮からなる群由来の正常な組織試料から選ばれる少なくとも3個のRNA試料を提供し；

i i i) i) に記載のセルラインと i i) に記載の組織試料中での mRNA の発現を比較し；

i v) 第2の核酸配列を同定し、ここで、

a) i) に記載の1またはそれ以上のセルライン中で発現される mRNA の量と i i) に記載の1またはそれ以上の組織中で発現される mRNA の量の間には差違があり；および/または、 10

b) i) に記載の少なくとも2個のセルライン中で発現される mRNA の量には本質上差違がなく；および/または、

c) i i) に記載の少なくとも2個の組織試料中で発現される mRNA の量には本質上相違がなく；

v) 工程 i v) で同定した第2のヌクレオチド配列と機能的に連結する第1の核酸配列を同定する、

という工程を含む、該方法。

【請求項18】

工程 i) は少なくとも5個の悪性セルラインを含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】

工程 i i) は、肺、肝臓、心臓および腎臓からなる群から誘導される組織試料を含む、請求項17記載の方法。

【請求項20】

工程 i i) は、少なくとも5個のRNA試料を提供することを含む、請求項17記載の方法。

【請求項21】

工程 i i i) は、

i) 悪性セルライン由来の mRNA を含む RNA を単離し； 30

i i) 該 RNA から cDNA 個体群を調製し（ここで、1つのcDNA個体群は1つのセルラインまたは1つの組織試料から単離したRNAから調製する）；

i i i) 各 cDNA 個体群を検出可能な標識で標識し；

i v) 公知の核酸配列のアレイを固定化した固体支持体を提供し；

v) 各 cDNA 個体群を、ハイブリダイゼーション可能な条件下で固体支持体と一緒にインキュベートし；

v i) 固体支持体上の検出可能標識を検出する；

という工程を含む、請求項17記載の方法。

【請求項22】

検出可能標識は蛍光標識である、請求項21記載の方法。

【請求項23】

固体支持体はガラスプレートである、請求項21記載の方法。

【請求項24】

少なくとも1000個の公知の核酸配列を固体支持体に固定化する、請求項21記載の方法。

【請求項25】

工程 i v)、a) における差違は、少なくとも2倍の mRNA の発現の差違である、請求項17記載の方法。

【請求項26】

工程 i v)、a) における差違は、原則的に無限数倍である、請求項17記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

工程 i v)、b) は、少なくとも 3 個の悪性セルラインを含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 28】

工程 i v)、c) は、少なくとも 3 個の組織試料を含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 29】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンの上流に少なくとも 15,000 塩基対を含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 30】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンの上流に少なくとも 5,000 塩基対を含む、請求項 17 記載の方法。 10

【請求項 31】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンの上流に 5,000 までの塩基対を含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 32】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンの上流にイントロン配列を含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 33】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンの下流にイントロン配列を含む、請求項 17 記載の方法。 20

【請求項 34】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンから 10,000 塩基対以上上流または下流に位置するエンハンサー配列を含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 35】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンから上流に 5,000 までの塩基対を含み、そこから少なくとも 10 の内部 bp を除去する、請求項 17 記載の方法。

【請求項 36】

第 2 核酸配列に機能的に連結したいずれかの第 1 核酸配列は、染色体上の該第 2 核酸配列の翻訳開始コドンから上流に 5,000 までの塩基対を含み、そこから少なくとも 1 個のサイレンサーを除去する、請求項 17 記載の方法。 30

【請求項 37】

i) 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法によって同定される細胞表面分子と結合することができる結合パートナー（ここで、該細胞表面分子は GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、NCA M1、NPTXR、LRP8 および CHRNA5 からなる群から選ばれる）；および、

i i) 生物学的反応性の種；
を含有する、ターゲティング複合体。

【請求項 38】

細胞表面分子は GRIA2 を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 37 記載のターゲティング複合体。 40

【請求項 39】

細胞表面分子は GRM8 を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 37 記載のターゲティング複合体。

【請求項 40】

細胞表面分子は ITGAV を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 37 記載のターゲティング複合体。

【請求項 41】

細胞表面分子は ITGAE を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 37 記載のターゲティング複合体。

【請求項 4 2】

結合パートナーは、L-グルタミン酸塩、カイニン酸塩、5-(プロモメチル)-4-イソキサゾールプロピオン酸、グルタミン酸塩の類似体、置換キノキサリン2,3ジオン類、GYKI52466、5-I-ウィラージン、5-F-ウィラージン、AMPA ((RS)- -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸) に対するアゴニストおよびアンタゴニストリガンド、NBQX、CNQX、DNQX、GYKI52466、6-クロロキヌレン酸、JSTX、L-APA、L-SOP、ACPT、(R,S)-PPG、CPPG、MAP4、(S)-3,4-DCPG、ピトロネクチン、シタクチン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、MMP-2、オステオポンチン、プロトロンビン、トロンボスポンジン、フォン・ビルブランド因子、L1CAMの組換えフラグメント、サルモシン、E-カドヘリンおよびそのペプチド (ペプチド：NRDKETKVを包含する)、NCAM1ドメインIgI+II、NCAM1ドメインIgIIIおよびそのペプチド、ペプチドC3：ASKKPKRNIKA、D3：AKKERQRKDTU、D4：ARALNWGAKP、モノクローナル抗体123C3、NPTX1、NPTX2、タイボキシン、TCBP49、オキシノル、ApoE2、ApoE3、ApoE4、ApoE由来のペプチド (E₁₄₁ ; -155 ; LRKLRKRLRDADDLおよびそのタンデムE_(141 ; -155)2 ; LRKLRKRLRDADDL-LRKLRKRL RDADDL) リーリン、ニコチン、アセチルコリン、 -ブンガロトキシン、カルバコール、および該表面分子のいずれかに対する特異的抗体からなる群から選ばれる、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。

10

【請求項 4 3】

細胞表面分子は該ターゲティング複合体をインターナライズすることができる、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 4 4】

生物学的反応性の種は核酸を含む、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。

20

【請求項 4 5】

核酸は、発現シグナルを含有する第 1 の核酸配列と機能的に連結した第 2 の核酸を含む、請求項 4 4 に記載のターゲティング複合体。

【請求項 4 6】

i) 請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法によって同定される細胞表面分子と結合することができる結合パートナー (ここで、該細胞表面分子は該ターゲティング複合体をインターナライズすることができる) ; および、

ii) 発現シグナルを含有する第 1 の核酸配列と機能的に連結した第 2 の核酸を含有する核酸配列を含む生物学的反応性の種 (ここで、該第 1 の核酸配列は請求項 1 7 ~ 3 6 のいずれか記載の方法によって同定される) ;

30

を含有する、ターゲティング複合体。

【請求項 4 7】

細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8およびCHRNA5からなる群から選ばれる細胞表面分子を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 4 6 記載のターゲティング複合体。

【請求項 4 8】

細胞表面分子は、NCAM1を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 4 6 記載のターゲティング複合体。

【請求項 4 9】

細胞表面分子は、NPTXRを含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 4 6 記載のターゲティング複合体。

40

【請求項 5 0】

細胞表面分子は、LRP8を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 4 6 記載のターゲティング複合体。

【請求項 5 1】

細胞表面分子は、CHRNA5を含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項 4 6 記載のターゲティング複合体。

【請求項 5 2】

結合パートナーは、NCAM1ドメインIgI+II、NCAM1ドメインIgIIIおよびそのペプチド、ペプチドC3：ASKKPKRNIKA、D3：AKKERQRKDTU、D4：ARALNWGAKP、モノクローナル抗体123C3

50

、NPTX1、NPTX2、タイボキシン、TCBP49、オキシノル、ApoE2、ApoE3、ApoE4、ApoE由来のペプチド ($E_{141;-155}$; LRKLRKRLLRDADDLおよびそのタンデム $E_{(141;-155)}_2$; LRKLRKRLLRDADDL-LRKLRKRLLRDADDL) リーリン、ニコチン、アセチルコリン、 α -ブンガロトキシン、カルバコール、および該表面分子に対する特異的抗体からなる群から選ばれる、請求項46記載のターゲティング複合体。

【請求項53】

第1の核酸配列は、非悪性細胞と比較して悪性細胞中でのより高レベルの第2の核酸配列の発現を指令する発現シグナルを含む、請求項46記載のターゲティング複合体。

【請求項54】

第1の核酸配列は、非悪性細胞と比較して悪性細胞中でのより低レベルの第2の核酸配列の発現を指令する発現シグナルを含む、請求項46記載のターゲティング複合体。 10

【請求項55】

第1の核酸配列は、pro221、pro210、pro71、pro41、pro30、pro2、pro209、pro14、pro4、pro8、pro246、pro16、pro27、pro5、pro49、pro19、pro140、pro139、pro207、pro81、pro273およびpro362からなる群から選ばれる、請求項46または47のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項56】

第1の核酸配列は、pro221、pro210、pro71、pro41、pro30、pro2、pro209、pro14、pro4、pro8、pro246、pro16、pro27、pro5、pro49、pro19、pro140、pro139、pro207、pro81、pro273およびpro362からなる群から選ばれるヌクレオチド配列のフラグメントを含む、請求項46または47のいずれか記載のターゲティング複合体。 20

【請求項57】

第1の核酸配列は、pro221、pro210、pro71、pro41、pro30、pro2、pro209、pro14、pro4、pro8、pro246、pro16、pro27、pro5、pro49、pro19、pro140、pro139、pro207、pro81、pro273およびpro362からなる群から選ばれるヌクレオチド配列の1つ以上のフラグメントを含む、請求項46または47のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項58】

第1の核酸配列は、pro221またはその1つ以上のフラグメントを含む、請求項46または47のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項59】

第1の核酸配列は、pro220またはその1つ以上のフラグメントを含む、請求項46または47のいずれか記載のターゲティング複合体。 30

【請求項60】

第1の核酸配列は、pro71またはその1つ以上のフラグメントを含む、請求項46または47のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項61】

第1の核酸配列は更にそれと天然状態で結合しない核酸配列を含む、請求項46記載のターゲティング複合体。

【請求項62】

天然状態で結合しない核酸配列はステロイドホルモンレセプター結合部位である、請求項61記載のターゲティング複合体。 40

【請求項63】

第2の核酸配列は治療タンパク質をコードしている、請求項44または46のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項64】

第2の核酸配列は、アンチセンスRNAまたはアンチセンスRNAの一部をコードしているかまたは含む、請求項44または46のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項65】

第2の核酸配列はリボザイムをコードしているかまたは含む、請求項44または46のいずれか記載のターゲティング複合体。 50

【請求項 6 6】

アンチセンスRNAまたはリボザイムは、オンコジーンまたはプロトオンコジーンのRNAをターゲットとする、請求項 4 4 または 4 6 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 6 7】

オンコジーンまたはプロトオンコジーンは、Ras、Raf、Myc、Syn、Pim、BMI-1、FOP、Sis、KGF、Fms、Flg、Neu、Trk、Kit、Met、Src、Fyn、Mas、Fes/Fps、Tre、Mer、ABL、BCL3、int-2、Cym、Ets、Elk、RhoA、Ski、Wnt-5a、Spi-1、Rap2、p55およびc-tyrからなる群から選ばれる、請求項 6 6 に記載のターゲティング複合体。

【請求項 6 8】

複合体は更に保護的キャッピングを含み、ここで該保護的キャッピングは第 1 のおよび / または第 2 の核酸配列と結合する核酸配列からなる、請求項 3 7 または 4 6 のいずれか記載のターゲティング複合体。 10

【請求項 6 9】

保護的キャッピングは修飾ヌクレオチドを含む、請求項 6 8 記載のターゲティング複合体。

【請求項 7 0】

生物学的反応性の種は毒素である、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 7 1】

毒素は、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、ストレプトゾトシンまたはコレラ毒素からなる群から選ばれる、請求項 7 0 記載のターゲティング複合体。 20

【請求項 7 2】

生物学的反応性の種はアポトーシスのインジューサーである、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 7 3】

アポトーシスのインジューサーは、レチン酸、A23187、オカダ酸、ピューロマイシン、スタウロスポリン、タブシガルジン、アクチノマイシンD、カンプトテシン、シクロヘキシミド、デキサメタゾン、エトポシドおよびグルココルチノイドからなる群から選ばれる、請求項 7 2 記載のターゲティング複合体。

【請求項 7 4】

生物学的反応性の種は放射性同位元素である、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。 30

【請求項 7 5】

生物学的反応性の種は静細胞剤である、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 7 6】

生物学的反応性の種はポリペプチドを含むかまたはそれから構成される、請求項 3 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 7 7】

ポリペプチドは治療タンパク質である、請求項 7 6 記載のターゲティング複合体。

【請求項 7 8】

治療タンパク質は腫瘍抑制因子である、請求項 6 3 または 7 7 のいずれか記載のターゲティング複合体。 40

【請求項 7 9】

治療タンパク質はアポトーシスのインジューサーである、請求項 6 3 または 7 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 0】

治療タンパク質は、細胞周期を停止するのに寄与することができるタンパク質である、請求項 6 3 または 7 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 1】

治療タンパク質は毒性薬物から細胞を防止することができるタンパク質である、請求項 6 3 または 7 7 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 2】

治療タンパク質は毒性物質の製造を触媒することができるタンパク質である、請求項 6 3 または 7 7 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 3】

治療タンパク質は p 5 3 である、請求項 6 3 または 7 7 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 4】

治療タンパク質は、p73、p16、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-1、MEN-II、BRCA1、VHL、FCC、MCC、MSH2、PTCH、DPCH、TSC2、CDKN2AおよびARFからなる群から選ばれる腫瘍抑制因子である、請求項 6 3 または 7 7 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 5】

治療タンパク質は、Fas/Apo1、TNF、TRAIL、TGF- α 、カスパーゼ、Bak、Bax、Bid、BikおよびGZMBからなる群から選ばれるアポトーシスのインジューサーである、請求項 6 3 または 7 7 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 6】

1 個、または 1 個よりも多い、例えば 2 個、例えば 3 個、例えば 4 個の治療タンパク質をコードしている、1 個以上の第 1 のヌクレオチド配列を含む、請求項 6 3 または 7 7 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 7】

複合体は更に、核ターゲティングシグナルを含む、請求項 3 7 ~ 8 6 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 8】

核ターゲティングシグナルはオリゴペプチドである、請求項 8 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 8 9】

核ターゲティングシグナルは、サルウイルス 4 0 ラージ腫瘍抗原の核局在化シグナルである、請求項 8 7 記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 0】

複合体は更に、エンドソーム溶解性薬物を含む、請求項 3 7 ~ 8 9 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 1】

複合体は更に、ポリエチレンイミン(P E I)、複製欠損ウイルスおよびウイルスタンパク質キャプシドからなる群から選ばれるエンドソーム溶解性薬物を含む、請求項 9 0 に記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 2】

ターゲティング複合体は更に、クロロキニンを含む、請求項 3 7 ~ 8 9 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 3】

両方のエンドソーム溶解性薬物は膜不安定化ポリペプチドを含む、請求項 9 0 記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 4】

結合パートナーは、該結合パートナーと共有的に結合する核酸結合性薬物を介して生物学的反応性の種と結合する、請求項 3 7 ~ 9 3 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 5】

核酸結合性薬物は、ポリ-L-リシン(P L L)、スペラミン、スペラジミンおよびヒストンタンパク質からなる群から選ばれる、請求項 9 4 記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 6】

核酸結合性薬物は 1 5 ~ 1 0 0 0 個の残基を含有する P L L である、請求項 9 4 記載のターゲティング複合体。

【請求項 9 7】

結合パートナーは、特異的な相互作用性成分の対を介して間接的に該生物学的反応性の種

10

20

30

40

50

と結合し、ここで1成分は該生物学的反応性な種と共有結合し、そして第2成分は該結合パートナーと共有結合する、請求項37～93のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項98】

相互作用性成分はビオチンおよびストレプトアビジンである、請求項97記載のターゲティング複合体。

【請求項99】

請求項1～16のいずれか記載に従って同定される細胞表面分子の薬物標的としての使用であって、該薬物標的は結合パートナーと結合することができ、そして該結合パートナーを該細胞表面分子を発現する細胞中にインターナライズすることができる、該使用。

【請求項100】

細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる、請求項99記載の使用。

【請求項101】

新規な薬物標的を同定するための方法であって、該方法は、

i) 請求項1～16のいずれか記載の方法によって同定される細胞表面分子を提供し(ここで、該細胞表面分子はTNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる) ; および、

ii) 該細胞表面分子と結合することができる結合パートナーを同定しおよび/または製造する、

工程を含む、該方法。

【請求項102】

結合パートナーは、前悪性および/または悪性の病気の処置のための医薬組成物中で使用することができる、請求項101記載の方法。

【請求項103】

結合パートナーを、

i) 動物を、該細胞表面分子または該細胞表面分子の一部で免疫化させ ; および

ii) 該動物から抗体を得たり ; または、

iii) 該動物から抗体を産生する細胞を得たりおよび該細胞から抗体を得る ;

工程によって製造される、請求項101記載の方法。

【請求項104】

結合パートナーは、ポリペプチドおよび/またはオリゴペプチドを発現するライブラリーから選ばれる、請求項101記載の方法。

【請求項105】

結合パートナーは、ポリペプチドおよび/またはオリゴペプチドを発現する合成コンピナトリアルライブラリーから選ばれる、請求項101記載の方法。

【請求項106】

結合パートナーは、抗体のファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって同定される、請求項101記載の方法。

【請求項107】

結合パートナーは、ヒト抗体のファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって同定される、請求項101記載の方法。

【請求項108】

結合パートナーは、小さい化学的化合物から選ばれる、請求項101記載の方法。

【請求項109】

細胞表面分子と結合することができる、単離および/または精製された特異的な結合パートナーであって、正常な細胞と比較して悪性細胞中で異なったレベルで発現し、そして請求項101～108のいずれか記載の方法によって同定される、該結合パートナー。

【請求項110】

結合パートナーは、ポリペプチドを含むかまたはそれから本質的に構成される、請求項109記載の結合パートナー。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 1】

結合パートナーは、抗体または抗体のフラグメントである、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

【請求項 1 1 2】

結合パートナーは、ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

【請求項 1 1 3】

結合パートナーは、モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

【請求項 1 1 4】

結合パートナーは、マウスモノクローナル抗体である、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

10

【請求項 1 1 5】

結合パートナーは、ヒト化抗体である、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

【請求項 1 1 6】

結合パートナーは、ファージディスプレイライブラリーから同定されるヒト抗体である、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

【請求項 1 1 7】

抗体は、細胞表面分子の細胞外部分と相互作用することができる、請求項 1 1 1 ~ 1 1 6 のいずれか記載の結合パートナー。

20

【請求項 1 1 8】

抗体は、細胞表面分子の細胞外部分の翻訳後修飾と相互作用することができる、請求項 1 1 1 ~ 1 1 6 のいずれか記載の結合パートナー。

【請求項 1 1 9】

抗体は、細胞表面分子との結合時にインターナライズすることができる、請求項 1 1 1 ~ 1 1 8 のいずれか記載の結合パートナー。

【請求項 1 2 0】

結合パートナーは、細胞表面分子についての天然に存在するリガンドである、請求項 1 0 9 に記載の結合パートナー。

【請求項 1 2 1】

結合パートナーは、細胞表面分子についての組み換え産生されたりガンドである、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

30

【請求項 1 2 2】

結合パートナーはウイルスタンパク質である、請求項 1 0 9 に記載の結合パートナー。

【請求項 1 2 3】

結合パートナーは、ウイルスクャプシドタンパク質である、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

【請求項 1 2 4】

結合パートナーは組み換え産生され、そしてウイルスクャプシドタンパク質配列を含む、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

40

【請求項 1 2 5】

結合パートナーは小さい化学的化合物である、請求項 1 0 9 記載の結合パートナー。

【請求項 1 2 6】

結合パートナーは請求項 1 0 9 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の結合パートナーである、請求項 3 7 ~ 9 8 のいずれか記載のターゲティング複合体。

【請求項 1 2 7】

工程：

- i) 請求項 1 0 9 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の結合パートナーを提供し；および、
 - i i) 該結合パートナーと結合することができる可能性のある薬物標的を同定する；
- ことを含む、新規な薬物標的を同定するための方法。

50

【請求項 1 2 8】

薬物標的はポリペプチドを含み、そして正常な細胞と比較して悪性細胞中で異なったレベルで発現する細胞表面分子である、請求項 1 2 7 記載の方法。

【請求項 1 2 9】

請求項 1 2 7 ~ 1 2 8 のいずれか記載の方法によって同定される、薬物標的。

【請求項 1 3 0】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに従って同定された細胞表面分子、および請求項 3 7 ~ 9 8 のいずれかに記載のターゲティング複合体を含有する、複合体。

【請求項 1 3 1】

細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる、請求項 1 3 0 記載の複合体。 10

【請求項 1 3 2】

請求項 3 7 ~ 9 8 記載のターゲティング複合体の製造のための、請求項 1 0 9 ~ 1 2 5 のいずれか記載の結合パートナーの使用。

【請求項 1 3 3】

請求項 3 7 ~ 9 8 のいずれか記載のターゲティング複合体を、医薬的に許容し得る担体と一緒に含有する、医薬組成物。

【請求項 1 3 4】

処置が必要な個体における前悪性および/または悪性の病気の処置方法であって、該個体に請求項 3 7 ~ 9 8 のいずれか記載のターゲティング複合体の医薬的に有効な量を投与することを含む、該方法。 20

【請求項 1 3 5】

処置は軽減処置である、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 3 6】

処置は治療学的処置である、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 3 7】

処置は予防学的処置である、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 3 8】

病気は、メラノーマ、脳腫、神経芽細胞腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、頸癌、子宮癌、卵巣癌、白血病、大腸癌、直腸癌および膀胱癌からなる群から選ばれる癌である、請求項 1 3 4 記載の方法。 30

【請求項 1 3 9】

病気は、小細胞肺癌 (SCLC) および非小細胞肺癌 (NSCLC) からなる群から選ばれる、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 0】

病気は小細胞肺癌である、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 1】

病気は乳癌である、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 2】

臨床的な病気は、グリア芽細胞腫、神経芽細胞腫、星細胞腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、髄芽腫、神経腫、上皮細胞腫、頭蓋咽頭腫、松果体腫、生殖細胞腫瘍およびシュワン細胞腫からなる群から選ばれる脳腫瘍である、請求項 1 3 4 記載の方法。 40

【請求項 1 4 3】

ターゲティング複合体は非経口投与する、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 4】

ターゲティング複合体は静脈内注射によって投与する、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 5】

ターゲティング複合体は、皮下注射によって投与する、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 6】

方法は更に、1つ以上の第2処置を含む、請求項 1 3 4 記載の方法。 50

【請求項 1 4 7】

第2処置は、外科的処置、化学療法、放射線療法、サイトカインを用いる療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法およびレーザー光を用いる処置法からなる群から選ばれる、請求項 1 4 6 記載の方法。

【請求項 1 4 8】

処置が必要な個体における前悪性および/または悪性の病気の処置のための薬物の製造における、請求項 3 7 ~ 9 8 のいずれか記載のターゲティング複合体の使用。

【請求項 1 4 9】

処置は軽減処置である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 0】

処置は治療学的処置である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 1】

処置は予防学的処置である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 2】

病気は、メラノーマ、脳腫、神経芽細胞腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、頸癌、子宮癌、卵巣癌、白血病、大腸癌、直腸癌および膀胱癌からなる群から選ばれる癌である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 3】

病気は、小細胞肺癌 (SCLC) および非小細胞肺癌 (NSCLC) からなる群から選ばれる、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 4】

病気は小細胞肺癌である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 5】

病気は乳癌である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 6】

病気は、グリア芽細胞腫、神経芽細胞腫、星細胞腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、髄芽腫、神経腫、上皮細胞腫、頭蓋咽頭腫、松果体腫、生殖細胞腫瘍およびシュワン細胞腫からなる群から選ばれる脳腫瘍である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 7】

薬物は非経口投与に相当である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 8】

薬物は静脈内注射に相当である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 5 9】

薬物は皮下注射に相当である、請求項 1 4 8 記載の使用。

【請求項 1 6 0】

ワクチンを製造するための、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに従って同定される細胞表面分子の医薬的に有効な量の使用。

【請求項 1 6 1】

ワクチンを製造するための、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに従って同定される細胞表面分子をコードしている核酸配列の医薬的に有効な量の使用。

【請求項 1 6 2】

細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる、請求項 1 6 0 または 1 6 1 のいずれか記載の使用。

【請求項 1 6 3】

ワクチンは更に、細胞表面分子と共有的に結合する非自己抗原を含む、請求項 1 6 0 または 1 6 1 のいずれか記載の使用。

【請求項 1 6 4】

ワクチンは更に、核酸配列と結合する非自己抗原をコードしている第2核酸配列を含む、請求項 1 6 0 または 1 6 1 のいずれか記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 1 6 5】

ワクチンは更に、1 個以上の抗原を含む、請求項 1 6 0 または 1 6 1 のいずれか記載の使用。

【請求項 1 6 6】

ワクチンは更に、アジュバントを含む、請求項 1 6 0 または 1 6 1 のいずれか記載の使用。

【請求項 1 6 7】

ワクチンは、前悪性および/または悪性の病気の軽減処置および/または治療学的処置および/または予防学的処置に相当である、請求項 1 6 0 または 1 6 1 のいずれか記載の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(技術分野)

本発明は、癌細胞の細胞表面上の分子を同定する方法、ならびに、癌治療のための治療用遺伝子の運搬および発現のために単独でまたは組み合わせて使用するための癌特異的プロモーターを同定する方法に関するものである。

【0 0 0 2】

(背景技術)

全癌患者のおよそ半数は、診断時点で播種性疾患を持っている。現在の癌治療はこれらの患者の 5 ~ 7 % を治すに過ぎない。したがって、単独でまたは現存する治療と組み合わせて全身投与できる、より有効な薬品に対する多大な需要がある。故に、癌細胞の有効且つ特異的治療を運搬する遺伝子治療を利用する方法は有望な戦略である。しかしながら、現在までに採用された戦略は限られた成功を収めているに過ぎず、適切な運搬系のさらなる開発が必要とされている。

20

【0 0 0 3】

運搬ベクター

遺伝子治療のための運搬ベクターの選択は重要な問題である。レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルスといったウイルスベクター、および、リボソーム、カチオン脂質またはポリカチオンと複合体形成するといった非ウイルスベクターを包含する多くのベクター系が遺伝子移動に対するそれらの適性について試験されてきた。しかしながら、これらのベクターの全てには特定の利点と限界がある。レトロウイルスは形質導入のために有糸分裂を必要とするが、ゲノムに組み込まれるため、長期の発現を媒介する。アデノウイルスは分裂細胞と非分裂細胞の両者に形質導入するが、エピソームのままであるためそれは一時的なものに過ぎない。ところがアデノウイルスは極めて免疫原性であり、レトロウイルスは人間の補体系によって速やかに不活性化される。レンチウイルスは免疫反応を誘起しないが、免疫不全ウイルスの一員であることから安全性に対する特別な配慮が必要である。ウイルスベクターは製造が困難で且つ高価であり、治療用遺伝子の挿入サイズが限られており、そして安全性の検討を数多く行わなければならないにも拘わらず、これまで全プロトコルの 75 % 以上がウイルスベクターを使用してきた。故に、アデノウイルスベクターのために使用するプロトコルの大多数は、このウイルスの局所力価を増大させそして免疫原性反応を回避するために治療用遺伝子を局所運搬(腫瘍内への注射)によって投与してきたが、最も高い力価の系であっても局所の腫瘍を治癒するには未だ充分でなかった。ウイルスベクター系の主たる不都合は、これらの取り込みが非特異的であり、癌細胞にターゲティングされないことである。しかしながら、アデノウイルスは運搬の効率性の故に依然として好ましいベクターであるため、免疫反応を低下させそして該ウイルスを特定細胞にターゲティングする方法を開発中である。一方、免疫原性がより低く、製造がより容易であり、そしてウイルスベクターの安全性を考慮する必要のないリボソームおよびポリカチオン複合体は、トランスフェクション効率がウイルス形質導入よりずっと低く、しかも細胞特異性を欠く。しかしながら、ポリカチオンは運搬された DNA の電荷を圧縮しおよび中和する能力を有し、そして PEI 複合体は血液系に

30

40

50

において比較的安定であるように見受けられる (Goulaらによる1998; Mountain、2000における総説)。

【0004】

治療の高い特異性を保証し望ましくない副作用を制限するため、問題の治療用遺伝子を効率的に高い特異性をもって癌細胞にターゲッティングおよび運搬するベクターまたは媒体を設計することが重要である。ところが下に記載するようにこれは多要素ベクターの組み立てを含んでいる。

【0005】

レセプターターゲッティング

リガンドまたは抗体が癌細胞表面に結合することによりインターナライズし得る機能的レセプターまたはその他の細胞表面分子を、該細胞への遺伝子運搬のターゲッティングに使用できる。レセプターのリガンドに接合したDNAによる、レセプターターゲッティングされた遺伝子運搬は有望なアプローチを提供する。ターゲッティングされた遺伝子運搬の主たる利点は、レセプターターゲッティングがウイルス無しで遂行でき、よって遺伝子治療の現行戦略に存在する障害の多くを取り除いていることである。レセプターターゲッティングを用いる癌細胞への遺伝子運搬の成功が、表皮成長因子 (CristanoおよびRothによる1996、Frederiksenらによる2000)、葉酸塩 (Gottschalkらによる1994)、トランスフェリン (Wagnerらによる1990) のレセプターを包含する様々な異なる表面レセプターについて報告されている。上皮成長因子レセプターに関して立証されているように、特異的レセプターの高度発現が常に効率的なレセプター媒介取り込みの必要条件である訳ではない (Frederiksenらによる2000)。しかしながら、癌細胞によって発現されるレセプターの多くは正常細胞によってもある程度発現されており、これは正常細胞もまたしばしばターゲッティングされていることを意味する。この問題は、治療用遺伝子の発現または性質に特異性のためのさらなる要件が必要であることを強調する。

【0006】

分子接合体

ターゲッティング遺伝子治療のためには、インターナライズされるリガンド、および治療用遺伝子を発現するDNAを、レセプター媒介取り込みのために物理的に結合させることが必須である。カチオン性ポリマー、例えばポリ-L-リジン (Frederiksenらによる2000) またはポリエチレンイミン (PEI) (Kircheisらによる1997) (polyplexes) をリガンドおよびDNAと結合させることにより、ターゲッティングされたDNA分子接合体の非ウイルス合成ベクターを製造するための幾つかの方法が利用されている。幾つかの分子接合体について遺伝子ターゲッティングの成功が報告されている。このリガンドをポリカチオンに共有結合させるか、または、ビオチニル化リガンドとポリリジンをストレプトアビジンを介して複合体形成させてDNAとの縮合 (condensed) 接合体を形成させるが、これは該リガンドのレセプターによってインターナライズされる。ウイルスの媒介する移動よりこれらの系が有利な点の1つは、DNAの大きさの制限が無いことである。加えてPEI複合体は肺の毛細管障壁を通過できるようであり、その事が該化合物を分子接合体のための1物質としている。

【0007】

分子接合体のエンドソーム放出

レセプターによりDNA/リガンド接合体のエンドサイトーシスがなされた後、正常な経路によりDNAの分解と喪失が導かれる。それ故分子接合体中にエンドソーム溶解物質が含まれていることが必須であると判明した。アデノウイルス、複製不全アデノウイルスおよびウイルスキャプシドは、この分子接合体中に含まれる時、全てエンドソーム溶解によって極めて有効であることが判明している。しかしながら、ベクターとしてアデノウイルスを使用する用途を適用する非特異的取り込み、安全性および免疫原性反応についての全条件 (reservation) もまたこの系に当てはまる。例えばインフルエンザウイルス、毒素または合成ペプチド由来のアミノ酸配列を含むその他の融合誘導ペプチドの、該分子接合体中への包含が、細胞質放出について試験されている。これらはより低い免疫原性とより低

10

20

30

40

50

い費用という利点を持つが、エンドソーム溶解においてアデノウイルスより有効性が低いという事が示されている。しかしながら、P E I はエンドソームの膨潤と破壊をもたらす固有のエンドソーム緩衝能を有するため、分子接合体をポリカチオン性 P E I を用いて製造するならばエンドソーム溶解物質を含ませる必要はない。

【0008】

癌特異的プロモーター

発現を制御する腫瘍特異的プロモーターが使用できるならば、治療用遺伝子の癌細胞へのターゲティング特異性の増大が達成できる (Nettelbeckらによる2000に総説されている)。発現が悪性表現型に特異的であるがテロメラーゼのような組織特異性を示さない遺伝子のためのプロモーターが使用されてきた。また、成人では通常発現されない腫瘍胎児抗原、例えば癌胎児抗原 (C E A) を調節するプロモーターが、腫瘍細胞中で活性であることが見出された。しかしながら、これらのプロモーターの活性は (強力な常時活性型 (constitutive active) ウイルスプロモーターと比較して) しばしば治療用遺伝子の十分な発現を媒介しないことが判明しており、それ故、この腫瘍特異的遺伝子を、治療用遺伝子を制御する別のより強力なプロモーターの活性化に使用した。腫瘍胎児プロモーターのもう1つの不都合は、これらのプロモーターが、腫瘍の組織起源に応じて、或る部分集合の腫瘍型でしか活性でないことである。これとは別に、癌細胞で過剰発現される多くの癌遺伝子はそれら各々の D N A 認識配列からの高い転写活性を媒介できる転写因子であるという事実を利用して、合成プロモーターが設計された。

10

【0009】

治療用遺伝子

治療用遺伝子の産物は細胞死を有効に誘発できなければならない。癌治療の遺伝子治療戦略は数多くの異なるアプローチを利用してきた。これらには、免疫系のサイトカイン刺激 (腫瘍細胞に対する免疫反応を増強)、選択的プロドラッグ活性化、自殺遺伝子、腫瘍抑制遺伝子の修復、および活性化された癌遺伝子の抑制といった免疫遺伝子治療が包含される (Frederiksenらによる1999; Gunjiらによる2000に総説されている)。事実、癌に対する臨床試験での現行の治療プロトコルの殆どは免疫療法を含んでいる。しかしながら、癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子の異常発現または突然変異に関する多くの型の癌の分子表現型として、これらはターゲティングすべき明白な候補対象である。癌遺伝子の発現または活性を低下させる治療用遺伝子産物、例えばアンチセンス R N A または中和抗体フラグメントが試用され、増殖を抑制することが示された。しかしながら、癌遺伝子の不活性化は必ずしも細胞を殺す訳ではなく、故に恐らく短期間の治療には適用できない。現在有望な戦略の1つは腫瘍抑制遺伝子を再導入することであるが、それは、殆どの癌細胞は1またはそれ以上のこれら遺伝子の機能の喪失を示すためである。特に興味深いものは、p53をコードしている腫瘍抑制遺伝子TP53であり、これは細胞周期の停止とアポトーシスの誘発に関わることが分かっている遺伝子を活性化する転写因子である。野生型p53の再導入は、インビトロおよびインビボ系の両方で腫瘍細胞の増殖を著しく低減しまたは癌細胞のアポトーシスを誘発する事が示されている (Rothらによる1996; NielsenおよびManevalによる1998)。

20

30

【0010】

しかしながら、それ以外の状況では無害な薬物に対し細胞を感受性にする遺伝子産物もまた遺伝子治療の治験に広範囲に利用されてきた。特に、ヌクレオシドアナログ薬物ガンシクロビルと組み合わせた単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-tk) が利用されてきた。しかしながら、該薬物をこの酵素によって毒性のヌクレオシド類似体に変換することは、それだけで分裂しつつある細胞を殺すであろう。ところが、この毒性産物はいわゆる「傍観者 (by-stander)」効果によって周囲の細胞に伝達され、このアプローチが、ターゲティング効率の低い系に対して可能となる。

40

【0011】

(発明の概要)

したがって、正常細胞と比較して悪性細胞中で異なったレベルで発現する多数の細胞表面

50

分子を同定するための方法であって、

i) CPH 54 A、CPH 54 B、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DM S 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI H69、NCI N417、MAR H24、MAR 86 MI、SHP-77、NCI-H2171、NCI-H2195、NCI-H2196、NCI-H2198、NCI-H2227、NCI-H2286、NCI-H2330、NCI-H735、NCI-H1339、NCI-H1963、NCI-H2107、NCI-H2108、NCI-H1304、NCI-H1341、NCI-H1417、NCI-H1436、NCI-H1522、NCI-H1618、NCI-H1672、NCI-H1694、NCI-H1836、NCI-H1870、NCI-H1876、NCI-H1882、NCI-H1926、NCI-H1930、NCI-H1994、NCI-H2029、NCI-H2059、NCI-H2066、NCI-H2081、NCI-H2141、NCI-H211、NCI-H220、NCI-H250、NCI-H524、NCI-H592、NCI-H711、NCI-H719、NCI-H740、NCI-H748、NCI-H774、NCI-H841、NCI-H847、NCI-H865、NCI-H1048、NCI-H1059、NCI-H1092、NCI-H1105、NCI-H1184、NCI-H1238、NCI-H1284、NCI-H1688、NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H660、NCI-H889、NCI-H60、NCI-H196、NCI-H446、NCI-H209、NCI-H146、NCI-H82、NCI-H460、NCI-H345、NCI-H510A、NCI-128、NCI-446、SW 1271からなる群から選ばれる少なくとも3個の悪性セルラインを提供し；

10

ii) 肝臓、心臓、腎臓、肺、副腎、結腸、膵臓、小腸、脾臓、骨格筋、気管、前立腺、胎盤、唾液腺、精巣、白血球、脳、脂肪組織、膀胱、乳房、頸、食道、喉頭、卵巣、直腸、皮膚、脊髄、胃、胸腺、甲状腺および子宮からなる群から選ばれる正常組織から誘導される少なくとも3個の全RNA試料を提供し；

iii) 工程i)に記載のセルラインと工程ii)に記載の組織試料におけるmRNAの発現を比較し；

20

iv) 核酸配列を同定し、ここで、

a) i)に記載の1またはそれ以上のセルライン中で発現されるmRNAの量とii)に記載の1またはそれ以上の組織で発現されるmRNAの量の間には差違があり；および/または、

b) i)に記載の少なくとも2個のセルライン中で発現されるmRNAの量には本質上差違がなく；および/または、

c) ii)に記載の少なくとも2個の組織試料中で発現されるmRNAの量には本質上差違がなく；および、

v) iv)に記載の核酸配列の中から、可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列を選択する、

30

という工程を含む方法を提供する事が、本発明の第1の目的である。

【0012】

第1の核酸配列に機能的に連結した第2の核酸配列の発現を指令(directing)することができる第1の核酸配列を同定する方法であって、該発現のレベルは正常細胞と比較して悪性細胞中で異なり、

i) CPH 54 A、CPH 54 B、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DM S 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI H69、NCI N417、MAR H24、MAR 86 MI、SHP-77、NCI-H2171、NCI-H2195、NCI-H2196、NCI-H2198、NCI-H2227、NCI-H2286、NCI-H2330、NCI-H735、NCI-H1339、NCI-H1963、NCI-H2107、NCI-H2108、NCI-H1304、NCI-H1341、NCI-H1417、NCI-H1436、NCI-H1522、NCI-H1618、NCI-H1672、NCI-H1694、NCI-H1836、NCI-H1870、NCI-H1876、NCI-H1882、NCI-H1926、NCI-H1930、NCI-H1994、NCI-H2029、NCI-H2059、NCI-H2066、NCI-H2081、NCI-H2141、NCI-H211、NCI-H220、NCI-H250、NCI-H524、NCI-H592、NCI-H711、NCI-H719、NCI-H740、NCI-H748、NCI-H774、NCI-H841、NCI-H847、NCI-H865、NCI-H1048、NCI-H1059、NCI-H1092、NCI-H1105、NCI-H1184、NCI-H1238、NCI-H1284、NCI-H1688、NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H660、NCI-H889、NCI-H60、NCI-H196、NCI-H446、NCI-H209、NCI-H146、NCI-H82、NCI-H460、NCI-H345、NCI-H510A、NCI-128、NCI-446、SW 1271からなる群から選ばれる少なくとも3個の悪性セルラインを提供し；

40

ii) 肝臓、心臓、腎臓、肺、副腎、結腸、膵臓、小腸、脾臓、骨格筋、気管、前立腺、胎盤、唾液腺、精巣、白血球、脳、脂肪組織、膀胱、乳房、頸、食道、喉頭、卵巣、直腸

50

、皮膚、脊髄、胃、胸腺、甲状腺および子宮からなる群由来の正常な組織試料から選ばれる少なくとも3個のRNA試料を提供し；

i i i) i)に記載のセルラインとi i)に記載の組織試料中でのmRNAの発現を比較し；

i v)第2の核酸配列を同定し、ここで、

a) i)に記載の1またはそれ以上のセルライン中で発現されるmRNAの量とi i)に記載の1またはそれ以上の組織中で発現されるmRNAの量の間には差違があり；および/または、

b) i)に記載の少なくとも2個のセルライン中で発現されるmRNAの量には本質上差違がなく；および/または、

c) i i)に記載の少なくとも2個の組織試料中で発現されるmRNAの量には本質上相違がなく；

v)工程i v)で同定した第2のヌクレオチド配列と機能的に連結する第1の核酸配列を同定する、

という工程を含む方法を提供する事が、本発明の第2の目的である。

【0013】

ワクチンの製造のための、本発明に従って同定した医薬的有効量の細胞表面分子の使用を提供する事が、本発明の第3の目的である。さらに、本発明は、ワクチンの製造のための、本発明の方法に従って同定した細胞表面分子をコードしている医薬的有効量の核酸配列の使用を提供する。さらに本発明は、ワクチンの製造のための、医薬的有効量の細胞表面分子および/または該細胞表面分子をコードしている核酸配列の使用を提供し、ここで、該細胞表面分子は、好ましくは以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGRIA2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン 6、例えばGPIIb；例えばピトロネクチンレセプター サブユニット；例えばインテグリン -7；例えばインテグリン E前駆体；例えばインテグリン 6B；例えばインテグリン 5サブユニット；例えばインテグリン -5サブユニット；例えばインテグリン -3鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ、例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR；例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体；例えばIGF1R、例えばインスリン様成長因子IIレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-D R7関連糖タンパク質 鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン- レセプター 鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リポタンパク質レセプター；例えば超低密度リポタンパク質レセプター；例えばN-CAM；例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば 2 カルシウムチャネルサブユニットI型I；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばパソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター(5-HT1D~)；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノーゲンレセプター；例えばFGFレセプター；

10

20

30

40

50

例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13¹；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOC15；例えばTRAILレセプター2；例えばHNMP-1；例えば腎-2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・パーシカンV1；例えばmGluR1、例えばCD97；例えばL6；例えばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESP R；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3、例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FL J22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFR2；例えばTGFR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である。

10

【0014】

本発明に記載の方法に従って同定した細胞表面分子の、薬物標的としての使用を提供する事が本発明の第4の目的であり、ここで該薬物標的は、結合パートナーと結合してその結合パートナーを該細胞表面分子を発現している細胞中にインターナライズすることができる。さらに、本発明は、好ましくは以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGRIA2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン α 6、例えばGPIIb；例えばビトロネクチンレセプターサブユニット；例えばインテグリン α 7；例えばインテグリン α E前駆体；例えばインテグリン α 6B；例えばインテグリン α 5サブユニット；例えばインテグリン α 5サブユニット；例えばインテグリン α 3鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ；例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR、例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体；例えばIGF1R、例えばインスリン様成長因子IIレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-DR7関連糖タンパク質鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン- γ レセプター鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リボタンパク質レセプター；例えば超低密度リボタンパク質レセプター；例えばN-CAM、例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば Ca^{2+} カルシウムチャネルサブユニットI型I；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばパソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D \sim ）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター、例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸塩輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13¹；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOC15；例えばTRAILレセプター2、例えばHNMP-1；例えば腎-2-

20

30

40

50

アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・パーシカンV1；例えばmGluR1；例えばCD97；例えばL6、例えばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3；例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター、例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター、例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFBR2；例えばTGFBR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である細胞表面分子の、薬物標的としての使用を提供し、ここで該薬物標的は、結合パートナーと結合してそして該結合パートナーを該細胞表面分子を発現している細胞中にインターナライズすることができる。

10

【0015】

i) 本発明に記載の方法によって同定した細胞表面分子を提供し；
 i i) 該細胞表面分子と結合できる結合パートナーを同定しおよび/または製造する、という工程を含む、特異的結合パートナーを同定しおよび/または製造する方法を提供する事が本発明の第5の目的である。

【0016】

20

i) 好ましくは以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン 6、例えばGPIIb、例えばビトロネクチンレセプター サブユニット；例えばインテグリン -7、例えばインテグリン E前駆体；例えばインテグリン 6B；例えばインテグリン 5サブユニット；例えばインテグリン -5サブユニット；例えばインテグリン -3鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ；例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR、例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体、例えばIGF1R；例えばインスリン様成長因子IIレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-D R7関連糖タンパク質 鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン- レセプター 鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リポタンパク質レセプター；例えば超低密度リポタンパク質レセプター；例えばN-CAM；例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば 2 カルシウムチャネルサブユニットI型I；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばバソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D~）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター；例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13；例えばCPE-レセプター；例え

30

40

50

ばCRH2R；例えばOC15；例えばTRAILレセプター2；例えばHNMP-1；例えば腎-2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカンパーシカンV1；例えばmGluR1；例えばCD97；例えばL6；例えばNY-ES0-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3；例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFR2；例えばTGFR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である細胞表面分子を提供し；
 i i) 該細胞表面分子と結合できる結合パートナーを同定しおよび/または製造する、という工程を含む、特異的結合パートナーを同定しおよび/または製造する方法を提供する事が本発明のさらなる目的である。

10

【0017】

正常細胞と比較して悪性細胞中で異なったレベルで発現され、本発明により提供する方法によって同定される細胞表面分子と結合できる、単離および/または精製された特異的結合パートナーを提供する事が、本発明のさらなる目的である。さらに本発明は、好ましくは以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGR1A2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン6；例えばGPIIb；例えばビトロネクチンレセプターサブユニット；例えばインテグリン-7；例えばインテグリンE前駆体；例えばインテグリン6B；例えばインテグリン5サブユニット；例えばインテグリン-5サブユニット；例えばインテグリン-3鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ；例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR；例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体；例えばIGF1R；例えばインスリン様成長因子IIレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-DR7関連糖タンパク質鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン-レセプター鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リポタンパク質レセプター；例えば超低密度リポタンパク質レセプター；例えばN-CAM；例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば2カルシウムチャネルサブユニットI型I；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばバソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D~）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター；例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸塩輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOC15

20

30

40

50

；例えばTRAILレセプター-2；例えばHNMP-1；例えば腎-2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・パーシカンV1；例えばmGluR1；例えばCD97；例えばL6；例えばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプター-JAB61；例えばHER2；例えばHER3；例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFR2；例えばTGFR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である細胞表面分子と結合できる、単離されたおよび／または精製された特異的結合パートナーを提供する。

10

【0018】

i) 本発明に記載の結合パートナーを提供し、
 ii) 該結合パートナーと結合できる可能性ある薬物標的を同定する、
 という工程を含む、新規な薬物標的を同定する方法を提供する事もまた、本発明の目的である。

【0019】

本発明に記載の方法により同定した薬物標的を提供する事もまた本発明のもう1つの目的である。

20

【0020】

さらに、

i) 本発明に記載の結合パートナー；および、
 ii) 生物学的反応性種、
 を含むターゲッティング複合体を提供する事が本発明の目的であって、該ターゲッティング複合体は、本発明に記載の方法に従って同定した細胞表面分子に結合でき、そして該細胞表面分子を有する細胞中にインターナライズされ得る。

【0021】

さらに本発明は、本発明に係るターゲッティング複合体を製造するための、本発明に記載の結合パートナーの使用を提供する。

30

【0022】

本発明に記載のターゲッティング複合体を医薬的に許容し得る担体と共に含有する医薬組成物を提供する事が本発明のさらなる目的である。

【0023】

処置を必要とする個体における前悪性および／または悪性の病気の処置方法であって、該個体に本発明に記載のターゲッティング複合体の医薬的有効量を投与することを含む方法を提供する事が、本発明のさらなる目的である。

【0024】

さらに、処置を必要とする個体の前悪性および／または悪性の病気の治療用薬物を製造するための、本発明に記載のターゲッティング複合体の使用を提供する事が、本発明の目的である。

40

【0025】

(発明の詳細な記載)

定義

結合パートナーとは、「細胞表面分子結合パートナー」を参照されたい。

【0026】

生物学的反応性種とは、標的細胞に直接的または間接的に生物学的影響を及ぼすことのできるいずれかの分子である。

【0027】

50

Bp：塩基対

【0028】

細胞表面分子とは、天然状態で細胞表面と結合している分子である。

【0029】

細胞表面分子結合パートナーとは、細胞表面分子と特異的に結合できるいずれかの分子である。本明細書において用語「細胞表面分子結合パートナー」およびより短い用語「結合パートナー」は互換的に使用し、両方の用語は本明細書において互いに等価である。

【0030】

エンハンサーとは、それに機能的に連結した第2核酸配列の転写を増強できる核酸配列である。

10

【0031】

第1核酸配列とは、それに機能的に連結した第2核酸配列の発現を指令できる核酸配列である。

【0032】

正常細胞とは、非悪性起源の非悪性細胞である。

【0033】

正常組織とは、非悪性組織である。

【0034】

プロモーターとは、それに機能的に連結した第2核酸配列の発現を指令できる第1核酸配列である。

20

【0035】

第2核酸配列とは、発現され得る核酸配列であって、例えばmRNAはそれらが第1核酸配列と機能的に連結している時、該核酸配列から転写され得る。

【0036】

サイレンサーとは、それと機能的に連結している第2核酸配列の転写を抑制できる核酸配列である。

【0037】

ターゲッティング複合体とは、少なくとも1個の結合パートナーおよび生物学的反応性種を含みおよび細胞中にインターナライズされ得る複合体である。

【0038】

30

(発明の態様)

もし癌の遺伝子治療が、特に播種性疾患において、癌の有効な代替または補助的治療になるとすれば、幾つかの要件が解決されねばならないという事が徐々に明らかとなってきた。これらには、例えばi)複合体のターゲッティングが有効且つ癌特異的であること；ii)治療用遺伝子の発現が有効且つ癌特異的であること、そしてiii)該分子接合体が非免疫原性であり、全身投与後に高い安定性を持ち、且つ毛細管障壁を越えられるという事が包含される。

【0039】

或る好ましい態様では、本発明は、癌細胞により特異的に発現される遺伝子を同定するための新規な高スループットスクリーニング法の使用と、二重ターゲッティング遺伝子移動および癌治療のための治療用遺伝子の発現へのそれらの適用に関するものである。二重ターゲッティング遺伝子移動の原理の例を図1に略記する。本発明に係るスクリーニング法は癌細胞によって発現される新規な分子の同定を可能にする。

40

【0040】

或る態様では、この方法を小細胞肺癌(SCLC)細胞によって発現される適当な分子の遺伝子発現の同定に適用する。小細胞肺癌は全肺癌症例のおよそ25%を構成する極めて攻撃性の新生物である。この疾患は診断時には殆ど常に転移している。SCLCは異なる化学療法薬単独で、または放射線療法と組み合わせて治療する。治療を改善するための徹底的な試みにも拘わらず、そして殆どの患者が最初は治療に良好に反応するという事実にも拘わらず、致死率は高い。現在の癌治療はこれらの患者のわずか5~7%を治癒できるに過ぎず

50

、5年の生存率は極端に低い(5~15%)。故にSCLC患者には新しい治療法開発の大きな必要性がある。

【0041】

この疾患の分子表現型が完全に特性決定され、幾つかの腫瘍抑制遺伝子(例えばp53およびRb)の機能喪失に加えて腫瘍遺伝子(特にmycファミリー)の異常発現が、SCLC腫瘍の80%以上に見出された。これらの表現型はまたSCLC腫瘍から誘導した殆どのセルラインにも見出され(Frederiksenらによる1999による総説)、このセルラインを抗癌薬の可能性のある物質のインビトロ試験のための実験手段として使用することを可能としている。さらに、これらのセルラインはヌードマウスでインビボ増殖させることができ、よって開発した薬物をインビボ状態で試験することができる。故に、SCLCから誘導したセルラインを、癌特異的(または高度に発現される)表面分子およびSCLC細胞において特定の転写活性を持つ領域(プロモーター)の同定のために、遺伝子発現の初回スクリーニングに利用する。

10

【0042】

膨大な数のSCLCで発現される遺伝子を同定するためには、異なる研究所が樹立した、呼び異なる患者由来の多岐にわたる異なったSCLCセルラインを本発明において使用することが好ましい。さらに、これらのSCLCセルラインにおける発現を、好ましくは内胚葉、外胚葉および中胚葉起源の異なる組織の代表である様々な正常組織での発現と比較することが好ましい。

【0043】

本発明の中では二相性戦略の適用が可能であるが、本発明のある態様では他の戦略も適用できる。本発明に係る二相性戦略は、例えば、全身投与を介して、表面上の機能的輸送コンピテントレセプターとの結合により癌細胞に効果的にターゲティングすることができ、この事によりその後、この癌細胞で特異的に活性または機能亢進であるプロモーターにより、該遺伝子が癌細胞中で発現されるような遺伝子治療薬である。

20

【0044】

アミノ酸および核酸

本明細書および特許請求の範囲全編にわたり、天然アミノ酸の一文字表記または三文字表記のいずれかを使用する。LまたはD型が明記されていない場合、問題のアミノ酸は天然L型(Pure & Appl.ChemVol56(5)pp595-624(1984)を参照されたい)またはD型であり、その結果形成されるペプチドはL型、D型、またはL型とD型の混合配列で構成され得ると理解すべきである。

30

【0045】

何も明記していない場合、本発明に係るポリペプチドのC末端アミノ酸は遊離カルボン酸として存在すると理解すべきであり、これは「-OH」とも記載できる。ポリペプチドのN末端アミノ酸は遊離アミノ基を含み、これは「H-」とも記載できる。

【0046】

別途明記していない場合、アミノ酸は天然または非天然の如何に拘わらず任意のアミノ酸、例えば アミノ酸、 アミノ酸、および/または アミノ酸から選択できる。したがってこの群は、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Met、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Aib、Nal、Sar、Orn、リジン類似体DAPおよびDAPAを含むがこれらに限定される訳ではない。

40

【0047】

「核酸」という語は、本明細書全編で、DNAおよびRNAならびにペプチド核酸(PNA)またはlocked核酸(LNA)といったそれらの誘導体の包含を意味する。

【0048】

細胞表面分子とプロモーターを同定する方法

本発明に係る、細胞表面分子および/または第1核酸配列(これは機能的に連結した第2核酸配列の発現を指令できる)の同定に使用する方法は、好ましくは悪性セルライン中に見出されるmRNAのレベルを正常組織に見出されるmRNAのレベルと比較することを

50

含む。

【 0 0 4 9 】

好ましくは、本発明に係る悪性セルラインは哺乳動物のセルライン、より好ましくは人間のセルラインである。より一層好ましくは該セルラインは小細胞肺癌（SCLC）から誘導する。更により一層好ましくはこのセルラインは、CPH 54 A、CPH 54 B、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DMS 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI H69、NCI N417、MAR H24およびMAR 86 MI、SHP-77、NCI-H2171、NCI-H2195、NCI-H2196、NCI-H2198、NCI-H2227、NCI-H2286、NCI-H2330、NCI-H735、NCI-H1339、NCI-H1963、NCI-H2107、NCI-H2108、NCI-H1304、NCI-H1341、NCI-H1417、NCI-H1436、NCI-H1522、NCI-H1618、NCI-H1672、NCI-H1694、NCI-H1836、NCI-H1870、NCI-H1876、NCI-H1882、NCI-H1926、NCI-H1930、NCI-H1994、NCI-H2029、NCI-H2059、NCI-H2066、NCI-H2081、NCI-H2141、NCI-H211、NCI-H220、NCI-H250、NCI-H524、NCI-H592、NCI-H711、NCI-H719、NCI-H740、NCI-H748、NCI-H774、NCI-H841、NCI-H847、NCI-H865、NCI-H1048、NCI-H1059、NCI-H1092、NCI-H1105、NCI-H1184、NCI-H1238、NCI-H1284、NCI-H1688、NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H660、NCI-H889、NCI-H60、NCI-H196、NCI-H446、NCI-H209、NCI-H146、NCI-H82、NCI-H460、NCI-H345、NCI-H510A、NCI-128、NCI-44およびSW 1271からなる群から選ばれる。より好ましくは該セルラインは、CPH 54 A、CPH 54 B、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DMS 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI H69、NCI N417、MAR H24およびMAR 86 MIからなる群から選ばれる。

10

20

【 0 0 5 0 】

よりいっそう好ましくは該セルラインは、CPH 54A、CPH 54 B、CHP 136A、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DMS 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI-H69、NCI-N417、MAR H24およびMAR 86MIからなる群から選ばれる。

【 0 0 5 1 】

最も好ましくは該セルラインはDMS53、DMS70、DMS92、DMS114、DMS153、DMS273、NCI417およびNCI H69からなる群から選ばれる。

【 0 0 5 2 】

本発明に係る好ましいセルラインを受託番号と共に表 1 に列挙する。

30

【 表 1 】

表 1 小細胞肺癌セルラインの受託番号

SCLC セルライン	培養 収集物	(仮) 受託番号	寄託者
CPH 54A	ECACC	01061905	ODIN Medical A/S
CPH 54B	ECACC	01061906	
GLC 2	ECACC	01061907	
GLC 3	ECACC	01061908	
GLC 14	ECACC	01061909	
GLC 16	ECACC	01061910	
GLC 19	ECACC	01061911	
GLC 26	ECACC	01061912	
GLC 28	ECACC	01061913	
DMS 406	ECACC	01061914	
DMS 456	ECACC	01061915	
MAR H 24	ECACC	01061916	
MAR 86 MI	ECACC	01061917	
DMS 53	ATTC	CRL-2062	O.S Pettengill; G.Sorensen
	ecacc	95062823	
DMS 79	ATTC	CRL-2049	
	ecacc	95062824	
DMS 92	ecacc	950662825	
DMS 114	ATTC	CRL-2066	
DMS 153	ATTC	CRL-2064	
	ecacc	95062827	
DMS 273	ecacc	95062830	A.M. Koros
SHP-77	Ecacc	98110201	
	ATTC	CRL-2195	

10

20

30

【表 2】

NCI-H2171	ATTC	CRL-5929	A.F.Gazdar; J.D. Minna
NCI-H2195		CRL-5931	
NCI-H417		CRL-5809	
NCI-H2196		CRL-5932	
NCI-H2198		CRL-5933	
NCI-H2227		CRL-5934	
NCI-H2286		CRL-5938	
NCI-H2330		CRL-5940	
NCI-H735		CRL-5978	
NCI-H1339		CRL-5979	
NCI-H1963		CRL-5982	
NCI-H2107		CRL-5983	
NCI-H2108		CRL-5984	
NCI-H1304		CRL-5862	
NCI-H1341		CRL-5864	
NCI-H1417		CRL-5869	
NCI-H1436		CRL-5871	
NCI-H1522		CRL-5874	
NCI-H1618		CRL-5879	
NCI-H1672		CRL-5886	
NCI-H1694		CRL-5888	
NCI-H1836		CRL-5989	
NCI-H1870		CRL-5901	
NCI-H1876		CRL-5902	
NCI-H1882		CRL-5903	
NCI-H1926		CRL-5905	
NCI-H1930		CRL-5906	
NCI-H1994		CRL-5910	
NCI-H2029		CRL-5913	
NCI-H2059		CRL-5916	
NCI-H2066		CRL-5917	
NCI-H2081		CRL-5920	
NCI-H2141		CRL-5927	
NCI-H211		CRL-5824	
NCI-H220		CRL-5825	
NCI-H250		CRL-5828	

10

20

30

40

【表 3】

NCI-H524		CRL-5831	
NCI-H592		CRL-5832	
NCI-H711		CRL-5836	
NCI-H719		CRL-5837	
NCI-H740		CRL-5840	
NCI-H748		CRL-5841	
NCI-H774		CRL-5842	
NCI-H841		CRL-5845	
NCI-H847		CRL-5846	
NCI-H865		CRL-5849	
NCI-H1048		CRL-5853	
NCI-H1059		CRL-5854	
NCI-H1092		CRL-5855	
NCI-H1105		CRL-5856	
NCI-H1184		CRL-5858	
NCI-H1238		CRL-5859	
NCI-H1284		CRL-5861	
NCI-H1688		CCL-257	
NCI-H187		CRL-5804	
NCI-H378		CRL-5808	
NCI-H526		CRL-5811	
NCI-H660		CRL-5813	
NCI-H889		CRL-5817	
NCI-H60		CRL-5821	
NCI-H196		CRL-5823	
NCI-H446		HTB-171	
NCI-H209		HTB-172	
NCI-H146		HTB-173	
NCI-H82		HTB-175	
NCI-H460		HTB-177	
NCI-H345		HTB-180	
NCI-H510A		HTB-184	
NCI-128		HTB-120	A.F.Gazdar
NCI-446		HTB-171	
NCI H 69		HTB-119	
SW 1271		CRL-2177	W. McCombs

10

20

30

40

【 0 0 5 3 】

例えばこの方法は、CPH 54 A、CPH 54 B、GLC 2、GLC 3、GLC 14、GLC 16、GLC 19、GLC 26、GLC 28、DMS 53、DMS 79、DMS 92、DMS 114、DMS 153、DMS 273、DMS 406、DMS 456、NCI H69、NCI N417、MAR H24およびMAR 86 MI、SHP-77、NCI-H2171、NCI-H2195、NCI-H2196、NCI-H2198、NCI-H2227、NCI-H2286、NCI-H2330、NCI-H735、NCI-H1339、NCI-H1963、NCI-H2107、NCI-H2108、NCI-H1304、NCI-H1341、NCI-H1417、NCI-H1436、NCI-H1522、NCI-H1618、NCI-H1672、NCI-H1694、NCI-H1836、NCI-H1870、NCI-H1876、NCI-H1882、NCI-H1926、NCI-H1930、NCI-H1994、NCI-H2029、NCI-H2059、NCI-H2066、NCI-H2081、NCI-H2141、NCI-H211、NCI-H220、NCI-H250、NCI-H524、NCI-H592、NCI-H711、NCI-H719、NCI-H7

50

40、NCI-H748、NCI-H774、NCI-H841、NCI-H847、NCI-H865、NCI-H1048、NCI-H1059、NCI-H1092、NCI-H1105、NCI-H1184、NCI-H1238、NCI-H1284、NCI-H1688、NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H660、NCI-H889、NCI-H60、NCI-H196、NCI-H446、NCI-H209、NCI-H146、NCI-H82、NCI-H460、NCI-H345、NCI-H510A、NCI-128、NCI-446およびSW 1271からなる群から選ばれる、少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも8、例えば少なくとも10、例えば少なくとも12、例えば少なくとも14、例えば少なくとも16、例えば少なくとも18、例えば少なくとも20、例えば21、例えば少なくとも25、例えば少なくとも30、例えば少なくとも40、例えば少なくとも50、例えば少なくとも60、例えば少なくとも70、例えば79種類前後の悪性セルラインを含む。

【0054】

10

本発明の或る好ましい態様では、該方法は、セルラインDMS53、DMS70、DMS92、DMS114、DMS153、DMS273、NCI417およびNCI H69の全てを含む。

【0055】

該セルラインは任意の適当な手段で培養でき、例えば当業者の知悉する適当な条件の下にインビトロ細胞培養で培養できる。本発明の或る態様では、1またはそれ以上のセルラインを異種移植片として動物中でインビボ培養する。動物は任意の適当な動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはげっ歯類、最も好ましくはマウスであり得る。セルラインを異種移植片としてインビボ培養する方法の例を実施例1に示す。

【0056】

同じセルラインをインビトロ細胞培養で、およびインビボで培養できるという事もまた本発明に包含される。

20

【0057】

一般にインビボ培養状態、即ち異種移植片として動物中で培養することは、自然に発生する腫瘍または癌により似ており、よって少なくとも1、例えば少なくとも2、例えば少なくとも3、例えば少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも7、例えば少なくとも8種類のセルラインをインビボ培養することが通常好ましい。より好ましくは1乃至79、例えば2乃至70、例えば3乃至60、例えば4乃至50、例えば5乃至40、例えば6乃至30、例えば7乃至20種類の範囲のセルラインをインビボ培養する。より一層好ましくは8種類前後のセルラインをインビボ培養する。

【0058】

30

好ましくは、インビボ培養するセルラインは表1に述べたセルラインの群から選ばれ、より一層好ましくはインビボ培養するセルラインはCPH54A、CHP136A、GLC3、GLC14、DMS273、NCI-H69、NCI-N417およびMAR H24からなる群から選ばれる。

【0059】

正常組織とは非悪性である組織である。好ましくは該組織は前悪性および/または悪性の病気に罹患していない個体から誘導する。より好ましくは正常組織は哺乳動物の組織であり、より一層好ましくは該組織はヒトの組織である。更により好ましくはこの組織は、肝臓、心臓、腎臓、肺、副腎、結腸、脾臓、小腸、脾臓、骨格筋、気管、前立腺、胎盤、唾液腺、精巣、白血球、脳、脂肪組織、膀胱、乳房、頸、食道、喉頭、卵巣、直腸、皮膚、脊髄、胃、胸腺、甲状腺および子宮からなる群から選ばれる。より一層好ましくは該組織は脳、副腎、肺、腎臓、心臓、気管、前立腺、唾液腺、甲状腺、肝臓、脾臓、脾臓、小腸、骨格筋、結腸、胃および精巣からなる群から選ばれる。最も好ましくは該組織は肺、肝臓、心臓および腎臓からなる群から選ばれる。

40

【0060】

好ましくは該方法は、少なくとも3、例えば少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも8、例えば少なくとも10の全RNA試料を含む。

【0061】

該方法は、悪性セルライン中に見出されるmRNAのレベルを正常組織中に見出されるmRNAのレベルと比較するのに適した、当業者の知悉する任意の方法とすることができる。一般にこのような方法はmRNAまたは全RNAいずれかの精製を含む。RNAの精製

50

は、例えばSambrookらによる1989または本明細書の下記実施例に記載のような、当業者の知悉する標準的な方法に従って実施できる。

【0062】

RNA試料は幾つかの異なる技術によって比較できる。任意の適当な技術を本発明と共に適用できる。例えば、ディファレンシャルディスプレイまたは差し引きハイブリダイゼーションによって該RNA試料を比較できる。さらに、公知の核酸配列を持つ標識したRNAまたはcDNAプールのハイブリダイゼーションを含む技術が本発明に好適である。例えば該公知の核酸をハイブリダイゼーションに先立ち固体支持体、例えば膜、例えばニトロセルロース膜上に固定化でき、または該固体支持体はプラスチックもしくはガラス製であってよい。

10

【0063】

標識されたRNAまたはcDNAは任意の直接または間接的に検出可能な標識、例えば酵素、放射性アイソトープ、発色団、蛍光基もしくは重金属で標識できる。さらに、該標識は一对の結合パートナーのうちの第1部分であってよく、その場合第2部分が直接的または間接的のいずれかで検出できる。間接的に検出可能な標識の検出のためには、一对の結合パートナーの第1部分が第2部分によって認識され、一方この第2部分が第1部分によって認識され、これが再度第2部分によって認識されるといった「サンドイッチ」系の使用が可能である。全ての工程において第1および/または第2部分は標識され得る。結合パートナーの対の例は抗原/抗体またはビオチン/ストレプトアビジンである。しかしながら、その他任意の適当な対もまた本発明と共に使用できる。

20

【0064】

本発明の或る態様では、この方法は、

- i) 悪性セルライン由来のmRNAを含むRNAを単離し；
 - ii) 該RNAからcDNA個体群を調製し（ここで、1つのcDNA個体群は1つのセルラインまたは1つの組織試料から単離したRNAから調製する）；
 - iii) 各cDNA個体群を検出可能な標識で標識し；
 - iv) 公知の核酸配列のアレイを固定化した、固体支持体を提供し；
 - v) 各cDNA個体群を、ハイブリダイゼーション可能な条件下で固体支持体と一緒にインキュベートし；
 - vi) 固体支持体上の検出可能標識を検出する；
- という工程を含む。

30

【0065】

好ましくは該検出可能標識は間接的に検出可能な標識であり、より好ましくは該標識は一对の結合パートナーの第1部分であって、第2部分は直接的または間接的に検出可能である。最も好ましくは該標識はビオチンである。ビオチンは、標識されたストレプトアビジン種、好ましくは蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出できる。より好ましくは該ストレプトアビジンは、ビオチンで標識した抗ストレプトアビジン抗体と結合でき、そして該ビオチンが標識化ストレプトアビジン、好ましくは蛍光標識されたストレプトアビジンによって検出できる。該蛍光標識は例えばフィコエリスリンまたはその他の適当な蛍光標識であり得る。

40

【0066】

一つの好ましい態様では、該固体支持体はガラスプレートである。好ましくは少なくとも1000、例えば少なくとも5000、例えば少なくとも10,000、例えば少なくとも50,000、例えば少なくとも100,000、例えば少なくとも150,000、例えば少なくとも200,000、例えば240,000前後の異なる公知の核酸配列を固体支持体上に固定化する。これらの核酸配列は全て異なる遺伝子から誘導したものであってよいが、しかしながら、より好ましくは各遺伝子は、1以上、例えば2以上、例えば4以上、例えば7以上、例えば10以上、例えば15以上、例えば20以上、好ましくは20前後の異なる核酸配列で表される。

【0067】

本発明の或る態様では、該RNA試料をCHIPS分析またはGeneChips分析によって比較でき

50

る。Chips分析およびGeneChips分析という語は本明細書全編で互換的に使用する。Chips分析の実施方法の例を実施例1に示す。

【0068】

適当な細胞表面分子を幾つかの基準に従って選ぶ。好ましくは、本発明に係る方法で使用する1またはそれ以上のセルラインで発現されるmRNAの量と、本発明に係る1またはそれ以上の組織で発現されるmRNAの量の間には差違がある。好ましくは該差違は少なくとも1.1倍、例えば1.2倍、例えば1.5倍、例えば1.75倍、例えば2倍、例えば2.5倍、例えば少なくとも3倍、例えば少なくとも4倍、例えば少なくとも5倍、例えば少なくとも7.5倍、例えば少なくとも10倍のmRNA発現の差違である。或る好ましい態様では該差違は、原則的に無限数倍であり、例えば1またはそれ以上のセルライン中では発現される検出可能なmRNAがないが、1またはそれ以上の正常組織中ではmRNAが検出でき、あるいは、1またはそれ以上の正常組織中では発現される検出可能なmRNAがないが、1またはそれ以上のセルライン中ではmRNAが検出できる。

10

【0069】

さらに、本発明に係る方法で使用する少なくとも2、例えば少なくとも3、例えば少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも8、例えば少なくとも10、例えば少なくとも12、例えば少なくとも14、例えば少なくとも16、例えば少なくとも18、例えば少なくとも20、例えば21、例えば少なくとも25、例えば少なくとも30、例えば少なくとも40、例えば少なくとも50、例えば少なくとも60、例えば少なくとも70、例えば79前後の悪性セルライン中で発現されるmRNAの量には好ましくは本質上差違がない。

20

【0070】

加えて、本発明の方法に従ってそこから全RNAを使用する、少なくとも2、例えば少なくとも3、例えば少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも8、例えば少なくとも10の組織試料で発現されるmRNAの量には好ましくは本質上差違がない。

【0071】

可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列を、上の基準を満たす核酸配列から選ぶ。1つの特に好ましい態様では、この可能性ある細胞表面分子を実施例1に概説する通り同定し、そして該実施例に記載の基準に従って選ぶ。

30

【0072】

どの核酸配列が可能性ある細胞表面分子をコードしているかを決定するために、異なる戦略を利用できる。例えば、可能性ある細胞表面分子は、一般にアクセス可能なデータベースで入手し得る情報に従って選択できる。このようなデータベースは例えばPubMed (NCBI)、Nucleotide (NCBI)、Protein (NCBI)、Structure (NCBI)、OMIM (NCBI) およびLocusLink (NCBI) からなる群から選ばれる。NCBIはNational Center for Biotechnology Informationの略語である。さらに、可能性ある細胞表面分子は、該可能性ある細胞表面分子の名称中に1またはそれ以上の選ばれた語が存在する事に基づいて選択できる。例えば係る語は、レセプター、膜、接着、インテグリン、表面、抗原、シンデカン、輸送、チャネル、ホルモン、結合、糖タンパク質、マトリックス、CAM、デスモソーム、ギャップ接合部、デルタ、免疫グロブリン、MHC、CD、HSPG、CSPG、内在性およびノッチからなる群から選ばれる。

40

【0073】

別法として、可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列を、公知の細胞表面分子との配列相同性に従って選ぶ。可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列は公知の細胞表面分子をコードしている核酸配列と、少なくとも20%、例えば少なくとも22.5%、例えば少なくとも25%、例えば27.5%、例えば少なくとも30%の配列一致を持つべきである。

【0074】

可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列はまた、公知の細胞表面分子内部に含

50

まれるドメインとの配列相同性に基づいて選ぶこともできる。好ましくは、可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸のドメインと公知の細胞表面分子のドメインをコードしている核酸配列の間には、少なくとも20%、例えば少なくとも22.5%、例えば少なくとも25%、例えば27.5%、例えば少なくとも30%、例えば少なくとも32.5%、例えば少なくとも35%、例えば少なくとも37.5%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも42.5%、例えば少なくとも45%、例えば少なくとも47.5%、例えば少なくとも50%の配列一致がある。

【0075】

可能性ある細胞表面分子をコードしている核酸配列は、可能性ある細胞表面分子はドメイン（これはしばしば細胞表面と結合している）を含むという事に基づいて選ぶこともできる。該ドメインは例えば疎水性領域および可能性あるグリコシル化部位からなる群から選ばれ得る。

10

【0076】

本発明の或る態様では、候補細胞表面分子をChips分析によって同定した。次いで適当な細胞表面分子を幾つかの基準に基づいて選ぶことができる。例えば、絶対的必要性をもって存在する（P）と採点され、例えば>10、例えば>20、例えば>40、例えば>50の平均差違を有する細胞表面分子を含めることができる。さらに、適当な細胞表面分子を同定するための得点系を作ることにも可能である。例えば、該遺伝子を発現する各々のセルラインまたは組織につき1点といったように、細胞表面分子をコードしている遺伝子を幾つかの点数で採点することができる。各遺伝子に対する合計評点を正常組織とSCLCセルラインについてそれぞれ合計する。次いで、SCLCラインの少なくとも3、例えば4、例えば5、例えば6、例えば7、例えば8、例えば9、例えば10、例えば10以上に存在すると採点された遺伝子を選ぶことができる。細胞表面分子を選ぶ好ましい方法を実施例1に記載する。

20

【0077】

本発明はまた、それに機能的に連結した第2核酸配列の発現を指令できる第1核酸配列を同定する方法をも提供する。これらの方法は、正常細胞と比較して悪性細胞中では異なったレベルで発現される第2核酸配列を同定することを含んでいる。

【0078】

したがって好ましくは、1またはそれ以上のセルラインで発現される第2核酸配列のmRNAの量と、1またはそれ以上の組織で発現される第2核酸配列のmRNAの量には差違がある。より好ましくは、該差違は、少なくとも1.1倍、例えば1.2倍、例えば1.5倍、例えば1.75倍、例えば2倍、例えば2.5倍、例えば少なくとも3倍、例えば少なくとも4倍、例えば少なくとも5倍、例えば少なくとも7.5倍、例えば少なくとも10倍のmRNA発現の差違である。

30

【0079】

或る好ましい態様では、1またはそれ以上のセルライン中で発現される検出可能な第2核酸配列mRNAはなく、且つ1またはそれ以上の正常組織中では該mRNAが検出可能である、あるいは、1またはそれ以上の正常組織中で発現される検出可能な第2核酸配列mRNAはなく、且つ1またはそれ以上のセルライン中では該mRNAが検出可能である、といったように、原則としてこの差違が無限数倍である。

40

【0080】

さらに、本発明方法で使用する少なくとも2、例えば少なくとも3、例えば少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも8、例えば少なくとも10、例えば少なくとも12、例えば少なくとも14、例えば少なくとも16、例えば少なくとも18、例えば少なくとも20、例えば21、例えば少なくとも25、例えば少なくとも30、例えば少なくとも40、例えば少なくとも50、例えば少なくとも60、例えば少なくとも70、例えば79前後の悪性セルライン中で発現される第2核酸配列mRNAの量には本質上差違がない。

【0081】

50

さらに、好ましくは、少なくとも2、例えば少なくとも3、例えば少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも8、例えば少なくとも10の正常組織試料中で発現される第2核酸配列mRNAの量には本質上差がない。

【0082】

或る特に好ましい態様では、第2核酸配列を実施例1に記載の方法に従って同定する。最も好ましくは、その実施例に概説した基準を適用して有用な第2核酸配列を選ぶ。

【0083】

本発明の或る態様では、候補プロモーターをChips分析によって同定した。次いで適当なプロモーターを、そのプロモーターが制御する遺伝子の発現レベルに基づく幾つかの基準に基づいて選ぶことができる。例えば、絶対的必要性をもって存在する(P)と採点され、>10、例えば>20、例えば>30、例えば>40、例えば>50(発現レベル)の平均差違を有する遺伝子のみを含めることができる。本明細書中、上に記載した点数採点系を使用できる。例えば少なくとも3、例えば少なくとも4、例えば少なくとも5、例えば少なくとも6、例えば少なくとも7、例えば少なくとも8、例えば少なくとも9、例えば少なくとも10、例えば少なくとも11、例えば少なくとも12のSCLC系列に存在すると採点された遺伝子を例えば選択できる。もし或る遺伝子が1またはそれ以上の正常組織に存在すると採点されたならば、SCLCセルラインのメジアン平均差違値は、好ましくは正常組織のメジアン平均差違値の4倍またはそれ以上でなければならない。好ましくは正常組織についての発現の平均差違が<50でSCLCについては>100であるプロモーターを選ぶ。より好ましくは、正常組織についての発現の平均差違が<50でSCLCについては>200であるプロモーターを選ぶ。最も好ましくは正常組織についての発現の平均差違が<50でSCLCについては>400であるプロモーターを選ぶ。別法として、SCLCにおける発現の平均差違が正常組織におけるその>8倍であるプロモーターを選ぶことができる。細胞表面分子を選ぶ好ましい方法を実施例1に記載する。

上記の基準に従って第2核酸配列を同定したならば、この第2ヌクレオチド配列と機能的に連結した第1核酸配列を同定することが可能である。これは当業者の知悉する任意の標準的な方法に従って実施できる。例えば公知のヒトゲノム配列を利用することが可能である。

【0084】

細胞表面分子

本発明に係る細胞表面分子は細胞表面に天然状態で結合している任意の分子である。細胞表面分子はその存続期間の間ずっと細胞表面に結合できる訳ではなく、特定の時期にのみ細胞表面に結合できる。本発明の範囲内にある細胞表面分子は細胞表面に結合しているいかなる種類の分子であってもよいが、本発明に係る細胞表面分子は好ましくはポリペプチドを含む。

【0085】

本発明の或る態様では、細胞表面分子は細胞表面に結合せず、細胞内レセプターである。細胞内レセプターは例えば核ステロイドホルモンレセプターを包含する。

【0086】

しかしながら本発明のその他の好ましい態様では、細胞表面分子は、例えば貫膜ドメイン、膜係留ドメイン、または膜と結合できる親油性基のような共有結合により結合した基を介して、例えば細胞表面に直接結合する分子を包含する。親油性基は例えばグリコシル-ホスファチジル-イノシトール基(GPI)であり得る。しかしながら、該細胞表面分子は、細胞表面に間接的に結合する分子、例えば細胞表面に直接的または間接的に結合している他の細胞表面分子と結合できる分子をも包含する。

【0087】

一般に細胞表面分子は少なくとも1個の細胞外ドメインを含むが、細胞表面分子は1以上の細胞外ドメイン、例えば2、例えば3、例えば4、例えば5、例えば6、例えば7、例えば8、例えば9、例えば10、例えば10以上の細胞外ドメインを含むこともできる。

【0088】

10

20

30

40

50

細胞表面分子はしばしばグリコシル化されたポリペプチドである。

【 0 0 8 9 】

本発明の或る好ましい態様では、細胞表面分子は特異的結合パートナーと結合でき、そして結合時に該特異的結合パートナーをインターナライズすることができる。即ち、結合パートナーと細胞表面分子との結合の後、該結合パートナーは細胞表面分子を発現している細胞の内部に移行する。該結合パートナーはしばしばレセプター媒介エンドサイトーシスによってインターナライズされるが、その他の機構も可能であり、本発明の範囲内にある。結合パートナーをインターナライズできる細胞表面分子は、例えば放射線療法、毒素療法もしくは遺伝子療法または癌ワクチンに有用となり得る。

【 0 0 9 0 】

本発明の別の好ましい態様では、細胞表面分子は細胞表面で特異的結合パートナーと結合できるが、該特異的結合パートナーをインターナライズすることはできない。非インターナライズ細胞表面分子は例えば放射線療法および癌ワクチンに有用となり得る。

【 0 0 9 1 】

好ましい細胞表面分子のGenBank受託番号と名称を表 2 に示す。

【 表 4 】

表 2

受託	細胞表面分子	遺伝子名称	配列番号 (cDNA/DNA)	配列番号 (タンパク質)
M11507	トランスフェリンレセプター	ヒトトランスフェリンレセプターmRNA、完全cds	1	2
X01060	トランスフェリンレセプター	トランスフェリンレセプターのヒト mRNA	3	4
AB015633	HP10481	II型膜タンパク質のホモサピエンス mRNA、完全cdsクローン：HP10481	5	6
M14219	PG40	ヒトコンドロイチン/デルマタン硫酸プロテオグリカン (PG40) コアタンパク質 mRNA、完全cds	7	8
AF064801	TRC8	ホモサピエンスマルチ膜スパンレセプターTRC8 (TRC8) mRNA、完全cd	9	10
M29960	TR2-11	ヒトステロイドレセプター (TR2-11) mRNA、完全cds	11	12
X69398	OA3抗原性表面決定因子	OA3抗原性表面決定因子のホモサピエンス mRNA	13	14
X53586	インテグリン α 6	インテグリン α 6 のヒト mRNA	15	16
M34480	GPIIb	ヒト血小板糖タンパク質IIb (GPIIb) mRNA、完全cds	17	18
M14648	ビトロネクチンレセプター α サブユニット；ITGAVとも呼ばれる	ヒト細胞接着性タンパク質 (ビトロネクチン) レセプター α サブユニット；ITGAV mRNA、完全cds	19	20
AF032108	インテグリン α 7	ホモサピエンスインテグリン α 7 mRNA、完全cds	21	22
M35011	インテグリン β -5サブユニット	ヒトインテグリン β -5サブユニット mRNA、完全cds	23	24
X53002		インテグリン β -5サブユニットのヒト mRNA	25	26
L25851	インテグリン α E前駆体、ITGAEとも呼ばれる	ホモサピエンスインテグリン α E前駆体；ITGAE、mRNA、完全cds	27	28
S66213	インテグリン α 6B	インテグリン α 6B [ヒト、mRNA一部、528 nt]	29	30
X06256	インテグリン α 5サブユニット	インテグリン α 5サブユニットのヒト mRNA	31	32
M59911	インテグリン α -3鎖	ヒトインテグリン α -3鎖 mRNA、完全cds	33	34
S59184	RYK	RYK=レセプターチロシンキナーゼに関連 [ヒト、肝臓、mRNA、3068 nt]	35	36

10

20

30

40

【表 5】

(続き)

U50939	アミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1	ヒトアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1 mRNA、完全cds	37	38
U95822	推定貫膜GTPアーゼ	ヒト推定貫膜GTPアーゼmRNA、部分的cds	39	40
X59408	膜補助因子タンパク質	ホモサピエンス、膜補助因子タンパク質の遺伝子	41	
L20859	GLVR1	ヒト白血病ウイルスレセプター1 (GLVR1)mRNA、完全cds	42	43
D64154	Mr110,000抗原	Mr.110000抗原のヒトmRNA、完全cds	44	45
		インター α トリプシンインヒビター重鎖様遺伝子		47
Z48199	シンデカン-1	ホモサピエンスシンデカン-1遺伝子 (エキソン2-5)	48	49
Y18007	推定セブン貫膜ドメインタンパク質	推定セブン貫膜ドメインタンパク質のホモサピエンスmRNA	50	51
Y00815	LCA-相同体/LARタンパク質	LCA相同体のヒトmRNA。LARタンパク質 (白血球抗原関連)	52	53
X64364	M6抗原	M6抗原のホモサピエンスmRNA	54	55
X62654	Me491/CD63抗原	Me491/CD63抗原のホモサピエンス遺伝子	56	57
U94831	マルチスパン膜タンパク質	ホモサピエンスマルチスパン膜タンパク質mRNA、完全cds	58	59
U48705	DDR	ヒトレセプターチロシンキナーゼDDR遺伝子、完全cds	60	61
M63175	自己分泌型運動因子レセプター	ヒト自己分泌型運動因子レセプターmRNA	62	63
AB015631	II型膜タンパク質クローン	II型膜タンパク質のホモサピエンスmRNA、完全cds、クローン:HP10390	64	65
Y00285	インスリン様成長因子IIレセプター	インスリン様成長因子IIレセプターのヒトmRNA	66	67
U01160	SAS	ヒト貫膜4スーパーファミリータンパク質 (SAS)mRNA、完全cds	68	69
M33680	TAPA-1	ヒト26-kDa細胞表面タンパク質TAPA-1 mRNA、完全cds	70	71
M16941	MHCクラスII HLA-DR7関連糖タンパク質 β 鎖	ヒトMHCクラスII HLA-DR7関連糖タンパク質 β 鎖mRNA完全cds	72	73
J04599	骨小プロテオグリカンIビグリカン	骨小プロテオグリカンIビグリカンをコードしているヒトhPGI mRNA、完全cds	74	75
Y07593	CAR	46kDaコクサッキーウイルスおよびアデノウイルスレセプター (CAR) タンパク質のホモサピエンスmRNA	76	77

10

20

30

40

【表6】

(続き)

U73682	MEA11	ヒト髄膜腫発現抗原11(MEA11)mRNA、部分的cds	78	79
U19247	インターフェロンγレセプターα鎖	ホモサピエンス インターフェロンγレセプターα鎖遺伝子、エキソン7および完全cds	80	81
X73079	多量体免疫グロブリンレセプター	多量体免疫グロブリンレセプターをコードしているホモサピエンス	82	83
X80818	代謝調節型グルタミン酸レセプター4型	代謝調節型グルタミン酸レセプター4型のホモサピエンスmRNA	84	85
AF037339	CLPTM1	ホモサピエンス唇裂および口蓋貫膜タンパク質1(CLPTM1)mRNA、完全cds	86	87
U10689	MAGE5a	ヒトMAGE-5a抗原(MAGE5a)遺伝子、完全cds	88	89
U03735	MAGE-3	ヒトMAGE-3抗原(MAGE-3)遺伝子、完全cds	90	91
M77481	MAGE-1	ヒト抗原(MAGE-1)遺伝子、完全cds	92	93
U10691	MAGE6	ヒトMAGE-6抗原(MAGE6)遺伝子、完全cds	94	95
L33930	CD24	ホモサピエンスCD24シグナルトランスデューサーmRNA、完全cdsおよび3'領域	96	97
M84349	CD59	ヒト貫膜タンパク質(CD59)遺伝子、エキソン4	98	99
L00352	低密度リポタンパク質レセプター	ヒト低密度リポタンパク質レセプター遺伝子、エキソン18	100	101
AF023676	ラミンBレセプター相同体TM7SF2	ホモサピエンスラミンBレセプター相同体TM7SF2(TM7SF2)mRNA完全cds	102	103
U41804	T1/ST2レセプター結合タンパク質前駆体	ヒト推定T1/ST2レセプター結合タンパク質前駆体mRNA、完全cds	104	105
Y10148	NTR2レセプター	NTR2レセプターのホモサピエンスmRNA	106	107
U46194	RAGE-4	ヒト腎細胞癌抗原RAGE-4 mRNA、完全推定cds	108	109
M90683	HLA-G1	ヒトリンパ球抗原(HLA-G1)mRNA、完全cds	110	111
AF104942	MOAT-C	ホモサピエンスABC輸送体MOAT-C(MOAT-C)mRNA、完全cds	112	113
AF042792	α2δカルシウムチャネルサブユニットI	ホモサピエンスα2δカルシウムチャネルサブユニットI mRNA、完全cds	114	115

10

20

30

40

【表 7】

(続き)

Y00636	LFA-3	リンパ球機能関連抗原3 (LFA-3) のヒト mRNA	116	117
X59847	L1-CAM	神経細胞接着性分子L1のホモサピエンス mRNA (HSNCAML1)	118	119
XM010168	AVPR2	アルギニン-バソプレシンレセプター (AVPR2)		120
	C1 p115 C1	C1 p115		121
	TE2	ARD1 N-アセチルトランスフェラーゼ関連タンパク質		122
	RbP	レニン結合タンパク質		123
	HCF-1	宿主細胞因子1		124
	IRAK	インターロイキン1-レセプター結合キナーゼ		125
D29963	CD151	CD151のホモサピエンス mRNA、完全 cds	126	127
M60922	表面抗原	ヒト表面抗原 mRNA、完全 cds	128	129
M29273	MAG	ヒトミエリン結合糖タンパク質 (MAG) mRNA、完全 cds	130	131
U64871	GPR19	ヒト推定Gタンパク質共役レセプター (GPR19) 遺伝子、完全 cds	132	133
L78132	Pcta-1	ヒト前立腺癌腫瘍抗原 (pcta-1) mRNA、完全 cds	134	135
U65011	PRAME	選択的に発現されるメラノーマのヒト抗原 (PRAME) mRNA、完全 cds	136	137
X81882	バソプレシンにより活性化されるカルシウム動員レセプター様タンパク質	バソプレシンにより活性化されるカルシウム動員レセプター様タンパク質のホモサピエンス mRNA	138	139
U65416	MICB	ヒトMHCクラスI分子 (MICB) 遺伝子、完全 cds	140	141
Y12505	セロトニンレセプター5-HT4B	セロトニンレセプター5-HT4Bのホモサピエンス mRNA、スプライス変異体	142	143
M38690	CD9	ヒトCD9抗原 mRNA、完全 cds	144	145
AF077820	LDLレセプター成員LR3	ホモサピエンス LDLレセプター成員LR3 mRNA、完全 cds	146	147
U10688	MAGE-4b	ヒトMAGE-4b抗原 (MAGE4b) 遺伝子、完全 cds	148	149
AF068868	DR6	ホモサピエンス TNFR-関連死レセプター6 (DR6) mRNA、完全 cds	150	151
D16532	超低密度リポタンパク質レセプター	超低密度リポタンパク質レセプターのヒト遺伝子、エキソン19	152	153

10

20

30

40

【表 8】

(続き)

M81590	セロトニン1Dレセプター(5-HT1D~)	ホモサピエンスセロトニン1Dレセプター(5-HT1D~)mRNA、完全cds	154	155
M58286	腫瘍壊死因子レセプター	ホモサピエンス腫瘍壊死因子レセプターmRNA、完全cds	156	157
AF062006	HG38	ホモサピエンスオーファンGタンパク質共役レセプターHG38 mRNA、完全cds	158	159
U09937	ウロキナーゼ型プラスミノージェンレセプター	ヒトウロキナーゼ型プラスミノージェンレセプター、エキソン7	160	161
M22092	N-CAM; NCAM1とも呼ばれる	ヒト神経細胞接着分子(N-CAM)遺伝子、エキソンSECおよび部分的cds	162	163
M34641	FGFレセプター	ヒト線維芽細胞成長因子(FGF)レセプター1 mRNA、完全cds	164	165
M14764	神経成長因子レセプター	ヒト神経成長因子レセプターmRNA、完全cds	166	167
U10694	MAGE-9	ヒトMAGE-9抗原(MAGE9)遺伝子、完全cds	168	169
AB026891	シスチン/グルタミン酸塩輸送体	シスチン/グルタミン酸塩輸送体のホモサピエンスmRNA、完全cds	170	171
U73304	CB1カンナビノイドレセプター(CNR1)	ヒトCB1カンナビノイドレセプター(CNR1)遺伝子、完全cds	172	173
M69245	PSG	ヒト妊娠特異的 β -1糖タンパク質(PSG) mRNA、完全cds	174	175
AB000712	CPEレセプター	CPEレセプターのホモサピエンスhCPE-R mRNA、完全cds	176	177
AF011406	CRH2R	ホモサピエンスコルチコトロピン放出ホルモンレセプター2型 β イソ型(CRH2R)mRNA、完全cds	178	179
U50410	OCI5	ヒトヘパラン硫酸プロテオグリカン(OCI5)mRNA、完全cds	180	181
AF016266	TRAILレセプター2	ホモサピエンスTRAILレセプター2 mRNA、完全cds	182	183
U87947	HNMP-1	ヒト造血神経膜タンパク質(HNMP-1)mRNA、完全cds	184	185
J03853	腎 α -2-アドレナリン作動性レセプター	ヒト腎 α -2-アドレナリン作動性レセプターmRNA、完全cds	186	187
U10686	MAGE11	ヒトMAGE-11抗原(MAGE11)遺伝子、完全cds	188	189
U25988	PSG13'	ヒト妊娠特異的糖タンパク質13(PSG13')mRNA、完全cds	190	191

10

20

30

40

【表 9】

(続き)

M60459	エリスロポエチンレセプター	ヒトエリスロポエチンレセプターmRNA、完全cds	192	193
X15998	コンドロイチン硫酸プロテオグリカンバーシカンV1	コンドロイチン硫酸プロテオグリカンバーシカンV1スプライス変異体のホモサピエンスmRNA; 前駆体ペプチド	194	195
U31216	mGlu1beta	ヒト代謝調節型グルタミン酸レセプター1β (mGluR1beta)mRNA、完全cds	196	197
X94630	CD97	ホモサピエンスCD97遺伝子エキソン1(および結合したCDS)	198	199
M90657	L6	ヒト腫瘍抗原(L6)mRNA、完全cds	200	201
U87459	NY-ESO-1	ヒト自己免疫原性癌/精巣抗原NY-ESO-1 mRNA、完全cds	202	203
S71824	N-CAM; NCAM1とも呼ばれる	N-CAM=145kda神経細胞接着性分子[ヒト、小細胞肺癌セルラインOS2-R、mRNA、2960 nt]	204	205
AE000659	T細胞レセプターαδ	完全ヌクレオチド配列の塩基250472から501670まで(セクション5のうちの2)のホモサピエンスT細胞レセプターαδ遺伝子座	206	207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222
M97639	Ror2	ヒト貫膜レセプター(ror2)mRNA、完全cds	223	224
M81830	SSTR2	ヒトソマトスタチンレセプターイソ型2(SSTR2)遺伝子、完全cds	225	226
AF030339	VESPR	ウイルスセマフォリンタンパク質のホモサピエンスレセプター(VESPR)mRNA、完全cds	227	228
X02160	インスリンレセプター前駆体	インスリンレセプター前駆体のヒトmRNA	229	230
U12255	IgG Fcレセプター	ヒトIgG FcレセプターhFcRn mRNA、完全cds	231	232
X82068	グルタミン酸レセプターサブユニットGluRC	グルタミン酸レセプターサブユニットGluRCのホモサピエンスmRNA	233	234

10

20

30

40

【表 10】

(続き)

X75208	HEK2	タンパク質チロシンキナーゼレセプターのホモサピエンスHEK2 mRNA	235	236
X64116	PVR	ポリオウイルスレセプターのホモサピエンスPVR遺伝子(エキソン1)	237	
		ポリオウイルスレセプター γ		238
		ポリオウイルスレセプター β		239
		ポリオウイルスレセプター α		240
M29540	CEA	ヒト癌胎児抗原mRNA (CEA)、完全cds	241	242
U94888	CC-ケモカイン結合レセプターJAB61	ホモサピエンスCC-ケモカイン結合レセプターJAB61 mRNA、完全cds	243	244
M97675	Ror1	ヒト貫膜レセプター(ror1)mRNA、完全cds	245	246
M12036	HER2	ヒトチロシンキナーゼ型レセプター(HER2) 遺伝子、部分的cds	247	248
U87460	推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質	ヒト推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質mRNA、完全cds	249	250
L20852	GLVR2	ヒト白血病ウイルスレセプター2(GLVR2)mRNA、完全cds	251	252
L05424		ヒト細胞表面糖タンパク質CD44(CD44) 遺伝子、長末端イソ型の3'末端	253	254
M59040	CD44	ヒト細胞接着分子(CD44)mRNA、完全cds	255	256
U83993	P2X4プリンレセプター	ヒトP2X4プリンレセプターmRNA、完全cds	257	258
XM_015664	上皮成長因子関連タンパク質と類似のFLJ22357	上皮成長因子レセプター関連タンパク質と類似のホモサピエンス仮想タンパク質FLJ22357 (FLJ22357)mRNA	261	262
NM_022450		上皮成長因子レセプター関連タンパク質と類似のホモサピエンス仮想タンパク質FLJ22357 (FLJ22357)mRNA	259	260
M84562	FPRL1	ヒトホルミルペプチドレセプター様レセプター(FPRL1)mRNA、完全cds	263	264
M34309	HER3	ヒト上皮成長因子レセプター(HER3)mRNA、完全cds	265	266
M83664	HLA-DP	ヒトMHCクラスIIリンパ球抗原(HLA-DP) β 鎖mRNA、完全cds	267	268
AF025998	心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター	ホモサピエンス心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター(ANPRC)mRNA、完全cds	269	270
XM_006034	ガストリン/CC-K-Bレセプター	ホモサピエンスコレシストキニンBレセプター(CCKBR)、mRNA	271	272
M73482	ニューロメディンBレセプター	ヒトニューロメディンBレセプター(NMB-R)mRNA、完全cds	273	274

10

20

30

40

【表 1 1】

(続き)

NM_001496	GFRA3	ホモサピエンスGDNFファミリーレセプター α 3(GFRA3)、mRNA	275	276
XM_010317	GRPR	ホモサピエンスガストリン放出ペプチドレセプター(GRPR)、mRNA	277	278
U92459	代謝調節型グルタミン酸レセプター8; GRM8またはGluR8とも呼ばれる	ヒト代謝調節型グルタミン酸レセプター8(GluR8)mRNA、完全cds; GRM8	279	280
XM_007840	CDH1	ホモサピエンスカドヘリン1、1型、E-カドヘリン(上皮性)(CDH1)、mRNA	281	282
XM_016157	CDH2	ホモサピエンスカドヘリン2、1型、N-カドヘリン(神経性)(CDH2)、mRNA	283	284
XM_005591	TGFBR1	ホモサピエンストランスフォーミング成長因子、 β レセプターI(アクチビンAレセプターII型様キナーゼ、53kD)(TGFBR1)、mRNA	285	286
XM_003094	TGFBR2	ホモサピエンストランスフォーミング成長因子、 β レセプターII(70-80kD)(TGFBR2)、mRNA	287	288
XM_001924	TGFBR3	ホモサピエンストランスフォーミング成長因子、 β レセプターIII(β グリカン、300kD)(TGFBR3)、mRNA	289	290
NM_000875	IGF1R	ホモサピエンスインスリン様成長因子1レセプター(IGF1R)、mRNA	291	292
X00588	上皮成長因子レセプターの前駆体	上皮成長因子レセプター前駆体のヒトmRNA	293	294
Z75190	LRP8	ホモサピエンスアポリポタンパク質Eレセプター2(APOER2)、LRP8とも呼ばれる; mRNA	295	296
U62434	CHRNA 5	ニコチン性アセチルコリンレセプター α 5サブユニット(CHRNA 5); mRNA	297	298
U19878	TMEFF1	EGF様および2個のフォラスチアチン様ドメイン1を持つ貫膜タンパク質(TMEFF1); mRNA	299	300
L20814	GRIA2; GluR2とも呼ばれる	ヒトグルタミン酸レセプター2(HBGR2); GluR2またはGRIA2とも呼ばれる; 完全コード配列	301	302
AL008583	NPTXR	神経細胞性ペントラキシンレセプター(NPTXR); DNA配列	303	304

10

20

30

40

【0092】

本発明に係るより一層好ましい細胞表面分子は以下の群のうちの1つに属するレセプターである：

レセプターチロシンキナーゼの成員、
 インテグリンファミリーの成員、
 免疫グロブリンスーパーファミリー接着性分子の成員、
 ヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、
 コンドロイチン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、
 MAGEファミリーの成員、

50

RAGEファミリーの成員、
低密度リポタンパク質レセプターファミリーの成員、
カドヘリン接着分子の成員、
代謝調節型グルタミン酸レセプターの成員、
ステロイドホルモンファミリーの成員、
セブン貫膜レセプターファミリーの成員、
心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター、
GFRA3、
トランスフェリンレセプター、
セリン/スレオニンキナーゼレセプターの成員。

10

【0093】

本発明に係るより更に好ましい細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる細胞表面分子である。

【0094】

本発明の或る好ましい態様では、細胞表面分子は、結合時に特異的結合パートナーをインターナライズすることができる（本明細書上記を参照されたい）。結合パートナーをインターナライズすることのできる本発明に係る好ましい細胞表面分子はNCAM1、NPTXR、LRP8およびCHRNA5からなる群から選ぶことができる。

20

【0095】

本発明の別の好ましい態様では、細胞表面分子はそれらの特異的結合パートナーをインターナライズすることができない。結合パートナーをインターナライズすることのできない本発明に係る好ましい細胞表面分子はGRIA2、GRM8、ITGAVおよびITGAEからなる群から選ぶことができる。

【0096】

本発明に係る1つの特に好ましい細胞表面分子はNCAM1（NCAM、神経細胞接着性分子、N-CAM、CD56）である。NCAM1は殆どのSCLC中で高度に発現される。NCAM1の発現は例えばCHIPS分析、RT-PCRおよびウェスタンブロッティングにより示されている（実施例1、図11および図15を参照されたい）。NCAM1は、結合パートナーとインターナライズすることができる。NCAM1と結合できる結合パートナーを本明細書下記に記載する。NCAM1は星状細胞にインターナライズされることが示されており（Minanaらによる2001）、抗NCAM1抗体-タンパク質A-ストレプトアビジン-ビオチン-ガラクトシダーゼ酵素からなる極めて大型の分子複合体の非常に効率的なインターナライゼーションが可能であることが証明されている（Yuらによる2000）。

30

【0097】

本発明に係る別の好ましい細胞表面分子はNPTXR（ニューロンペントラキシンレセプター、NPR）である。NPTXRは殆どのSCLC中で発現される。NPTXRの発現は例えばCHIPS分析、RT-PCRおよびウェスタンブロッティングにより証明されている（実施例1、図10および図14を参照されたい）。NPTXRは高インターナライズレセプターである。NPTXRと結合できる結合パートナーを本明細書下記に記載する。

40

【0098】

本発明に係るさらに別の好ましい細胞表面分子はLRP8（低密度リポタンパク質レセプター関連タンパク質、アポリポタンパク質Eレセプター2）である。

【0099】

LRP8は試験した全てのSCLC中で発現されている。LRP8の発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRによって証明された（実施例1および図9を参照されたい）。LRP8は高インターナライズレセプターである。LRP8と結合できる結合パートナーを本明細書下記に記載する。

【0100】

本発明に係るさらに別の好ましい細胞表面分子はCHRNA5（ニコチン性アセチルコリンレセプター5サブユニット）である。CHRNA5と結合できる結合パートナーを本明細書下記に

50

記載する。

【0101】

本発明において使用できるさらに別の細胞表面分子はL1CAM（神経細胞接着性分子L1）である。L1は結合パートナーをインターナライズできることが知られている。L1CAMと結合できる結合パートナーを本明細書下記に記載する。

【0102】

本発明に係るさらに別の好ましい細胞表面分子はTNFRSF12（DR6、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー成員21）である。TNFRSF12は殆どのSCLC中で発現される。TNFRSF12の発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRによって証明されている（実施例1および図8を参照されたい）。TNFRSF12が属するファミリーのその他の成員は結合パートナーをインターナライズすることができる。

10

【0103】

本発明に係る特に好ましい細胞表面分子はGRIA2（イオンチャネル型グルタミン酸レセプター2、GLUR2、GLURB、HBGR2、AMPA2）である。GRIA2は試験した全てのSCLC中および脳中で発現されている。GRIA2は極めて特異的な脳の外部のSCLCレセプターである。GRIA2の発現は例えばChips分析、RT-PCRおよびウェスタンブロットティングにより証明されている（実施例1、図12Aおよび図16を参照されたい）。

【0104】

本発明に係る別の好ましい細胞表面分子はGRM8（代謝調節型グルタミン酸8レセプター、GLUR8、mGlu8、GPRC1H）である。GRM8は脳以外のSCLC中で極めて特異的に発現され、殆どのSCLC中で発現されている。GRM8の発現は例えばChips分析、RT-PCRおよびウェスタンブロットティングにより証明されている（実施例1および図13を参照されたい）。GRM8と結合できる結合パートナーを本明細書下記に記載する。

20

【0105】

本発明に係るさらに別の好ましい細胞表面分子はITGAV（インテグリンサブユニット α 、ビトロネクチンレセプター、CD51）である。ITGAVはSCLCで高度に発現される。発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRにより証明されている（実施例1および図12Bを参照されたい）。

【0106】

本発明に係るさらに別の好ましい細胞表面分子はITGAE（インテグリンEサブユニット前駆体、ヒト粘膜リンパ球1抗原、CD103）である。ITGAEは試験した全てのSCLCで発現され、ITGAEはSCLC中で極めて特異的に発現される。発現は例えばCHIPS分析およびウェスタンブロットティングにより証明されている（実施例1および図17を参照されたい）。

30

【0107】

本発明に係るさらに別の好ましい細胞表面分子はGPR49（オーファンGタンパク質共役レセプター67、GPR67、HG38）である。

【0108】

本発明に係るさらに別の好ましい細胞表面分子はTMEFF1（EGF様および2個のフォラスタチン様ドメインを持つ貫膜タンパク質）である。

【0109】

しかしながら本発明は、表2に示すヌクレオチド配列のフラグメントがコードしているフラグメントを含む細胞表面分子にも関する。或る好ましい態様では、本発明は、同遺伝子がコードしているこれらの配列のスプライス変異体によってコードされている細胞表面分子にも関する。表2に概説した細胞表面分子のスプライス変異体は該細胞表面分子とフラグメントを共有するポリペプチド配列をコードしていることがあるが、しかしながら、スプライス変異体は別のリーディングフレームを利用しているかも知れず、その結果、2つのスプライス変異体の産物は共通フラグメントを持つヌクレオチド配列によってコードされていても、ポリペプチド配列は関連していないことがある。

40

【0110】

さらに、本発明は、表2に記載の細胞表面分子をコードしているヌクレオチド配列のフラ

50

グメントに関する。特に、本発明に係る結合パートナー（本明細書下記を参照されたい）は、本発明に係る細胞表面分子の1またはそれ以上のフラグメントの産物とのみ結合でき、好ましくは細胞表面分子の全フラグメントとは結合しない。したがって、可能性ある結合パートナーを同定するために該細胞表面分子のフラグメントを使用することが可能である（本明細書下記を参照されたい）。

【0111】

例えばこのようなフラグメントは該配列の5'側半分または3'側半分を含む。さらに、該フラグメントは、その配列の5'側半分の一部または3'側半分の一部を含むかも知れない。好ましくはこのようなフラグメントは5000bpより短く、例えば4000bpより短く、例えば3000bpより短く、例えば2500bpより短く、例えば2000bpより短く、例えば1750bpより短く、例えば1500bpより短く、例えば1250bpより短く、例えば1000bpより短く、例えば900bpより短く、例えば800bpより短く、例えば700bpより短く、例えば600bpより短く、例えば500bpより短く、例えば400bpより短く、例えば300bpより短く、例えば200bpより短く、例えば100bpより短く、例えば75bpより短く、例えば50bpより短く、例えば40bpより短く、例えば30bpより短く、例えば25bpより短く、例えば20bpより短く、例えば18bpより短い。

10

【0112】

該フラグメントは内部フラグメントであってよく、または5'もしくは3'末端を含んでいてもよい。

【0113】

本発明の或る好ましい態様では、該フラグメントは予め決められた長さの多数の構築(buiding)ブロックを含み、この構築ブロックは、天然遺伝子配列、好ましくは表2に概説した配列の一部と同一になるように連結している。したがって、フラグメントは予め決められた長さの複数の構築ブロックおよび予め決められた開始点を含み得る。

20

【0114】

構築ブロックは予め決められた長さおよび開始点を持つ核酸配列であり、その結果、第1の構築ブロックが該核酸配列のある位置で始まり、次の構築ブロックは前の構築ブロックが停止する位置の後の位置から始まる。

【0115】

好ましくは、該構築ブロックは以下の配列のいずれかから誘導される：配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号44、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68、配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号106、配列番号108、配列番号110、配列番号112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、配列番号174、配列番号176、配列番号178、配列番号180、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号190、配列番号192、配列番号194、配列番号196、配列番号198、配列番号200、配列番号202、配列番号204、配列番号206、配列番号223、配列番号225、配列番号227、配列番号229、配列番号231、配列番号233、配列番号235、配列番号237、配列番号241、配列番号243、配列番号245、配列番号247、配列番号249、配列番号251、配列番号253、配列番号255、配列番号257、配列番号261、配列番号259、配列番号263、配列番号265、配列番号267、配列番号269、配列番号271、配列番号273、配列番号275、配列番号277、配列番号279、配列番号281、配列番号283、配列番号285、配列番号287、配列番号289、配列番号291、配列

30

40

50

番号293、配列番号295、配列番号297、配列番号299、配列番号301および配列番号303。

【0116】

各構築ブロックは好ましくは1000bpより短く、例えば900bpより短く、例えば800bpより短く、例えば700bpより短く、例えば600bpより短く、例えば500bpより短く、例えば400bpより短く、例えば300bpより短く、例えば200bpより短く、例えば100bpより短く、例えば75bpより短く、例えば50bpより短く、例えば40bpより短く、例えば30bpより短く、例えば25bpより短く、例えば20bpより短く、例えば18bpより短い。或る態様では構築ブロックは18bp前後である。

【0117】

構築ブロックは、表2に概説した任意の配列の1位、例えば2位、例えば3位、例えば4位、例えば5位、例えば6位、例えば7位、例えば8位、例えば9位、例えば10位、例えば11位、例えば12位、例えば13位、例えば14位、例えば15位、例えば16位、例えば17位、例えば18位、例えば19位、例えば20位、例えば20位～100位のいずれか、例えば100位のいずれかで始まり得る。

10

【0118】

該フラグメントは好ましくは複数の構築ブロック、例えば2、例えば3、例えば4、例えば5、例えば5～10、例えば10～20、例えば20～30、例えば30～40、例えば40～50、例えば50～75、例えば75～100、例えば100以上の構築ブロックを含む。

【0119】

或る態様では、該フラグメントは、長さ100塩基対であり且つ1位で始まる構築ブロックを含む。

20

【0120】

さらに、本発明に係る細胞表面分子のフラグメントはキメラフラグメントであってよく、係るキメラフラグメントは、表2に概説した配列に従い互いに結合していない1以上のフラグメントを含む。該キメラフラグメントは同じ細胞表面分子に由来するフラグメントを含むことができたり、或いはそれらは本発明に係る1以上の細胞表面分子に由来するフラグメントを含むこともできる。

【0121】

さらに、本発明は表2に記載の細胞表面分子のポリペプチド配列のフラグメントに関する。特に、本発明に係る結合パートナー（本明細書下記を参照されたい）は本発明に係る細胞表面分子のうち1個だけまたはそれ以上のフラグメントに結合できるが、好ましくは細胞表面分子の全フラグメントには結合しない。したがって、該細胞表面分子のフラグメントを使用して可能性ある結合パートナーを同定することが可能である（本明細書下記を参照されたい）。

30

【0122】

ポリペプチド配列のフラグメントは3000アミノ酸よりも短く、例えば2500アミノ酸よりも短く、例えば2000アミノ酸よりも短く、例えば1750アミノ酸よりも短く、例えば1500アミノ酸よりも短く、例えば1250アミノ酸よりも短く、例えば1000アミノ酸よりも短く、例えば900アミノ酸よりも短く、例えば800アミノ酸よりも短く、例えば700アミノ酸よりも短く、例えば600アミノ酸よりも短く、例えば500アミノ酸よりも短く、例えば400アミノ酸よりも短く、例えば300アミノ酸よりも短く、例えば200アミノ酸よりも短く、例えば100アミノ酸よりも短く、例えば75アミノ酸よりも短く、例えば50アミノ酸よりも短く、例えば40アミノ酸よりも短く、例えば30アミノ酸よりも短く、例えば25アミノ酸よりも短く、例えば20アミノ酸よりも短く、例えば15アミノ酸よりも短く、例えば10アミノ酸よりも短くてよい。

40

【0123】

好ましくは、該フラグメントは以下のポリペプチド配列のフラグメントである：配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号43、

50

配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号63、配列番号65、配列番号67、配列番号69、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81、配列番号83、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号91、配列番号93、配列番号95、配列番号97、配列番号99、配列番号101、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号109、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151、配列番号153、配列番号155、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号169、配列番号171、配列番号173、配列番号175、配列番号177、配列番号179、配列番号181、配列番号183、配列番号185、配列番号187、配列番号189、配列番号191、配列番号193、配列番号195、配列番号197、配列番号199、配列番号201、配列番号203、配列番号205、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号220、配列番号221、配列番号222、配列番号224、配列番号226、配列番号228、配列番号230、配列番号232、配列番号234、配列番号236、配列番号238、配列番号240、配列番号242、配列番号244、配列番号246、配列番号248、配列番号250、配列番号252、配列番号254、配列番号256、配列番号258、配列番号260、配列番号262、配列番号264、配列番号266、配列番号268、配列番号270、配列番号272、配列番号274、配列番号276、配列番号278、配列番号280、配列番号282、配列番号284、配列番号286、配列番号288、配列番号290、配列番号292、配列番号294、配列番号296、配列番号298、配列番号300、配列番号302および配列番号304。さらに、該ポリペプチド配列のフラグメントの機能的相同体もまた本発明の細胞表面分子に包含され得、または該細胞表面分子は該ポリペプチド配列のフラグメントの機能的相同体を構成することができる。機能的相同体は本明細書下記に定義する。

10

20

30

40

50

【0124】

本発明に係る該細胞表面分子の特に好ましいフラグメントは、該細胞表面分子の1またはそれ以上の細胞外ドメインを含むフラグメントである。加えて、細胞外ドメインの一部を含むフラグメントもまた本発明の範囲内にある好ましいフラグメントである。最も好ましくは、本発明に係る細胞表面分子のフラグメントは、1またはそれ以上の細胞外ドメインを含み、且つ該フラグメントに対する親和性を持つ結合パートナーをインターナライズできるフラグメントである。

【0125】

或る態様では、該フラグメントは細胞外ドメインまたはそのフラグメントまたはその誘導体を含み、該細胞外ドメインは、ヌクレオチド配列番号3のヌクレオチド1014乃至2450、配列番号15のヌクレオチド216乃至3179、配列番号31のヌクレオチド147乃至2999、配列番号52のヌクレオチド419乃至4120、配列番号66のヌクレオチド268乃至7059、配列番号82のヌクレオチド235乃至2094、配列番号104のヌクレオチド160乃至663、配列番号204のヌクレオチド301乃至2250、配列番号229のヌクレオチド130乃至2880、配列番号281のヌクレオチド569乃至2152、配列番号283のヌクレオチド585乃至1901、配列番号291のヌクレオチド121乃至2836、および配列番号293のヌクレオチド259乃至2127のヌクレオチド配列によりコードされているポリペプチド配列からなる群から選ぶことができる。

【0126】

本明細書上記に概説した細胞表面分子および細胞表面分子のフラグメントは、翻訳後修飾をさらに含むことができる。翻訳後修飾の例は、リン酸化、グリコシル化、アセチル化、メチル化、硫酸化、ポリシアリル化、ファルネシル化、ミリストイル化またはパルミチル化である。

【0127】

表2に概説する細胞表面分子の機能的相同体もまた本発明内に含まれる。本発明に係る好

ましい細胞表面分子をコードしているポリペプチド配列の配列番号もまた表2に示す。本発明に係る細胞表面分子の機能的相同体は、本発明に係る結合パートナーと結合でき、且つ好ましくは該結合パートナーをインターナライズできる細胞表面分子である。

【0128】

プロモーター

本発明の範囲内にあるプロモーターは、それに機能的に連結した第2核酸配列の発現を指令(directing)できる第1核酸配列である。該第1核酸配列は通常、転写され得る核酸配列の染色体上の上流に見出される。

【0129】

或る態様では、好ましくは、第2核酸配列に機能的に連結した第1核酸配列は、染色体上の該第2核酸配列の翻訳開始コドンの上流に少なくとも15,000塩基対を含む。しかしながら、第2核酸配列に機能的に連結した第1核酸配列は、該染色体上の第2核酸配列の翻訳開始コドンの上流に少なくとも12,500、例えば少なくとも10,000、例えば少なくとも8,000、例えば少なくとも6,000、例えば少なくとも5,000、例えば少なくとも4,000、例えば少なくとも3,000、例えば少なくとも2,500、例えば少なくとも2,000、例えば少なくとも1,500、例えば少なくとも1,000、例えば少なくとも500、例えば少なくとも400、例えば少なくとも300、例えば少なくとも200、例えば少なくとも150、例えば少なくとも100、例えば少なくとも50、例えば少なくとも25、例えば少なくとも10塩基対を、または遺伝子発現を指令できるいずれかのこのような配列のフラグメントを含むこともある。

10

【0130】

さらに、別の態様では、第2核酸配列に機能的に連結している第1核酸配列は、好ましくは該染色体上の該第2核酸配列の翻訳開始コドンの上流に10までの、例えば100までの、例えば500までの、例えば1000までの、例えば2500までの、例えば5000までの塩基対を、または遺伝子発現を指令できるそのフラグメントを含む。

20

【0131】

第2核酸配列に機能的に連結している第1核酸配列が、該染色体上の第2核酸配列の翻訳開始コドンの上流に1もしくはそれ以上のイントロン配列またはそのフラグメントを含み得るという事もまた本発明の範囲内である。さらに、第2核酸配列に機能的に連結している第1核酸配列は、該染色体上の該第2核酸配列の翻訳開始コドンの下流に見出される1もしくはそれ以上のイントロン配列またはそのフラグメントを含み得る。

30

【0132】

第2核酸配列に機能的に連結している第1核酸配列はさらに、該染色体上の該第2核酸配列の翻訳開始コドンから15,000塩基対以上上流または下流に位置するエンハンサー配列を含み得る。

【0133】

第2核酸配列と機能的に連結した上述の第1核酸配列はまた、核酸の欠失および/または付加を含み得る。欠失および/または付加は内部であってよく、或いは核酸配列の末端であってよい。

【0134】

したがって、該染色体上の第2核酸配列の翻訳開始コドンから上流に例えば1000まで、例えば2500まで、例えば5000まで、例えば7500まで、例えば10,000まで、例えば15,000まで、例えば20,000塩基対までを含む第1核酸配列から、少なくとも10の内部bp、例えば少なくとも25の内部bp、例えば少なくとも50の内部bp、例えば少なくとも100の内部bp、例えば200の内部bp、例えば少なくとも300の内部bp、例えば少なくとも400の内部bp、例えば少なくとも500の内部bp、例えば少なくとも750の内部bp、例えば少なくとも1000の内部bp、例えば少なくとも1250の内部bp、例えば少なくとも1500の内部bp、例えば少なくとも1750の内部bp、例えば少なくとも2000の内部bp、例えば少なくとも2500の内部bp、例えば少なくとも3000の内部bp、例えば少なくとも3500の内部bp、例えば少なくとも4000の内部bp、例えば少なくとも4500の内部bpを除去することができる。

40

【0135】

50

特定の核酸配列は他の核酸配列よりも除去することが好ましい。例えば発現を抑制する配列または機能的に連結している第2核酸配列の発現を変化させない配列を除去することができる。したがって、本発明はまた、染色体上の第2核酸配列の翻訳開始コドンの上流に1000まで、例えば2500まで、例えば5000まで、例えば7500まで、例えば10,000まで、例えば15,000まで、例えば20,000までの塩基対を含む第2核酸配列に機能的に連結した第1核酸配列であって、そこから少なくとも1個のサイレンサーが除去された核酸配列をも包含する。

【0136】

第1核酸配列が1以上の欠失、例えば2、例えば3、例えば4、例えば5、例えば5以上の欠失を含むことも可能である。

10

【0137】

さらに、染色体上の第2核酸配列の翻訳開始コドンの上流に例えば20,000まで、例えば15,000まで、例えば10,000まで、例えば7500まで、例えば5000まで、例えば2500まで、例えば1000までの塩基対を含む第1核酸配列から、少なくとも10、例えば少なくとも25、例えば少なくとも50、例えば少なくとも100、例えば200、例えば少なくとも300、例えば少なくとも400、例えば少なくとも500、例えば少なくとも750、例えば少なくとも1000、例えば少なくとも1250、例えば少なくとも1500、例えば少なくとも1750、例えば少なくとも2000、例えば少なくとも2500、例えば少なくとも3000、例えば少なくとも3500、例えば少なくとも4000、例えば少なくとも4500の塩基対を一端または他端から除去することができる。

20

【0138】

核酸配列の付加は末端または内部に行うことができる。第1核酸配列は、1以上の付加、例えば2、例えば3、例えば4、例えば5、例えば5以上の付加を含み得る。それは少なくとも10、例えば少なくとも25、例えば少なくとも50、例えば少なくとも100、例えば少なくとも200、例えば少なくとも300、例えば少なくとも400、例えば少なくとも500、例えば少なくとも750、例えば少なくとも1000、例えば少なくとも1250、例えば少なくとも1500、例えば少なくとも1750、例えば少なくとも2000、例えば少なくとも2500、例えば少なくとも3000、例えば少なくとも3500、例えば少なくとも4000、例えば少なくとも4500、例えば4500以上の塩基対の付加であってよい。

【0139】

例えば、第1核酸配列の機能を改変する核酸配列を付加することが可能である。例えば特定の転写因子により認識される核酸配列を付加することができる。例えば、核ステロイドホルモンレセプターにより認識される核酸配列。

30

【0140】

好ましい第1核酸配列の例を表3および4に示す。本明細書下記に記載のこれら核酸配列の機能的相同体、並びに本明細書上記に記載の欠失および/または付加の突然変異体もまた本発明に包含される。

【表12】

表3 Blast データベースバージョン (2001年5月10日) 内の受託番号を
示す第1核酸配列

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs>)

番号	受託番号	染色体	領域	塩基
pro4	J05614	20	<u>NT_011387.3</u> -	4,073,925-4,125,777
pro12	AF059531	11	<u>NT_009107.3</u> +	16,582,000-16,639,000
pro17	AA913812	1	<u>NT_004705.3</u> +	145,236,000-145,282,000
pro18	W25866	1	<u>NT_004705.3</u> +	145,240,856-145,281,103
pro28	W74442	15	<u>NT_010356.3</u> -	87,186,215-87,226,899
pro37	U63743	1	<u>NT_004808.3</u> -	73,601,528-73,642,295

10

20

【表 1 3】

pro49	AA203476	4	NT 006291.3 +	46.964.650-47.005.368
		8	NT 008166.3 +	66.825.152-66.865.799
pro53	M15205	17	NT 024874.3 ?	78.209.000-78.266.000
pro55	Z95118	6	NT_007577	
pro62	AL050306	X	NT 011553	
		11	NT 025842	
pro73	U18271	12	NT 009681.3 +	103.894.000-103.940.000
pro74	U03735	X	NT 011534.1 +	138.253.000-138.770.000
pro76	U89387	2	NT 005409.3 -	130.026.000-130.083.000
pro77	U10689	X	NT 011726.3 ?	137.038.000-137.108.000
pro83	AI553745	5	NT 023270.3 -	177.081.000-177.128.000
pro86	L18877	X	NT 011534.1 +	138.233.000-138.771.000
pro87	U10691	X	NT 011534.1 +	138.233.000-138.770.000
pro89	L18920	X	NT 011534.1 +	138.233.000-138.770.000
pro91	N23137	12	NT 009464.3 +	132.284.168-132.324.678
pro93	W28479	13	NT 024495.3 +	87.871.068-87.891.259
pro97	AF053305	6	NT 007592.3 +	37.167.152-37.207.246
		12	NT 009782.3 +	53.429.369-53.469.399
pro103	U77949	17	NT 024901.3 -	40.905.000-40.968.000
pro112	AL021546	12	NT 009775	

10

20

30

40

【 表 1 4 】

pro120	M31315	5	NT 023188.3 ?	176.642.000-176.692.000
pro121	D26488	1	NT 004680.3 +	214.431.387-214.471.483
pro122	AL021366	6	NT 007592.3 +	31.000.000-38.000.000
pro123	N58115	2	NT 005343.3 -	184.162.000-184.223.000
pro129	AL031427	1	NT 004424	
pro139	Y13115	8	NT 008176.3 -	39.029.000-39.073.000
pro142	AA151922	17	NT 010711.3 -	73.365.739-73.406.421
pro153	U07563	9	NT 008338	
pro154	W26762	1	NT 019273.3 -	115.514.000-115.557.000
pro156	AI950382	17	NT 010641.3 +	77.160.000-77.208.000
pro161	M21259	1	NT 004662.3 +	175.106.661-175.147.391
pro163	U75285	17	NT 024874	
pro166	AA926957	5	NT 016864.3 +	52.120.104-52.140.918
		17	NT 010692.3 +	1.029.000-1.077.000
pro171	M90354	13	NT 024495.3 +	89.323.836-89.365.575
pro172	AA143321	18	NT 010934.3 -	35.186.000-35.241.000
pro176	AA181196	13	NT 009799.3 +	49.703.000-49.752.000
pro178	AB002359	15	NT 010354.3 -	19.619.949-19.660.316
pro183	U13695	2	NT 022197.3 -	197.599.000-197.820.000

10

20

30

40

【表 1 5】

pro184	U65011	22	<u>NT 011520.5</u> +	18.956.000-19.011.000
pro194	AF091754	1	<u>NT 004734.3</u> +	233.039.886-233.081.072
pro198	AL049842	13	<u>NT 009910</u>	
pro202	AA810792	12	<u>NT 009464.3</u> +	132.288.241-132.328.844
pro210	L37747	5	<u>NT 023326.1</u> -	122.981.845-123.022.988
pro212	Z36714	2	<u>NT 005370.3</u> -	212.774.647-212.814.782
pro216	X06745	X	<u>NT 011821.1</u> ?	21.110.482-21.151.898
pro225	T75292	4	<u>NT 006088.3</u> +	82.210.258-82.250.894
pro228	U38979	1	<u>NT 021930.3</u> +	97.904.873-97.945.550
pro229	AL031778	6	<u>NT 016968</u>	
pro230	AA044787	5	<u>NT 006964.3</u> -	154.054.000-154.122.000
pro232	M77481	X	<u>NT 011534.1</u> +	138.236.000-138.766.000
pro234	AL021397	1	<u>NT 004668</u>	
pro239	AA595596	1	<u>NT 004668</u>	
pro240	W25874	4	<u>NT 006088.3</u> +	82.210.000-82.256.000
pro241	AC004774	7	<u>NT 007816</u>	
Pro245	AF006010	8	<u>NT 007978.3</u> -	104.966.000-105.280.000

10

20

30

40

【 表 1 6 】

pro254	AA733050	1	NT 004662.3 +	175.107.000-175.116.000
pro260	AF094481	3	NT 005791.3 -	84.866.000-84.938.000
pro268	L16991	5	NT 023126.3 -	20.814.448-20.854.499
pro273	AC004770	11	NT 004686.11q12	64224936-64225035
pro280	AI985964	21	NT 011514.4 -	43.166.000-43.211.000
pro284	AA926959	5	NT 006687.3 -	48.821.840-48.862.512
pro292	U28386	4	NT 006109.2 -	: 89.638.000-89.682.000
pro299	AI087268	6	NT 007193.3 +	38.723.000-38.783.000
pro302	AF014837	14	NT 019583.3 +	18.376.000-18.432.000
pro303	AI570572	22	NT 011520.5 +	33.485.000-33.531.000
pro304	L17131	2	NT 005428.3 -	76.252.000-76.295.000
pro306	AI740522	6	NT 007234.3 -	128.840.581-128.881.528
pro328	M15796	X	NT 011568.3 -	33.655.000-33.706.000
		20	NT 011387.3 -	4.068.000-4.115.000
pro329	D00596	18	NT 011005.3 +	849.000.000-872.000.000
pro331	W27939	12	NT 009785.3 ?	49.701.000-49.745.000
pro338	AA768912	10	NT 008609.3 -	26.001.705-26.042.334

10

20

30

【表 1 7】

40

pro341	AA877215	1	NT 019273.3 -	114.182.965-114.223.575
		13	NT 009952.3 +	98.753.071-98.793.770
pro344	X16277	2	NT 005380.3 +	10.809.000-10.860.000
pro347	AI032612	1	NT 019269.3 -	41.189.000-41.265.000
pro348	AI032612	12	NT 024394.3 -	101.992.000-102.107.000
pro352	AI525633	12	NT 009785.3 ?	49.699.479-49.740.007
pro358	N95406	7	NT 007816.3 ?	96.997.000-97.064.000
pro361	AA255502	6	NT 007592.3 +	28.000.000-32.000.000

10

20

【表 1 8】

表4. ヒトゲノムブローサー（2002年12月12日、ヒトゲノムブローサーのドラフトアセンブリー）内の受託番号を示す第1核酸配列

番号	受託番号	染色体	バンド	塩基
pro1	M87338	7	7q11.22	67380990-67396543
pro2	U73379	20	20q13.11	46319851-46338917
pro3	X05360	10	10q21.2	64194062-64211044
pro5	M25753	5	5q23.2	137604120-137622654
		5	5q22.2	121662724-121679510
		5	5q13.1	73649568-73666303
pro6	M74558	1	1p33	52577823-52592535
pro7	D38073	6	6p12.2	56968405-56986831
pro8	AF015254	17	17p12	9089031-9106502
pro9	J03626	3	3q21.2	135784683-135799798
pro10	U74612	12	12p13.33	3074066-3089514
pro13	D63880	12	12p13.31	6903002-6917288
pro14	D14657	15	15q22.2	60215632-60231472
pro15	AB024704	20	20q11.21	31872458-31887490

30

40

【表 1 9】

pro16	AI375913 (J04088)	17	17q21.2	42673095-42689004
pro19	U37426	10	10q23.33	99600001-99623479
pro20	AF098162	12	12q13.3	58470993-58506578
pro21	X74330	12	12q13.3	58801599-58817157
pro22	L47276	17	17q21.2	42703746-42719695
pro23	L25876	14	14q22.2	50958791-50974988
pro24	U65410	4	4q26	126153161-126168416
pro25	X13293	20	20q12	44147604-44164046
pro26	X51688	4	4q26	128042847-128058218
pro27	AL080146	15	15q22.1	55104198-55120101
pro29	D88357	10	10q21.2	64199199-64214445
pro30	D26361	1	1q32.1	224035414-224051265
pro31	D14678	6	6p21.31	36374334-36389597
pro32	AF011468	20	20q13.2	36644429-36659811
				58763968-58779170
pro34	AB019987	3	3q25.33	175620714-175635845
pro36	AF053306	15	15q15.1	35625667-35641196
pro38	AF032862	5	5q34	178469476-178486752
pro39	U01038	16	16p21.1	28930379-28945875
pro40	D13633	14	14q22.3	29043898-29059035
				51960394-51975921
pro41	AJ000186	4	4q26	126153146-126168525
pro42	D26018	11	11q13.4	79445361-79460511
pro43	X02308	18	18p11.32	931580-947280
pro44	AF016371	1	1p34.1	47366616-47382271
pro45	U05340	1	1p34.1	48138801-48153800
pro46	D80008	20	20p11.21	27258467-27274295
pro47	AB000449	14	14q32.2	96123633-96139456
pro48	AF017790	18	18p11.32	2615001-2630207
pro50	X51688	4	4q26	128041767-128057590
pro51	AF081280	10	10q24.32	109292185-109308954
pro52	M86699	6	6q14.1	85882001-85897200
pro54	X74794	8	8q11.22	50261007-50276309
pro56	AB006624	12	12q13.3	59174501-59189500
pro57	L38933	17	17q21.2	45056497-45072182
pro58	AB018334	5	5p13.2	40319301-40338000
pro59	AF091433	8	8q22.1	98382913-98396920
pro60	Z29066	1	1q32.3	237405001-237420000
pro61	D79988	12	12q24.31	133269001-133284000
				133230501-133245500

10

20

30

40

【表 2 0】

pro63	AL050151	8	8q24.3	143930884-143952036
pro64	D79997	9	9p13.2	39124660-39148000
pro65	L07541	13	13q13.1	32415001-32433000
pro66	U37139	1	1p31.3	71792205-71807237
pro67	Y00272	10	10q21.2	64194599-64211207
pro68	D90070	18	18q21.32	62061499-62077998
pro69	U14518	2	2p23.3	26821351-26836883
pro70	X87843	14	14q23.1	57525402-57541401
pro71	U26727	9	9p21.3	23824001-23840000
pro72	X52142	1	1q42.12	251569001-251584900
pro75	L48692	2	2p13.3	69512098-69527598
pro78	L31801	1	1p13.2	124826201-124843002
				124490069-124506743
pro79	U15552	1	1p22.1	105019659-105034740
pro80	AF039652	17	17p11.2	20094899-20110488
pro81	U79266	11	11q13.2	67334001-67349000
pro82	X92106	17	17q11.2	31700001-31715000
pro84	L07540	12	12q24.23	126266001-126283000
pro85	U76638	2	2q35	219994976-220010675
pro88	L34600	2	2p16.1	56591445-56606916
pro90	D83781	11	11p11.2	48298842-48316506
pro92	X59618	X	Xp11.3	41625001-41640000
pro94	U73704	1	1p22.1	102963001-102978500
pro95	D50923	1	1q42.13	256927030-256942117
pro96	M85085	X	Xq22.1	100331001-100346000
pro98	AF025840	14	14q21.3	46340081-46355371
pro99	AF029670	17	17q23.2	63449001-63464000
pro100	AF070559	13	13q33.1	106141001-106156500
pro101	S78085	6	6q27	180902275-180917523
pro104	U39817	15	15q26.1	87983001-87998000
pro105	L23959	13	13q34	116658001-116673000
pro106	X77743	2	2q24.1	160044918-160062017
pro107	U10564	11	11p15.3	9127192-9142201
pro108	AB028069	7	7q21.12	88435001-88450000
pro109	AF053977	5	5q31.1	150402501-150422204
pro110	U09087	12	12q23.1	104568858-104585221
pro111	AF073362	11	11q21	101407914-101423315
pro113	L49054	3	3q25.32	173904528-173934748
pro114	X04327	7	7q33	139307570-139325937
pro115	AF074723	14	14q24.2	68654211-68669417
pro116	AF091092	1	1p32.3	58583305-58598434

10

20

30

40

【表 2 1】

pro117	AF058918	19	19q13.43	70037301-70052300
pro118	AF025441	15	15q15.1	36875108-36890661
pro119	AJ006591	4	4q31.1	148771298-148786657
pro124	L36529	18	18p11.32	254219-270019
pro125	X65550	10	10q26.2	138240294-138255077
pro126	M34065	5	5q31.2	150756331-150771379
pro127	L02547	20	20q13.2	58756755-58772000
pro128	U00238	4	4q12	59266501-59283500
pro130	L42450	2	2q31.1	176199115-176214588
pro131	X98253	X	Xq24	122031634-122047863
pro133	U58970	20	20q12	45447501-45463000
pro134	AF077953	18	18q21.1	47833501-47849000
pro135	J00140	5	5q14.1	86483185-86498573
		18	18q11.2	25676581-25692180
pro136	M74093	19	19q12	34192227-34207465
pro137	AF029669	17	17q23.1	63211106-63252789
pro138	AL050019	1	1p36.33	52302-67336
pro140	M68520	12	12q13.2	57983277-57998212
pro141	Y13467	17	17q12	41583543-41598142
pro143	U64805	17	17q21.31	45619001-45639000
pro144	U78082	14	14q24.2	68653184-68668183
pro145	Y15164	X	Xp22.22	13061501-13076500
pro146	AF008442	6	6p21.1	47871392-47886807
pro147	X16901	13	13q14.13	43972520-43990027
pro148	U06632	17	17q23.1	61863000-61878839
pro149	D26069	3	3q29	215253329-215270320
pro150	AF027150	14	14q21.1	35344279-35359894
pro152	D13413	3	3q29	211580067-211591811
pro155	L20320	5	5q13.1	73642669-73657817
pro157	AJ223728	22	22q11.21	16393966-16409005
pro158	AB023215	14	14q24.3	74118287-74135032
pro159	D32002	9	9q22.33	98867915-98884079
pro160	Y18046	6	6q27	177044740-177060727
pro162	U27459	2	2q33.2	206003518-206019965
pro164	D86322	4	4q31.1	147998675-148013849
pro165	Z46376	2	2p12	75788712-75806284
pro167	AF003540	11	11p15.5	2576355-2591604
pro168	D38553	2	2q11.1	94745291-94760990
pro169	M60725	17	17q23.2	64866487-64881241
pro173	L34673	3	3q24	162499055-162515000
pro174	U93867	1	1q21.1	162966980-162983139

10

20

30

40

【表 2 2】

pro175	U44754	14	14q23.1	58567756-58582473
pro177	AL050405	X	Xq26.1	132444071-132459420
pro179	U18937	5	5q31.3	153395323-153411137
pro180	X76388	4	4q31.21	152639006-152654005
pro181	AF038662	3	3q13.32	129394716-129409918
pro182	AF042169	10	10q22.1	74034210-74049959
pro185	U07804	20	20q12	41507121-41523513
pro187	M97388	1	1p22.1	104042438-104058335
pro189	L35546	1	1p22.1	104986774-105006727
pro191	AB007962	1	1q21.3	170103257-170119230
pro193	AF006259	12	12p13.22	4781441-4796771
pro195	X78827	2	2q14.3	123494635-123511228
pro196	M62810	10	10q21.1	61677452-61693234
pro197	AL080116	6	6q15	94998657-95013656
pro199	U79256	10	10q24.1	104501013-104516982
pro201	AL080088	16	16p13.2	11860550-11875029
pro203	M27878	12	12q24.33	144471103-144484312
pro204	AF091090	1	1p22.2	99597586-99612101
pro205	AF067656	10	10q21.1	59448924-59463923
pro206	U03911	2	2p16.3	48415852-48431851
pro207	U81145	7	7q36.1	155082360-155098279
pro208	D78335	1	1q23.3	187227102-187243552
pro209	U30872	1	1q41	240503771-240519770
pro211	U97188	7	7p15.3	23230613-23248257
		6	6q27	176760451-176776177
pro213	D38550	6	6p22.3	22232782-22247803
pro215	X15331	X	Xq22.3	108009046-108024961
pro217	D87448	3	3q22.1	146018136-146033999
pro219	U31556	8	8q21.3	88467142-88482808
pro220	X66113	1	1p36.22	11562849-11578096
pro221	M93119	20	20p11.23	21882614-21898000
pro222	AB020670	18	18q23	83636442-83651891
pro223	AF000430	12	12p11.21	33646020-33661381
pro224	U73960	7	7p21.3	11968001-11983000
pro226	X76029	4	4q12	58426181-58442374
pro227	AF063020	9	9p22.3	16919890-16934979
pro231	AJ132440	1	1q32.1	226438005-226453537
pro233	AB024401	13	13q34	113595323-113611692
pro235	AL049266	2	2q32.1	190196543-190212071
pro236	AB014550	18	18p11.32	2784040-2799481
pro237	X78932	7	7q11.21	64013301-64028356

10

20

30

40

【表 2 3】

pro238	U22377	1	1p34.2	44683920-44699429
pro242	L16782	10	10q23.31	96533196-96548690
pro243	AJ001810	16	16q12.2	63707495-63722576
pro244	U16028	2	2q31.1	178830447-178845919
pro246	L08424	12	12q23.2	109949544-109964900
pro247	U07559	5	5q11.2	53964473-53980257
pro248	Y10043	X	Xq28	155144719-155160264
pro249	S74445	15	15q24.2	74840231-74855495
pro250	U25165	3	3q26.33	196934501-196950372
pro251	U63336	6	6p21.33	33662019-33677856
pro253	U13022	7	7q35	149686107-149702331
pro255	AB019494	5	5p13.2	39907204-39922203
pro256	L07919	2	2q31.1	175756788-175772636
pro257	AB029006	2	2p22.3	32520144-32540169
pro258	AB028995	17	17q23.2	63475124-63497063
pro259	U62325	2	2q35	223126524-223141423
pro262	X54942	9	9q22.1	87899001-87915976
pro263	U10860	4	4p16.1	9058241-9073583
pro264	M87339	3	3q27.3	204899461-204915188
pro267	X59543	11	11p15.5	3340168-3358000
pro269	M76180	7	7p12.2	51709937-51727010
pro270	M92299	17	17q21.32	52711008-52726713
pro271	AB028021	20	20p11.21	25363017-25378980
pro272	Y16752	6	6p22.2	27692102-27707775
pro275	U96131	5	5p15.33	1133261-1148076
pro277	X84194	14	14q24.3	73530456-73545798
pro278	D82345	X	Xq22.1	102209954-102227610
pro279	L36818	11	11q13.4	76825241-76843255
pro282	V00568	8	8q24.13	130952716-130971510
pro283	U87459	X	Xq28	157900553-157917852
pro285	X16396	2	2p12	74933738-74953722
pro286	AF007140	19	19p13.2	10684785-10702574
pro287	AF053641	20	20q13.13	50999953-51020590
pro289	X55110	11	11p11.2	47010261-47026357
pro290	U84573	3	3q24	159499984-159525599
		X	Xq26.2	137568108-137581997
pro291	M97856	1	1p34.1	50925640-50946744
pro293	AB011173	1	1p36.12	25196653-25221848
pro294	U34994	3	3p24.3	25352447-25367957
pro295	Y18004	X	Xp22.13	18909706-18961865
pro296	D78611	7	7q32.2	133415266-133433462

10

20

30

40

【表 2 4】

pro297	D55716	7	7q22.1	101656642-101674644
pro298	L19183	17	17q11.2	29841430-29862449
pro300	X00737	14	14q11.2	16658977-16678611
pro301	X14850	9	9q21.12	73041595-73057571
pro305	M63180	5	5p13.3	32613067-32631841
pro307	AB014458	1	1p31.3	70502659-70519495
pro308	L07493	7	7p22.1	6711371-6728698
pro309	AF041474	3	3q26.33	198844404-198867622
pro310	Y18418	3	3q21.3	139858490-139872261
pro311	M94362	NA_ランダム		1360953-1386439
pro312	U50939	16	16q22.1	75154638-75172659
pro313	D64110	21	21q11.2	15926421-15943327
pro315	M91670	17	17p11.2	17349263-17365467
		10	10p11.21	38991035-39007459
pro316	X64229	6	6p22.3	19889797-19909681
pro317	X53793	4	4q12	59189280-59209671
pro318	AL080119	1	1p31.2	76612579-76631294
pro319	D28423	6	6p21.31	40691099-40706383
pro320	U35451	17	17q21.32	52107808-52124651
pro321	U94319	9	9p22.3	16952805-16970295
pro322	M30938	2	2q35	221329992-221351121
pro323	AF047473	10	10q26.12	132970590-132988540
pro324	L33930	6	6q21	114313634-114328131
pro326	X62534	4	4q34.1	182348719-182364558
pro327	D84557	2	2q22.1	138697866-138715350
pro330	D21063	3	3q21.3	139528312-139551423
pro332	U90426	19	19p13.13	15547854-15568398
pro333	D00762	14	14q23.1	55012125-55034336
pro334	U72066	18	18q11.2	22625608-22643453
pro335	M86737	11	11q12.1	57630355-57653499
pro336	D13627	21	21q21.3	27298411-27317280
pro337	X01060	3	3q29	216708325-216729920
pro339	AF039022	20	20q11.22	34329184-34345180
pro340	L27706	7	7p11.2	57350245-57365971
pro346	AF035316	6	6p25.2	3491115-3506631
pro349	U25182	X	Xp22.12	22338422-22357291
pro353	X74262	1	1p35.1	35716074-35777340
pro354	J02645	14	14q23.3	64971951-64997045
pro355	M37583	4	4q24	104191912-104207386
pro356	U37689	3	3q27.2	202022093-202041189
pro359	U09510	7	7p14.3	30543349-30559412
Pro362	X04741	4	4p4	39926899-39927127

10

20

30

40

【 0 1 4 1 】

好ましくは、該第1核酸配列は以下からなる群から選ばれる：

pro1、pro2、pro3、pro4、pro5、pro6、pro7、pro8、pro9、pro10、pro12、pro13、pro14、pro15、pro16、pro17、pro18、pro19、pro20、pro21、pro22、pro23、pro24、pro25、pro26、pro27、pro28、pro29、pro30、pro31、pro32、pro34、pro36、pro37、pro38、pro39、pro40、pro41、pro42、pro43、pro44、pro45、pro46、pro47、pro48、pro49、pro50、pro51、pro52、pro53、pro54、pro55、pro56、pro57、pro58、pro59、pro60、pro61、pro

50

62、pro63、pro64、pro65、pro66、pro67、pro68、pro69、pro70、pro71、pro72、pro73、pro74、pro75、pro76、pro77、pro78、pro79、pro80、pro81、pro82、pro83、pro84、pro85、pro86、pro87、pro88、pro89、pro90、pro91、pro92、pro93、pro94、pro95、pro96、pro97、pro98、pro99、pro100、pro101、pro103、pro104、pro105、pro106、pro107、pro108、pro109、pro110、pro111、pro112、pro113、pro114、pro115、pro116、pro117、pro118、pro119、pro120、pro121、pro122、pro123、pro124、pro125、pro126、pro127、pro128、pro129、pro130、pro131、pro133、pro134、pro135、pro136、pro137、pro138、pro139、pro140、pro141、pro142、pro143、pro144、pro145、pro146、pro147、pro148、pro149、pro150、pro152、pro153、pro154、pro155、pro156、pro157、pro158、pro159、pro160、pro161、pro162、pro163、pro164、pro165、pro166、pro167、pro168、pro169、pro171、pro172、pro173、pro174、pro175、pro176、pro177、pro178、pro179、pro180、pro181、pro182、pro183、pro184、pro185、pro187、pro189、pro191、pro193、pro194、pro195、pro196、pro197、pro198、pro199、pro201、pro202、pro203、pro204、pro205、pro206、pro207、pro208、pro209、pro210、pro211、pro212、pro213、pro215、pro216、pro217、pro219、pro220、pro221、pro222、pro223、pro224、pro225、pro226、pro227、pro228、pro229、pro230、pro231、pro232、pro233、pro234、pro235、pro236、pro237、pro238、pro239、pro240、pro241、pro242、pro243、pro244、pro245、pro246、pro247、pro248、pro249、pro250、pro251、pro253、pro254、pro255、pro256、pro257、pro258、pro259、pro260、pro262、pro263、pro264、pro267、pro268、pro269、pro270、pro271、pro272、pro273、pro275、pro277、pro278、pro279、pro280、pro282、pro283、pro284、pro285、pro286、pro287、pro289、pro290、pro291、pro292、pro293、pro294、pro295、pro296、pro297、pro298、pro299、pro300、pro301、pro302、pro303、pro304、pro305、pro306、pro307、pro308、pro309、pro310、pro311、pro312、pro313、pro315、pro316、pro317、pro318、pro319、pro320、pro321、pro322、pro323、pro324、pro326、pro327、pro328、pro329、pro330、pro331、pro332、pro333、pro334、pro335、pro336、pro337、pro338、pro339、pro340、pro341、pro344、pro346、pro347、pro348、pro349、pro352、pro353、pro354、pro355、pro356、pro358、pro359およびpro361。

10

20

【 0 1 4 2 】

より好ましくは、該第 1 核酸配列は以下からなる群から選ばれる：

pro1、pro2、pro3、pro4、pro5、pro6、pro7、pro8、pro9、pro10、pro12、pro13、pro14、pro15、pro16、pro17、pro18、pro19、pro21、pro22、pro23、pro24、pro25、pro26、pro27、pro28、pro29、pro30、pro31、pro32、pro34、pro36、pro37、pro38、pro39、pro40、pro41、pro42、pro43、pro44、pro45、pro46、pro47、pro48、pro49、pro50、pro51、pro52、pro53、pro54、pro56、pro58、pro59、pro62、pro64、pro65、pro66、pro68、pro69、pro70、pro71、pro72、pro73、pro74、pro75、pro77、pro78、pro81、pro82、pro85、pro86、pro87、pro89、pro90、pro92、pro98、pro103、pro105、pro108、pro120、pro125、pro128、pro130、pro133、pro135、pro136、pro137、pro157、pro184、pro205、pro206、pro207、pro209、pro210、pro211、pro212、pro216、pro217、pro219、pro221、pro227、pro231、pro233、pro241、pro246、pro248、pro249、pro253およびpro256。

30

【 0 1 4 3 】

より一層好ましくは、該第 1 核酸配列は以下からなる群から選ばれる：

pro1、pro2、pro3、pro4、pro5、pro7、pro8、pro14、pro15、pro16、pro22、pro23、pro24、pro26、pro27、pro29、pro34、pro37、pro38、pro39、pro40、pro45、pro46、pro48、pro49、pro50、pro52、pro59、pro69、pro71、pro74、pro77、pro86、pro87、pro89、pro184、pro205、pro206、pro207、pro209、pro210、pro211、pro221、pro241、pro246、pro248およびpro256。

40

【 0 1 4 4 】

更により好ましくは、該第 1 核酸配列は以下からなる群から選ばれる：

pro2、pro4、pro8、pro14、pro15、pro16、pro22、pro49、pro74、pro86、pro87、pro89、pro205、pro221およびpro246。

50

【 0 1 4 5 】

最も好ましくは、該第 1 核酸配列は以下からなる群から選ばれる：

pro221、pro210、pro71、pro41、pro30、pro2、pro209、pro14、pro4、pro8、pro246、pro16、pro27、pro5、pro49、pro19、pro140、pro139、pro207、pro81、pro273およびpro362。

【 0 1 4 6 】

別の好ましい態様において、該第 1 核酸配列は以下からなる群から選ばれる：

pro1、pro2、pro3、pro4、pro5、pro6、pro7、pro8、pro9、pro10、pro12、pro13、pro14、pro15、pro16、pro17、pro18、pro19、pro20、pro21、pro22、pro23、pro24、pro25、pro26、pro27、pro28、pro29、pro30、pro31、pro32、pro34、pro36、pro37、pro38、pro39、pro40、pro41、pro42、pro43、pro44、pro45、pro46、pro47、pro48、pro49、pro50、pro51、pro52、pro53、pro54、pro55、pro56、pro57、pro58、pro59、pro60、pro61、pro62、pro63、pro64、pro65、pro66、pro67、pro68、pro69、pro70、pro71、pro72、pro73、pro74、pro75、pro76、pro77、pro78、pro79、pro80、pro81、pro82、pro83、pro84、pro85、pro86、pro87、pro88、pro89、pro90、pro91、pro92、pro93、pro94、pro95、pro96、pro97、pro98、pro99、pro100、pro101、pro103、pro104、pro105、pro106、pro107、pro108、pro109、pro110、pro111、pro112、pro113、pro114、pro115、pro116、pro117、pro118、pro119、pro120、pro121、pro122、pro123、pro124、pro125、pro126、pro127、pro128、pro129、pro130、pro131、pro133、pro134、pro135、pro136、pro137、pro138、pro139、pro140、pro141、pro142、pro143、pro144、pro145、pro146、pro147、pro148、pro149、pro150、pro152、pro153、pro154、pro155、pro156、pro157、pro158、pro159、pro160、pro161、pro162、pro163、pro164、pro165、pro166、pro167、pro168、pro169、pro171、pro172、pro173、pro174、pro175、pro176、pro177、pro178、pro179、pro180、pro181、pro182、pro183、pro184、pro185、pro187、pro189、pro191、pro193、pro194、pro195、pro196、pro197、pro198、pro199、pro201、pro202、pro203、pro204、pro205、pro206、pro207、pro209、pro210、pro211、pro212、pro213、pro216、pro217、pro219、pro220、pro221、pro222、pro223、pro224、pro225、pro227、pro228、pro229、pro230、pro231、pro233、pro234、pro235、pro236、pro237、pro238、pro239、pro240、pro241、pro242、pro243、pro244、pro245、pro246、pro248、pro249、pro250、pro251、pro253、pro254、pro255、pro256、pro257、pro258、pro259、pro260、pro269、pro278、pro282、pro283、pro284、pro285、pro297、pro315、pro326、pro327、pro328およびpro329。

【 0 1 4 7 】

本発明の特に好ましい或る態様では、第 1 核酸配列はpro221またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro221はインスリノーマ関連抗原 IA-1、INSM1をコードしている遺伝子のプロモーターである。インスリノーマ関連抗原 mRNA は、試験された全てのSCLCによって極めて高レベルに発現され、そして脳および副腎中では極めて低レベルでしか発現されない。発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRにより証明された（実施例 1 および図 3 を参照されたい）。

【 0 1 4 8 】

本発明の別の好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro210またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro210はラミンB、LMNB1をコードしている遺伝子のプロモーターである。LMNB1 mRNA は、試験された全てのSCLCによって極めて高レベルに発現され、そして脾臓、結腸および肺中では極めて低レベルでしか発現されない。LMNB1の発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRにより証明された（実施例 1 および図 6 を参照されたい）。

【 0 1 4 9 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro71またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro71はp16INK4/MTS1、MTS1、サイクリン依存キナーゼインヒビター 2A、CDKN2Aをコードしている遺伝子のプロモーターである。p16INK4/MTS1 mRNA は、殆どのSCLCによって極めて高レベルに発現され、正常組織中では極めて低レベルでしか発現されないか全く発現されない。LMNB1の発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRによ

り証明された（実施例 1 および図 7 を参照されたい）。

【 0 1 5 0 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro41またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro41はヒトMAD2L1、有糸分裂停止不全、酵母相同体様 1 をコードしている遺伝子のプロモーターである。MAD2L1 mRNAは、SCLC中で極めて高レベルに発現され、精巣中で高レベルに発現されるが、他の正常組織中では低レベルでしか発現されない。MAD2L1の発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRにより証明された（実施例 1 および図 5 を参照されたい）。

【 0 1 5 1 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro30またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro30はヒトKIAA0042遺伝子のプロモーターである。KIAA0042 RNAは、殆どのSCLC中で極めて高レベルに発現され、正常組織では精巣中で低レベルに発現されるだけである。KIAA0042の発現は例えばCHIPS分析およびRT-PCRにより証明された（実施例 1 および図 4 を参照されたい）。

10

【 0 1 5 2 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro2またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro2はヒトサイクリン選択的ユビキチン担体タンパク質、UBE2Cをコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。UBE2C mRNAは、殆どのSCLC中で極めて高レベルに発現され、正常組織では脾臓と精巣中で低レベルに発現される。UBE2Cの発現は例えばCHIPS分析により証明された（実施例 1 を参照されたい）。

20

【 0 1 5 3 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro209またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro209はマイトシン、CENPF、セントロメアタンパク質Fをコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。CENPF mRNAは、殆どのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織中では精巣で低レベルに発現される。CENPFの発現は例えばCHIPS分析により証明された（実施例 1 を参照されたい）。

【 0 1 5 4 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro14またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro14はヒトKIAA0101遺伝子のプロモーターである。KIAA0101 RNAは、殆どのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織では7種類の組織中で低レベルに発現される。KIAA0101の発現は例えばCHIPS分析により証明された（実施例 1 を参照されたい）。

30

【 0 1 5 5 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro4またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro4はサイクリンタンパク質遺伝子、増殖細胞核抗原（PCNA）をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。PCNA mRNAは、殆どのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織では結腸、脾臓および精巣中で低レベルに発現される。PCNAの発現は例えばCHIPS分析により証明された（実施例 1 を参照されたい）。

【 0 1 5 6 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro8またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro8はセリン/スレオニンキナーゼ、STK-1、STK12、fms関連チロシンキナーゼ3をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。STK-1mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では結腸、脾臓および精巣中で低レベルに発現される。STK-1の発現は例えばCHIPS分析により証明された（実施例 1 を参照されたい）。

40

【 0 1 5 7 】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第 1 核酸配列はpro246またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro246はAchaete scute相同性タンパク質、ASH1、ASCL1をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。ASH1 mRNAは、多くのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織では脳中で低レベルに発現される。ASH1の発現は例えばCHIPS分析により証明された（実施例 1 を参照されたい）。

50

【0158】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro16またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro16はDNAトポイソメラーゼII (170kD)、TOP2Aをコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。TOP2A mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では9種類の組織中で低レベルに、そして精巣中で高レベルに発現される。TOP2Aの発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

【0159】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro27またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro27はサイクリンB2、CCNB2をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。サイクリンB2 mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では脾臓および気管中で低レベルに、そして精巣中で高レベルに発現される。サイクリンB2の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

10

【0160】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro5またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro5はサイクリンB1、CCNB1をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。サイクリンB1 mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では結腸、脾臓および気管中で低レベルに、そして精巣中で高レベルに発現される。サイクリンB1の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

【0161】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro49またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro49は下垂体腫瘍トランスフォーミング1、PTTG1をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。PTTG1 mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では甲状腺、脾臓および気管中で低レベルに、そして精巣中で高レベルに発現される。PTTG1の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

20

【0162】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro19またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro19はキネシン様紡錘タンパク質HKSP、KNSL1をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。KNSL1 mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では結腸、小腸および精巣中で低レベルに発現される。KNSL1の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

30

【0163】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro140またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro140はcdc2関連タンパク質キナーゼ、CDK2をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。CDK2 mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では脾臓中で高レベルに発現される。CDK2の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

【0164】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro139またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro139はセリン/スレオニンタンパク質キナーゼSAKをコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。SAK mRNAは、殆どのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織では精巣中で高レベルに発現される。SAKの発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

40

【0165】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro207またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro207はzeste相同体2のエンハンサー(EZH2)をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。EZH2 mRNAは、SCLC中で高レベルに発現され、正常組織では精巣中で高レベルに発現される。EZH2の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

【0166】

50

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro81またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro81はヒトHSU79266遺伝子のプロモーターである。HSU79266 RNAは、殆どのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織では精巣および脾臓中で発現される。HSU79266の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

【0167】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro273またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro273はRad2、皮弁(flap)構造特異的エンドヌクレアーゼ1、FEN1をコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。Rad2 mRNAは、殆どのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織では12種類の組織中で低レベルに発現される。Rad2の発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

10

【0168】

本発明のもう一つの好ましい態様では、第1核酸配列はpro362またはそのフラグメントまたはその機能的相同体である。pro362はタンパク質遺伝子産物PGP、ユビキチンカルボキシ末端エステラーゼL1、ユビキチンチオールエステラーゼをコードしているヒト遺伝子のプロモーターである。PGP mRNAは、殆どのSCLC中で高レベルに発現され、正常組織では腎臓中で低レベルに、そして脳中で高レベルに発現される。PGPの発現は例えばCHIPS分析により証明された(実施例1を参照されたい)。

【0169】

機能的相同体

20

本発明に係るポリペプチドの機能的相同体とは、同じ機能を含む任意のポリペプチド配列を含むことを意味する。例えば細胞表面分子の機能的相同体は、結合パートナーと結合でき、好ましくは該結合パートナーをインターナライズできる、細胞表面に結合している分子である。結合パートナーの機能的相同体は、細胞表面分子と結合でき、好ましくはその細胞表面分子を発現している細胞中にインターナライズされ得る分子である。

【0170】

本発明に係る機能的相同体はアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、これは、本明細書上記に概説したような予め決められたポリペプチド配列と少なくとも幾らかの相同性を共有している。例えば該ポリペプチドは、本明細書上記に概説した予め決められたポリペプチド配列のいずれかと、少なくとも約40パーセント、例えば少なくとも約50パーセント相同性、例えば少なくとも約60パーセント相同性、例えば少なくとも約70パーセント相同性、例えば少なくとも約75パーセント相同性、例えば少なくとも約80パーセント相同性、例えば少なくとも約85パーセント相同性、例えば少なくとも約90パーセント相同性、例えば少なくとも約92パーセント相同性、例えば少なくとも約94パーセント相同性、例えば少なくとも約95パーセント相同性、例えば少なくとも約96パーセント相同性、例えば少なくとも約97パーセント相同性、例えば少なくとも約98パーセント相同性、例えば少なくとも約99パーセント相同性である。

30

【0171】

アミノ酸配列間の相同性は、例えばBLOSUM30、BLOSUM40、BLOSUM45、BLOSUM50、BLOSUM55、BLOSUM60、BLOSUM62、BLOSUM65、BLOSUM70、BLOSUM75、BLOSUM80、BLOSUM85、およびBLOSUM90のいずれかといったような公知のアルゴリズムを用いて計算できる。

40

【0172】

機能的相同体は、或るアミノ酸を他の任意のアミノ酸に置換する、少なくとも1個の置換を含むアミノ酸配列を含むことができる。例えばこのような置換は同類アミノ酸置換であっても非同類置換であってもよい。

【0173】

同類アミノ酸置換は、予め決められたアミノ酸群内の1個のアミノ酸を同じ群内の別のアミノ酸に置換することであり、ここで該予め決められた群内のアミノ酸は類似または実質上類似の性質を示す。本明細書で適用する「同類アミノ酸置換」という語の意義内では、或るアミノ酸を

50

i) 極性側鎖 (Asp、Glu、Lys、Arg、His、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr、およびCys)

i i) 非極性側鎖 (Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Pro、およびMet)

i i i) 脂肪族側鎖 (Gly、Ala、Val、Leu、Ile)

i v) 環状側鎖 (Phe、Tyr、Trp、His、Pro)

v) 芳香族側鎖 (Phe、Tyr、Trp)

v i) 酸性側鎖 (Asp、Glu)

v i i) 塩基性側鎖 (Lys、Arg、His)

v i i i) アミド側鎖 (Asn、Gln)

i x) ヒドロキシ側鎖 (Ser、Thr)

x) 硫黄含有側鎖 (Cys、Met)、および

x i) モノアミノジカルボン酸またはモノアミノ - モノカルボキシ - モノアミドカルボン酸であるアミノ酸 (Asp、Glu、Asn、Gln)、

を有するという特徴を持つアミノ酸の群内の別のアミノ酸に置換することができる。

【 0 1 7 4 】

非同類置換はその他の任意の置換である。機能的相同体の形成を導く非同類置換は例えば、i) 疎水性が実質上相違する、例えば疎水性残基 (Val、Ile、Leu、PheまたはMet) を Arg、Lys、TrpもしくはAsnといった親水性残基に置換、またはThr、Ser、His、Gln、Asn、Lys、Asp、GluもしくはTrpといった親水性残基を疎水性残基に置換する事；および/またはi i) ポリペプチド骨格 (backbone) の向きに及ぼす影響が実質上相違する、例えばProもしくはGlyを他の残基にまたは他の残基からこれらに置換する事；および/またはi i i) 電荷が実質上相違する、例えば、GluもしくはAspのような負に荷電した残基をLys、HisもしくはArgのような正に荷電した残基に置換する事 (およびその逆) ；および/またはi v) 立体的な嵩が実質上相違する、例えばHis、Trp、PheもしくはTyrのような嵩高い残基を小さな側鎖を持つ残基、例えばAla、GlyもしくはSerに置換する事 (またはその逆) である。

【 0 1 7 5 】

本発明に係る機能的相同体はこのような置換を1以上、例えば2アミノ酸置換、例えば3または4アミノ酸置換、例えば5または6アミノ酸置換、例えば7または8アミノ酸置換、例えば10乃至15アミノ酸置換、例えば15乃至25アミノ酸置換、例えば25乃至30アミノ酸置換、例えば30乃至40アミノ酸置換、例えば40乃至50アミノ酸置換、例えば50乃至75アミノ酸置換、例えば75乃至100アミノ酸置換、例えば100以上のアミノ酸置換を含むことができる。

【 0 1 7 6 】

アミノ酸の付加または欠失は、2ないし5アミノ酸、例えば5ないし10アミノ酸、例えば10ないし20アミノ酸、例えば20ないし50アミノ酸の付加または欠失であってよい。しかしながら、50アミノ酸以上の付加または欠失、例えば50ないし200アミノ酸の付加もまた本発明に包含される。

【 0 1 7 7 】

それらのいずれかの変異体および機能的相同体を包含する本発明に係るポリペプチドは、或る態様では、5以上のアミノ酸残基、例えば10以上のアミノ酸残基、例えば20以上のアミノ酸残基、例えば25以上のアミノ酸残基、例えば50以上のアミノ酸残基、例えば75以上のアミノ酸残基、例えば100以上のアミノ酸残基、例えば150以上のアミノ酸残基、例えば200以上のアミノ酸残基を含むことができる。

【 0 1 7 8 】

本明細書で使用する意義に従う機能的相同体を決定する際には、さらなる要素を考慮に入れることができる。例えば機能的相同体は、本発明に係るポリペプチドに特異的な抗血清と結合し得る。

【 0 1 7 9 】

さらなる態様では、本発明は、+/-2.5以内の親水性または疎水親水指数を持つ置換アミノ酸を含む機能的相同体に関するものであり、該指標は、置換されたアミノ酸の値が、例え

10

20

30

40

50

ば ± 2.3 以内、例えば ± 2.1 以内、例えば ± 2.0 以内、例えば ± 1.8 以内、例えば ± 1.6 以内、例えば ± 1.5 以内、例えば ± 1.4 以内、例えば ± 1.3 以内、例えば ± 1.2 以内、例えば ± 1.1 以内、例えば ± 1.0 以内、例えば ± 0.9 以内、例えば ± 0.8 以内、例えば ± 0.7 以内、例えば ± 0.6 以内、例えば ± 0.5 以内、例えば ± 0.4 以内、例えば ± 0.3 以内、例えば ± 0.25 以内、例えば ± 0.2 以内である。

【0180】

タンパク質に生物学的相互機能を付与する際の親水性および疎水性親水性のアミノ酸指数の重要性は当分野でよく理解されている (Kyte & Doolittleによる1982、およびHopp、米国特許第4,554,101号；それぞれ引用により本明細書の一部とする)。

【0181】

本明細書で使用するアミノ酸疎水性親水性指数値は、イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5) (Kyte & Doolittleによる1982) である。

【0182】

アミノ酸親水性値は、アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 \pm 0.1)；グルタミン酸 (+3.0 \pm 0.1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 \pm 0.1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；トリプトファン (-3.4) (米国特許第4,554,101号) である。

【0183】

故に或る態様では、アミノ酸の置換は、それらの疎水性および親水性値、ならびに電荷、大きさなどを包含するアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性に基づいて行うことができる。前記の様々な性質を考慮に入れたアミノ酸置換の例は当業者に周知であり、アルギニンとリジン；グルタミン酸とアスパラギン酸；セリンとスレオニン；グルタミンとアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンとイソロイシンを包含する。

【0184】

本明細書に記載のポリペプチド化合物に加えて、該ペプチド構造の重要部分に似せるために立体的に類似の化合物を製造することができ、該化合物もまた本発明に係るペプチドと同様な様式で使用できる。これは当業者の知悉するモデル作製および化学設計の技術によって達成できる。例えば、テトラペプチド構造に似せるため、エステル化およびその他のアルキル化を用いて、例えばジアルギニンペプチド骨格のアミノ末端を修飾できる。該立体的に類似の構築物が全て本発明の範囲内にあるという事は明らかである。

【0185】

N末端アルキル化およびC末端エステル化を伴うペプチドもまた本発明に包含される。機能的等価物はまた、二量体または非関連化学部分を包含するグリコシル化および共有結合または凝集接合体をも包含する。該機能的等価物は、当分野で知られる方法により、フラグメント中のNおよびC末端の一方または両方に見出される基に官能性を結び付けることによって製造する。

【0186】

したがって機能的等価物は、カルボキシ末端の脂肪族もしくはアシルエステルまたはアミド、アルキルアミンまたはカルボキシ側鎖を含む残基に接合体したフラグメント、例えばアスパラギン酸残基のアルキルアミンとの接合体；ヒドロキシ基含有残基のO-アシル誘導体およびアミノ末端アミノ酸またはアミノ基含有残基のN-アシル誘導体、例えばMet-Leu-Pheとの接合体を含み得る。アシル基の誘導体はアルキル部分 (C3~C10ノルマルアルキルを包含する) の基から選ばれ、それによりアルカノイル種が形成され、および炭素環式またはヘテロ環式化合物から選ばれ、それによりアロイル種が形成される。該反

10

20

30

40

50

応性基は好ましくは、反応性側鎖基を介したタンパク質の不溶性マトリックスへの架橋に使用するための、自体既知の二官能性化合物である。

【0187】

本発明の範囲内の核酸配列の相同体は、

i) 類似の生物学的機能を持つRNAおよび/またはタンパク質をコードしており; または、

ii) 類似の生物学的影響を示すことができ; そして、

a) 少なくとも50%一致し、例えば少なくとも60%一致し、例えば少なくとも70%一致し、例えば少なくとも75%一致し、例えば少なくとも80%一致し、例えば少なくとも85%一致し、例えば少なくとも90%一致し、例えば少なくとも95%一致し、
b) またはストリンジェントな条件下で該核酸配列の相補鎖とハイブリダイズできる、
核酸配列である。

10

【0188】

この文脈にある類似の生物学的影響とは、例えばその核酸配列が、その機能的相同体と類似の様式で、それと機能的に連結した第2核酸配列の転写に影響を及ぼすことができるという事である。

【0189】

本明細書で使用するストリンジェントな条件とは、サザンブロットティングおよび例えばSouthern E. M.による1975、J. Mol. Biol. 98: 503-517により記載されたようなハイブリダイゼーションと関連して通常適用される緊縮性を指す。係る目的のためには前ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの工程を含むのが慣例である。このような工程は通常Sambrookらによる1989、「Molecular Cloning/A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor (これは引用により本明細書の一部とする)に記載の6 x SSPE、5%デンハート、0.5% SDS、50% ホルムアミド、100 µg/ml 変性鮭精巢DNAを含有する溶液を使用し(42 °C、18時間のインキュベート)、その後2 x SSCおよび0.5% SDS (室温および37 °C)、ならびに0.1 x SSCおよび0.5% SDS (68 °C、30分間のインキュベート)での洗浄で実施する。

20

【0190】

核酸配列の相同体はさらに、付加および/または欠失を含む核酸配列を包含する。該付加および/または欠失は内部または末端にあり得る。付加および/または欠失は1-5ヌクレオチド、例えば5-10ヌクレオチド、例えば10-50ヌクレオチド、例えば50-100ヌクレオチド、例えば少なくとも100ヌクレオチドのものであってよい。

30

【0191】

ワクチン

本発明の或る態様では、細胞表面分子をワクチンの製造に使用できる。好ましくは該ワクチンはその細胞表面分子に対する免疫反応を生じることができる。該免疫反応は好ましくは該細胞表面分子を発現する細胞の特異的殺滅をもたらす。最も好ましくは、該細胞表面分子を発現する細胞は悪性細胞であり、例えばそのワクチンが悪性細胞の特異的殺滅をもたらす。

【0192】

したがって、該ワクチンは好ましくは前悪性および/または悪性の病気の軽減的および/または治療的および/または予防的処置に好適である。よって、該ワクチンは好ましくは、前悪性および/または悪性の病気、好ましくは癌に罹患している個体に投与すべきである。該個体は任意の動物であってよいが、好ましくは該個体は人間である。

40

【0193】

細胞表面分子またはそのフラグメントまたはその誘導体と、該細胞表面分子をコードしている核酸またはそのフラグメントまたはその誘導体のいずれかを使用することが可能である。該ワクチンと共に使用することが好ましい細胞表面分子は、正常組織中よりもインビボの悪性細胞中で、および/または悪性セルライン中で高レベルに発現される細胞表面分子である。例えば該細胞表面分子は本明細書上記に概説した方法に従って同定できる。し

50

かしながら、その他の適当な細胞表面分子をも利用できる。

【0194】

好ましくは該細胞表面分子は、以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGRIA2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481、例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン 6、例えばGPIIb；例えばピトロネクチンレセプター サブユニット；例えばインテグリン -7；例えばインテグリン E前駆体；例えばインテグリン 6B；例えばインテグリン 5サブユニット；例えばインテグリン -5サブユニット；例えばインテグリン -3鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ；例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR；例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体；例えばIGF1R、例えばインスリン様成長因子IIレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-D R7関連糖タンパク質 鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン- レセプター 鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リポタンパク質レセプター；例えば超低密度リポタンパク質レセプター；例えばN-CAM；例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば 2 カルシウムチャネルサブユニットI型；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばパソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D~）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター；例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13'；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOCI5；例えばTRAILレセプター2；例えばHNMP-1；例えば腎 -2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン パーシカンV1；例えばmGluR1 ；例えばCD97；例えばL6；例えばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター ；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3；例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFR2；例えばTGFR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である。

【0195】

より好ましくは、該細胞表面分子はNCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる。

【0196】

或る好ましい態様では、該ワクチンはさらに該細胞表面分子と共有結合した非自己抗原を

10

20

30

40

50

含む。あるいは、細胞表面分子をコードしている核酸配列を使用する場合は、該ワクチンは該核酸配列に結合した非自己抗原をコードしている第二核酸配列を含むことができる。

【0197】

本発明と共に使用できる非自己抗原の例はT細胞エピトープ、好ましくはポリペプチドまたはペプチドである。

【0198】

ワクチンが1以上の抗原、例えば2、例えば3、例えば4、例えば5、例えば5以上の異なる抗原を含むことも可能である。抗原は自己抗原または非自己抗原であり得る。

【0199】

本発明に係るワクチンはさらにアジュバントおよび/または担体を含むことができる。該担体またはアジュバントはそれらの機能的等価物を包含する当分野で公知のいかなる担体またはアジュバントであってもよい。機能的に等価な担体は、同様な条件の下に使用した場合、同じ抗原を本質的に同じ立体配座で提供することができる。機能的に等価なアジュバントは、同様な条件の下に使用した場合、該組成物の有効性に同様な増大を提供することができる。

【0200】

好ましくは、該組成物は、抗原決定因子を包含する免疫原性決定因子の免疫原性を増強および/または調節する、強力な非毒性アジュバントを含み、ハプテン決定因子が好ましいアジュバントの1群を表す。加えて、該アジュバントは好ましくはより早期の、より強力な、またはより長時間の免疫反応を誘起する。該アジュバントは抗原の供給が限定されたりまたはその産生が高価である場合にも有用である。

【0201】

本発明に属するアジュバントはそれらが鉱物性、細菌性、植物性、合成、または宿主生成物であるといった起源にしたがって分類できる。この分類の第一群は、アルミニウム化合物のような鉱物性アジュバントである。アルミニウム塩で沈殿させた抗原、またはアルミニウム化合物と混合したりもしくはこれに吸着させた抗原は、動物および人間の免疫反応を増大させるために広く使用されてきた。アルミニウム粒子は免疫後7日間ウサギの局所リンパ節で証明され、そしてもう1つの重要な機能はリンパ節自身にあるT細胞含有領域に抗原を方向付けることであろう。アジュバントの力価は流入領域リンパ節という暗示(intimation)に関連することが示されている。多くの研究が、アルミニウム塩と共に投与された抗原が液性免疫の増強を導く事を確認しているが、遅延型過敏性によって測定される細胞性免疫は僅かしか増強されないように見受けられる。水酸化アルミニウムは補体経路を活性化すると記載されている。この機構は、局所炎症反応および免疫グロブリン産生とB細胞記憶で役割を果たし得る。さらに、水酸化アルミニウムは抗原を急速異化作用から防御できる。主としてその優れた安全性の証拠の故に、アルミニウム化合物は現在人間に使用される唯一のアジュバントである。

【0202】

もう一つの大きなアジュバントの群は細菌起源のものである。細菌起源のアジュバントは精製および合成することができ(例えば、ムラミルジペプチド、脂質A)、宿主仲介物がクローニングされている(インターロイキン1および2)。ここ10年間で細菌起源の活性成分を持つ幾つかのアジュバントの化学的精製に顕著な進展がもたらされている: Bordetella pertussis、Mycobacterium tuberculosis、リポ多糖類、フロイント完全アジュバント(FCA)およびフロイント不完全アジュバント(Difco Laboratories、Detroit、Mich.)ならびにMerck Adjuvant 65 (Merck and Company、Inc.、Rahway、N.J.)。さらに、本発明に係る好適なアジュバントは例えば、Titermax Classical adjuvant (SIGMA-ALDRICH)、ISCOMS、Quil A、ALUN(米国特許第58767号および米国特許第5,554,372号を参照されたい)、脂質A誘導体、コレラ毒素誘導体、HSP誘導体、LPS誘導体、合成ペプチドマトリックス、GMDPなど、および免疫刺激物質と組み合わせたもの(米国特許第5,876,735号)である。

【0203】

B. pertussisは、Tリンパ球集団への作用によって細胞性免疫を調節する能力のため、本発明の状況におけるアジュバントとして興味深い。リポ多糖類およびフロイント完全アジュバントについては、構造 - 機能相関の研究を可能にするアジュバントの活性部分が同定および合成されている。これらはまた、本発明に係る免疫原性組成物に含めるとみなされている。

【0204】

脂質Aを包含するリポ多糖類およびその様々な誘導体は、リポソームまたはその他の脂質エマルジョンと組み合わせると強力なアジュバントとなることを見出した。ヒトでの一般的使用にとって充分毒性が低い誘導体が製造できるかどうかはまだ確かではない。フロイント完全アジュバントは殆どの実験研究における標準である。

10

【0205】

抗原を急速異化から防御するため、鉱油をワクチン製剤に添加できる。

【0206】

その他多くの種類の材料を本発明に係る免疫原性組成物のアジュバントとして使用できる。これらにはサポニンのような植物産物、キチンのような動物産物、ならびに膨大な合成化学物質が包含される。

【0207】

本発明に係るアジュバントは提起されている作用機構によっても分類できる。殆どのアジュバントは1以上の機構によって機能するように思われるため、この型の分類は必然的に幾らか恣意的なものとなる。アジュバントは抗原の限局化および運搬を介して、または免疫系を作り上げている細胞、例えばマクロファージおよびリンパ球への直接効果によって作用できる。本発明に係るアジュバントが免疫反応を増強する別の機構は、抗原貯留(depot)の創成による。これは、アルミニウム化合物、油性エマルジョン、リポソーム、および合成ポリマーのアジュバント活性に寄与しているようである。リポ多糖類およびムラミルジペプチドのアジュバント活性は主にマクロファージの活性化によって媒介されているようであるが、B. pertussisはマクロファージとリンパ球の両者に影響を及ぼす。本発明に係る免疫原性組成物に組み込んだ場合に有用となり得るアジュバントのさらなる例は、米国特許第5,554,372号に記載されている。

20

【0208】

或る好ましい態様では、本発明に係るアジュバントは、アルミニウム化合物、フロイント不完全アジュバント、Titermax古典アジュバントおよび油性エマルジョンからなる群から選ばれる。

30

【0209】

免疫原性組成物が担体をさらに含む本発明の態様もまた提供する。この担体はアジュバントとは独立して存在することができる。抗原と担体のコンジュゲーションおよび/または同時免疫の目的は、例えばその抗原の活性もしくは免疫原性を高めるために抗原の分子量を増大させること、またはその抗原に安定性を付与すること、または抗原決定因子の生物学的活性を高めること、またはその血清半減期を増大させることであり得る。担体タンパク質は、抗原提示に好適な任意のタンパク質を包含する任意の通常の担体であってよい。通常の担体タンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清タンパク質、例えばトランスフェリン、牛血清アルブミン、またはヒト血清アルブミン、オボアルブミン、免疫グロブリン、またはホルモン類、例えばインスリンを包含するがこれらに限定される訳ではない。

40

【0210】

当業者に公知のいかなる適当な医薬担体も本発明に係るワクチンに使用できるが、医薬担体の種類は投与様式および持続放出投与が望まれるか否かに応じて変わり得る。皮下注射のような非経口投与の場合には、該医薬担体は、例えば水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ロウまたは緩衝液を含むことができる。生分解性ミクロスフェア(例えば、ポリ乳酸ガラクトド)もまた本発明の医薬組成物のための医薬担体として利用できる。

【0211】

50

本発明の或る態様では、該ワクチンは樹状細胞の使用を含む。このような態様は好ましくは、

i) 樹状細胞を提供し；そして、

ii) その発現を指令する第2核酸配列と機能的に連結した本発明に係る細胞表面分子をコードしている核酸配列を該樹状細胞に移したり、または細胞表面分子もしくはそのフラグメントを該樹状細胞に移し；そして、

iii) 該細胞表面分子またはそのフラグメントを該樹状細胞の細胞表面にディスプレイし；そして、

iv) 処置する個体に該樹状細胞を移す、

という工程を含む。

10

【0212】

好ましくは、該樹状細胞は治療する個体から誘導する細胞であるが、しかしながら該樹状細胞は別の個体から誘導してもよい。該樹状細胞を別の個体から誘導する場合には、好ましくは該細胞を、治療する個体と同じ種から誘導する。例えば、治療する個体がヒトであるならば、該樹状細胞はヒトから誘導する。

【0213】

好ましくは、該細胞表面分子はフラグメント、例えばMHC分子上にある状況のペプチドフラグメントとして該細胞表面にディスプレイされる。

【0214】

薬物標的

20

結合パートナーと結合でき且つ該結合パートナーを細胞表面分子を発現している細胞中にインターナライズできる細胞表面分子はまた、薬物標的としても利用できる。好ましくは、該細胞表面分子は、正常組織とは異なるレベルで悪性セルライン中で発現される。

【0215】

より好ましくは、該細胞表面分子は本発明に概説する方法に従って同定する。

【0216】

より好ましくは、該細胞表面分子は以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGRIA2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；
 30 例例えばTR2-11；例例えばOA3抗原性表面決定因子；例例えばインテグリン 6、例例えばGPIIb；
 例例えばビトロネクチンレセプター サブユニット；例例えばインテグリン -7；例例えばインテグリン E前駆体；例例えばインテグリン 6B；例例えばインテグリン 5サブユニット；例
 例例えばインテグリン -5サブユニット；例例えばインテグリン -3鎖；例例えばRYK；例例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例例えば推定貫膜GTPアーゼ；例例えば膜補助因子タンパク質；例例えばGLVR1；例例えばMr110,000抗原；例例えばシンデカン-1；例例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例例えばM6抗原；例例えばMe491/CD63抗原；例例えばマルチスパン膜タンパク質；例例えばDDR；例例えば自己分泌型運動
 因子レセプター；例例えばインスリンレセプター前駆体；例例えばIGF1R；例例えばインスリン様成長因子IIレセプター；例例えばSAS；例例えばTAPA-1；例例えばMICB；例例えばMHCクラスII H
 40 LA-DR7関連糖タンパク質 鎖；例例えばHLA-DP；例例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；
 例例えばCAR；例例えばMEA11；例例えばインターフェロン- レセプター 鎖；例例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例例えばCLPTM1；例例えばMAGE-4b；例例えばMAGE5a；例例えばMAGE-3；例例えばMAGE-1；例例えばMAGE6；例例えばMAGE-9；例例えばMAGE11；例例えばCD24；例
 例例えばCD59；例例えばCD44；例例えば低密度リポタンパク質レセプター；例例えば超低密度リポタン
 パク質レセプター；例例えばN-CAM；例例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例例えばNTR2レセプター；例例えばRAGE-4；
 例例えばHLA-G1；例例えばMOAT-C；例例えば 2 カルシウムチャネルサブユニットI型；
 例例えばLFA-3；例例えばL1-CAM；例例えばAVPR2；例例えばC1 p115 C1；例例えばTE2；例例えばRbP；

50

例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばパソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D〜）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター；例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13'；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOC15；例えばTRAILレセプター2；例えばHNMP-1；例えば腎-2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン-パーシカンV1；例えばmGluR1；例えばCD97；例えばL6；例えばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3；例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFR2；例えばTGFR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である。

10

【0217】

20

さらに好ましくは、該細胞表面分子はNCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる。

【0218】

本発明の範囲内にある薬物標的は、ベイトとして、薬物標的と結合する分子を同定するために使用でき、したがって薬物の可能性ある候補物質である分子である。特に、該薬物は、適切に製剤化した場合には、前悪性および/または悪性の病気の処置に使用できる。

【0219】

本発明はさらに、本発明に係る結合パートナーと相互作用できる新規な薬物標的を同定するための方法に関するものである（本明細書下記を参照されたい）。

【0220】

30

好ましくは係る新規な薬物標的はポリペプチドを含み、このポリペプチドは正常細胞と比較して悪性細胞中で異なるレベルで発現される細胞表面分子である。

【0221】

加えて、本発明はまた、上記方法によって同定される新規な薬物標的に関するものである。

【0222】**結合パートナーの同定方法**

本発明はさらに、特異的結合パートナーの同定方法を提供する。加えて本発明は、特異的結合パートナーの製造方法を提供する。

【0223】

40

特異的結合パートナーは幾つかの異なる方法によって同定/製造できる。具体的態様に依りて、当業者の知悉するいかなる適当な方法を本発明と共に使用することができる。

【0224】

本発明の或る態様では、結合パートナーを特異的抗体を製造するための標準方法によって製造する。例えば係る方法は以下の工程：

- i) 動物を該細胞表面分子または該細胞表面分子のフラグメントで免疫し；そして、
 - ii) 該動物から抗体を得たり；または、
 - iii) 該動物から抗体を産生する細胞を得て、そして該細胞から抗体を得る、
- を含み得る。

【0225】

50

免疫する動物は任意の動物、好ましくは哺乳動物であってよく、より好ましくは該動物はウサギ、マウス、ラット、ロバ、ヤギおよび羊からなる群から選ばれる。

【0226】

該抗体は好ましくは免疫した動物の血清から得る。それらは例えばアフィニティークロマトグラフィーといったような標準方法によって精製できる。このようにして得た抗体は好ましくはポリクローナル抗体である。

【0227】

抗体を産生する細胞は好ましくは免疫した動物の脾臓から取得し、好ましくは該細胞はB細胞である。抗体産生細胞は、不死化細胞を得るために、該動物から精製した後に他の細胞と融合させることができる。該細胞はインビトロ培養でき、例えばアフィニティークロマトグラフィー、またはタンパク質Aもしくはタンパク質Gクロマトグラフィーといった標準方法によって抗体を組織培養上清から回収できる。これらの抗体はしばしばモノクローナル抗体である。

10

【0228】

続いて、該抗体を当業者の知悉するいずれかの適当な方法によってヒト化することができる。

【0229】

しかしながら、抗体は他の手段で製造または同定することもできる。例えば天然に存在する抗体を、ヒトを包含する適当な動物から精製することができる。抗体は発現ライブラリーから得ることもできる（本明細書下記を参照されたい）。

20

【0230】

本発明に係る別の態様では、結合パートナーはポリペプチドで構成されたりまたはポリペプチドを含み、それは発現ライブラリーをスクリーニングすることによって同定できる。任意の適当な発現ライブラリーを本発明と共に使用できる。

【0231】

ライブラリーは適当な宿主細胞内に入れることができ、例えば宿主細胞は細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞であってよい。ライブラリーは任意の種、例えばウイルス、細菌、酵母、真菌、植物または動物から誘導したポリペプチドおよび／またはオリゴペプチドをコードしている核酸配列を含むことができる。動物はいかなる動物であってもよく、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトとすることができる。該ライブラリーは、合成であって天然に存在しないポリペプチドおよび／またはオリゴペプチドをコードしている核酸配列をも含むことができる。該核酸配列は適当なベクター、例えばプラスミド、ウイルス、ウイルス由来ベクター、ファージ、人工染色体またはコスミド内に含むことができる。

30

【0232】

例えば、結合パートナーはポリペプチドおよび／またはオリゴペプチドを発現する発現ライブラリーから選ぶことができる。それらはまた、ポリペプチドおよび／またはオリゴペプチドを発現する合成コンビナトリアルライブラリーから選択することもできる。

【0233】

結合パートナーはさらに、抗体のファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより同定できる。好ましくはファージディスプレイライブラリーはヒト抗体のライブラリーである。

40

【0234】

さらに別の態様では、該結合パートナーは小さな化学化合物のライブラリーから選ばれる。該ライブラリーは多数の異なる化学化合物を含むことができ、それは多数の異なる反応によって製造できる。例えばコンビナトリアルライブラリーのような好適なライブラリーが当業者に知られている。

【0235】

細胞表面分子または細胞表面分子のフラグメントと結合できる特異的結合パートナーを同定／製造したならば、該結合パートナーを好ましくはインターナライズされる能力につい

50

て試験しなければならない。該試験は該結合パートナーの性質に応じて多数の適当な方法で遂行できる。

【0236】

例えば、該結合パートナーを、該結合パートナーが結合することのできる細胞表面分子またはそのフラグメントを発現している細胞と一緒にインキュベートすることができる。インキュベートの後、細胞内部における結合パートナーの存在および/または不在が検出できる。検出は、例えば直接的または間接的に検出し得る標識で該結合パートナーを標識できるという利点を利用して遂行できる。別法として、該結合パートナーの存在を、該結合パートナーと特異的に相互作用できる第1種を用いて決定できる。該種は、直接的または間接的に標識できたり、あるいは、該第1種と特異的に相互作用でき且つ標識する事のできる第2種を用いて検出することができる。第2種と相互作用できる第3種、第3種と相互作用できる第4種等々を使用することも可能である。

10

【0237】

結合パートナー

本発明に係る特異的結合パートナーは少なくとも1つの細胞表面分子と相互作用できる。しかしながら、特異的結合パートナーは1以上の異なる細胞表面分子と結合できることもある。

【0238】

本発明の或る態様では、内部の結合パートナーは好ましくは細胞表面分子との結合後にその細胞表面分子を発現している細胞内にインターナライズされ得る結合パートナーである。

20

【0239】

本発明に係る結合パートナーは本明細書上記に概説した任意の方法によって同定できる。しかしながら、該結合パートナーはまた当業者の知悉するいずれかの他の方法によっても同定できる。

【0240】

好ましくは本発明に係る結合パートナーは、以下の群：

レセプターチロシンキナーゼの成員、

インテグリンファミリーの成員、

免疫グロブリンスーパーファミリー接着性分子の成員、

30

ヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、

MAGEファミリーの成員、

RAGEファミリーの成員、

低密度リポタンパク質レセプターファミリーの成員、

カドヘリン接着性分子の成員、

代謝調節型グルタミン酸レセプターの成員、

ステロイドホルモンファミリーの成員、

セブン(seven)貫膜レセプターファミリーの成員、

心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター、

40

GFRA3、

トランスフェリンレセプター、

セリン/スレオニンキナーゼレセプターの成員、

のうちの1つに属するレセプターからなる群から選ばれる1またはそれ以上の細胞表面分子と結合できる。

【0241】

より好ましくは、本発明に係る結合パートナーは、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる1またはそれ以上の細胞表面分子と結合できる。

【0242】

50

さらにより好ましくは、該結合パートナーは細胞表面分子の1またはそれ以上のフラグメントと結合できる。細胞表面分子の好ましいフラグメントは本明細書上記に概説している。最も好ましくは、該細胞表面分子のフラグメントは細胞表面分子の細胞外部分から誘導する。

【0243】

本発明に係る該結合パートナーは、前悪性および/または悪性の病気の処置のための医薬組成物に使用するのが好ましい。

【0244】

本発明の或る態様では、該結合パートナーはポリペプチドまたはオリゴペプチドを含むかまたは本質的にそれらで構成される。本発明に係るポリペプチドおよび/またはオリゴペプチドは天然に存在するものであってよく、または合成ポリペプチドであってもよい。

10

【0245】

或る好ましい態様では、該結合パートナーは抗体または抗体のフラグメントである。該抗体はポリクローナル抗体もしくはその結合フラグメントであってよく、またはモノクローナル抗体もしくはその結合フラグメントであってもよい。

【0246】

抗体は動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラット、ウサギ、マウス、ヒト、ロバ、ヤギおよび羊からなる群から選ばれる哺乳動物から誘導できる。或る態様では、該結合パートナーはマウスもしくはラットから誘導するモノクローナル抗体であり、例えば該結合パートナーはマウスモノクローナル抗体である。

20

【0247】

しかしながら、該抗体は、抗体の一部を或る種から誘導し、他の部分を別の種から誘導するといったような、組み合わせ抗体であってもよい。さらに、該抗体は、天然に産生されない合成抗体であってよい。

【0248】

多くの目的のため、該抗体はヒト化抗体であることが好ましい。特に、該結合パートナーを人間の前悪性および/または悪性の病気の処置に使用する場合には、抗体がヒト化されていることが望ましい。

【0249】

該抗体はまたヒト抗体であってもよい。ヒト抗体は天然に産生されるヒト抗体であってよく、またはファージディスプレイライブラリーから同定できる。さらにそれは、例えばコンピナトリルライブラリーから同定した、ヒト抗体から誘導した部分をも含むコンピナトリル抗体であってよい。該抗体はさらなるヒト化の必要がない。

30

【0250】

該抗体は好ましくは細胞表面分子の細胞外部分と相互作用できる(本明細書上記を参照されたい)。該抗体はまた、細胞表面分子の細胞外部分の翻訳後修飾と結合できる。或いは、該抗体は本明細書上記に概説した細胞表面分子のいずれかのフラグメントと相互作用できる。

【0251】

最も好ましくは該抗体は、該細胞表面分子との結合時にインターナライズされ得る。細胞表面分子と結合する多くの抗体は、結合時に細胞表面分子を発現している細胞内にインターナライズされない。本発明の範囲内の好ましい抗体は、結合後に細胞表面分子を発現している細胞内にインターナライズされ得る。

40

【0252】

本発明の別の態様では、該結合パートナーは該細胞表面分子の天然に存在するリガンドである。天然に存在するリガンドは、天然条件下で細胞表面分子と結合する化合物である。天然に存在するリガンドは例えばポリペプチド、オリゴペプチド、ホルモン、脂質、糖類、アミノ酸、神経伝達物質、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよびこれらの組み合わせからなる群から選ぶことができる。

【0253】

50

ホルモンは例えばステロイドホルモンであってよい。ステロイドホルモンはアンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロンおよびコルチコイドからなる群から選ぶことができる。

【0254】

アンドロゲンは例えばテストステロン、ジヒドロテストステロン、アンドロステンジオール、アンドロステジオン、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)、硫酸デヒドロエピアンドロステロン (DHEA-S) およびこれらの誘導体からなる群から選ぶことができる。

【0255】

エストロゲンは例えばエストリオン、エストラジオール、エストリオールおよびこれらの誘導体からなる群から選ぶことができる。

【0256】

天然に存在するリガンドは、本態様のリガンドに好適な任意の通常の技術により、ヒトを包含する動物から精製することができる。しかしながら、天然リガンドは当業者の知悉するいずれかの方法によりインビトロ産生することもできる。

【0257】

本発明の或る態様では、該結合パートナーは該細胞表面分子のための組換え産生リガンドである。リガンドがポリペプチドまたはオリゴペプチドである場合、該リガンドは、適当な宿主、例えば細菌、酵母、原生動物、動物、例えば哺乳動物、植物、動物細胞または植物細胞を、特定宿主における核酸配列の転写および/または翻訳を指令する核酸配列と機能的に連結したリガンドをコードしている核酸配列を用いて形質転換することによって産生することができる。形質転換は通常の技術に従って遂行できる。その後、該リガンドを標準方法に従って精製することができる。

【0258】

別の態様では、該結合パートナーはウイルスタンパク質であるか、またはウイルスタンパク質もしくはそのフラグメントを含む。膨大な数のウイルスタンパク質が細胞表面分子と結合できる。該結合はしばしばそのウイルス粒子のインターナライゼーションを生じ、よってウイルスタンパク質は本発明に係る好適な結合パートナーである。

【0259】

好ましくは、ウイルスタンパク質はウイルスクャプシドタンパク質であり、より好ましくは該ウイルスクャプシドタンパク質は細胞表面分子を発現している細胞中にインターナライズされ得る。

【0260】

該ウイルスタンパク質は任意のウイルス、好ましくは天然に細胞表面分子を発現する細胞に感染することのできるウイルスから誘導できる。該ウイルスは例えばアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルスおよびレンチウイルスファミリーの成員からなる群から選ぶことができる。

【0261】

該結合パートナーは組換え産生することができ(本明細書上記を参照されたい)、ウイルスクャプシドタンパク質配列を含むことができる。好ましくはウイルスクャプシドタンパク質配列は、細胞表面分子と結合でき且つインターナライゼーションを生じることのできるウイルスタンパク質の配列である。

【0262】

本発明に係るさらに別の態様では、該結合パートナーは小さな化学化合物である。該小さい化学化合物は通常合成によって製造する。それは当業者の知悉する任意の方法または方法の組み合わせによって製造できる。

【0263】

好ましい小さな化学化合物は、本明細書上記に概説した細胞表面分子および/または細胞表面分子のフラグメントと相互作用できる。より好ましくは、該小さな化学化合物は細胞表面分子を発現している細胞中にインターナライズされ得る。

【0264】

或る態様では、該結合パートナーは、EGF、TGF- α 、TGF- β 、アンフィレグリン、HB-EGF

10

20

30

40

50

、エピレグリン、 α -セルリン、IGF-1、IGF-2、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、アミロイド β -タンパク質前駆体、インターフェロン γ 、トランスフェリン、自己分泌型運動因子、L1、NCAM、カドヘリン、ボンベシン、ニューロメディンB、TNF、エリスロポエチン、インターロイキンおよびコレシストキニンBからなる群から選ばれるポリペプチドであってよい。さらに、該結合パートナーは例えばカンナビノイド、アセチルコリン、ドーパミン、ノルエピネフリン、セロトニンおよびGABAからなる群から選ばれる有機化合物であってよい。加えて、該結合パートナーは例えばホルミルペプチドおよび心房性ナトリウム利尿ペプチドからなる群から選ばれるオリゴペプチドであってよい。さらに該結合パートナーは例えばアミノ酸であってよく、それは任意のアミノ酸であってよく、好ましくは該アミノ酸はグルタミン酸塩、グリシンおよびヒスタミンからなる群から選ばれる。加えて、該結合パートナーは例えばATPおよびGTPからなる群から選ばれるヌクレオチドであってよい。さらに、該結合パートナーはエストロゲンのようなホルモン、脂質または糖類であってよい。

10

【0265】

さらに、本発明に係る結合パートナーは、EGF、TGF- β 、ヘレグリン、インスリン、IGF-1、PDGF、CSF-1、SCF、Flt-3L、VEGF、FGF1-9、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、HGF、MSP、Gas6、アングリオポエチン-1、エフリンA1-5、エフリンB1-3、GDNF、PEPHC1、TGF- β 、アングリオテンシン、トロニンピン、アデノシン、アドレナリン、セロトニン、デルトルフィン、ドーパミン、PTH、セクレチン、VIP、PA-CAP、グルカゴン、CRF、ボンベシン、ブラジキニン、NPY、グルタミン酸塩、 Ca^{2+} 、GABA、ケモカインおよびオピオイドからなる群から選ぶことができる。

20

【0266】

より好ましくは、該結合パートナーは、L-グルタミン酸塩、カイニン酸塩、5-(プロモメチル)-4-イソキサゾールプロピオン酸()、グルタミン酸塩の類似体、置換キノキサリン2,3ジオン類、GYKI52466、5-I-ウィラージン、5-F-ウィラージン、AMPA((RS)- α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸)に対するアゴニストおよびアンタゴニストリガンド、NBQX、CNQX、DNQX、GYKI52466、6-クロロキヌレン酸、JSTX、L-APA、L-SOP、ACPT、(R,S)-PPG、CPPG、MAP4、(S)-3,4-DCPG、ビトロネクチン、シタクチン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、MMP-2、オステオポンチン、プロトンピン、トロノスポンジン、フォン・ビルブランド因子、L1CAMの組換えフラグメント、サルモシン、E-カドヘリンおよびそのペプチド(ペプチド:NRDKETKVを包含する)、NCAM1ドメインIgI+II、NCAM1ドメインIgIIIおよびそのペプチド、ペプチドC3: ASKKPKRNIKA(配列番号305)、D3: AKKERQRKDTU(配列番号306)、D4: ARALNWGAKP(配列番号307)、モノクローナル抗体123C3、NPTX1、NPTX2、タイボキシン、TCBP49、オキシノル、ApoE2、ApoE3、ApoE4、ApoE由来のペプチド($E_{141;-155}$; LRKLRKRLLRDADDL(配列番号308)およびそのタンデム $E_{(141;-155)}_2$; LRKLRKRLLRDADDL-LRKLRKRLLRDADDL(配列番号308のタンデム))リーリン、ニコチン、アセチルコリン、 α -ブンガロトキシンおよびカルバコールからなる群から選ぶことができる。

30

【0267】

本発明に係る結合パートナーは本発明の具体的態様に使用する細胞表面分子に従って選択すべきである。

40

【0268】

よって、細胞表面分子が結合パートナーまたはターゲッティング複合体をインターナライズできる本発明の態様では、該結合パートナーは好ましくはNCAM1ドメインIgI+II、NCAM1ドメインIgIIIおよびそのペプチド、ペプチドC3: ASKKPKRNIKA(配列番号305)、D3: AKKERQRKDTU(配列番号306)、D4: ARALNWGAKP(配列番号307)、モノクローナル抗体123C3、NPTX1、NPTX2、タイボキシン、TCBP49、オキシノル、ApoE2、ApoE3、ApoE4、ApoE由来のペプチド($E_{141;-155}$; LRKLRKRLLRDADDL(配列番号308)およびそのタンデム $E_{(141;-155)}_2$; LRKLRKRLLRDADDL-LRKLRKRLLRDADDL(配列番号308のタンデム))リーリン、ニコチン、アセチルコリン、 α -ブンガロトキシン、カルバコールならびに該細胞表面分子に対

50

する特異的インターナライズ抗体からなる群から選ばれる。

【0269】

細胞表面分子が結合パートナーまたはターゲッティング複合体をインターナライズできない本発明の態様では、該結合パートナーは好ましくはL-グルタミン酸塩、カイニン酸塩、5-(プロモメチル)-4-イソキサゾールプロピオン酸()、グルタミン酸塩の類似体、置換キノキサリン2,3ジオン類、GYKI52466、5-I-ウィラージン、5-F-ウィラージン、AMPA((RS) - -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸) に対するアゴニストおよびアンタゴニストリガンド、NBQX、CNQX、DNQX、GYKI52466、6-クロロキヌレン酸、JSTX、L-APA、L-SOP、ACPT、(R,S)-PPG、CPPG、MAP4、(S)-3,4-DCPG、ピトロネクチン、シタクチン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、MMP-2、オステオポンチン、プロトロンピン、トロンボスポンジン、フォン・ビルブランド因子、L1CAMの組換えフラグメント、サルモシン、E-カドヘリンおよびそのペプチド(ペプチド:NRDKETKV(配列番号309)を包含する)、ならびに該細胞表面分子に対する特異抗体からなる群から選ばれる。

10

【0270】

本発明の特に好ましい態様では、該細胞表面分子はNCAM1である。該細胞表面分子がNCAM1である時、該結合パートナーは好ましくは、NCAM1の第1および第2免疫グロブリン(Ig)ドメイン(Kiselyovらによる1997)、NCAM1の第3Igドメイン、接着性分子L1およびプロテオグリカン類からなる群から選ばれる。さらに、該結合パートナーは好ましくは、コンピナトリアルペプチドライブラリーから同定できる多数のペプチド(11アミノ酸)(Ronnらによる1999)(例えばC3:ASKKPKRNIKA(配列番号305)、D3:AKKERQRKDTU(配列番号306)およびD4:ARALNWGAKPK(配列番号307)(Ronn et al., 1999)を包含する)を包含する、NCAMと結合できる合成結合パートナーからなる群から選ぶことができる。加えて、該結合パートナーは好ましくはNCAM1に対する抗体、好ましくはNCAM1に対するモノクローナル抗体、例えばインターナライズを惹起する抗体(123C3)からなる群から選ぶことができる。

20

【0271】

本発明の別の好ましい態様では、該細胞表面分子はNPTXRである。細胞表面分子がNPTXRである時、該結合パートナーは好ましくはニューロンペントラキシン1(NP1、NPTX1)およびニューロンペントラキシン2(NP2、NPTX2)からなる群から選ばれる(Kirkpatrickらによる2000; Doddsらによる1997)。さらに、該結合パートナーは好ましくは蛇毒タイボキシンおよびタイボキシン関連カルシウム結合タンパク質49(TCBP49)およびタイボキシン類似体オキシノルからなる群から選ぶことができる。加えて、該結合パートナーは好ましくは、NPTXRに対する抗体、好ましくはNPTXRに対するモノクローナル抗体からなる群から選ぶことができる。

30

【0272】

本発明に係る別の好ましい態様では、該細胞表面分子はLRP8である。細胞表面分子がLRP8である時、該結合パートナーは好ましくはApoE2、ApoE3およびApoE4ならびにリーリンからなる群から選ばれる。さらに、該結合パートナーは好ましくは種々の組換えApoEイソ型からなる群から選ぶことができ、それらの幾つかは市販品が入手可能である。しかしながら、天然ApoEイソ型は幾つかのレセプターと結合できる。加えて、該結合パートナーは好ましくはApoE由来のペプチド、例えば($E_{141;-155}$; LRKLRKRLLRDADDL(配列番号308)およびそのタンデム $E_{(141;-155)}_2$; LRKLRKRLLRDADDL-LRKLRKRLLRDADDL)からなる群から選ぶことができ、それらはいずれもレセプター機能を阻害することが示されている(Riddellらによる1999)。加えて、該結合パートナーは好ましくはLRP8に対する抗体、好ましくはLRP8に対するモノクローナル抗体からなる群から選ぶことができる。

40

【0273】

本発明に係る別の好ましい態様では、該細胞表面分子はCHRNA5である。細胞表面分子がCHRNA5である時、該結合パートナーは好ましくはニコチン、アセチルコリンおよび毒素 - ブンガロトキシンからなる群から選ばれる。さらに、該結合パートナーは、CHRNA5の合成

50

アゴニスト、例えばカルバコールからなる群から選ぶことができる。加えて、該結合パートナーは好ましくはCHRNA5に対する抗体、好ましくはCHRNA5に対するモノクローナル抗体からなる群から選ぶことができる。

【0274】

本発明に係る別の好ましい態様では、該細胞表面分子はL1CAMである。細胞表面分子がL1CAMである時、該結合パートナーは例えばインテグリンファミリーの接着性分子またはそのフラグメントを含むことができる。L1CAMは、RGD配列を介してインテグリンファミリーの、そしてオリゴマンノシド炭水化物を介して免疫グロブリンファミリーの接着性分子の幾つかに結合することが分かっている。加えて、該結合パートナーは好ましくはL1CAMに対する抗体、好ましくはL1CAMに対するモノクローナル抗体からなる群から選ぶことができる。

10

【0275】

本発明に係る別の好ましい態様では、該細胞表面分子はTNFRSF12である。細胞表面分子がTNFRSF12である時、該結合パートナーは例えばTNFRSF12に対する抗体、好ましくはTNFRSF12に対するモノクローナル抗体、例えばTNFRSF12の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体であってよい。

【0276】

本発明に係る1つの特に好ましい態様では、該細胞表面分子はGRIA2である。細胞表面分子がGRIA2である時、該結合パートナーは好ましくはL-グルタミン酸塩およびカイニン酸塩からなる群から選ばれる。さらに、該結合パートナーは好ましくはGRIA2に対する合成リガンド、例えばAMPA((RS)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸)レセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストリガンドからなる群から選ぶことができる。AMPAレセプターリガンドは一般に、グルタミン酸塩または置換キノキサリン2,3ジオン類の類似体のいずれかである。該アンタゴニストは競合的および調節部位アンタゴニストに分けられる(Brauner-Osborneらによる2000; Madsenらによる2001)に論評されている)。加えて、1つのAMPAアンタゴニスト、GYKI52466はGRIA2レセプターを発現している細胞上の腫瘍細胞の増殖を阻害することが示されている(CavalheiroおよびO'Ineyらによる2001)。リガンドのレセプター結合はそのリガンドの主要(major)部分の結合を含むことから、置換(例えばハロゲン)は極めて少ない部位でしか実施できない。AMPAの臭素置換型(ABPA)はAMPAレセプターの強力なアゴニストとして働くことが示された(Krogsgaard-Larsenらによる1985)。このアゴニストはまた、アゴニストのハロゲン化型、例えばウィリアージンおよび異なるAMPAレセプター親和性を持つ類似体であってもよい(Jane. Dによる2001)。これらの多くはAMPA自身よりもAMPAレセプターの方が何倍も高い親和性を持つことを示している。ウィリアージン(Willardiine)および6-アゾウィリアージンハロゲン化類似体の合成は(Janeらによる1997)に詳細に記載されている。5-*l*-ウィラージンおよび5-F-ウィラージンは³H型でも市販されている。加えて、該結合パートナーは小さな分子アンタゴニスト、例えば市販品が入手可能なNBQX、CNQX、DNQX、GYKI52466および6-クロロキヌレン酸からなる群、ならびに蜘蛛毒JSTX-3に関連するAMPAレセプターチャネルのより大きなポリアミンアンタゴニストの群(Yonedaらによる2001)から選ぶことができる。加えて、該結合パートナーは好ましくはGRIA2に対する抗体、好ましくはGRIA2に対するモノクローナル抗体からなる群から選ぶことができる。

20

30

40

【0277】

本発明に係る別の好ましい態様では、該細胞表面分子はGRM8である。細胞表面分子がGRM8である時、該結合パートナーは好ましくはL-グルタミン酸塩であってよい。さらに、結合パートナーは好ましくはアゴニストおよびアンタゴニスト、例えば市販品が入手可能なL-APA、L-SOP、ACPT、(R,S)-PPG、CPPG、MAP4、(S)-3,4-DCPGおよびMSOPならびにそれらの³H標識型からなる群から選ぶことができる。1つのアゴニスト(R,S)-PPGはGRM8について25倍の選択性を持ち(Gaspariniらによる1999)、またアゴニスト(S)-3,4-DCPGはGRM8について100倍以上の選択性を示す(Brunoらによる2001; Thomasらによる2001; TurnerおよびSaltによる1999)。加えて、結合パートナーは好ましくはGRM8に対する抗体、好ましくは

50

GRM8に対するモノクローナル抗体からなる群から選ぶことができる。

【0278】

本発明に係る別の好ましい態様では、該細胞表面分子はIT-GAVである。細胞表面分子がIT-GAVである時、該結合パートナーは好ましくはピトロネクチン、シタクチン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、MMP-2、オステオポンチン、プロトンピン、トロンボスポンジン、フォン・ビルブランド因子および α_3 からなる群から選ぶことができる。 α_3 は α サブユニットを介して神経細胞接着性分子L1の組換えフラグメントに結合することが示されている (Montgomeryらによる1996)。ピトロネクチンのような天然リガンドはその他幾つかの普遍的に発現されるインテグリンのリガンドでもあり、故に特異的ターゲティングのために最適ではない。さらに、結合パートナーは好ましくはディスインテグリン類およびADAM、例えばサルモシンまたはコントロスタチンからなる群から選ぶことができる。ディスインテグリン類およびADAM (A DisintegrinおよびA Metalloprotease) は蛇毒由来の多数のタンパク質であり、それらは異なる特異性で異なるインテグリンに結合する (Evansによる2001; Huangによる1998)。組換え産生されたサルモシン (Kangらによる1999) およびコントロスタチン (Mercerらによる1998) を包含する、 α_3 および α_5 に特異的な幾つかのディスインテグリンが同定されている。加えて、結合パートナーは好ましくは小さな環状ペプチドおよび非ペプチド化合物からなる群から選ぶことができ、それらは α_3 結合のアнтаゴニストである (Bogerらによる2001; HartmanおよびDugganによる2000; Kerrらによる2000; Battらによる2000)。加えて、結合パートナーは好ましくはITGAVに対する抗体、好ましくはITGAVに対するモノクローナル抗体からなる群から選ぶことができる。

10

20

【0279】

本発明に係る別の好ましい態様では、該細胞表面分子はIT-GAEである。細胞表面分子がIT-GAEである時、該結合パートナーは好ましくは細胞接着性分子E-カドヘリンまたはそのフラグメントであってよい。E-7に対するE-カドヘリンのヘテロフィリック結合部位は、E-カドヘリンと別のE-カドヘリンのホモフィリック結合部位とが相違している (Kareclaらによる1996; Taraszkaらによる2000)。好ましくはこのフラグメントは、E-カドヘリンの第1ドメインからの短ペプチド配列 (アミノ酸27-34: NRDKETKV (配列番号309)) を含み、またはより好ましくは該ペプチド配列で構成されており、これらは E-7とE-カドヘリンとの結合を妨害できる。さらに、該結合パートナーは特異的 E-7特異的ペプチドからなる群から選ぶことができる (BrennerおよびCepekによる2001)。加えて、該結合パートナーは好ましくはITGAEに対する抗体、好ましくはITGAEに対するモノクローナル抗体、例えばアンタゴニストとして使用できる E特異抗体からなる群から選ぶことができる。

30

【0280】

複合体

ある態様において、本発明は細胞表面分子および結合パートナーを含有する複合体に関する。好ましくは、該細胞表面分子は本発明に開示される方法によって同定される。該細胞表面分子は、好ましくは以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGRIA2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン α_6 、例えばGPIIb；例えばピトロネクチンレセプター α サブユニット；例えばインテグリン α_7 ；例えばインテグリン E前駆体；例えばインテグリン α_6 B；例えばインテグリン α_5 サブユニット；例えばインテグリン α_3 サブユニット；例えばインテグリン α_3 鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ、例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR；例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体；例えばIGF1R、例えばインスリン様成長因子I

40

50

Iレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-DR7関連糖タンパク質鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン-レセプター鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リボタンパク質レセプター；例えば超低密度リボタンパク質レセプター；例えばN-CAM；例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば2カルシウムチャンネルサブユニットI型I；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばパソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D~）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター；例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13'；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOC15；例えばTRAILレセプター2；例えばHNMP-1；例えば腎-2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・パーシカンV1；例えばmGluR1、例えばCD97；例えばL6；例えばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3、例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFR2；例えばTGFR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である。

10

20

30

【0281】

より好ましくは、該細胞表面分子は以下からなる群から選ばれ得る：

レセプターチロシンキナーゼの成員、

インテグリンファミリーの成員、

免疫グロブリンスーパーファミリー接着性分子の成員、

ヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、

MAGEファミリーの成員、

RAGEファミリーの成員、

低密度リボタンパク質レセプターファミリーの成員、

カドヘリン接着分子の成員、

代謝調節型グルタミン酸レセプターの成員、

ステロイドホルモンファミリーの成員、

セブン貫膜レセプターファミリーの成員、

心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター、

GFRA3、

トランスフェリンレセプター、

セリン/スレオニンキナーゼレセプターの成員。

40

【0282】

より好ましくは、該細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV

50

、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる。

【0283】

該複合体の結合パートナーは、該細胞表面分子と相互作用することができるいずれかの特異的な結合性パートナーであり得る。結合パートナーの例は、本明細書中に上記する。

【0284】

ターゲティング複合体

本発明はターゲティング複合体を提供し、このものは結合パートナーおよび生物学的反応性の種を含む。該結合パートナーは、上記本明細書中に概説する通り、1つ以上の細胞表面分子またはそのフラグメントと結合することができるべきである。

【0285】

本発明の1好ましい態様において、該細胞表面分子（このものは、該ターゲティング複合体の結合パートナーと結合することができる）は、該ターゲティング複合体をインターナライズすることができる。しかしながら、本発明の別の好ましい態様において、該細胞表面分子は該ターゲティング複合体とインターナライズすることができず、単に該ターゲティング複合体と結合することができるだけである。

【0286】

より好ましくは、該細胞表面分子は以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGRIA2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン 6、例えばGPIIb；例えばビトロネクチンレセプター サブユニット；例えばインテグリン -7；例えばインテグリン E前駆体；例えばインテグリン 6B；例えばインテグリン 5サブユニット；例えばインテグリン -5サブユニット；例えばインテグリン -3鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ、例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR；例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体；例えばIGF1R、例えばインスリン様成長因子IIレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-DR7関連糖タンパク質 鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIビグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン- レセプター 鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リボタンパク質レセプター；例えば超低密度リボタンパク質レセプター；例えばN-CAM；例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば 2 カルシウムチャネルサブユニットI型I；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばパソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D~）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター；例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOCI5；例えばTRAILレセプター2；例えばHNMP-1；例えば腎 -2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・パーシカンV1；例えばmGluR1、例えばCD97；例えばL6；例え

10

20

30

40

50

ばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3、例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFR1；例えばTGFR2；例えばTGFR3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である。より一層好ましくは、該細胞表面分子は以下の群の1つに属するレセプターからなる群から選ばれる：

10

レセプターチロシンキナーゼの成員、
 インテグリンファミリーの成員、
 免疫グロブリンスーパーファミリー接着性分子の成員、
 ヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、
 コンドロイチン硫酸プロテオグリカンファミリーの成員、
 MAGEファミリーの成員、
 RAGEファミリーの成員、
 低密度リポタンパク質レセプターファミリーの成員、
 カドヘリン接着分子の成員、
 代謝調節型グルタミン酸レセプターの成員、
 ステロイドホルモンファミリーの成員、
 セブン貫膜レセプターファミリーの成員、
 心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター、
 GFRA3、
 トランスフェリンレセプター、
 セリン/スレオニンキナーゼレセプターの成員。

20

【0287】

一層より好ましくは、該細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれる。

【0288】

30

本発明に係わる該生物学的反応性の種は、ターゲティング細胞に生物学的な影響を直接的にまたは間接的に及ぼすことができるいずれかの種であり得て、ここで該ターゲティング細胞は該細胞表面分子を発現するいずれかの細胞であり得て、そしてこのものは該ターゲティング構築物をインターナライズすることができる。本発明に係わる生物学的な影響は、例えば細胞周期の停止、並びに毒素および細胞死からの細胞の防止からなる群から選ばれる。

【0289】

該生物学的反応性の種はいずれかの化合物であり得て、例えば核酸配列、ポリペプチド、オリゴペプチド、毒素、小さい化学化合物または放射性同位元素であり得る。

【0290】

40

ある好ましい態様において、該生物学的反応性の種は核酸配列である。好ましくは、該核酸配列は、発現シグナルを含有する第1の核酸配列と機能的に連結した第2の核酸を含む。

【0291】

ある好ましい態様において、第2の核酸配列は治療タンパク質（本明細書中の以下を参照）をコードすることができる。治療タンパク質をコードしている核酸配列は、相補DNA（cDNA）を含むことができる。本明細書で使用する用語「cDNA」は、鋳型としてメッセンジャーRNA（mRNA）を用いて製造するDNAを意味する。ゲノムDNA、ゲノムDNAから重合したDNA、または非もしくは部分的に加工処理したRNA鋳型と対抗して、cDNAを用いる利点は、cDNAがいずれかの非コードのイントロン配列を

50

含まず、むしろ対応するタンパク質の中断されていないコード領域を含む。しかしながら、全または部分のゲノム配列が好ましい場合（例えば、非コード領域が最適な発現にとって必要である場合）もあり得る。

【0292】

別の態様において、該第2の核酸配列はアンチセンスRNAまたはアンチセンスRNAの一部をコードしている。あるいは、該2の核酸配列は、アンチセンスRNAまたはアンチセンスRNAの一部を含むかまたはそれらから本質的に構成される。

【0293】

本発明の文脈において、用語「アンチセンスRNA」は、遺伝子の非コードDNA鎖から転写されたRNA配列、またはストリンジェントな条件下でmRNAもしくはそのフラグメントとハイブリダイズすることができるRNA配列を包含することを意図する。 10

【0294】

好ましくは、本発明の文脈におけるアンチセンスRNAは、細胞の生存、細胞の増殖および/または細胞の運動を促進する、タンパク質をコードしている遺伝子のアンチセンスRNAである。より好ましくは、該アンチセンスRNAはオンコジーンまたは増殖因子のアンチセンスRNAである。

【0295】

第2の態様において、該第2の核酸配列はリボザイムをコードしているかまたは含む。本発明の文脈におけるリボザイムは、少なくとも1つのRNAを含み、そして酵素活性を含む分子である。好ましくは、本発明に係わるリボザイムはオンコジーン、プロトオンコジーンまたは増殖因子のRNAをターゲットとする。 20

【0296】

従って、本発明の好ましい態様において、アンチセンスRNAまたはリボザイムは、オンコジーン、プロトオンコジーンまたは増殖因子のRNAをターゲットとする。増殖因子の例は、本明細書中以下に示す。

【0297】

オンコジーンは遺伝子の多様なクラスであり、その産物は癌の発生および/または進行に寄与し得る。プロトオンコジーンは、ある環境下でまたは突然変異による後に、癌の発生および/または進行に寄与し得る。オンコジーンまたはプロトオンコジーンは例えば、Ras、Raf、Myc、Syn、Pim、BMI-1、FOP、Sis、KGF、Fms、Flg、Neu、Trk、Kit、Met、Src、Fyn、Mas、Fes/Fps、Tre、Mer、ABL、BCL3、int-2、Cym、Ets、Elk、RhoA、Ski、Wnt-5a、Spi-1、Rap2、p55およびc-tyrからなる群から選ばれ得る。このものは、本発明と一緒に使用することができる、オンコジーンまたはプロトオンコジーンの排他的な例ではなく、単に例示的な例を含む。 30

【0298】

第2核酸配列はまた、該細胞内での腫瘍抑制遺伝子のいずれかの内因性突然変異を訂正する(correct)ために、該細胞表面分子を発現する細胞中に導入される腫瘍抑制遺伝子をコードすることができる。該腫瘍抑制因子は、いずれかの腫瘍抑制因子（例えば、本明細書中以下に示す）であり得る。

【0299】

本発明に係わる第1核酸配列は好ましくは、発現シグナルを含む。該発現シグナルは好ましくは、そのものに機能的に連結した第2核酸配列の転写に影響を及ぼすべきである。好ましくは、本発明に係わる第1核酸配列は、例えばそれらは特異的な環境下で転写を増大させるように、転写に影響を及ぼす。 40

【0300】

本発明のある態様において、該第1核酸配列は、非悪性細胞と比較して、悪性細胞中での第2核酸配列の低レベルの発現を指令する発現シグナルを含む。別の実施態様において、該第1核酸配列は非悪性細胞と比較して、悪性細胞中での第2核酸配列のほぼ同レベルの発現を指令する発現シグナルを含む。

【0301】

しかしながら、本発明の好ましい態様において、該第 1 核酸配列は、非悪性細胞と比較して悪性細胞中での第 2 核酸配列のより高レベルな発現を指令する。特に、該第 1 核酸配列は、本明細書中上に概説する方法に従って同定された第 1 核酸配列からなる群から選ばれ得る。

【 0 3 0 2 】

好ましくは、該第 1 核酸配列は、以下のものからなる群から選ばれる：

pro1、pro2、pro3、pro4、pro5、pro6、pro7、pro8、pro9、pro10、pro12、pro13、pro14、pro15、pro16、pro17、pro18、pro19、pro20、pro21、pro22、pro23、pro24、pro25、pro26、pro27、pro28、pro29、pro30、pro31、pro32、pro34、pro36、pro37、pro38、pro39、pro40、pro41、pro42、pro43、pro44、pro45、pro46、pro47、pro48、pro49、pro50、pro51、pro52、pro53、pro54、pro55、pro56、pro57、pro58、pro59、pro60、pro61、pro62、pro63、pro64、pro65、pro66、pro67、pro68、pro69、pro70、pro71、pro72、pro73、pro74、pro75、pro76、pro77、pro78、pro79、pro80、pro81、pro82、pro83、pro84、pro85、pro86、pro87、pro88、pro89、pro90、pro91、pro92、pro93、pro94、pro95、pro96、pro97、pro98、pro99、pro100、pro101、pro103、pro104、pro105、pro106、pro107、pro108、pro109、pro110、pro111、pro112、pro113、pro114、pro115、pro116、pro117、pro118、pro119、pro120、pro121、pro122、pro123、pro124、pro125、pro126、pro127、pro128、pro129、pro130、pro131、pro133、pro134、pro135、pro136、pro137、pro138、pro139、pro140、pro141、pro142、pro143、pro144、pro145、pro146、pro147、pro148、pro149、pro150、pro152、pro153、pro154、pro155、pro156、pro157、pro158、pro159、pro160、pro161、pro162、pro163、pro164、pro165、pro166、pro167、pro168、pro169、pro171、pro172、pro173、pro174、pro175、pro176、pro177、pro178、pro179、pro180、pro181、pro182、pro183、pro184、pro185、pro187、pro189、pro191、pro193、pro194、pro195、pro196、pro197、pro198、pro199、pro201、pro202、pro203、pro204、pro205、pro206、pro207、pro208、pro209、pro210、pro211、pro212、pro213、pro215、pro216、pro217、pro219、pro220、pro221、pro222、pro223、pro224、pro225、pro226、pro227、pro228、pro229、pro230、pro231、pro232、pro233、pro234、pro235、pro236、pro237、pro238、pro239、pro240、pro241、pro242、pro243、pro244、pro245、pro246、pro247、pro248、pro249、pro250、pro251、pro253、pro254、pro255、pro256、pro257、pro258、pro259、pro260、pro262、pro263、pro264、pro267、pro268、pro269、pro270、pro271、pro272、pro273、pro275、pro277、pro278、pro279、pro280、pro282、pro283、pro284、pro285、pro286、pro287、pro289、pro290、pro291、pro292、pro293、pro294、pro295、pro296、pro297、pro298、pro299、pro300、pro301、pro302、pro303、pro304、pro305、pro306、pro307、pro308、pro309、pro310、pro311、pro312、pro313、pro315、pro316、pro317、pro318、pro319、pro320、pro321、pro322、pro323、pro324、pro326、pro327、pro328、pro329、pro330、pro331、pro332、pro333、pro334、pro335、pro336、pro337、pro338、pro339、pro340、pro341、pro344、pro346、pro347、pro348、pro349、pro352、pro353、pro354、pro355、pro356、pro358、pro359およびpro361。

【 0 3 0 3 】

該第 1 核酸配列は更に、以下のものからなる群から選ばれる核酸配列のフラグメントを含むかおよび／またはそれらから本質的に構成され得る：

pro1、pro2、pro3、pro4、pro5、pro6、pro7、pro8、pro9、pro10、pro12、pro13、pro14、pro15、pro16、pro17、pro18、pro19、pro20、pro21、pro22、pro23、pro24、pro25、pro26、pro27、pro28、pro29、pro30、pro31、pro32、pro34、pro36、pro37、pro38、pro39、pro40、pro41、pro42、pro43、pro44、pro45、pro46、pro47、pro48、pro49、pro50、pro51、pro52、pro53、pro54、pro55、pro56、pro57、pro58、pro59、pro60、pro61、pro62、pro63、pro64、pro65、pro66、pro67、pro68、pro69、pro70、pro71、pro72、pro73、pro74、pro75、pro76、pro77、pro78、pro79、pro80、pro81、pro82、pro83、pro84、pro85、pro86、pro87、pro88、pro89、pro90、pro91、pro92、pro93、pro94、pro95、pro96、pro97、pro98、pro99、pro100、pro101、pro103、pro104、pro105、pro106、pro107、

pro108、pro109、pro110、pro111、pro112、pro113、pro114、pro115、pro116、pro117、
 pro118、pro119、pro120、pro121、pro122、pro123、pro124、pro125、pro126、pro127、
 pro128、pro129、pro130、pro131、pro133、pro134、pro135、pro136、pro137、pro138、
 pro139、pro140、pro141、pro142、pro143、pro144、pro145、pro146、pro147、pro148、
 pro149、pro150、pro152、pro153、pro154、pro155、pro156、pro157、pro158、pro159、
 pro160、pro161、pro162、pro163、pro164、pro165、pro166、pro167、pro168、pro169、
 pro171、pro172、pro173、pro174、pro175、pro176、pro177、pro178、pro179、pro180、
 pro181、pro182、pro183、pro184、pro185、pro187、pro189、pro191、pro193、pro194、
 pro195、pro196、pro197、pro198、pro199、pro201、pro202、pro203、pro204、pro205、
 pro206、pro207、pro208、pro209、pro210、pro211、pro212、pro213、pro215、pro216、 10
 pro217、pro219、pro220、pro221、pro222、pro223、pro224、pro225、pro226、pro227、
 pro228、pro229、pro230、pro231、pro232、pro233、pro234、pro235、pro236、pro237、
 pro238、pro239、pro240、pro241、pro242、pro243、pro244、pro245、pro246、pro247、
 pro248、pro249、pro250、pro251、pro253、pro254、pro255、pro256、pro257、pro258、
 pro259、pro260、pro262、pro263、pro264、pro267、pro268、pro269、pro270、pro271、
 pro272、pro273、pro275、pro277、pro278、pro279、pro280、pro282、pro283、pro284、
 pro285、pro286、pro287、pro289、pro290、pro291、pro292、pro293、pro294、pro295、
 pro296、pro297、pro298、pro299、pro300、pro301、pro302、pro303、pro304、pro305、
 pro306、pro307、pro308、pro309、pro310、pro311、pro312、pro313、pro315、pro316、
 pro317、pro318、pro319、pro320、pro321、pro322、pro323、pro324、pro326、pro327、 20
 pro328、pro329、pro330、pro331、pro332、pro333、pro334、pro335、pro336、pro337、
 pro338、pro339、pro340、pro341、pro344、pro346、pro347、pro348、pro349、pro352、
 pro353、pro354、pro355、pro356、pro358、pro359およびpro361。

【 0 3 0 4 】

一層より好ましくは、該第 1 核酸配列は、pro221、pro210、pro71、pro41、pro30、pro2、
 pro209、pro14、pro4、pro8、pro246、pro16、pro27、pro5、pro49、pro19、pro140、p
 ro139、pro207、pro81、pro273およびpro362、並びにそれらのフラグメントからなる群か
 ら選ばれる。

【 0 3 0 5 】

該第 1 核酸配列はまた、上記の群から選ばれるヌクレオチド配列の 1 つ以上のフラグメン 30
 トをも含み得る。

【 0 3 0 6 】

該第 1 核酸配列は更に自然に関係しない核酸配列を含むこともまた、本発明内に包含する。
 該自然に関係しない核酸配列は、例えば転写因子結合部位、好ましくは 1 つ以上のステ
 ロイドホルモンレセプター結合部位であり得る。

【 0 3 0 7 】

本発明の好ましい実施態様において、該第 1 核酸配列は、本明細書中上で概説するいずれ
 かの第 1 核酸配列であり得る。

【 0 3 0 8 】

ある実施態様において、核酸配列は細胞のゲノム中に安定に組み込まれる。この組み込み 40
 は、相同的な組み換え（遺伝子組み換え）による同族の位置および配向の内にあり得たり、
 またはランダムで非特異的な位置内に組み込み得る（遺伝子増強）。更なる態様におい
 て、該核酸配列は DNA の別のエピソームセグメントとして細胞中に安定に保つことができ
 る。該核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主の細胞周期から独立しているかまた
 はそれと同期化した保持および複製が許容されるのに十分な配列をコードしている。

【 0 3 0 9 】

該ターゲティング複合体は結合パートナーおよび生物学的反応性の種に加えて、更に別の
 構成成分を含むことができる。別構成成分は例えば、保護成分であり得る。

【 0 3 1 0 】

該生物反応性の種が核酸である場合には、該ターゲティング複合体は更に、保護的なキャ 50

ッピングを含み得て、ここで該保護的なキャッピングは該第1および/または第2の核酸配列と結合する核酸配列から成る。保護的性質を有する核酸配列は例えば、改変ヌクレオチドを含み得る。該改変ヌクレオチドは例えば、1つ以上のアミノ酸、アミン基またはピオチン基で改変することができる。

【0311】

本発明の1態様において、該生物学的反応性の種は毒素である。毒素は、細胞表面分子を発現する細胞にとって毒であるいずれかの種である。例えば、該毒素は、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、ストレプトゾトシンまたはコレラ毒素からなる群から選ばれ得る。しかしながら、毒素のこの例示は完全なものではなく、本発明を限定するものとみなすべきではない。

10

【0312】

本発明の別の態様において、該生物学的反応性の種はアポトーシスのインジューサーである。細胞表面分子を発現する細胞中で直接的にまたは間接的にアポトーシスを誘起することができるいずれかの化合物は、本発明の意義内でアポトーシスのインジューサーである。

【0313】

アポトーシスのインジューサーはポリペプチド(本明細書中以下を参照)であり得るか、またはそのものは他の種類の化合物であり得る。例えば、アポトーシスのインジューサーは、レチン酸、A23187、オカダ酸、ピューロマイシン、スタウロsporin、タブシガルジン、アクチノマイシンD、カンプトテシン、シクロヘキシミド、デキサメタゾン、エトボシドおよびグルココルチノイドからなる群から選ばれ得る。しかしながら、アポトーシスのいずれかのインジューサーをまた、本発明内に含む。

20

【0314】

本発明の更なる別の態様において、該生物学的反応性の種は放射性同位体である。放射性同位体は、(125)I、(131)I、(123)I、(111)In、(205)Bi、(206)Bi、(213)Bi、(186)Re、(188)Re、(225)Ac、99mTc、(68)Ga、(62)Cu、(90)Y、(64)Cu、(211)At、(212)Bi、(177)Lu、(153)Smおよび(157)Gdからなる群から選ぶことができる。ある態様において、該放射性活性な種は他の種と共有結合することができ、例えば該放射性活性な種は結合パートナーと共有結合することができる。

【0315】

本発明の更なる実施態様において、該生物学的反応性の種は静細胞剤(cytostatica)である。静細胞剤は、例えば化学療法において使用することができる薬物であり得る。化学療法における使用に適当な薬物は、本明細書中以下に記載する。

30

【0316】

本発明に係わる該生物学的反応性の種はホルモンの作動薬、好ましくはエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、LHおよびRHからなる群から選ばれるホルモンの作動薬である。

【0317】

アンドロゲンは例えば、テストステロン、ジヒドロテストステロン、アンドロステジオール、アンドロステジオン、デヒドロエピアンドロステロン(DEHA)、デヒドロエピアンドロステロン硫酸(DEHA-S)およびそれらの誘導体からなる群から選ぶことができる。

40

【0318】

エストロゲンは例えば、エストリオン(estrion)、エストラジオール(estradiol)、エストリオール(estriol)およびそれらの誘導体からなる群から選ぶことができる。

【0319】

あるいは、該生物学的反応性の種は、アロマターゼインヒビターであり得る。

【0320】

本発明のある好ましい態様において、該生物学的反応性の種は、ポリペプチドを含むかまたはそれらから本質的に構成される。特に、該ポリペプチドは治療タンパク質であり得る

50

。

【0321】

用語「治療タンパク質」とは、細胞の潜在的な利点のために細胞中に導入されるいずれかのポリペプチド、または該細胞を含有する生物を意味すると意図する。治療タンパク質は、多数の異なるクラスに属することができる。例えば、治療タンパク質は、腫瘍抑制因子、毒性物質であり得るか、またはそのものはアポトーシスのインジューサーであり得る。本発明に係わる該治療タンパク質は、細胞周期停止に寄与することができるタンパク質であり得る。

【0322】

癌処置様式の文脈において、特に有用な遺伝子は腫瘍抑制因子である。正常な細胞の新生物細胞中への形質転換のプロセスの間、腫瘍抑制遺伝子の突然変異は重要な役割を果たしていると考えられる。腫瘍抑制因子の最も重要な機能の1つは、細胞周期を弱毒化し、そして変異型細胞のアポトーシスを媒介することである。腫瘍抑制遺伝子は非常に有効であって、その結果該腫瘍抑制遺伝子の両方のアレルの突然変異がその機能を除去するのに必要である。従って、機能的な腫瘍抑制遺伝子の変異型表現型を有する癌細胞中への導入は、細胞周期の停止およびアポトーシスを誘起するのに十分であることが多い。p53、p73およびp16は肺癌の場合において突然変異することが多い腫瘍抑制遺伝子である。治療遺伝子運搬ベクターを用いた野生型のこれら遺伝子の癌細胞中への導入は、癌細胞を選択的に殺滅させる可能な方法である。当該分野の当業者にとってよく知られる多数の腫瘍抑制因子が存在し、好ましくは例えばp53、p73、p16、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、FCCおよびMCCを含む。この例示は、当該分野において知られる様々な腫瘍抑制因子の排他的なものではなく、むしろより一般的な腫瘍抑制因子の典型例であると意図する。

【0323】

好ましくは、該治療タンパク質はp73、p16、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-1、MEN-II、BRCA1、VHL、FCC、MCC、MSH2、PTCH、DPCH、TSC2、CDKN2AおよびARFからなる群から選ばれる腫瘍抑制である。より好ましくは、該治療タンパク質はp53である。

【0324】

癌治療の重要な終末点は癌細胞の殺滅または除去である。この事象の導入のために通常使用される方法の1つは、変異型p53を有する癌細胞中への野生型p53の導入、それによる細胞周期の停止およびアポトーシスの誘発である。治療遺伝子としてのp53の使用は、癌細胞中における内因性p53の状態に依存する。野生型の過剰発現は有効なことが多く、しかしながら、p53の過剰発現と細胞周期調節遺伝子（例えば、p16）の過剰発現との組み合わせは、該効果を増大させることができる。他の細胞周期調節遺伝子（例えば、p15、p17、p18またはp19）はまた、p53またはp53ファミリー由来の他の遺伝子（例えば、p73）と組み合わせ有効である。化学治療薬物またはイオン照射(ionising radiation)との組み合わせ療法は、p53遺伝子療法に対する治療学的な反応を著しく増強することができることも可能である。

【0325】

タンパク質のBcl-2ファミリーは、細胞死の重要な制御因子である。それらは、抗アポトーシス性成員に対するアポトーシス促進性成員という、2つの相反する機能からなる。全てのbcl-2ファミリーは、4つの非常に保存されたドメインである、BH1、BH2、BH3およびBH4の1つ以上を有する。Bcl-2ファミリーメンバーは、A1、mcl-1、bcl-2、bcl-w、bcl-x、bax、badおよびbakを含むが、これらに限定されない。細胞内膜タンパク質をコードしているA1、bcl-2、mcl-1、bcl-wおよびbcl-xl（長型のbcl-x）遺伝子は、アポトーシスを遮断したりまたは遅延させることが分かった。これら遺伝子の過剰発現は、アポトーシス（これは、化学療法によって誘発されるものを含む）に対する耐性を与えることが分かった。これらの遺伝子およびそれらのタンパク質に関するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、アポトーシスを誘起するのに治療学的に使用することができる。

【0326】

それに対して、bax、bad、bakおよびbcl-xs（短型のbcl-x）は、抗アポトーシス性bcl-2ファミリー成員の保護的な効果を抑制することによって、細胞死を促進することが本発明において分かった。腫瘍細胞中でのアポトーシスを誘起する可能な方法は、これらの遺伝子の導入および過剰発現によるものである。

【0327】

カスパーゼ（システイン-アスパラギン酸-プロテアーゼ）は、アポトーシスの問題の中心であるタンパク質のクラスである。これらのプロテアーゼは、アポトーシスを受ける細胞中に見られる形態学的変化を生じる、細胞タンパク質の分解における主な原因である。カスパーゼは、タンパク質分解性の切断によって活性化される不活性なプロ酵素として存在する。少なくとも12個のカスパーゼがヒトにおいて同定されている。カスパーゼ8、9および3は、アポトーシス経路における中心的な接合部に位置する。カスパーゼ8およびカスパーゼ9は、タンパク質分解性の切断によってカスパーゼ3を活性化し、次いでカスパーゼ3は生命(vital)細胞タンパク質または他のカスパーゼを切断する。これらのカスパーゼの1つの導入および過剰発現は癌細胞のアポトーシスを生じると企図されるであろう。

10

【0328】

好ましくは、該治療タンパク質は、Fas/Apo1、TNF、TRAIL、TGF- β 、カスパーゼ、Bak、Bax、Bid、BikおよびGZMBからなる群から選ばれるアポトーシスのインジューサーである。

【0329】

本発明に係わる該生物学的反応性の種は、更にオンコジーンタンパク質、または癌の形成に關与する他のタンパク質と結合する抗体であり得る。オンコジーンタンパク質の例示は、本明細書中上で示す。

20

【0330】

癌細胞は、増殖、血管新生および免疫系の回避(evasion)を媒介する自己分泌またはパラ分泌ループ(loop)を持続するための増殖因子または増殖因子レセプターを産生することが多い。従って、該生物学的反応性の種は抗体、例えばTGF- β 、VEGF、IGFおよび増殖因子レセプター（例えば、EGFR）からなる群から選ばれる1つ以上の増殖因子を抑制する細胞内単鎖であり得る。

【0331】

加えて、該治療タンパク質は毒性物質から細胞を防止することができるタンパク質であり得たり、またはそれらは毒性物質の製造を触媒することができるタンパク質であり得る。

30

【0332】

プロドラッグの細胞障害性化合物への変換を媒介するタンパク質を導入する、異なるシステムが開発されている。単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子は、特異的な前毒性ヌクレオシドアナログ（例えば、アシクロビルおよびガンシクロビル(gancyclovir)）を強力なDNA合成インヒビターへ変換する。HSV-tkを発現することができる細胞は、薬物に対して非常に感受性となり、一方で非HSV-tk発現細胞は比較的の不活性である。該プロドラッグ変換の影響は、HSV-tk形質導入細胞中だけでなく、周囲の細胞中にも見られる。この効果は傍観者(bystander)効果と呼ばれ、このものはHSV-tk遺伝子を用いて腫瘍細胞の100%を形質導入する要求を避けるような治療学的な利点である。

40

【0333】

別の該薬物感受性の治療タンパク質は、シトシンデアミナーゼ(cytosine deaminase)(CD)である。該CDタンパク質は、プロドラッグ5-フルオロシトシン(5FC)の5-フルオロウラシル(5FU)への変換を触媒し；5FCを用いるCD形質導入細胞の処置により、CD陽性腫瘍細胞中での該5FCの抗腫瘍性薬物5FUへの変換を生じる。

【0334】

該治療タンパク質は更に、オンコジーンの発現を妨害し、その結果新生物細胞の増殖を抑制するために導入される、毒性タンパク質（例えば、サイトカイン）であり得る。

【0335】

本発明に係わる該ターゲティング複合体は、1個以上の異なる生物学的反応性の種（例え

50

ば2個、例えば3個、例えば4個、例えば5個、例えば5個以上の異なる生物学的反応性の種)を含むことができる。例えば、該ターゲティング複合体は、1個以上の治療タンパク質をコードしている1個以上の第1ヌクレオチド配列(例えば1個および/またはそれ以上の治療タンパク質をコードしている、2個、例えば3個、例えば4個、例えば5個、例えば5個以上の第1ヌクレオチド配列)を含むことができる。

【0336】

本発明のいくつかの態様において、該ターゲティング複合体は更に、核ターゲティングシグナルを含む。該核ターゲティングシグナルは、該核中への転位を指令する。ある生物学的反応性の種は、活性である該核に侵入しなければならず、そして従ってそれらが核局在化シグナルと結合する場合には有利となる。例えば、DNA配列は、転写されるために該核に侵入しなければいけない。

【0337】

本発明に係わる核ターゲティングシグナルは、核に局在化することができるいずれかの核ターゲティングシグナルであり得る。該核ターゲティングシグナルは例えばオリゴペプチドであり得て、好ましくは該核ターゲティングシグナルは、以下の配列を有するオリゴペプチドからなる群から選ばれる：

RRMKWKK PDX (配列番号310)、
 RVHPYQR QKI (配列番号311)、
 KRPACTLKPECVQQLLVCSQEAKK HCDA (配列番号312)、
 PKKKRKV (配列番号313) (SV40 LrgT)、
 GKRSKA (配列番号314) (H2B)、
 KAKRQR (配列番号315) (v-Rel)、
 RGRRRRQR (配列番号316)、
 RKRRR (配列番号317)、
 PPVKRERTS (配列番号318) (RanBP3)、
 PYLNKRKGKP (配列番号319) (Pho4p)、
 CYGSKNTGAKKRKIDDA (配列番号320) (DNAヘリカーゼQ1)、
 KKKKRKREK (配列番号321) (LEF-1)、
 KKKRSREK (配列番号322) (TCF-1)、
 Krx{7,9}PQPKKKP (配列番号323) (p53)、
 KVTKRKHDNEGSGSKRPK (配列番号324) (Hum-Ku70)、
 RLKKLKCSKx{19}KTKR (配列番号325) (GAL4)、
 RKRIREDRKx{18}RKRKR TCPTP (配列番号326)、
 RRERx{4}RPRKIPR (配列番号327) (BDV-P)、
 KKKKKEEEGEGKKK (配列番号328) (act/inh ベータA)、
 PRPRKIPR (配列番号329) (BDV-P)、
 PPRIYPQLPSAPT (配列番号330) (BDV-P)、
 KDCVINKHHRNRCQYCRLQR (配列番号331) (TR2)、
 Krx{9}KTKK (配列番号332) (THOV NP)、
 APKRKSGVSKC (配列番号333) (ポリオーマVP1)、
 RKKRRQRRR (配列番号334) (HIV-1 Tat)、
 RQARRNRRRRWR (配列番号335) (HIV-1 Rev)、
 MPKTRRRPRRSQRKPPT (配列番号336) (Rex)、
 KRPMNAFIVWSRDQRRK (配列番号337) (SRY)、
 PRRRK (配列番号338) (SRY)、
 KRPMNAFMVWAQAARRK (配列番号339) (SOX9)、
 PRRRK (配列番号338) (SOX9)、
 [KAR]TPIQKHWRPTVLTEGPPVKIRIETGEWE[KA] (配列番号340)、
 PPRKKRTVV (配列番号341)、
 YKRPCKRSFIRFI (配列番号342)、

10

20

30

40

50

LKDVRKRKLGPGRH (配列番号343)、	
KRPRP (配列番号344)、	
RKRKK (配列番号345)、	
RRSMKRK hVDR (配列番号346)、	
PAKRARRGYK (配列番号347)、	
RKCLQAGMNLEARKTKK (配列番号348)、	
RRERNKMAAAKCRNRRR (配列番号349)、	
KRMNRRIAASKCRKRKL (配列番号350)、	
KKSKKGRQEALERLKKK (配列番号351)、	
RKEWLTNFMEDRRQRKL (配列番号352)、	10
KKQTTLAFKPIKKGKKR (配列番号353)、	
RKRKKMPASQRSKRRKT (配列番号354)、	
RAIKRRPGLDFDDDGEGNSKFLR (配列番号355)、	
SxGTKRSYxxM (配列番号356)、	
TKRSxxxM (配列番号357)、	
RIRKKLR (配列番号358)、	
KRAAEDDEDDVDTKKQK (配列番号359)、	
GRKRKKRT (配列番号360)、	
KKKQKK (配列番号361)、	
REKKEKEQKEKCA (配列番号362)、	20
LEKKVKKKFDWCA (配列番号363)、	
TEKK[QG]KSILYDCA (配列番号364)、	
SDKKVRSLIECA (配列番号365)、	
LKRKLQR (配列番号366)、	
RRKGKEK (配列番号367)、	
CKRKT TNADRRKA (配列番号368)、	
VNEAFETLKRC (配列番号369)、	
MPTEERVRRKESNRESARRSRYRKAHLK (配列番号370)、	
KVNSRKRKEVPGPNGATEED (配列番号371)、	
PRRGPR HCV (配列番号372)、	30
PRGRRQPIPKARQP (配列番号373)、	
KRSAEGGNPPKPLKKLR (配列番号374)、	
KRKx{11}KKKSKK (配列番号375)、	
EYLSRKGKLEL (配列番号376)、	
PKRPRDRHDGELGGRKRARG (配列番号377)、	
KRPAATKKAGQAKKKK (配列番号378)、	
KRKEMANKSAPEAKKKK (配列番号379)、	
RKRAFHGDDPFGEGPPDKK (配列番号380)、	
GGGx{3}KNRRx{6}RGGRN (配列番号381)、	
YNNQSSNFGPMKGGN (配列番号382)、	40
PAAKRVKLD (配列番号383)、	
KRPAEDMEEQAFKRSR SxGTKRSYxxM (配列番号384)、	
MNKIPIKDLLNPG (配列番号385)、	
PKKARED (配列番号386)、	
VSRKRPR (配列番号387)、	
APTKRKGS (配列番号388)、	
PNKKKRK (配列番号389)、	
EEDGPQKKKRRL (配列番号390)、	
PLLKKIKQ (配列番号391)、	
PPQKKIKS (配列番号392)、	50

PQPKKKP (配列番号393)、
SKRVAKRKL (配列番号394)、
IKYFKKFPKD (配列番号395)、
KTRKHRG (配列番号396)、
KHRKHPG (配列番号397)、
PQSRKKLR (配列番号398)、
HRKYEAPRHx{6}PRKR (配列番号399)、
KKEKKKSKK (配列番号400)。

【0338】

ここで、それらが誘導されるタンパク質の命名は角括弧 (bracket) 内で示され、ここで「[KR]」は、「KまたはR」、すなわち該位置で妥当な該2つのアミノ酸のいずれかを示し、「x」は
10
いづれかのアミノ酸を示し、「x{9}」は「9個のx」を示し、「x{7, 9}」は「少なくとも7個、
ほとんどの場合9個のx」を示す。アミノ酸はそれらの1文字コードで示す。

【0339】

その上、本発明に係わる核局在化シグナルはまた上記の配列の変異体でもあり得る。例えば、
該変異体は、例えば1個、例えば2個、例えば3個、例えば4個、例えば5個、例え
ば6個、例えば7個、例えば8個、例えば9個、例えば10個のアミノ酸がいずれかの別
のアミノ酸（好ましくは、それは同類アミノ酸置換である）で置換された変異体である（
本明細書中上記を参照）。例えば1個、例えば2個、例えば3個、例えば4個、例えば5
個、例えば6個、例えば7個、例えば8個、例えば9個、例えば10個のアミノ酸が欠損
20
している突然変異体は、本発明に係わる核局在化シグナルである。

【0340】

より好ましくは、該核ターゲティングシグナルは、シミアンウイルス40ラージ腫瘍抗原
の核局在化シグナルである。

【0341】

本発明のある態様において、該ターゲティング複合体は更に、エンドソーム溶解性薬物を
含む。該ターゲティング複合体は、レセプター媒介性エンドサイトーシスとして知られる
方法によって、該細胞表面分子を発現する細胞中に溶かされることが多く、従って該ター
ゲティング複合体はエンドソーム内の細胞中に入り、そしてこのものは分解を避けるため
に逃避 (escape) しなければいけない。このために、該ターゲティング複合体はエンドソー
30
マル溶解性薬物を含むことが多い。

【0342】

多数のウイルスがエンドソームを回避するために開発されており、従って弱毒化ウイルス
またはウイルスの一部は、エンドソーム溶解性薬物であり得る。好ましくは、該エンドソ
ーム溶解性薬物は、ポリエチレンイミン (PEI)、複製欠損ウイルスおよびウイルスタン
パク質キャプシドからなる群から選ばれる。より好ましくは、該エンドソーム溶解性薬物
は、膜不安定化ポリペプチドを含み得る。

【0343】

本発明のある態様において、該ターゲティング複合体は更にクロロキンを含む。クロロキ
ンは、エンドソーム分解から保護することができ、従って、その存在は本発明のいくつか
40
の態様において所望され得る。

【0344】

本発明の好ましい態様において、該生物学的反応性の種および該結合パートナーは、直接
的にまたは間接的にいずれかで互いに結合する。該生物学的反応性の種が核酸配列であ
る場合には、該結合パートナーは例えば、該結合パートナーと共有結合する核酸結合性薬
物を介して該生物学的反応性の種と結合することができる。

【0345】

核酸結合性薬物としては、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、ヌクレオチド、
炭水化物、脂肪酸、有機または無機の化合物、並びにこれらおよび他のものの組み合わせ
を含む。

【0346】

核酸結合性薬物は、化学的もしくは物理的な力によってまたはそれら2つの組み合わせによって、1本鎖もしくは2本鎖のDNA、1本鎖または2本鎖のRNAと結合することができる。核酸結合性薬物は、(i)核酸そのものについてだけのアフィニティを有し得るか、(ii)核酸および別の分子の両方についてのアフィニティを有し、その結果該2つの間の架橋を形成し得るか、または(iii)核酸についてのアフィニティを有する別の分子についてのアフィニティを介して核酸についての間接的なアフィニティを有し得る。

【0347】

本発明によれば、核酸結合性薬物と結合パートナーとのカップリング反応は、該結合パートナーと該細胞表面分子との結合を妨害しない様式で生じ得る。好ましくは、レセプター媒介性エンドサイトーシスを介する該ターゲティング複合体のインターナライズもまた保持される。一層より好ましい態様において、この認識およびインターナライズは該核酸配列を、発現または標的内的核酸との相互作用によって適当な形態で標的細胞中へ運搬する。

10

【0348】

ある態様において、該核酸結合性薬物は、インターキャラティブ(intercalative)様式で二本鎖核酸の塩基対の間にそのものを挿入することができたり、または二本鎖核酸の小さくは中のグロブ(groove)中で結合することができる。

【0349】

この結合は、配列特異的であり得たりまたは配列に全く関連得ない。他の態様において、核酸は化学的または光化学的に反応性の基を有する他の分子と架橋することができる。

20

【0350】

本発明の別の態様において、該核酸結合性薬物は、該核酸を別の分子と共有的に連結する。1態様において、該核酸結合性薬物は、カップリング試薬(例えば、カルボジイミド)の1つであり得る。しかしながら、該核酸の共有カップリング反応はその特異性を改変し得て、そして適当な遺伝子発現またはターゲット核酸認識を妨げ得る。その上、直鎖または1本鎖の核酸は、該核酸と該結合パートナーとの共有カップリング反応にとって必要となり得る。最後に、核酸は負に荷電した分子であり、このことはそれらが細胞表面から忌避する(repell)ことができ、そのことにより転移がエンドソーム溶解経路によって困難となることを意味する。従って、サイズおよび種類の制限は、結合パートナーと直接的に結合した核酸の効率的な運搬に必要となり得る。

30

【0351】

核酸結合性薬物は例えば、ポリカチオン性薬物であって、このものはW0 96/30536に記載されているDNA結合性薬物と同様に、核酸上のカチオン性基と負に荷電したホスフェートとの間の、配列に中性な相互作用に含めた静電支配の結合に依存する。

【0352】

該ポリカチオン性薬物はDNAと強く結合し、その結果、核酸分子の負電荷が完全に中和されたトロイド(toroid)複合体を形成する。この可溶性トロイド複合体は、正常なレセプター媒介性エンドサイトーシスを介してインターナライズすることができる。

【0353】

1本鎖mRNAから2本鎖環状プラスミドまでのいずれかの種類の核酸を使用することができる。

40

【0354】

その上、結合する該ポリカチオン性薬物にとっての負電荷の供給源が存在する限り、いずれかのサイズの核酸を使用することができる。ある態様において、これらのポリカチオン性部分としては例えば、中性ポリアミン(例えば、スペルミンおよび/またはスペルミジン)を含み得る。好ましい態様において、該ポリカチオン性薬物は、人為的に製造された薬物(例えば、ポリリシンまたはポリエチレンアミン)であり得る。

【0355】

本発明が適当に機能するために、該核酸結合性薬物に関するある基準を満たす必要がある

50

。第1に、該細胞中へ運搬される該核酸は、いずれの様式でその整合性を失うことなく、該核酸結合性薬物と結合しなければならない。

【0356】

第2に、リガンド、核酸結合性薬物および核酸を含有する複合体は、インビトロおよびインビボで該複合体が細胞へより大きく到達することができるために可溶形態でなければいけない。第3に、一旦該複合体が宿主細胞とインターナライズすれば、該核酸はそのターゲット配列に接近し、一方で分解を避けなければならない。

【0357】

該核酸結合性薬物は例えば、カルボジイミド、N-スクシンイミジル、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、スクシンイミジル、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼンおよびヘキサメチレンジアミンなどの薬物を含み得る。この例示は、当該分野において知られる様々なカップリング試薬の排他的なものではなく、むしろ使用することができるより一般的な連結薬物の典型例であると意図する。

【0358】

好ましくは、該核酸結合性薬物は、ポリ-L-リシン(PLL)、スペラミン、スペラジミンおよびヒストンタンパク質からなる群から選ばれる。

【0359】

核酸結合性薬物がPLLである場合には、PLLは15~1000、例えば50~750)、例えば100~500、例えば200~400の残基を含み得る。

【0360】

本発明のある態様において、該結合パートナーは特異的な相互作用性成分の対を介して間接的に該生物学的反応性の種と結合し、ここで1成分は該生物学的反応性な種と共有結合し、そして該第2成分は該結合パートナーと共有結合する。

【0361】

該特異的な相互作用性成分の対の1例はビオチンおよびステプトアビジンであるが、しかしながら、相互作用性成分の他の対をまた使用することができる。

【0362】

細胞表面分子およびターゲティング複合体を含有する複合体

細胞表面分子、結合パートナーおよび生物学的反応性の種を含む複合体を提供することは、本発明の1目的である。細胞表面分子、結合パートナーおよび生物学的反応性の種の例は、本明細書中上に示す。

【0363】

好ましくは、該複合体は本発明に係わるいずれかの方法に従って同定される細胞表面分子、および本明細書中上記のターゲティング複合体を含み得る。

【0364】

あるいは、該複合体は本明細書中上記の細胞表面分子およびターゲティング複合体を含み得て、ここで該細胞表面分子は好ましくは以下のものを含んでいるか、または本質上以下のもので構成されるか、または例えばGRIA2、例えばLPR8、例えばCHRNA5、例えばTMEFF、例えばNPTXR、例えばトランスフェリンレセプター；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10481；例えばII型膜タンパク質クローン；例えばHP10390；例えばPG40；例えばTRC8；例えばTR2-11；例えばOA3抗原性表面決定因子；例えばインテグリン 6、例えばGP IIb；例えばビトロネクチンレセプター サブユニット；例えばインテグリン -7；例えばインテグリン E前駆体；例えばインテグリン 6B；例えばインテグリン 5サブユニット；例えばインテグリン -5サブユニット；例えばインテグリン -3鎖；例えばRYK；例えばアミロイド前駆体タンパク質結合タンパク質1；例えば推定貫膜GTPアーゼ、例えば膜補助因子タンパク質；例えばGLVR1；例えばMr110,000抗原；例えばシンデカン-1；例えば推定セブン貫膜ドメインタンパク質；例えばLCA-相同体/LARタンパク質；例えばM6抗原；例えばMe491/CD63抗原；例えばマルチスパン膜タンパク質；例えばDDR；例えば自己分泌型運動因子レセプター；例えばインスリンレセプター前駆体；例えばIGF1R、例えばイン

10

20

30

40

50

スリン様成長因子IIレセプター；例えばSAS；例えばTAPA-1；例えばMICB；例えばMHCクラスII HLA-DR7関連糖タンパク質鎖；例えばHLA-DP；例えば骨小プロテオグリカンIピグリカン；例えばCAR；例えばMEA11；例えばインターフェロン-レセプター鎖；例えば多量体免疫グロブリンレセプター；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター4型；例えば代謝調節型グルタミン酸レセプター8；例えばCLPTM1；例えばMAGE-4b；例えばMAGE5a；例えばMAGE-3；例えばMAGE-1；例えばMAGE6；例えばMAGE-9；例えばMAGE11；例えばCD24；例えばCD59；例えばCD44；例えば低密度リボタンパク質レセプター；例えば超低密度リボタンパク質レセプター；例えばN-CAM；例えばラミンBレセプター相同体TM7SF2；例えば推定T1/ST2レセプター結合タンパク質レセプター前駆体；例えばNTR2レセプター；例えばRAGE-4；例えばHLA-G1；例えばMOAT-C；例えば2カルシウムチャネルサブユニットイソ型I；例えばLFA-3；例えばL1-CAM；例えばAVPR2；例えばC1 p115 C1；例えばTE2；例えばRbP；例えばHCF1；例えばIRAK；例えばCD151；例えば表面抗原；例えばMAG；例えばGPR19；例えばpcta-1；例えばPRAME；例えばパソプレシン活性化カルシウム動員レセプター様タンパク質；例えばセロトニンレセプター5-HT4B；例えばセロトニン1Dレセプター（5-HT1D~）；例えばCD9；例えばLDLレセプター成員LR3；例えばDR6；例えば腫瘍壊死因子レセプター；例えばHG38；例えばウロキナーゼ型プラスミノゲンレセプター；例えばFGFレセプター；例えば神経成長因子レセプター；例えばシスチン/グルタミン酸輸送体；例えばCB1カンナビノイドレセプター（CNR1）；例えばPSG；例えばPSG13；例えばCPE-レセプター；例えばCRH2R；例えばOCI5；例えばTRAILレセプター2；例えばHNMP-1；例えば腎-2-アドレナリン作動性レセプター；例えばエリスロポエチンレセプター；例えばコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・パーシカンV1；例えばmGluR1、例えばCD97；例えばL6；例えばNY-ESO-1；例えばT細胞レセプター；例えばror1；例えばror2；例えばSSTR2；例えばVESPR；例えばIgG Fcレセプター；例えばグルタミン酸レセプターサブユニットGluRC；例えばHEK2；例えばPVR；例えばCEA；例えばCC-ケモカイン-結合レセプターJAB61；例えばHER2；例えばHER3、例えば上皮成長因子レセプター関連タンパク質に類似の仮想タンパク質FLJ22357；例えば推定エンドセリンレセプターB型様タンパク質；例えばGLVR2；例えばP2X4プリンレセプター；例えばFPRL1；例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドクリアランスレセプター；例えばガストリン/CCK-Bレセプター；例えばニューロメディンBレセプター；例えばGFRA3；例えばGRPR；例えばCDH1；例えばCDH2；例えばTGFB1；例えばTGFB2；例えばTGFB3；例えば上皮成長因子レセプターの前駆体である。

10

20

30

【0365】

より好ましくは、該細胞表面分子は、NCAM1、NPTXR、LRP8、CHRNA5、GRIA2、GRM8、ITGAV、ITGAE、TNFRSF12、L1CAM、GPR49およびTMEFF1からなる群から選ばれ得る。

【0366】

条件

前悪性および/または悪性の病気は、例えば癌であり得るか、または癌に発展し得る病気であり得る。本発明の範囲内の用語「癌」は、悪性腫瘍および良性腫瘍の両方、並びに白血病を包含する。

【0367】

癌は、例えば腺腫、癌腫または肉腫であり得る。癌は例えば、メラノーマ、脳腫、神経芽細胞腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、頸癌、子宮癌、卵巣癌、白血病、大腸癌、直腸癌、精巣の癌、腎臓の癌、肝臓の癌、唇の癌、舌の癌、胃の癌、皮膚癌、肉腫、中皮腫、膀胱癌、骨腫、悪性胸水、腹水、髄膜癌腫症、頭および首の癌、並びに内分泌気管（例えば、甲状腺、下垂体および副腎(suprarenal gland)）の癌からなる群から選ばれ得る。

40

【0368】

肺癌は例えば、小細胞肺癌（SCLC）および非小細胞肺癌（NSCLC）を含む群から選ばれる癌であり得る。好ましくは、該前悪性および/または悪性の病気は小細胞肺癌である。

【0369】

ある好ましい態様において、該前悪性および/または悪性の病気は乳癌である。

【0370】

50

別の好ましい態様において、該前悪性および／または悪性の病気は脳腫瘍である。脳腫瘍は例えば、グリア芽細胞腫、神経芽細胞腫、星細胞腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、髄芽腫、神経腫(neuronomas)、上皮細胞腫、頭蓋咽頭腫(cranio-pharyngiomas)、松果体腫、生殖細胞腫瘍およびシュワン細胞腫からなる群から選ばれ得る。

【0371】

投与および医薬組成物

処置を受ける個体はいずれかの動物であるが、しかしながら、好ましくは該個体はヒトである。

【0372】

本発明に記載の処置は軽減処置であり得て、該処置は治療処置であり得ておよび／または該処置は予防処置であり得る。 10

【0373】

本発明に記載の薬物運搬の主要な経路は、以下に記載する通り、静脈内、経口および皮下である。他の薬物投与方法(例えば、局所的な運搬)(これは、該薬物をターゲット部位に運搬したり、または該薬物を該血流中に導入するのに有効である)をも企図する。該化合物はまた、吸入によって、すなわち鼻腔内および経口吸入投与によって投与することができる。

【0374】

本発明の医薬組成物を投与する粘膜は、該生物学的に活性な物質を、例えば鼻、膣、眼、口、生殖器官、肺、胃腸管または直腸へ与える哺乳動物のいずれかの粘膜であり得る。 20

【0375】

本発明の化合物は好ましくは、非経口的に、すなわち静脈内、筋肉内、皮下、鼻腔内、直腸内、膣内または腹腔内投与によって投与することができる。非経口投与の皮下および筋肉内形態が通常好ましい。該投与のための適当な剤形は、通常の方法によって製造することができる。

【0376】

好ましくは、本発明に係わる該ターゲティング複合体は非経口的に投与し、より好ましくは該ターゲティング複合体は静脈内注射および／または皮下注射によって投与する。

【0377】

本発明に係わる化合物は、少なくとも1つのそれらの化合物と一緒に投与することができる。該化合物は、別々の製剤としてもしくは単位用量形態で組み合わせるかいずれかで投与するか、または連続的に投与することができる。 30

【0378】

該用量の所要量は、使用するある薬物組成物、投与の経路および処置する個体により変わる。理想的には、本発明によって処置する個体は、通常、薬物耐性が発生する前に要求されるよりも高くない、最大耐用量で該化合物の医薬的に有効な量を受ける。

【0379】

ターゲティング複合体の個々の用量は、処置する病気の性質および大きさ、剤形、投与の経路および部位、並びに処置する特定の患者によって決まり、そして該最適量は、通常の方法によって決定することができる。処置の最適コース、すなわち決めた日数あたりに与えられる該化合物またはその医薬的に許容し得る塩の投与の回数は、処置決定試験の通常のコースを用いて当該分野の当業者によって確かめることができることも、当該分野の当業者によって認められるであろう。 40

【0380】

本明細書において使用する用語「単位用量形態」とは、ヒトおよび動物の個体にとっての1回用量として適当な物理学的に別個な単位を意味し、ここで該各単位は医薬的に許容し得る希釈剤、担体またはビヒクルと合わせて所望する効果を与えるのに十分な量で算出された、予め決定した量の化合物を単独でまたは他の薬物と組み合わせて含有する。本発明の該単位用量形態についての規格(specification)は、使用するある化合物、および達成されるべき効果、並びに宿主中での各化合物について関連する薬力学に依存する。該投与 50

用量は、「有効量」または該個体の患者において「有効量」を達成するのに必要な量であるべきである。

【0381】

「有効レベル」は投与の好ましい終点として使用されるので、該実際の用量およびスケジュールは、薬物動態学、薬物分布および代謝における個体間の差に依存して、変わり得る。「有効レベル」は、例えば本発明に係わる1つ以上の化合物の濃度に対応する該個体中で所望される血中または組織中レベルと定義することができる。

【0382】

該本発明の化合物を含有する医薬組成物は、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, E. W. Martin編, Mack Publishing Company, 19版, Easton, Pa.に記載する通り、通常の方法によって製造することができる。該組成物は、通常の形態、例えばカプセル剤、錠剤、エアロゾル剤、液剤、懸濁剤または局所適用剤であらわすことができる。

10

【0383】

本発明に係わる化合物の医薬的に許容し得る塩はまた、本発明の範囲内にあるとみなされるべきである。医薬的に許容し得る塩は、標準的な方法で製造する。親化合物が塩基である場合には、そのものは適当な溶媒中、過剰量の有機または無機の酸を用いて処置する。親化合物が酸である場合には、そのものは適当な溶媒中、無機または有機の塩基を用いて処置する。

【0384】

本発明の化合物は、そのアルカリ金属塩またはそのアルカリ土類金属塩の形態で、医薬的に許容し得る担体または希釈剤と併用して、同時にまたは一緒に、特におよび好ましくはその医薬的組成物の形態で、経口、直腸または非経口（これは、皮下を含む）経路のいずれかによって有効な量で投与することができる。

20

【0385】

本発明の医薬組成物中での使用のための医薬的に許容し得る酸付加塩は、例えば鉱酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸および硫酸）、および有機酸（例えば、酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸、p-トルエンスルホン酸およびアリールスルホン酸）から誘導される塩を含む。

30

【0386】

本発明の化合物または塩は未加工の化学品として投与することが可能であるが、それらを医薬的な製剤の形態で与えることが好ましい。従って、本発明は更に医学的な利用のための医薬製剤を提供し、そのものは本明細書に定義する本発明の化合物またはその医薬的に許容し得る塩、および医薬的に許容し得る担体を含む。

【0387】

本発明の化合物は、広範囲の経口投与剤形で投与することができる。該医薬組成物および剤形は、活性成分として、本発明の化合物もしくはその医薬的に許容し得る塩、またはそれらの結晶形態を含む。該医薬的に許容し得る担体は、固体または液体のいずれかであり得る。固体形態の製剤としては、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、サッシェ、坐剤および分散可能な顆粒剤を含む。固体担体は、希釈剤、芳香剤、可溶化剤、滑沢剤、懸濁化剤、結合剤、保存剤、湿潤剤、錠剤崩壊剤、またはカプセル物質として作用することもできる物質の1つ以上であり得る。

40

【0388】

好ましくは、該組成物は本発明の化合物の約0.5重量%~75重量%であり、残りは適当な医薬的な賦形剤からなる。経口投与の場合には、該賦形剤としては例えば、医薬的なグレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石(talcum)、セルロース、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

【0389】

50

散剤の場合には、該担体はよく粉碎した活性成分との混合物である、よく粉碎した固体である。錠剤の場合には、該活性成分は適当な割合で必要な結合能力を有する担体と一緒に混合し、そして所望する形および大きさに成型する。該散剤および錠剤は好ましくは、該活性化合物の1～約70パーセントを含有する。適当な担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、ココアバターなどが挙げられる。用語「製剤」とは、該活性化合物と、担体としてのカプセル化物質（このものは、担体の存在または不存在での該活性成分が、担体によって囲まれたりまたは担体と結合しているカプセルを与える）との製剤を含むことを意図する。同様に、サッシェおよびトローチ剤を含む。経口投与に適当な固体形態として錠剤、散剤、カプセル剤、丸剤、サッシェおよびトローチ剤があり得る。

10

【0390】

本発明に係わる滴剤は、滅菌または非滅菌の水溶性または油性の水溶液または懸濁液を含み得て、そしてこのものは適当な水溶液中（このものは、場合により殺菌性および/または殺真菌性の薬剤、および/またはいずれかの他の適当な保存剤、および場合により界面活性剤を含む）に該活性成分を溶解させることによって製造することができる。次いで、得られた溶液をろ過によって透明にし、適当な容器に移し、次いでこのものを封し、そしてオートクレーブするか（autoclaving）または98～100℃で約1時間半維持することによって滅菌する。あるいは、該溶液をろ過によって滅菌し、そして該容器に無菌的に移すことができる。滴剤中に含有するのに適当な殺菌性および殺真菌性の薬剤は例えば、フェニル水銀硝酸または酢酸（0.002%）、バンズアルコニウムクロリド（0.01%）およびクロロヘキシジン酢酸（0.01%）が挙げられる。油状溶液の製剤のための適当な溶媒としては、グリセロール、希釈したアルコールおよびプロピレングリコールを含む。

20

【0391】

固体形態の製剤もまた含まれ、このものは使用する直前に経口投与のための液体形態製剤に変換されることを意図する。該液体形態としては、液剤、懸濁剤および乳剤を含む。これらの製剤は、活性成分に加えて、着色剤、芳香剤、安定化剤、緩衝化剤、人工および天然の甘味剤、分散剤、増粘剤（thickeners）、可溶化剤などを含むことができる。

【0392】

経口投与に適当な他の形態としては、液体形態の製剤を含む。このものは例えば、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、水性液剤、水性懸濁剤、練り歯磨き、ゲル歯磨き（dentrifrice）、チューイングガム、または固体製剤（このものは、使用する直前に液体製剤に変換することを意図する）を含む。乳剤は、プロピレングリコール溶液中の液剤として製造することができ、またはこのものは乳化剤（例えば、レシチン、モノオレイン酸ソルビタンまたはアカシア）を含み得る。水性液剤は、該活性成分を水中に溶解し、そして適当な着色剤、芳香剤、安定化剤および増粘剤を加えることによって製造することができる。水性懸濁剤は、よく粉碎した活性成分を粘性物質（例えば、天然または合成のガム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび他のよく知られる懸濁化剤）と一緒に水中に分散させることによって製造することができる。固体形態製剤としては例えば、液剤、懸濁剤および乳剤を含み、そしてこのものは該活性成分に加えて、着色剤、芳香剤、安定化剤、緩衝化剤、人工および天然の甘味剤、分散剤、増粘剤、可溶化剤などを含み得る。

30

40

【0393】

本発明の化合物は、非経口投与（例えば注射、例えばボラス注射または連続注入）のために製剤化することができ、そしてこのものはアンプル、予め充填したシリンジ、保存物質を加えた少容量の注入または複数回投与の容器での単位用量形態で提示することができる。該組成物は、例えば油性または水溶性のビヒクル中の懸濁剤、液剤または乳剤の形態、例えば水性ポリエチレングリコールの溶液をとることができる。油性または非水性の担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルとは例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリ

50

コール、植物油（例えば、オリーブ油）および注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）を含み、そしてこれらは処方用(formulatory)薬剤（例えば、保存剤、湿潤剤、乳化剤または懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤）を含むことができる。あるいは、該活性成分は散剤形態であり得て、このものは滅菌固体の無菌的単離によるか、または適当なビヒクル（例えば、滅菌パイロジェンなしの水）と一緒に使用する前の組成用溶液からの凍結乾燥によって、得ることができる。

【0394】

非経口用製剤において有用な油状物は、ワセリン、動物性油、植物性油または合成油を含む。該製剤において有用な油状物の具体例は、ピーナッツ油、大豆油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ油、ワセリンおよび鉱油を含む。非経口用製剤中の使用のための適当な脂肪酸は、オレイン酸、ステアリン酸およびイソステアリン酸を含む。オレイン酸エチルおよびミリスチル酸イソプロピルは、適当な脂肪酸エステルの例である。

10

【0395】

非経口用製剤中の使用のための適当な石鹼は、脂肪のアルカリ金属塩、アンモニウム塩およびトリエタノールアミン塩を含み、そして適当な洗浄剤は（a）カチオン性洗浄剤（例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライドおよびアルキルピリジニウムハライド）；（b）アニオン性洗浄剤（例えば、アルキル、アリアルおよびオレフィンのスルホン酸塩、アルキル、オレフィン、エーテルおよびモノグリセリドの硫酸塩およびスルホコハク酸塩）、（c）非イオン性洗浄剤（例えば、脂肪アミンオキシド、脂肪酸アルカノールアミドおよびポリオキシエチレンポリプロピレンの共重合体）、（d）両性洗浄剤（例えば、アルキル - ベータ - アミノプロピオン酸および2 - アルキル - イミダゾリン4級アンモニウム塩）、および（e）それらの混合物を含む。

20

【0396】

該非経口用製剤は典型的に、溶液中に約0.5～約25重量%の活性成分を含む。保存剤および緩衝剤を使用することができる。注射部位での刺激作用を最少としたりまたは除去するために、該組成物は約12～約17の親水性 - 親油性バランス(HLB)を有する非イオン性界面活性剤の1つ以上を含むことができる。該製剤における界面活性剤の量は典型的に、約5～約15重量%の範囲に及ぶ。適当な界面活性剤としては例えば、ポリエチレンソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ソルビタンモノオレイン酸）および疎水性塩基との高分子量のエチレンオキシド付加物（このものは、プロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合によって得られる）を含む。該非経口製剤は、単位用量または複数回用量の封した容器（例えば、アンプルおよびバイアル）で提示ことができ、そしてこのものは使用する直前に、滅菌液体賦形剤（例えば、注射用の水）の添加にだけ必要な凍結乾燥(freeze-dried)（凍結乾燥(lyophilized)）条件下で保存することができる。即席的(Ex tempore)注射溶液および懸濁液は、上記の種類の滅菌性の散剤、顆粒剤および錠剤から製造することができる。

30

【0397】

本発明の化合物はまた、局所的に運搬することができる。局所投与のための領域は皮膚表面および、膣、直腸、鼻、口および咽頭の粘膜組織をも含む。皮膚および粘膜を介する局所投与用組成物は、刺激作用の兆候（例えば、腫張または赤み）を引き起こしてはならない。

40

【0398】

該局所用組成物は、局所投与に適合した医薬的に許容し得る担体を含むことができる。従って、該組成物は例えば、懸濁剤、液剤、軟膏、ローション剤、性滑沢剤(sexual lubricant)、クリーム剤、発泡剤、エアロゾル剤、スプレー剤、坐剤、インプラント、吸入剤、錠剤、カプセル剤、乾燥散剤、シロップ剤、バalm(balm)またはトローチ剤の形態をとることができる。該組成物の製造法は、医薬産業においてよく知られる。

【0399】

本発明の化合物は、軟膏、クリーム剤もしくはローション剤としてまたは経皮パッチとして、上皮に局所投与するために製剤化することができる。本発明に係わるクリーム剤、軟

50

膏またはペースト剤は、外部適用のための活性成分の半固体製剤である。それらは、該活性成分をよく粉碎したりもしくは粉末にした形態で単独で、または水性もしくは非水性の液体中の溶液もしくは懸濁液中で脂肪性もしくは非脂肪性の塩基と一緒に、適当な機械類の助けで混合することによって製造することができる。該塩基は、炭化水素（例えば、固型パラフィン、軟パラフィンまたは流動パラフィン）、グリセロール、蜜蝋、金属石鹸）；粘液(mucilage)；天然油（例えば、アーモンド油、コーン油、ピーナッツ油、ゴマ油またはオリーブ油）、羊脂もしくはその誘導体または脂肪酸（例えば、ステアリン酸またはオレイン酸）を、アルコール（例えば、プロピレングリコールまたはマクロゴール(macro gel)）と一緒に含むことができる。該製剤は、いずれかの適当な界面活性剤（例えば、アニオン性、カチオン性、または非イオン性の界面活性剤（例えば、ソルビタンエステルまたはそのポリエチレン誘導体））を包含することができる。懸濁化剤（例えば、天然ガム、セルロース誘導体または無機物質（例えば、シリカ質(silicaceous)シリカ）および他の成分（例えば、ラノリン(lanolin)）をも含むことができる。

10

【0400】

本発明に係わるローション剤としては、皮膚または眼への適用に適当なものを含む。眼ローション剤は、場合により殺菌剤を含有する滅菌水性液剤を含み得て、そしてこのものは滴剤の製造法と同様な方法によって製造することができる。皮膚への適用のためのローション剤またはリニメント剤はまた、皮膚を乾燥するのを促進したりおよび冷却する薬物（例えば、アルコールまたはアセトンおよび/または湿潤剤(moisturiser)（例えば、グリセロール）または油（例えば、ヒマシ油またはピーナッツ油））を含み得る。

20

【0401】

本明細書に記載の医薬活性化合物は、経皮投与することができる。経皮投与は典型的に、患者の全身性循環への該薬物の経皮的な通過のための医薬薬剤の運搬を含む。該皮膚部位としては例えば、該薬物を経皮投与するための解剖学的な領域を含み、そしてこのものは例えば、前腕、腹部、胸部、背中、臀部、乳頭部位などを含む。

【0402】

経皮運搬は、該活性化合物の供給源を患者の皮膚に長時間曝露することによって達成される。経皮パッチは、医薬薬剤 - 化学的モディファイヤーの複合体の徐放性放出を与えるという更なる利点を有する。Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, HadgraftおよびGuy(編), Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, RobinsonおよびLee(編), Marcel Dekker Inc., (1987); 並びに、Transdermal Delivery of Drugs, Vols. 1-3, KydonieusおよびBerner(編), CRC Press, (1987)を参照。該剤形は、該医薬活性化合物を適当な媒質（例えば、腸溶性(elastomeric)マトリックス物質）中に溶解し、分散し、またはさもなければ取り込むことによって製造することができる。吸収エンハンサーはまた、該化合物が皮膚を通るフラックスを増大させるのに使用することができる。該フラックスの速度は、徐放性膜を与えるかまたはポリマーのマトリックスもしくはゲル中に該化合物を分散するかのいずれかによって、制御することができる。

30

【0403】

本発明の化合物は、坐剤として投与するために製剤化することができる。低融点ワックス（例えば、脂肪酸グリセリドまたはココアバターの混合物）は第1に融解し、そして該活性成分を例えば攪拌することによって均一に分散する。次いで、均一に溶解した混合物を、通常の大きさの型に注ぎ、冷却し、そして固化する。

40

【0404】

該活性化合物は坐剤に製剤化することができ、該坐剤は例えばポリエチレングリコール(PEG)（例えば、PEG 1000 [96%] およびPEG 4000 [4%]）中に処分された本発明の化合物の約0.5%～約50%を含有する。

【0405】

本発明の化合物は、膣投与のために製剤化することができる。該活性成分に加えて該担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、発砲剤またはスプ

50

レー剤は適当であると、当該分野において知られる。

【0406】

所望する場合には、製剤は該活性成分の持続放出性のまたは徐放性の投与に適当な腸溶性コーティングを用いて製剤化することができる。

【0407】

医薬組成物は通常、担体を含む。固体担体としては例えば、ラクトース、白陶土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などを含む。固体担体は、芳香剤、滑沢剤、可溶化剤、懸濁化剤、賦形剤(fillers)、グリダント(glidant)、圧縮剤、結合剤または錠剤崩壊剤としても作用し得る物質を1つ以上含み得て；そのものはまたカプセル化物質でもあり得る。散剤の場合には、該担体はよく粉砕した活性成分と一緒に混合した、よく粉砕した固体である。錠剤の場合には、該活性成分を必要な圧縮性質を有する担体と一緒に適当な割合で混合し、そして所望の形および大きさに成型する。該散剤および錠剤は好ましくは、99%までの該活性成分を含む。適当な固体担体としては例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、低融点ワックスおよびイオン交換樹脂を含む。

10

【0408】

例示的な液体担体としては例えば、シロップ、ピーナッツ油、オリーブ油、水などを含む。液体担体は、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤および加圧組成物を製造するのに使用する。該活性成分は、医薬的に許容し得る液体担体（例えば、水、有機溶媒、その両方の混合物）または医薬的に許容し得る油状物もしくは脂肪中に溶解したりまたは懸濁することができる。該液体担体は、他の適当な医薬的添加物（例えば、可溶化剤、乳化剤、緩衝化剤、保存剤、甘味剤、芳香剤、懸濁化剤、増粘剤、着色剤、粘性調節剤、安定化剤または浸透圧調節剤）を含むことができる。経口および非経口投与用の液体担体の適当な例としては、水（上記の添加物、例えばセルロース誘導体、好ましくはカルボキシセルロースナトリウム溶液を部分的に含有する）、アルコール（一価アルコールおよび多価アルコール、例えばグリコールを含む）およびそれらの誘導体、並びに油状物（例えば、分別した(fractionated)ココナッツ油およびピーナッツ油）を含む。非経口投与の場合には、該担体はまた油状エステル（例えば、オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピル）であり得る。滅菌液体担体は、非経口投与のための滅菌液体形態の組成物において有用である。加圧組成物のための液体担体は、ハロゲン化炭化水素または他の医薬的に許容し得るプロペラントであり得る。滅菌の溶液または懸濁液である液体医薬組成物は、例えば筋肉内、腹腔内、または皮下注射によって使用することができる。滅菌液剤はまた、静脈内投与することもできる。該化合物はまた、液体または固体の組成物形態のいずれかで経口投与することもできる。

20

30

【0409】

該担体または賦形剤は、当該分野で良く知られる時間遅延型(time delay)物質（例えば、グリセリルモノステアリン酸またはグリセリルジステアリン酸）をワックス、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルメタアクリル酸などと合わせて含み得る。経口投与のために製剤化する場合には、PHOSAL PG-50中の0.01%ツウィーン80(1,2-プロピレングリコールと合わせた、リン脂質濃縮物；A. Nattermann & Cie. GmbH)は他の化合物のための許容し得る経口製剤を与えるものとして認識されており、そしてこのものは本発明の様々な化合物のための製剤に適用することができる。

40

【0410】

組み合わせ療法

本発明に係わるターゲティング複合体は、1つ以上の第2処置（例えば、現在癌を処置するのに使用されている処置）と組み合わせ投与することができる。

【0411】

例えば、該第2処置は、外科的処置、化学療法、放射線療法、サイトカインを用いる療法

50

、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法およびレーザー光を用いる処置法からなる群から選ぶことができる。

【0412】

化学療法は、化学治療用薬物（例えば、静細胞剤(Cytostatica)）の投与を含む。本発明に関わる静細胞剤は、例えばカルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド、イフォスファミド(iphosphamide)、ヘキサメチルメラミン、ドキソルビシン、エピルビシン、エトピシド(VP-16)、テニポシド(VM-26)、ビンクリスチン、ビンデシン、タキサン、イリノテカン、チロシンキナーゼインヒビター、ニムスチン、ロムスチン(lomustine)、BCNU、ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、抗血管新生化合物、抗転移性化合物、5 - フルオロウラシル \pm ロイコボリン(leucovorin)、トポイソメラーゼインヒビター I および II、並びにテモゾラミド(Temozolamide)からなる群から選ぶことができる。

10

【0413】

加えて、化学療法は例えば、抗エストロゲン、抗プロゲステロン、抗アンドロゲン、LH - RH拮抗薬またはアロマターゼインヒビターの投与を含み得る。

【0414】

実施例

以下は、本発明の態様の例であって、このものは本発明を限定するものとしてみなすべきではない。

【0415】

実施例 1

20

【表 25】

小細胞肺癌 (SCLC) セルラインの培養

以下の小細胞肺癌セルラインを分析に使用した

セルライン	樹立細胞系	増殖: A= 接着 S= 懸濁	増殖培地
CPH 54A	University of Copenhagen, Denmark (Engelholm et al., 1986)	A	MEM (EAGLE) + 10% FCS
CPH 54B		A	MEM (EAGLE) + 10% FCS
GLC 2	Groningen Lung Cancer Centre, The Netherlands (de Leij et al., 1986; Berendsen et al., 1988, Bulte et al., 1993)	A (S)	RPMI + 10% FCS
GLC 3		S (A)	RPMI + 10% FCS
GLC 14		S	RPMI + 10% FCS
GLC 16		S	RPMI + 10% FCS
GLC 19		S	RPMI + 10% FCS
GLC 26		S	RPMI + 10% FCS
GLC 28		S	RPMI + 10% FCS
DMS 53	Dartmouth Medical School, NH, USA (Pettengill et al., 1980)	A	Waymouth + 10% FCS
DMS 79		S	RPMI + 10% FCS
DMS 92		A (S)	Waymouth + 10% FCS
DMS 114		A	Waymouth + 10% FCS
DMS 153		A	Waymouth + 10% FCS
DMS 273		A	Waymouth + 10% FCS
DMS 406		A (S)	Waymouth + 10% FCS
DMS 456		A (S)	Waymouth + 10% FCS
NCI H69	National Cancer Institute, MD, USA (Camey et al., 1985)	S	RPMI + 10% FCS
NCI N417		S	RPMI + 10% FCS
MAR H24	Philips University, Marburg, Germany (Bepler et al., 1987)	S	RPMI + 10% FCS
MAR 86 MI		S	RPMI + 10% FCS

10

20

30

【0416】

全ての細胞を、抗体のない培地中、加湿雰囲気下、5% CO₂ 中、37℃ で保ち、そして2週間継代する。全ての培地および血清をLife Technologiesから入手する。

【0417】

異種移植片

0.5 ~ 1.2 × 10⁷ 細胞を、12 ~ 13週齢のBalb/cヌードマウスの側方に両側で皮下的に播種する。該マウスに殺傷し、そして腫瘍の1つが最大直径1 cmに達した後に、該異種移植片腫瘍を収集する。壊死性の組織を除去する。セルラインCPH 136Aだけを、2 mm腫瘍ブロックの播種によってヌードマウス中で伝播する。RNA単離のための腫瘍は、直ぐに処理するか、または後者のRNA (Ambion製) 中に24時間保存し、続いて-70℃ で保存し、そして以下に記載する通り処理する。ウェスタンブロット分析用のライセートに使用する腫瘍は、以下に記載する通り直ぐに処理する。

40

【0418】

正常な組織由来のRNA

正常なヒト組織由来の全RNAを、Clontech社 (胎児脳、脳、肺、腎臓、心臓、気管、副腎、前立腺、唾液腺、甲状腺) またはAmbion社 (肺、肝臓、脳、脾臓、小腸、骨格筋、大

50

腸、胃、精巣)から入手する。1つだけの試料を2回(Clontech社およびAmbion社からの肺RNAの場合)、そして3回(Clontech社製の2個の異なるバッチおよびAmbion社製の1個の脳RNA)を分析する。胎児の脳を、胚性の神経内分泌組織についての基準として含める。

【0419】

セルライン由来のRNAの単離

半集密的な培養物由来の細胞を収集し(接着性細胞の場合にはトリプシン処理によって)、そして約 10^7 細胞を商業主の説明書に従ってRNeasyキット(Qiagen製)を用いて単離する。異種移植片腫瘍(新しいかまたは後者のRNAの場合には保存後に)を、トリゾール(Trizol)(Life Technologies製)および商業主の説明書に従って精製したRNA中でホモジナイズする。該トリゾール単離したRNAを、更にRNeasyキット(Qiagen製)を用いて精製する。

10

【0420】

RNAの濃度は、 260 nm (A_{260})での吸収によって見積もる。該RNAの整合性(integrity)は、 A_{260} / A_{280} の比率が1.9以上であることを測定することによって、また18S rRNAに対する28S rRNAの比率(これは、ホルムアルデヒド(変性)ゲル分析によって分析される)が約2であることを見積もることによって、立証する。

【0421】

cDNAの調製

70℃で10分間変性後に、全RNA($10\text{ }\mu\text{g}$)の H_2O ($10\text{ }\mu\text{L}$)を、 100 pmol T7-(dT)₂₄プライマー(HP LC精製した、5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG(T)₂₄(配列番号401); GENSETから入手)にハイブリダイズする。以下の反応は、Gibco BRL, Life Technologies社製の試薬を用いて行なう。第1鎖製造は、反応液($20\text{ }\mu\text{L}$)の第1鎖緩衝液(50 mM トリス-HCl(pH 8.3)、 75 mM KCl、 3 mM MgCl₂)、 10 mM DTT、 0.5 mM dNTPs(各々)中で、400U スーパースクリプト(SuperScript)RnaseH-逆転写酵素キットを用いて42℃で1時間、行なう。第2鎖製造は、反応液($150\text{ }\mu\text{L}$)の第2鎖緩衝液(20 mM トリス-HCl(pH 6.9)、 5 mM MgCl₂、 100 mM KCl、 0.15 mM -NAD⁺、 10 mM (NH₄)₂SO₄; これは、 0.26 mM dNTPs、 $0.07\text{ U}/\mu\text{L}$ E. coli DNAリガーゼ、 $0.27\text{ U}/\mu\text{L}$ E. coli DNAポリメラーゼ、 $0.013\text{ U}/\mu\text{L}$ E. coli Rnase Hを含有する)中、16℃で2時間インキュベートすることによって行なう。DNA末端は、 $0.07\text{ U}/\mu\text{L}$ T4 DNAポリメラーゼの添加によって満たし(fill out)、そして16℃で5分間インキュベートする。該反応は、EDTAの添加によって停止させて、最終濃度を $33\text{ }\mu\text{M}$ とする。該cDNAを、1倍容量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)(これは、 10 mM トリス-HCl(pH 8.0)、 1 mM EDTAを用いて飽和とする)を用いて抽出し、続いてペレットの視覚化のために 2.5 M NH₄Acの63%エタノール中でPellet Paint(Novagen製)を加えながら沈降させることによって、精製する。該ペレットを80%エタノールを用いて2回連続してすすいだ後に、該ペレットを風乾し、そして水($12\text{ }\mu\text{L}$)中に溶解する。アリコートのアガロースゲル電気泳動によって分析して、cDNAの長さが $0.1 \sim 10\text{ kb}$ の範囲であることを確認する。

20

30

40

【0422】

ビオチン標識cRNA(IVT-cRNA)の製造

ビオチン標識リボヌクレオチドを用いる、T7 RNAポリメラーゼを有するビオチン標識cRNA(相補RNA)を生成するインビトロ転写は、商業主の規格に従って、反応液($40\text{ }\mu\text{L}$)中でcDNA($6\text{ }\mu\text{L}$)(これは、約 $1\text{ }\mu\text{g}$ のcDNAを含むと見積もられる)を用いる、BioArray(登録商標)、High Yield(登録商標)RNA転写標識キット(Enzo Diagnostics, NY, USA)を用いて行なう。該ビオチン標識cRNAは、RNA標識(cleanup)法について商業主が明記する方法に従って、RNeasyスピンカラムキット(Qui

50

agen製)を用いて精製する。IVT-cRNAのアリコートを、変性アガロースゲル電気泳動によって分析して、全長転写物(0.1~>10kb)を確認する。該cRNAの濃度は、260nmでの吸収によって見積もり、そして該cDNA反応について最初に使用する全RNAの寄与について校正する。収量は、反応毎に25~100µgに及ぶ。

【0423】

IVT-cRNAのフラグメンテーション

IVT-cRNA(22µg)を、トリス-酢酸(pH8.1)、0.03M MgAc、0.1M KAcの反応液(20µL)中、94℃で35分間インキュベートすることによってフラグメンテーションする。該フラグメンテーションしたIVT-cRNAのアリコートを、アガロースゲル電気泳動によって分析して、大きさが30~200塩基のフラグメンテーションを確認する。 10

【0424】

Affymetrix GeneChip(登録商標)へのハイブリダイゼーションおよびデータ分析(CHIPs分析)

0.1M MES、0.75[Na⁺], 0.1mg/mLのヘリング(herring)精液DNA、0.1mg/mLのアセチル化BSA、0.05nMのピオチン化コントロールオリゴB2(5'-GTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGA(配列番号402))およびスパイク(spiking)のためのコントロールピオチン標識IVT-cRNA(これは、プラスミドpglks-bioB(150pM)、pglks-bioC(500pM)、pglks-bioD(2.5nM)およびpglks-cre(10nM)(アメリカンタイプカルチャーコレクション)から製造)を含有する、容量が400µL中のフラグメント化したIVT-cRNA(20µg)を含有するハイブリダイズ混合物。該コントロールオリゴおよびコントロールcRNAをAffymetrix社から入手する。100µLをAffymetrix試験用2CHIPにハイブリダイズし、続いてストレプトアジピン-フィコエリトリン接合体を用いて染色し、そしてピオチン化抗ストレプトアビジンヤギ抗体を用いて標識し、続いてストレプトアジピン-フィコエリトリン接合体を用いて最終的に染色するか(商業主プロトコールMini-euk1に従う)、あるいは300µLをAffymetrix U95A GeneChipにハイブリダイズし、そしてAffymetrix Fluidics station中、商業主プロトコールEukGE-WS2に従って染色し、そして共焦点レーザースキャナー(Hewlett Packard GeneArray Scanner G2500A)中、560nmでスキャンする。該デジタル化したイメージデータは第1に、該RNAの質の評価およびハイブリダイズのためにAffymetrix Microarray Suite(登録商標)version 4.0を用いて、並びに候補遺伝子の選択のためにAffymetrix Data Mining Tool(version 2.0)を用いて、処理する。表面分子の選択のために、該データをAffymetrix Microarray Suite(登録商標)version 5を用いて再分析する(結果を参照)。分析からのデータだけを使用する。ここで、コントロールオリゴBioB、BioC、BioDおよびCreは全て存在するものとして検出する。スケール化したノイズ(Q)は10よりも小さく;グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)およびベータ-アクチンの3'末端に対する5'末端のmRNAレベルの検出比は2以下であり;全てのプローブセットの少なくとも40%が存在するものと同定される。試料間の比較のために、全体の強度(global intensity)を100にセットする。 20 30 40

【0425】

RT-PCR

半定量的なRT-PCRを、Chips分析の確認のために選択した遺伝子について行なう。上記の通り製造したcDNAを、Chips分析に使用する以外の別個の調製物としてを除く、RT-PCRに使用する。該PCR反応を、添加緩衝液としての緩衝液(これは、該酵素に0.008%のクレゾール赤および12%スクロースを与える)内の反応液(25µL)(これは、200nM プライマー(DNA Technology A/S)、1.5mM MgCl₂、0.2mM 各dNTPs、0.1U/µL 白金Taqポリメラーゼ(Life Technologies)を有する)中の全RNA(350ng)由来のcDNAを用いて行なう。全ての反応は94℃で2分間行ない、1サイクルは;94℃で30秒間、各プライマーセットについて示す温度にアニーリングし、72℃で30秒間、25サイクルを30秒間、および最終 50

伸張段階を 7 2 で 1 0 分間とする。2 5 サイクルだけを用いて、該反応を半定量化する。

【 0 4 2 6 】

使用するプラマーセットは以下の通りである：

グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)

512 bp PCR産物スパニング (spanning) GenBank Acc. 番号 NM_002046 bp. 608-1119,

センス：5'-TCCATGCCATCACTGCCACCCA (配列番号 403)

アンチセンス：5'-TCTTGTGCTCTTGCTGGGGCTG (配列番号 404)、アニーリング温度：56 。
1 個の RT-PCR 反応を行なう。

【 0 4 2 7 】

10

P r o 3 0 (KIAA0042)

432 bp PCR産物スパニング GenBank Acc. 番号 D26361 bp. 5181-5612,

センス：5'-GTTTTGAATCTGAAGAAAGCCC (配列番号 405)

アンチセンス：5'-TCAAACCTCTGACCTTGATCT (配列番号 406)、アニーリング温度：49 。
2 個の別個の RT-PCR 反応を行なう。

【 0 4 2 8 】

P r o 4 1 (MAD2)

525 bp PCR産物スパニング GenBank Acc. 番号 AJ000186 bp. 643-1167,

センス：5'-GTAAATAGCATGGTGGCCTACA (配列番号 407)

アンチセンス：5'-GGTCCAAAGGAGCTATACAGCA (配列番号 408)、アニーリング温度：45 。 20
2 個の別個の RT-PCR 反応を行なう。

【 0 4 2 9 】

P r o 2 2 1 (インスリノーマ関連抗原、IA-1)

532bp PCR産物スパニング GenBank Acc. 番号 M93119 bp. 1549-2080,

センス：5'-GTGTTCCCTGCAAGTACTGCCC (配列番号 409)

アンチセンス：5'-CAGAGATTGGTAGGCGAGGCGA (配列番号 410)、アニーリング温度：52 。
2 個の別個の RT-PCR 反応を行なう。

【 0 4 3 0 】

P r o 2 1 0 (ラミン B1)

439bp PCR産物スパニング GenBank Acc. 番号 L37747 bp. 424-862,

30

センス：5'-ACTGTGTACTGTTCGGAAGGG (配列番号 411)

アンチセンス：5'-TAGAGAAACCCTTCCCTCCC (配列番号 412)、アニーリング温度：46 。
1 個だけの RT-PCR 反応を行なう。RT-PCR は、精巣については行なわない。

【 0 4 3 1 】

P r o 7 1 (p16INK4/MTS 1, CDKN2A)

437bp PCR産物スパニング GenBank Acc. 番号 U26727 bp. 176-612,

センス：5'-TGAGGAGCCAGCGTCTAGGG (配列番号 413)

アンチセンス：5'-GTGGCCCTGTAGGACCTTCG (配列番号 414)、アニーリング温度：57 。
1 個だけの RT-PCR 反応を行なう。RT-PCR は、精巣については行なわない。

【 0 4 3 2 】

40

D R 6 (TNFRS12、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー成員 21)

559bp PCR産物スパニング GenBank Acc. 番号 AF068868 bp. 1081-1639,

センス：5'-GTGCTTGTGGTGATTGTGGTGTG (配列番号 415)

アンチセンス：5'-TGTTCTTGTCTGTGGGGAAGG (配列番号 416)、アニーリング温度：56 。
2 個の別個の RT-PCR 反応を行なう。

【 0 4 3 3 】

N C A M 1 (ニューロン細胞接着性分子)

456 bp PCR産物スパニング GenBank Acc. 番号 hsu63041 bp. 2045-2500,

センス 5'-TATGAGGTCTACGTGGTGGC (配列番号 417)

アンチセンス：5'-CTCCTGGCACTCTGGCTTTG (配列番号 418)、アニーリング温度：53 。 50

1 個だけの RT-PCR 反応を行なう。RT-PCR は、精巢については行なわない。

【 0 4 3 4 】

N P T X R (ニューロンペントラキシンレセプター)

482 bp PCR 産物 スパニング GenBank Acc. 番号 HS327J16 bp. 46012-46493,

センス : 5'-CACACGCACACATGTTGCAGC (配列番号 419)

アンチセンス 5'-GCTCTGAGAGGCCAAAGCC (配列番号 420)、アニーリング温度 : 55 。

1 個だけの RT-PCR 反応を行なう。RT-PCR は、精巢については行なわない。

【 0 4 3 5 】

G L U R 2 (イオンチャネル型グルタミン酸レセプター 2 ; GRIA2)

522bp PCR 産物 スパニング GenBank Acc. 番号 L20814 bp. 2449-2970,

センス : 5'-AGGAACCCAGTAAATCTTGACG (配列番号 421)

アンチセンス : 5'-TCAGTCACACTGACATTTCATTCCC (配列番号 422)、アニーリング温度 : 51

。

1 個だけの RT-PCR 反応を行なう。RT-PCR は、精巢については行なわない。

【 0 4 3 6 】

I T G A V (インテグリンアルファ V サブユニット)

533bp PCR 産物 スパニング GenBank Acc. 番号 M14648 bp. 3867-4399,

センス : 5'-AATTTTAGGTCAAATCCTTCAAGCCAAC (配列番号 423)

アンチセンス : 5'-TGACAGCCGAGACTGATTTTACACATTA (配列番号 424)、アニーリング温度 :

50 。

1 個だけの RT-PCR 反応を行なう。RT-PCR は、精巢については行なわない。

【 0 4 3 7 】

L R P 8 (リポタンパク質 E レセプター 2)

459bp PCR 産物 スパニング GenBank Acc. 番号 HSZ75190 bp. 2016-2474,

センス ; 5'-GCTCCATATAGGGAGAACTGCTCAG (配列番号 425)

アンチセンス : 5'-CCCCAGCAACCAAACATCTTCT (配列番号 426)、アニーリング温度 : 50 。

1 個だけの RT-PCR 反応を行なう。RT-PCR は、精巢については行なわない。

【 0 4 3 8 】

ウェスタンブロット法

タンパク質試料

ホールセルライセートを、選択した遺伝子のタンパク質発現の確認のために、セルラインおよび異種移植片から抽出する。該ライセートは、ラバーポリースマン (rubber policeman) (接着性細胞について) を用いて擦過 (scraping) し、そして氷冷 20 mM トリス - Cl (pH 7.5) 中で洗浄することによって、半集密培養物から調製する。該細胞ペレットを、氷冷 20 mM トリス - Cl (pH 7.5)、2 % トリトン X - 100 (これは、1 : 100 に希釈したプロテアーゼインヒビターカクテルセット II および III (Calbiochem 製) を含有する) 中に溶解する。渦巻いた後に、該ライセートを 4 で 5 分間、遠心分離 (15,000 × g) することによって清澄とする。異種移植片腫瘍由来のライセートを該腫瘍の収集後直ぐに調製し、そして成体ラットの脳由来のライセートを同様な方法で処理する。該腫瘍を秤量し、そして 5 倍容量 (重量比) の氷冷 20 mM トリス - Cl (pH 7.5)、2 % トリトン X - 100 (これは、1 : 100 に希釈したプロテアーゼインヒビターカクテルセット II および III (Calbiochem 製) を含有する) 中にホモジナイズした Heindolph DIAX 900 を用いてホモジナイズし、4 で 5 分間遠心分離 (15,000 × g) することによって清澄とする。該ライセートのタンパク質濃度を、商業主によって推奨されている通り、BCA Protein Assay (Pierce 製) を用いて測定する。

【 0 4 3 9 】

Jurkat (Santa Cruz 製) および A431 (Neomarkers 製) の商業的な細胞ライセートを、いくつかのウェスタンブロット法における正 (positive) コントロールとして使用する。

【 0 4 4 0 】

S D S - P A G E およびブロッティング

10

20

30

40

50

5 ~ 15 μ g のライセートを、還元剤 (NuPAGE) と一緒に L D S 試料緩衝液中の各レーン毎に添加し、そして 3 ~ 8 % のトリス酢酸 S D S ゲル上で分離し、トリス - 酢酸 S D S ランニング緩衝液 (NuPAGE) 中で 1 時間、150 V で操作し、このものを PVDF LC 2002 (Novex 製) 膜の移動緩衝液 (NuPAGE) に移す。タンパク質サイズマーカーは、ProSieve カラータンパク質マーカーである。抗 - NCAM1 を用いてプローブするために、該ライセートを 40 ng / μ L 組み換え EndoN-HIS (E. Bock から寄贈) を用いて 37 °C で 5 分間前処理して、ポリシアル化 (polysialylation) を除去する。

【0441】

該膜を、洗浄緩衝液 (10 mM トリス - Cl pH 7.5、100 mM NaCl、0.1 % ツウィーン 20) (これは、5 % 低脂肪乳を含有する) 中、室温で 60 分間 (インテグリン E に対する抗体 (CD103) について)、ブロックする。ITGAE の場合には、トリス - Cl 緩衝液 (pH 10.2) は、全てのインキュベーションおよび洗浄の操作に使用する。該プロットを、以下に記載するブロック緩衝液中の一次抗体および二次抗体、並びに商業主によって推奨される NBT/BCIP 錠剤 (Roche 製) を用いて ECL (Amersham 製) またはアルカリ性ホスファターゼによって視覚化した結合抗体と一緒に、インキュベートする。

【0442】

NCAM1 (ニューロン細胞接着性分子)

一次抗体：マウスモノクローナル抗 - NCAM1 クローン 123C3 (Santa Cruz 製) (このものは 1 : 100 に希釈し、4 °C で 16 時間インキュベートする)。二次抗体：アルカリ性ホスファターゼ接合ラビット抗 - マウス Ig (DAKO 製) (このものは、1 : 500 に希釈し、室温で 1 時間インキュベートする)。アルカリ性ホスファターゼによって現像 (development) する。

【0443】

Glur2 (イオンチャネル型グルタミン酸レセプター 2)

一次抗体：マウスモノクローナル抗 GluR2 および 4 (クローン 3A11) (Pharmingen 製) (このものは、1 : 500 に希釈し、4 °C で 16 時間インキュベートする)。二次抗体：アルカリ性ホスファターゼラビット抗マウス Ig (DAKO 製) (このものは、1 : 500 に希釈し、室温で 1 時間インキュベートする。アルカリホスファターゼによって現像する。

【0444】

GRM8 (Glur8 (代謝調節型グルタミン酸レセプター 8))

一次抗体：ラビットポリクローナル抗 - mGluR8 (Upstate Biotechnology, TriChem 製) (このものは、1 : 500 に希釈し、4 °C で 16 時間インキュベートする)。二次抗体：ホースラディッシュペルオキシダーゼブタ (swine) 抗ラビット Ig (DAKO 製) (このものは、1 : 1000 に希釈し、室温で 1 時間インキュベートする。ECL によって現像する。

【0445】

NPTXR (ニューロンペントラキシンレセプター)

一次抗体：ヤギポリクローナル抗 NPTXR (C-17) (Santa Cruz 製) (このものは、1 : 500 に希釈し、4 °C で 16 時間インキュベートする)。二次抗体：ホースラディッシュペルオキシダーゼラビット抗ヤギ Ig (DAKO 製) (このものは、1 : 1000 に希釈し、室温で 1 時間インキュベートする。ECL によって現像する。

【0446】

ITGAE (インテグリンアルファ E サブユニット)

一次抗体：ヤギポリクローナル抗インテグリン E (N-19) (Santa Cruz 製) (このものは、1 : 1000 に希釈し、4 °C で 16 時間インキュベートする)。二次抗体：アルカリ性ホスファターゼラビット抗ヤギ Ig (sc-2771) (Santa Cruz 製) (このものは、1 : 500 に希釈し、室温で 1 時間インキュベートする)。アルカリ性ホスファターゼによって現像する。

【0447】

得られた ChIPs 分析データのクラスター分析

10

20

30

40

50

分析した正常な組織および小細胞肺癌セルラインの間に見られる発現パターンの変化を解釈するために、我々はSOMs（自己組織化マップ(self-organising maps)）および階層的クラスタリングの両方の利点を採用する。これらは、発現パターンにおける類似度に基づいて、遺伝子群に継続的に使用する。該分析に使用する遺伝子は、50以上の平均的な差違を有し、そして該試料のいずれか1つに存在すると採点する。

【0448】

SOMs

自己組織化マップ(SOMs)は、k-平均値クラスタリングにいくらか関連するクラスター分析の方法である。SOMアルゴリズムの陰の基本的な原理は、ニューロンのウェイトベクトルであり、このものは最初にランダムに初期化し、反復性のデータ入力の際に初期の測定ベクトルの数を示す(Toronenらによる1999)。該算出において以下のパラメータを使用した：遺伝子：Xdimは1；Ydimは10；Iterationsは100000；試料：Xdimは1；Ydimは10；Iterationsは20000。

10

【0449】

階層的クラスタリング

階層的クラスタリングの下にある基本的な原理は、樹(tree)中へ細目の組(遺伝子またはアレイ)を集合させることであり、ここでその細目は互いに非常に似ている場合には比重に短い枝(branch)によって接合し(join)し、そしてそれらの類似性が減少するにつれて徐々に長い枝によって接合する。SOMクラスタリングからの出力ファイルは、階層的クラスタリングのために使用し、このものはSOMクラスタリングによるオーダリング(odering)が階層的樹におけるノードのフリッピング(flipping)を導くのに使用されることを意味する(Eisenらによる1998)。該算出において、以下のパラメータを使用した。遺伝子の場合：クラスターはイエス、算出ウェイトはイエス、類似マトリックスは非中心の相関(correlation uncentered)；試料の場合：クラスターはイエス、算出ウェイトはイエス、類似マトリックスは非中心の相関。引き続いて、平均的な結合(linkage)クラスター分析を行なった。

20

【0450】

クラスタリング分析の結果

X-軸(試料)のクラスタリング(図2)は予想した通り、SCLCセルラインが最も離れている部分のMar86MIおよびCPH54Aと、クラスタリングすることを示す。GLC14、GLC16およびGLC19(これらは、同じ患者から誘導化する)が示す通り、CPH54AおよびBは非常に近くクラスタリングする(ここで、BはAのクローン変異体である)。脳RNA(CLONTECH製)および脳RNA(Ambion製)との2個の異なるバッチが示す通り、肺RNA(Ambion製)および肺RNA(CLONTECH製)からの正常な組織の発現は、非常に近くクラスタリングする。胎児脳から得る発現は、成熟脳と同様に近くクラスタリングされ、そしてこのものはSCLCセルラインに対する全ての正常な組織の最も近いものである。このことにより、SCLCラインが神経内分泌起源のものであることを確認する。Y-軸(遺伝子)のクラスタリングは、SCLCセルライン中でのより高い発現を有する4個の非常に異なる遺伝子のクラスターであることが明白に分かる。最も小さいものは19個の遺伝子を、第2番目および3番目のものは各々65個の遺伝子を、そして第4番目でかつ最も大きな遺伝子クラスターは268個の遺伝子を含む。

30

40

【0451】

候補プロモーター(第1核酸配列)についての選択基準

該候補プロモーターを、プロモーターが制御している遺伝子の発現レベルに基づいて選択する。該選択は、異種移植片以外の全ての21個のSCLCセルライン、および7個の正常な組織(脳、副腎、肺、腎臓、心臓、前立腺、脾臓)について行なう。

【0452】

選択は、いくつかの基準に基づく。絶対的必要性をもって存在する(P)と採点され、且つ>50の平均差違を有する、遺伝子だけを含める。これらの出力データは、マイクロソフトエクセル2000において更に処理する。21個のSCLCラインの内の少なくとも11

50

個が存在すると採点する遺伝子を選択し、そして該遺伝子が1つ以上の正常な組織中に存在すると採点する場合には、SCLCセルラインの平均差違値の中央値(the median Average difference value)は、正常な組織の平均差違値の中央値の4倍以上でなければいけない。より正常な組織からのRNAを用いて第2のスクリーニング後に、該選択した候補物を上記と同じ基準に従わせ、そしてそれらが上記の要件を満たさないならば廃棄する。

【0453】

RT-PCRによるChips分析の確認

選択した遺伝子は、Chips分析によって同定された発現の立証のために、半-定量的RT-PCRによって分析する。該cDNAの質は、GADPH(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)についてのプライマーを用いて試験する(図2)。全てのcDNA試料は非常に陽性であって、このことは更なる分析のためのcDNAの質が良好であることを示す。

10

【0454】

Pro 221としてのプライマー(IA-1、インスリノーマ関連抗原1)を用いるRT-PCR(図3)は、正常な組織である副腎、脳、および胎児脳がChipsおよびRT-PCRの両方の分析において弱い陽性であることを示す。4個のSCLCラインまたは異種移植片は、両方の分析において陰性である。他の全ては弱から非常に強い陽性である。該RT-PCRおよびChips分析は、非常によく相関する。

【0455】

Pro 30としてのプライマー(KIA0042)を用いるRT-PCR(図4)は、正常な組織精巢においてChipsおよびRT-PCRの両方について陽性であることを示す。他の正常な組織は、両方の分析法によって低いかまたは陰性である。全てのSCLC細胞および異種移植片は、ChipsおよびRT-PCR分析の両方において陽性である。ChipsおよびRT-PCRにおける相対的な量が相関しない(例えば、ある分析では高く、他の分析においては低い)いくつかの試料が存在する。

20

【0456】

Pro 41としてのプライマー(MAD2)を用いるRT-PCR(図5)は、Chips分析およびRT-PCRの両方によって測定される通り、ほとんどの正常な組織中では低い発現を、および精巢中では高い発現を示す。全てのSCLCセルラインおよび異種移植片は、ChipsおよびRT-PCR分析の両方によって非常に高い発現を示す。

30

【0457】

Pro 210としてのプライマー(ラミンB1)を用いるRT-PCR(図6)は、正常な組織中では非常に低いかまたはなしの発現を示す(両方アッセイについて、大腸は陽性である)。全てのSCLCおよび異種移植片は、Chips分析によって高い発現を有し、そして2個以外は全て、RT-PCRによって非常に陽性である。RT-PCR値は、Chipsシグナルと一致するように任意に選択する。

【0458】

Pro 71としてのプライマー(CDKN2A)を用いるRT-PCR(図7)は、正常な組織中では非常に低いかまたはなしの発現を示し、そして4個のSCLC以外全てにおいて高い発現を示す。1個の試料はRT-PCRにおいては陰性であり、そしてChips分析においては陽性であることを除いて、該RT-PCRおよびChipsデータは非常によく相関する。

40

【0459】

RT-PCRによるChips分析の立証に関する結論

該ChipsデータおよびRT-PCRデータは、非常によく相関する。Chips分析によって観察されるほとんどの正常な組織中での低から無しの発現は、半定量的なRT-PCR反応によって確認する。該選択遺伝子のSCLCセルラインおよび異種移植片中での発現は、全てまたはほとんどのセルライン中で非常に高い。従って、高く且つ特異的な発現を有するプロモーターの同定のためのChips分析の使用は、利用可能な方法である。

【0460】

Chips分析によって同定された候補細胞表面分子についての選択基準

50

候補細胞表面分子の第1の産生 (generation) は、いくつかの基準に基づいて選択する。該選択は、異種移植片以外の全ての21個のSCLCセルラインについて、および7個の正常な組織 (脳、副腎、肺、腎臓、心臓、前立腺、膵臓) について実施する。絶対的必要性をもって存在する (P) と採点され、且つ > 50 の平均差違を有する、遺伝子だけを含める。これらの出力データは、マイクロソフトエクセル2000において更に処理する。各セルラインまたは組織についての遺伝子を、1点として採点する。各遺伝子についての全採点を、正常な組織およびSCLCセルラインについてそれぞれまとめる。21個のSCLCラインの内の少なくとも5個に存在すると採点した遺伝子を、選択する。以下の用語: 「レセプター、膜、接着、インテグリン、表面、抗原、シンデカン、輸送、チャンネル、ホルモン、結合、糖タンパク質、マトリックス、CAM、デスモソーム、ギャップ接合部、デルタ、免疫グロブリン、MHC、CD、(HSPG、CSPG、完全 (integral)、ノッチ)」の1つを遺伝子名称中に含む場合に、選択したこれら遺伝子および候補遺伝子について研究を行なう。該タンパク質の機能および細胞局在化は、データベースサーチ (NCBI: Nucleotide, Protein, Nucleotide, OMIM, PubMed, LocusLink) にばらばらに基づく。次いで、最も良い候補遺伝子を、機能、細胞局在化および発現についての採点 (すなわち、正常な組織の場合よりもSCLCの場合により高い「発現採点」) を重要視したこれらの情報に基づいて選択する。更に、異なる正常な組織中での発現は、理論的な副作用を見積もるために、特異的な組織に従って評価する。第2の選択は、21個のSCLCセルライン、異種移植片として増殖するセルラインの内の8個、および17個の正常な組織 (脳、肺、腎臓、心臓、気管、副腎、前立腺、唾液腺、甲状腺、肝臓、膵臓、脾臓、小腸、骨格筋、大腸、胃、精巣) からのRNAについて、Affymetrix Microarray Suite (登録商標) version 5を用いて行なう。絶対的必要性をもって存在する (P) と採点され、且つ少なくとも6個のSCLCセルラインまたは異種移植片において > 20 の平均差違を有する、発現された遺伝子だけを含める。更なる選択は、上記の通り行なう。

10

20

30

40

50

【0461】

RT-PCRによるChips分析の立証

選択した遺伝子は、Chips分析によって同定された発現の立証のために、半-定量的RT-PCRによって分析する。DR6としてのプライマー (TNFR関連死レセプター6) を用いるRT-PCR (図8) は、ほとんどの正常な組織中で中位の発現を、およびSCLCラインまたは異種移植片を除く全てにおいて中位から高い発現を示す。Chips分析は、2個の正常な組織中で高い発現を、および8個のSCLCラインまたは異種移植片中で高い発現を示す。Chips分析による全ての陽性はまた、RT-PCRにおいて陽性である。

【0462】

LRP8としてのプライマー (アポリポタンパク質Eレセプター2) を用いるRT-PCR (図9) は、6個の正常な組織中で低い発現を示し、そして全てのSCLCラインおよび異種移植片中の高い発現がRT-PCRによって陽性である。Chips分析における全ての陽性はまた、RT-PCRにおいて陽性である。RT-PCR値は、Chipsシグナルに一致するように任意に選択する。

【0463】

NTPXRとしてのプライマー (ニューロンペントラキシンレセプター) を用いるRT-PCR (図10) は、Chips分析による全ての陽性はまたRT-PCRによっても陽性であることを示す。RT-PCRによって測定される通り陽性発現を有する、より多くの組織およびSCLCが存在するが、発現はSCLCにおいて平均的に高い。2個のSCLC試料は陰性である、RT-PCR値は、Chipsシグナルと一致するように任意に選択する。

【0464】

NCAM1としてのプライマー (ニューロン細胞接着性分子) を用いるRT-PCR (図11) は、Chips分析による陽性の全ての試料がまたRT-PCRによっても陽性であることを示す。7個の組織および1個のSCLCを除く全てがRT-PCRだけによって陽性である。1つのSCLCセルラインは、RT-PCRおよびChips分析の両方において陽性である。RT-PCR値は、Chipsシグナルと一致するように任意に選択する。

【0465】

GluR2としてのプライマー（イオンチャネル型グルタミン酸レセプター2）を用いるRT-PCR（図12A）は、Chips分析による全ての試料がまたRT-PCRによっても陽性であることを示す。両方の分析は、脳において非常に高い発現を示し、そしてRT-PCRは副腎において低い発現を示す。4個のSCLCセルラインは、RT-PCRおよびChips分析の両方において陰性である。RT-PCR値は、Chipsシグナルと一致するように任意に選択する。

【0466】

ITGAVとしてのプライマー（インテグリン α サブユニット）を用いるRT-PCR（図12B）は、5個の試料がChips分析において陽性であるが、RT-PCRによって陰性である。他の点では、Chips分析およびRT-PCR分析の間には良い相関がある。SCLCにおいて、しかし多数の組織においてもまた、高い発現がある。

10

【0467】

RT-PCR値は、Chipsシグナルと一致するように任意に選択する。

【0468】

RT-PCRによる表面分子の発現のChips分析の立証についての結論

ITGAVを除いて、Chips分析によって発現するものとして同定される全ての遺伝子はまた、RT-PCRによって分析時に発現することが分かった。より多数の試料が、RT-PCRによって測定時に、陽性である。SCLCセルラインおよび異種移植片中での選択した遺伝子の発現は、多数のセルラインにおいて高い。従って、SCLCによって発現される表面分子についてのmRNAの同定のためのChips分析の使用は、利用可能な方法である。

【0469】

20

ウェスタンブロットングによるChips分析の立証

選択した遺伝子産物の発現は、Chips分析によって同定されたmRNAの発現の比較のために、特異的な抗体を用いるウェスタンブロットングによって分析する。ウェスタンブロット分析は、SCLCセルラインおよび異種移植片についてのみ行なう。mGluR8（代謝調節型グルタミン酸レセプター8）に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析（図13）は、全てのSCLCセルラインおよび異種移植片中でmGluR8タンパク質の発現を示し、一方でChips分析だけが8個の試料において発現を検出する。ウェスタンブロットの強度は、Chips値と相関しないが、しかしmGluR8の発現を明白に示す。ラット脳のホモジネートは、陽性コントロールとして使用する。

【0470】

30

NPTXR（ニューロンペントキシンレセプター）に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析（図14）は、Chips分析による発現を有するものと同定された全てのSCLC試料中のタンパク質発現を示す。GLC 28を除いて全ての試料は、弱から強い陽性である。DMS 153は、ラットの脳にも存在する顕著な高分子量のバンドを有し、このものは未プロセッシングまたは二量化のレセプターであり得る。該タンパク質の量は、Chipsデータと直接には相関しないが、しかしほとんどのSCLC中では明白な発現を示す。ラットの脳のホモジネートを、陽性コントロールとして使用する。

【0471】

NCAM1（ニューロン細胞接着性分子）に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析（図15）は、全てのSCLCセルラインおよび異種移植片によるNCAM1の2個のイソ型の発現を示すが、一方でChips分析は14個の試料中での発現を同定する。Chips分析によって陽性である全ての試料は、ウェスタンブロットングによって陽性である。

40

【0472】

Chips分析およびウェスタンブロットングにおける相対的な量の間には全く明らかな相関はない。

【0473】

GluR2（イオンチャネル型グルタミン酸レセプター2）に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析（図16）は、9個の試料中での発現を示す。6個の試料は、Chips分析によって陽性であるが、ウェスタンブロットングによって陰性である。しかしながら、抗体の感受性は、高くない。他の陽性の試料は、Chips分析とよく相関する。ITGAE（インテグ

50

リン Eサブユニット) に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析(図17)は、ほとんどのSCLC試料中での発現を示す。1試料は、Chips分析において陽性であって、ウェスタンブロッティングによっては陰性である。Chips分析およびウェスタンブロッティングの間の発現の相対的な強度は、多数の試料について相関しない。A431細胞ライセートは、陽性コントロールとして使用する。

【0474】

表面分子におけるChips分析のウェスタンブロット立証の確認

選択した表面分子について、Chips分析によって発現するものと同定された全ての遺伝子はまた、ウェスタンブロッティングによって発現するものと同定され、このことはChips分析によって測定される遺伝子発現がタンパク質合成に反映されることを示す。いくつかの遺伝子について、ウェスタンブロッティングにより、Chips分析よりもより多くの試料中での発現が発現される。従って、該Chips分析は、SCLCによって発現される表面分子を同定するための利用可能な方法である。

【0475】

実施例2

RT-PCRによって同定されるSCLCセルラインによって発現する表面分子

他の発現される細胞表面分子は、RT-PCRの方法によって同定する。上記例のセルラインの内の21個全てから、商業主の規格に従って、QuickPrep(商標)mRNA Purification Kit(Pharmacia製)を用いて、mRNAを調製する。29個の異なる組織由来のmRNAまたは全RNAは、CLONTECH社から得る。該RNAは、以下の組織から得る：全脳、脊髄、小腸、腎臓、心臓、肺、精巣、網膜、膀胱、胃、子宮、肝臓、脾臓、白血球、脂肪細胞、下垂体、卵巣、乳腺、前立腺、気管、胸腺、副腎、大腸、膵臓、唾液腺、骨髄、甲状腺、リンパ節および骨格筋。

【0476】

一本鎖cDNA合成は、オリゴ-(dT)₁₅プライマーを用いる商業主の指示に従って、RT-PCR用の第1鎖cDNA合成キット(Boehringer Mannheim製)を用いて実施する。

【0477】

続く、鋳型として該cDNAを用いるPCRは、10mM トリス-C1(pH 8.3)、50mM KCl、1mM MgCl₂、0.8mM dNTPs、0.4μM プライマーおよび0.12U/μL サームプライム(Thermoprime)プラスDNAポリメラーゼ(Advanced Biotechnologies製)中に行ない、95で30秒間、62で30秒間および72で1分間を35または40サイクルの増幅を行なう。GADPHプライマーを用いる対照反応は、全てのcDNAについて実施する。該PCR産物は、アガロースゲル電気泳動によって分析する。分析する遺伝子産物、GenBankデータベース内のヌクレオチド配列におけるそれらの位置と合わせたプライマー配列、セルラインまたは組織のパーセント(このものは、対応する遺伝子からのmRNAについて陽性である)を以下に示す。

【表26】

分子	受託番号	プライマー配列	位置	% RT-PCR 陽性	
				正常組織	SLCL ライン
心房性 ナトリウム 利尿 ペプチド クリアランス レセプター	AF025998	5'- AGCGGAACTGCTACTTC ACC (配列番号427)	629-648	95.5 %	95.5 %
		5'- TAGTCTCCACTGGTCAT GCC (配列番号428)	851-832		
ガストリン /CCK-B レセプター	XM_006034	5'-GTGCGA- ATGTTGCTGGTGATCG (配列番号429)	994-1015	100 % [#]	100 %
		5'-ACGGTGCATGAAGCAG TAGACC (配列番号430)	1185-1164		
ニューロ メディンB レセプター	M73482	5'AGATGGAAACACGGAA ACGCCTGG (配列番号431)	909-932	96.5 %	95.2 %
		5'-GGCTGTTGAA- GGCTGTTGAA- ATGCCTCCTGAAGC (配列番号432)	1151-1128		

10

20

30

【表 2 7】

グリアセル ライン誘導 向神経性 因子 α レセプター	NM_001496	5'- TCTGCTTCTCCGACCCG CTT (配列番号433)	761-780	96.5 %	95.2 %
		5'-TAGCTGCA- ATGGCCTCCGTG (配列番号434)	1042-1023		
ボンベシン レセプター (GRPR)	XM_010317	5'- CATGCTCCACTTTGTCA CCAGC (配列番号435)	1289-1310	100 % [#]	100 %
		5'- GAGGTCATGCAGGTTGT ACTCC (配列番号436)	1477-1456		
代謝調節型 グルタミン酸 レセプター	U92459	5'CCAGAGCTAAGTGATA ACACCAGG (配列番号437)	598-621	21.1 %	95.2 %
		5'- TTCACGTGGGATTTTCT GTGACTG (配列番号438)	801-825		

7個の正常な組織からのRNAについて分析

10

20

30

【 0 4 7 8 】

該 R T - P C R 実験からのデータは、95.2%の S C L C セルライン中で発現するが、正常な組織の21.1%中でだけ発現するので、該代謝調節型グルタミン酸レセプター 8 は候補レセプターであることを、明白に示唆する。それらは95%以上のセルライン中で発現するので、他のレセプターもまた候補である。リアルタイムの R T - P C R またはノーザンブロッティングによる R N A 発現の相対レベルの定量は、更に該適当なレセプターを同定する。

【 0 4 7 9 】

実施例 3

ウェスタンブロッティングによって同定される S C L C セルラインによって発現される表面分子

40

上記の同じパネルからの19個の試験した S C L C ライン内の18個が、該表面分子：ニューロン細胞接着性分子 (NCAM1) およびカドヘリンを発現することが見出されている (R yggaardらによる1992)。該 S C L C セルライン中の発現は、インビトロおよびヌードマウス中の異種移植片としての両方で伝播されたセルラインからのタンパク質抽出物においてポリクローナル抗体を用いるウェスタンブロッティングによって測定する。NCAM1は、20個の外科的に切開 (resected) した S C L C 腫瘍の内の20個における免疫組織化学的方法 (Kibbelaarらによる1991) (これは、S C L C 細胞がインビボでNCAM1を発現することを実証する) によって検出する。NCAM1は胚発生の間に広く発現するが、しかし成人においては非常に下方制御され (GegelashviliおよびBockによる1996、総説)、従って S

50

CLC患者からの正常な組織中では低レベルで発現する。NCAM1発現はエンドサイトーシスによって部分的に制御され (Minanaらによる2001)、そしてNCAM1は抗体結合によってインターナライズするように導入することができる (Michalidesらによる1994)ことは、既の実証されている。カドヘリンはまた、正常な状況下 (Kameiらによる1999; Leらによる1999)、および病理学的な状況下 (ParkesおよびHartによる2000、総説)でエンドサイトーシスされることも見出されている。従って、これらの分子は遺伝子移入のための表面レセプターとしての可能性ある候補である。

【0480】

実施例 4

他の方法によって同定されるSCLCセルラインによって発現される表面分子
いくつかの他の細胞表面レセプターは多数のSCLCセルラインによって発現し、従って遺伝子移入のための表面レセプターとしての可能性ある候補でもあることが分かっている。

【0481】

高アフィニティのトランスフォーミング成長因子 - レセプター (TGF- R) の発現は、化学的な架橋によって上記パネル由来のセルラインのいくつかにおいて実証される (Damstrupらによる1993)。ノーザンブロット分析によって、TGF- RIについてのmRNAの存在は9個のSCLCの内の9個において、TGF- RIIの場合は9個のSCLCラインの内の6個において、およびTGF- RIII (ベータグリカン (betaglycan)) の場合は9個のSCLCラインの内の9個において見出されている (Norgaardらによる1996)。これらのレセプターに対するリガンドの結合は、該レセプターのインターナライズを誘発する (Andersらによる1997, Doreらによる2001)。

【0482】

インスリン様成長因子レセプター (IGF-R) mRNAはRT-PCRによって測定され、そしてこのものは14個の検査したSCLCラインの内の14個において存在することが見出されている (Quinnらによる1996)。11個のSCLCラインの内の11個におけるIGF-R1 (Rotschらによる1992) およびIGF-RII (Schardtらによる1993) の両方の存在は、ノーザンブロットティング、競合的な結合アッセイおよび化学的な架橋法によって実証されている。両方のレセプターは、リガンド結合後にインターナライズすることが知られる (Doreらによる1997)。

【0483】

上皮成長因子レセプター (EGF-R)、および様々な相同体、改変体または変異体 (v-erb-B, HER2/neu (c-erb-2), ErbB3, ErbB4およびEGF-R vIII) は、多数の癌セルラインおよび腫瘍上で発現し、そしていくつかの形態はリガンド結合後にインターナライズすることが見出されている (Wellsによる1999; HuangおよびHarariによる1999、総説)。ノーザンブロットティング分析によって、上記のパネルにおける21個のSCLCラインの内の11個がEGF-Rを発現することが分かっている。該発現は、ラジオレセプター、および該セルラインの内の10個におけるアフィニティー標識分析によって立証されている (Damstrupらによる1992)。実際に、該EGF-Rは、これらのSCLCラインの内のいくつかにおいてターゲットとした遺伝子運搬を媒介することを実証されている (CristanoおよびRothによる1996, Frederiksenらによる2000)。

【0484】

実施例 5

SCLCセルラインの遺伝子発現と、別のタイプの正常なヒト組織および他の腫瘍セルラインの遺伝子発現との比較

SCLCセルラインおよび正常な組織の間の遺伝子発現プロファイルを更に比較するために、白血球からの正常な組織由来の全RNAを、商業的な供給源 (CLONTECH, Stratagene, Ambion or ResGen) から入手する。ピオチン標識cRNAは、上記の通り製造する。

【0485】

正常な組織と比較してSCLC細胞中で非常に高く発現する遺伝子が癌細胞についての一般的

な現象であるかまたはSCLC特異的であるかどうかを決めることは重要である。従って、全RNAは、他のタイプのヒト癌由来のセルライン（これは、例えば乳癌、神経こう腫、非小細胞肺癌（NCLC）、大腸癌、神経芽腫から誘導される商業的に入手可能なセルライン）から単離され、そして上記の通り分析する。

【0486】

インビトロでのSCLCセルラインの遺伝発現と、インビボでのSCLC細胞からの遺伝子発現の比較

インビボで伝播されるSCLCラインの遺伝子発現の分析

選択したセルラインを、Rygaardらによる1992に従って、BALB/cヌードマウスの両方の側方に異種移植片としてインビボで伝播する。該腫瘍の1つが約1 cm × 1 cmの大きさに達した後に、該マウスを殺し、そして腫瘍を取り出す。該腫瘍からの全RNA単離の場合には、該腫瘍はRNAlater（登録商標）（Ambion）中で24～48時間保存し、続いて該保存溶液から取り出し、そしてRNA調製まで-70℃で保存する。全RNAは、商業主の規格に従って、トリゾール（Life Technologies製）を用いる抽出によって該腫瘍から調製する。該全RNAは更に、RNA精製（cleanup）についての商業主の方法に従って、RNeasyカラム（Qiagen）を用いて精製する。単離した全RNAの分析、cDNAおよびビオチン標識のcRNAの調製、並びに遺伝子発現のAffymetrix Chipsによる分析は、上記の通り行なう。ウェスタンブロット分析のためのタンパク質抽出物は、5倍容量（w/v）の20 mM トリス-HCl（pH 7.5）、2%トリトンX-100中、プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビター（プロテアーゼインヒビターカクテルセットIIIおよびホスファターゼインヒビターカクテルセットII、Calbiochem製）を加えながら、テフロンパステルを用いて氷上でホモジナイズし、続いて高スピード遠心分離（13,000 × g）によって清澄することによって、新しく取り出した腫瘍から調製する。

【0487】

小細胞肺癌を有する患者からのバイオプシーの遺伝子発現の分析

小細胞肺癌と診断された患者からのバイオプシー（これは、Herlev Hospitalから入手）を、RNAlater（登録商標）（Ambion）中に24～72時間保存し、続いて該保存溶液から取り出し、そして-70℃で保存する。該腫瘍を熟練の病理学者によってミクロ解剖し、そして上記の通りRNAを該腫瘍から単離する。いくつかの腫瘍からのRNAを貯蔵する。得られる全RNA量がビオチン標識cRNAの直接的な調製に十分でない場合には、Oh yamaらによる2000に記載の通り、標識方法を2個の更なる増幅工程を含むように改変する。

【0488】

実施例 6

細胞表面分子の同定のための実験方法

SCLC細胞によって発現する候補細胞表面分子（レセプター）は、Gene Chip分析、ノーザンブロッティング、RT-PCRまたはウェスタンブロッティングによって同定される。該SCLC細胞によって発現される該特異的なスプライス形態は、RT-PCRおよび/またはシーケンシング法（GATC Biotech AG, 独国で実施）によって測定される。タンパク質発現および分子の細胞下局在化（これらは、mRNAレベルに関してのみ同定する）は、他の方法によって立証されなければいけない。商業的な抗体を入手可能ならば、ウェスタンブロッティング（このものは、上記の通りインビトロおよびインビボで伝播される上記パネル由来のSCLCセルラインから調製されるタンパク質抽出物を用いる）およびSCLCセルラインの免疫染色による同定は、商業主による推奨を用いて実施する。

【0489】

公知のリガンド（このものは、商業的に入手可能であるかまたは組み換え的に産生することができる（以下を参照））を有する分子について、このものは加えてまたは別に、結合または架橋の研究によって達成することができる。該標識化リガンド（例えば、放射-、ビオチン-、または蛍光-標識リガンド）をも用いて、レセプターのアフィニティ、細胞当たりのレセプター分子の数、および該リガンドのインターナライズにおけるそれらの能

10

20

30

40

50

力を測定する。

【0490】

公知のリガンドを有しない細胞表面分子の場合、該表面分子の発現およびリガンドの同定の両方を測定しなければならない。該細胞表面分子をコードしている mRNA は SCLC ラインから容易に入手可能であるので、該細胞外部分をコードしている cDNA は発現ベクター中に標準的な RT-PCR 方法によってクローニングして、免疫化のために使用する組み換えタンパク質の発現が可能である。好ましくは、組み換えタンパク質の容易な精製のための適当なタグ（例えば、6 × HIS）との融合としての細菌システム（例えば、Qiagen pQEベクター）中での発現を使用する。ウサギでのポリクローナル抗体の発生のための免疫化は、Department of Experimental Medicine, The Panum Institute, University of Copenhagen で実施する。マウスモノクローナルハイブリドーマの発生は、Serum Institute, Copenhagen で実施する。免疫化動物からの血清、およびハイブリドーマからの条件培地は、固定化抗原として組み換え産生タンパク質を用いて（ミクロタイターウェル中または膜上で）抗原との結合についてスクリーニングする。加えて、哺乳動物細胞によって発現する時の該細胞表面分子における該抗体の特異性は実施されなければならない。このことは、RT-PCR を用いて、完全長分子をコードしている cDNA を真核生物発現ベクター（例えば、pcDNA 3.1（Invitrogen 製）または pCMV-Tag（CLONETECH 製））中にクローニングすることによって達成される。該分子を内因的に発現しないセルラインの一時的な形質移入後に、該抗体の特異性は、間接的な免疫蛍光染色を用いて測定する。

10

【0491】

適当な抗体または血清を同定する場合には、該タンパク質発現は、インビトロおよびインビボで増殖される SCLC セルラインについて、加えて SCLC バイオプシーについて免疫染色することによって分析して、インビトロおよびインビボの両方での発現を立証する。正常な組織中での発現は、ガラス顕微鏡スライド（VastArray（登録商標）（GenRes 製））上にスポットした 200 個の別個の組織試料を含有するヒト組織アレイを用いて評価する。

20

【0492】

別法として、ファージディスプレイライブラリーから単離したヒト 1 本鎖抗体を使用することができる（以下を参照）。

【0493】

実施例 7

細胞表面分子に対するリガンドの同定およびそれらのインターナライゼーション能力の測定のための実験方法

30

可能ならば、商業的に入手可能である公知のリガンドを、放射 - 、ビオチン - または蛍光 - 標識形態のいずれかで得る。候補表面分子としてのインテグリンの分析について、該セルライン中に見出される特異的なインテグリン および サブユニットの組み合わせを第 1 に、細胞外マトリックスリガンドを同定するために測定しなければならない。このことは、特異的なインテグリン組み合わせに対する多数の抗体を商業的に入手可能であるので、免疫染色によって実施することができる。

【0494】

該リガンドを標識形態以外で商業的に入手可能であるならば、該リガンドを、¹²⁵I（例えば、クロラミン - T 法を使用）、または蛍光色素もしくはビオチン（例えば、FluoReporter Kits（Molecular Probes 製）を使用）を用いて標識することができる。結合アッセイを実施して、該表面分子に対するリガンド結合の特異性および能力を測定する。該標識リガンドを用いて、37 °C でインターナライズする該表面分子の能力（コントロールとして、0 ~ 4 °C でインキュベートする）は、外部に結合したリガンドのストリップ（例えば、酸またはプロテアーゼ処置による）後、および放射標識リガンドについてのインターナライズされた放射能の測定後；ビオチン標識リガンドについての酵素もしくは蛍光標識のストレプトアビジンを用いる染色後、または顕微鏡観察による蛍光標識リガンドについての直接的な評価後に、追跡することができる。

40

【0495】

50

該リガンドが公知であるが、商業的に入手不可能である場合には、該リガンドをコードしている遺伝子を、RT-PCRを用いたり、または適当な組織もしくはセルラインからcDNAライブラリーを得て発現ベクター中にクローニングしたり、または（入手可能ならば）商業的な供給源（GeneStorm（商標）（Invitrogen製）またはGeneConnection（登録商標）（CLONTECH製））から該クローンを得る。適当なタグ（例えば、6 × HIS）は、容易な精製のために該組み換えリガンド中に含まれるべきである。細菌性発現システムが好ましい。組み換え発現はまた、結合およびインターナライゼーションの分析を容易にするために、EGFPとの融合として該リガンドを発現する可能性を可能とする。別法として、該タグに対する抗体を、結合およびインターナライゼーションの分析のために使用することができる。しかしながら、翻訳後修飾（例えば、グリコシル化または硫酸化）が、該リガンドとそのレセプターとの結合にとって必須である場合には、分泌型タンパク質としての発現は、酵母菌システム（*Pichia pastorius*）中で、昆虫システム（バキュロウイルス）中で、または哺乳動物細胞（例えば、HEK293、COS-7またはCHO細胞）中で達成することができる。

10

【0496】

細胞表面分子のリガンドが知られていない場合には、レセプターのゲノム配列またはアミノ酸配列に基づく相同研究は、あるレセプターが属するレセプターのスーパーファミリーの同定を与えることができる。次いで、このスーパーファミリーに特異的なリガンドのパネルを、上記の方法を用いて試験することができる。別法として、細菌性ペプチド発現ライブラリー（例えば、FliTrx Random Peptide Display Library（Invitrogen製））を用

20

【0497】

該細胞表面分子に対するマウスモノクローナル抗体を得た場合には、別方法は、蛍光標識抗マウス抗体によってエンドサイトーシスされた抗体の検出によってインターナライズする該能力についてこれらの抗体をスクリーニングすることである。抗体産生ハイブリドーマからクローニングされた組み換え発現一本鎖抗体もまた、試験する。臨床治験については、これらの抗体は、例えばLosmanらによる1999に記載の方法によってヒト化しなければいけない。インターナライズするモノクローナル抗体が入手不可能である場合には、ヒト一本鎖抗体フラグメントを発現するファージライブラリーをインターナライズする抗体の単離のために使用することができる。問題の該細胞表面分子について陰性のセルラインと一緒にインキュベートし、そして該分子（上記）を発現する形質移入したセルラインを用いて選択することにより、ファージディスプレイした抗体の非特異的結合を除去することによって、特異的であって且つインターナライズする抗体を同定し、続いてエンドサイトーシス後に該細胞によって溶かされたプラスミドDNAからクローニングする（NielsenおよびMarksによる2000; Heitnerらによる2001）（Prof. J. Engberg, Royal Danish School of Pharmacyとの共同研究）。

30

【0498】

実施例 8

治療遺伝子の発現のためのプロモーターの同定

遺伝子由来のプロモーター領域（GeneChips分析によるこの発現は、SCLCセルラインおよび異種移植片中では高く、且つ正常な組織中では低いかまたは陰性であることが分かる）は、ターゲットとされる遺伝子療法における治療遺伝子の発現を制御し且つ媒介するための可能性ある候補である。GeneChips分析によって測定される候補プロモーターによる発現は第1に、GeneChips分析において使用される同一のRNA上の全分子（SCLC細胞および正常な組織由来）をカバーするいくつかの異なるプライマーセットおよびプローブを用

50

いるRT-PCRまたはノーザンブロッティングによって立証されて、該プロモーターの癌細胞特異性を確認する（正常な組織中での同一プロモーターによって発現される別のスプライシング変異体は、ffymetrix Chipによって認識され得ない）。プロモーターの活性および特異性はDNAの非常に大きな領域においてコードされ得るので、表面分子による運搬を増大するために該治療遺伝子をコードしているDNAのサイズを限定する目的で、SCLC細胞中での特異的で且つ高い発現に十分である、プロモーターの領域を定義することが必須である。我々はこの限定を15 kbとし、これはPCRによるクローニングのための実行可能なサイズ内である。最初に、候補遺伝子のコード領域から約15 kb上流の領域（これは、mRNAの5'非翻訳部分をコードしている領域を含む）は、鋳型として熱安定ポリメラーゼ（これは、ゲノムDNAを有する大きいPCR産物を伸張することができる）（例えば、Herculase（Stratagene製））を用いるPCRによってクローニングする。PCRについて使用するプライマーは、HUGOデータベース内のゲノム配列から設計し、そして制限切断によるクローニングのためのまれな制限部位を含むようにまたはCreリコンビナーゼの添加による制限切断なしでの直接的なクローニングのためのLoxP部位を含むように、設計する。該プロモーター領域を試験するために使用するベクターは、多数のクローニング部位中のまれな制限部位（例えば、pd2EGFP-1（CLONTECH製））および/またはloxP部位に先行して、増強緑色蛍光タンパク質（Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)）をコードしているプロモーターなし(promoterless)遺伝子を含むように構築する。該プロモーターの活性は、該SCLCライン中への転写後の蛍光顕微鏡観察を用いる半定量的方法（例えば、Lipfectamine Plus（登録商標）（Life Technologies製））で視覚的に、あるいはフルオロメーター（例えば、Victor 1420（Wallac製））を用いて半定量的に、見積もる。形質移入の有効性についてのコントロールとして、CMVプロモーター（pDsRed2-N1（CLONTECH製））の制御下で、赤色蛍光タンパク質をコードしているプラスミドの低量を使用する。

10

20

30

40

50

【0499】

上記アッセイにおいて活性であるプロモーターを、より小さいフラグメント中にサブクローニングし（これは、上記のPCRによるかまたは標準的な制限酵素消化による）、そして上記の通りプロモーター活性について調べる。プロモーターおよびそのサブクローンの相対的活性は、ホタルルシフェラーゼをコードしているプロモーターなしベクター中に再クローニング(recloning)し、および形質移入コントロールとしてSV40プロモーターから発現するウミシイタケルシフェラーゼをコードしているプラスミドと一緒に同時形質移入することによって、定量的に測定することができる。Dual-Luciferase（商標）レポーターアッセイシステム（Promega製）を用いて、一時的に形質移入した細胞の抽出物中の両方のプラスミドからの形質移入物を、ルミノメーター(luminometer)（Lumat LB9507（EG & G製））を用いて定量化する。同様な方法で、異なる強いSCLC特異的なプロモーターの活性部分のキメラを、最適な発現および制御のために試験することができる。あるいは、他の遺伝子由来の別のエンハンサー配列（例えば、ウイルスエンハンサー）を挿入することができる。正常な組織と比較してSCLC細胞についての選択プロモーター領域の特異性が様々な構築物中で失われていないことを保証するために、これらは加えて、正常な組織から誘導される様々な起源の商業的に入手可能なセルライン中に形質移入することによって試験する。より高い特異性が必要である場合には、p53遺伝子内の変異を有する癌細胞に対する別の特異性を該システムに取り込む。該治療遺伝子についてのプロモーターに近接するloxP部位を挿入し、そしてp53活性化プロモーターの制御下でCreリコンビナーゼをコードしている遺伝子を挿入することによって、wt p53を発現する正常な細胞は、該治療遺伝子についてのプロモーターを切除するCreリコンビナーゼを発現し、従ってそのものは発現しない。

【0500】

腫瘍特異的なプロモーターの転写性活性が、該治療遺伝子をコードしている転写物の十分な高レベルを得るのに十分でない場合には、第2の組織に非特異的であるが、非常に活性なプロモーター（例えば、CMV）の活性化のための特異的なプロモーターを使用すること

が可能である。このシステムは例えば、特異的なプロモーターによる Cre リコンビナーゼのコード化であり、このものは、腫瘍組織中での発現後に、loxP配列によってフランクされるサイレンシング要素の組み換え除去による CMV プロモーターを活性化する (Kijamaらによる1999)。

【0501】

加えて、内因性転写性エンハンサー (例えば、ステロイドホルモンレセプター結合性領域およびレセプター) の存在を測定する。このことは、ステロイドホルモン (例えば、レチン酸、エストロゲン、プロゲステロン、またはグルココルチコイド) の添加後に、上記の EGFP または ルシフェラーゼのプロモーター制御発現を用いる形質移入によって分析する。現在、これらは該ホルモンのアジュバント投与によって、該治療遺伝子の発現を増大させる機会を与える。別に、これらの配列は、該対応するレセプターが SCLC 細胞によって発現する場合には、転写性活性の増強のためにプロモーター中に挿入することができる。

10

【0502】

実施例 9

DNA とリガンドとの複合体形成のための最適な方法

治療遺伝子の発現を制御する組織特異的なプロモーターをコードしている DNA と、該リガンドとの間の複合体形成は、特異的なインターナライゼーションのために達成されなければならない。いくつかの異なる可能性を試験する。ストレプトアビジンを介して、ビオチン標識ポリ-カチオン性ポリ-L-リシン (PLL) と結合するビオチン標識リガンドは、負に荷電した DNA と複合体を形成し、その結果コンパクトなリガンド/DNA ポリプレックス (polyplex) が得られ、このものは該リガンドを介してインターナライズすることができる (Frederiksenらによる2000)。リガンドおよび異なるサイズのポリ-L-リシンのビオチン化は、Cristianoらによる1996またはWagnerらによる1990によって記載されている通り、実施することができる。

20

【0503】

あるいは、商業的に入手可能な分枝のカチオン性ポリマーのポリエチレンイミン (PEI) を、リガンド/DNA 複合体を得るのに使用することができる。PEI/DNA 複合体それ自身は、遺伝子移入の低活性を有する。しかしながら、該活性および特異性は、リガンドと PEI とを共有的に架橋することによって実質的に増大させることができる (Kirchheisらによる1997)。別の可能性は、上記の PLL について記載する通り、ビオチン標識リガンドとストレプトアビジンとを組み合わせたビオチン標識 PEI を試験することである。

30

【0504】

PLL を用いるこのシステムの更なる利点は、エンドソーム溶解性薬物の該複合体中への含有が不必要であることである (以下を参照)。

【0505】

該リガンドを組み換え産生する場合には、異なる方法をまた試験する。該組み換えリガンド (このものは、治療遺伝子を含む DNA 中にコードされている特異的な DNA 配列と強く結合することができる) 中にペプチド配列を含むことによって、DNA/リガンド複合体を得ることが可能であり、次いでこのものを中和してそして PLL によってコンパクト化することができる。該リガンドを有する組み換え融合体として産生する、酵母菌転写性アクチベーター GAL4 からの DNA 結合ドメインは、DNA を用いる本方法 (ここで、GAL4 認識領域のタンデム反復は該 DNA 中に取り込まれる) において試験する。

40

【0506】

上記の複合体は最初に、インターナライゼーション可能な細胞表面レセプターと結合することが知られるリガンドを有する CMV プロモーターによって制御された、EGFP をコードしている DNA を用いて試験する。該有効性および特異性は、蛍光顕微鏡観察による視覚的な評価によって、および/または該リガンドに対するレセプターの発現のあるなしで細胞に投与後の蛍光定量的な定量法によって、測定する。

【0507】

50

実施例 10複合体のエンドソーム溶解の最適化

エンドサイトーシスされた複合体のリソソーム分解を避けるために、細胞質または薬物（例えば、クロロキン）中へ該DNAを放出させるために、該複合体中にエンドソーム溶解薬物を含めて、このことによりエンドソームpHを上昇させ、その結果リソソーム酵素による分解を抑制することは必須である（Guyらによる1995、総説）。複製欠損アデノウイルスは、リガンド/DNAポリプレックスと直接的に結合する場合には、極力なエンドソモリティク(endosmolytic)薬物として実証されている（Yoshimuraらによる1993）。しかしながら、欠損アデノウイルスまたウイルス性キャプシドの欠点は望まない免疫学的な応答、ウイルスレセプターを介する該複合体の非特異的な取り込み、安全性の注意、並びに製造および安定性における困難である。従って、これらの欠点を避けそして該複合体のサイズをより小さく減少させる目的で、好ましくは非ウイルス性エンドソモリティク薬物を試験する。該インフルエンザウイルス赤血球凝集素HA-2 N-末端膜融合ペプチド（Wagnerらによる1992）、N-末端ライノウイルスペプチド、シュードモナス外毒素Aトランスロケーションドメイン（FominayaおよびWelsによる1996）および合成ペプチド（Gottschalkらによる1996）は、エンドソーム溶解またはエンドソーム回避を媒介することを見出されている。ビオチン標識エンドソモリティクペプチドは、ストレプトアビジンと結合したビオチン標識ポリ-L-リシン（PLL）によって産生する場合には、リガンド/DNA複合体中に含まれ得る。あるいは、該リガンドを組み換え的に産生する場合には、該ペプチド配列は該リガンドのN-またはC-末端部分中に含むことができる。これらのペプチドの有効性（このものは、別々に加えられまたは組み換えリガンド中に取り込まれる）は、レポーター遺伝子をコードしているDNA（EGFPまたはルシフェラーゼ）（このものは、インターナライズすることが知られるリガンドと複合体形成するCMVプロモーターによって制御されている）、および該エンドソーム溶解（これは、該レセプター遺伝子の発現の評価によって追跡される）を用いて試験する。該リガンド/DNA複合体がPEIによって集合する場合には、この薬物は単独でエンドソーム膨潤、並びにそれに続く該複合体の溶解および放出を媒介することができる（Boussifらによる1995）。

10

20

【0508】

実施例 11治療遺伝子の保護および核ターゲティングのための方法の最適化

治療遺伝子をコードしているエンドソーム放出性DNAの核への運搬を増大させるために、該DNAは核ターゲティング配列（NLS-核局在化配列）をコードしているペプチドと共有的に連結する。制限酵素を有するプロモーターと合わせた該治療遺伝子の切除によって、該DNA末端のエンドヌクレアーゼによる消化からの防止は、オリゴヌクレオチドとのハイブリダイズおよびライゲーションによって達成することができ、これにより該二本鎖DNA末端での保護的な幹(stem)-ループキャップを得る。該オリゴヌクレオチド中にアミノ改変ヌクレオチドを含有させることによって、この残渣は核局在化シグナルをコードしているC-末端アミド化ペプチドに共有的に架橋するために使用することができる（Zantaらによる1999）（該ペプチドは、例えばGenosys, TX, USAから商業的に入手することができる）。多数の可能性ある配列を、本明細書中に上記する。最初に、サルウイルス40ラージ腫瘍抗原のNLSペプチドと該DNAとのカップリングによる発現の増大は、CMVプロモーターを有するEGFPをコードしているDNAフラグメントを用いて試験し、そしてSCLCセルラインの一時的な形質移入によって発現を試験する。他のタンパク質由来のNLSをコードしている他のペプチド（本明細書中上記を参照）は、最も効率的な核運搬の測定について試験する。

30

40

【0509】

実施例 12治療遺伝子の選択のための実験方法

可能性ある治療遺伝子は、アポトーシスを誘発する遺伝子産物、毒性遺伝子産物、無害な薬物に対する感受性を導入する遺伝子産物、オンコジーンについてのアンチセンスRNA

50

、オンコジーンをターゲットとするリボザイム、およびオンコジーンに対する抗体をコードしている遺伝子からなる群から選ばれる。タンパク質またはアンチセンスRNAの発現のための遺伝子産物をコードしているcDNAは、cDNAライブラリーにおけるPCRをRT-PCRによってクローニングすることによって得るか、あるいは商業的な供給源から得る。細胞死を促進する治療遺伝子の有効性を評価するために、これらはCMVプロモーターの制御下でベクター中に挿入され、そして発現の効果を、形質移入細胞の同定のための同時形質移入についてのEGFPを発現するプラスミドを用いて、上記のパネル由来のSCLCセルライン中への一時的な形質移入（例えば、LipofectaminePlus, Life Technologiesを使用）後に試験する。アポトーシス誘発性遺伝子の場合に、発現が形質移入細胞に及ぼす影響を、特異的な染色によって追跡する（例えば、Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes製)の使用による）。加えて、形質移入細胞の細胞死は、蛍光「生菌株(live strains)」(例えば、LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes製))の使用によって追跡する。上記の実験から選ばれる治療遺伝子を、続いて再クローニングして、1つ以上のSCLC特異的なプロモーターの制御下で発現させ、そして上記の通り、該発現の有効性を形質移入によって分析する。

10

【0510】

実施例 13

インビボでの形質伝達実験

可能性ある表面分子およびそれらのリガンドを選択し、そしてDNA/リガンド複合体形成方法（これは、エンドソーム溶解性薬物および遺伝子の核ターゲティングを含む）を開発した後に、該運搬システムの特異性および有効性を、ヌードマウス中で伝播した上記例からの選択セルラインのSCLC腫瘍異種移植片への該複合体のインビボ投与によって試験する。適当な医薬製剤中にCMVプロモーターと一緒にレポーター遺伝子（例えば、 β -ガラクトシダーゼまたはEGFP）を含有する複合体を、尾静脈中に静脈内注射によって腫瘍異種移植片マウスに投与する。24、48または72時間後に、該マウスを殺し、そして肺、肝臓、心臓、脳、脾臓、腎臓および骨格筋からの該腫瘍および組織を切除し、染色し、そしてレポーター遺伝子の産物（例えば、 β -ガラクトシダーゼ）について分析する。

20

【0511】

インビボでの治療遺伝子を使用する形質伝達実験

インビボで治療遺伝子を運搬する該DNA/リガンドの能力を試験するために、インビトロでの実験によって選択される治療遺伝子およびインビボ実験から選択されるDNA/リガンド複合体を用いる形質導入実験を、上記の通り実施する。該治療遺伝子がチミジンキナーゼをコードしている場合には、ヌクレオチドアナログ（例えば、ガングシクロビル(gangcyclovir)）の投与によって達成される。腫瘍の発生をサイズの測定によって追跡し、バイオプシーからの細胞のフローサイトメトリーおよび該マウスの殺傷後に、該腫瘍をアポトーシスおよび壊死について分析する。

30

【0512】

引用文献

Anders RA, Arline SL, Dore JJ, Leof EB.による

Distinct endocytic responses of heteromeric and homomeric transforming growth factor beta receptors.

40

Mol Biol Cell. 1997 Nov; 8(11): 2133-43.

【0513】

Batt DG, Petraitis J J, Houghton G C, Modi D P, Cain G A, Corjay M H, Mousa S A, Bouchard P J, Forsythe M S, Harlow P P, Barbera F A, Spitz S M, Wexler R RおよびJadhav P Kによる(2000), Disubstituted Indazoles As Potent Antagonists of the Integrin Alpha(v)Beta(3). J Med Chem 43: pp 41-58.

【0514】

:Bepler G, Jaques G, Neumann K, Aumuller G, Gropp C, Havemann K.による

Establishment, growth properties, and morphological characteristics of permanent

50

human small cell lung cancer cell lines.

J Cancer Res Clin Oncol. 1987; 113(1): 31-40.

【 0 5 1 5 】

Berendsen HH, de Leij L, de Vries EG, Mesander G, Mulder NH, de Jong B, Buys CH, Postmus PE, Poppema S, Sluiter HJらによる

Characterization of three small cell lung cancer cell lines established from one patient during longitudinal follow-up.

Cancer Res. 1988 Dec 1; 48(23): 6891-9.

【 0 5 1 6 】

Boger DL, Goldberg J, Silletti S, Kessler TおよびCheresh D Aによる(2001) Identification of a Novel Class of Small-Molecule Antiangiogenic Agents Through the Screening of Combinatorial Libraries Which Function by Inhibiting the Binding and Localization of Proteinase MMP2 to Integrin Alpha(V)Beta(3)., J Am Chem Soc 123: pp 1280-1288. 10

【 0 5 1 7 】

Brenner, M. BおよびCepek, K. L.による、Methods and compositions for modulating heterotypic E-cadherin interactions with T lymphocytes. [米国特許第6300080号]. 2001.

【 0 5 1 8 】

Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor P JおよびNicoletti Fによる(2001), Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes As Targets for Neuroprotective Drugs., J Cereb Blood Flow Metab 21: pp 1013-1033. 20

【 0 5 1 9 】

Brauner-Osborne H, Egebjerg J, Nielsen E O, Madsen UおよびKrogsgaard-Larsen Pによる(2000), Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects., J Med Chem 43: pp 2609-2645.

【 0 5 2 0 】

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JPによる 30

A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1; 92(16): 7297-301.

【 0 5 2 1 】

Brenner, M. B.およびCepek, K. L.による、Methods and compositions for modulating heterotypic E-cadherin interactions with T lymphocytes. [米国特許第6300080号]. 2001.

【 0 5 2 2 】

Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor P JおよびNicoletti Fによる(2001), Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes As Targets for Neuroprotective Drugs., J Cereb Blood Flow Metab 21: pp 1013-1033. 40

【 0 5 2 3 】

Brauner-Osborne H, Egebjerg J, Nielsen E O, Madsen UおよびKrogsgaard-Larsen Pによる(2000), Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. J Med Chem 43: pp 2609-2645.

【 0 5 2 4 】

:Bulte JW, Go KG, Zuiderveen F, The TH, de Leij L.による、Intracerebral and subcutaneous xenografts of human SCLC in the nude rat: comparison of monoclonal antibody localization and tumor infiltrating lymphocytes. 50

J Neurooncol. 1993 Apr; 16(1): 11-8.

【 0 5 2 5 】

:Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD.による,

Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features.

Cancer Res. 1985 Jun; 45(6): 2913-23.

【 0 5 2 6 】

Cavalheiro EA and Olney J Wによる(2001) Glutamate Antagonists: Deadly Liaisons With Cancer., Proc Natl Acad Sci U S A 98: pp 5947-5948.

10

【 0 5 2 7 】

Chen CY, Chang YN, Ryan P, Linscott M, McGarrity GJ, Chiang YL.による, Effect of herpes simplex virus thymidine kinase expression levels on ganciclovir-mediated cytotoxicity and the ''bystander effect''.

Hum Gene Ther. 1995 Nov; 6(11): 1467-76.

【 0 5 2 8 】

:Chomczynski P, Sacchi N.による,

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem. 1987 Apr; 162(1): 156-9.

20

【 0 5 2 9 】

Cristiano RJ, Roth JA.による,

Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor.

Cancer Gene Ther. 1996 Jan-Feb; 3(1): 4-10.

【 0 5 3 0 】

:Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Poulsen HS.による,

Expression of the epidermal growth factor receptor in human small cell lung cancer cell lines.

Cancer Res. 1992 Jun 1;52(11): 3089-93.

30

【 0 5 3 1 】

:Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Skovgaard Poulsen H.による,

Expression of transforming growth factor beta (TGF beta) receptors and expression of TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3 in human small cell lung cancer cell lines.

Br J Cancer. 1993 May; 67(5): 1015-21.

【 0 5 3 2 】

:de Leij L, Postmus PE, Buys CH, Elema JD, Ramaekers F, Poppema S, Brouwer M, van der Veen AY, Mesander G, The TH.による,

Characterization of three new variant type cell lines derived from small cell carcinoma of the lung.

Cancer Res. 1985 Dec; 45(12 Pt 1): 6024-33.

40

【 0 5 3 3 】

Dodds DC, Omeis I A, Cushman S J, Helms J A and Perin M Sによる(1997), Neuronal Pentraxin Receptor, a Novel Putative Integral Membrane Pentraxin That Interacts With Neuronal Pentraxin 1 and 2 and Taipoxin- Associated Calcium-Binding Protein 49., J Biol Chem 272: pp 21488-21494.

【 0 5 3 4 】

Dore S, Kar S, Quirion R.による,

Presence and differential internalization of two distinct insulin-like growth fa

50

ctor receptors in rat hippocampal neurons.

Neuroscience. 1997 May; 78(2): 373-83.

【 0 5 3 5 】

:Dore JJ Jr, Yao D, Edens M, Garamszegi N, Sholl EL, Leof EB.による,
Mechanisms of Transforming Growth Factor-beta Receptor Endocytosis and Intracellular Sorting Differ between Fibroblasts and Epithelial Cells.,

Mol Biol Cell. 2001 Mar; 12(3): 675-84.

【 0 5 3 6 】

:Engelholm SA, Spang-Thomsen M, Vindelov LL, Brunner N, Nielsen MH, Hirsch F, Nielsen A, Hansen HH.による,

Comparison of characteristics of human small cell carcinoma of the lung in patients, in vitro and transplanted into nude mice.

Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]. 1986 Sep; 94(5): 325-36.

【 0 5 3 7 】

Evans JPIによる(2001), Fertilin Beta and Other ADAMs As Integrin Ligands: Insights into Cell Adhesion and Fertilization., Bioessays 23: pp 628-639.

【 0 5 3 8 】

Foley AG, Hartz B P, Gallagher H C, Ronn L C, Berezin V, Bock EおよびRegan C Mによる(2000), A Synthetic Peptide Ligand of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Igl Domain Prevents NCAM Internalization and Disrupts Passive Avoidance Learning.

10

20

【 0 5 3 9 】

:Fominaya J, Wels W.による,

Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system.

J Biol Chem. 1996 May 3; 271(18): 10560-8.

【 0 5 4 0 】

Frederiksen KS, Petri A, Abrahamsen N, Poulsen HS.による,

Gene therapy for lung cancer.

Lung Cancer. 1999 Mar; 23(3): 191-207. Review.

30

【 0 5 4 1 】

Frederiksen KS, Abrahamsen N, Cristiano RJ, Damstrup L, Poulsen HS.による,
Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor.

Cancer Gene Ther. 2000 Feb; 7(2): 262-8.

【 0 5 4 2 】

Gegelashvili, G.およびBock, E.による(1996),

Cell recognition molecules of the immunoglobulin superfamily in the nervous system.

Biomembranes, vol 3, 33-75.

40

【 0 5 4 3 】

Gottschalk S, Cristiano RJ, Smith LC, Woo SL.による,

Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells: potosomal disruption results in enhanced gene expression.

Gene Ther. 1994 May; 1(3): 185-91.

【 0 5 4 4 】

Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SL, Smith LC.による,
A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells.

Gene Ther. 1996 May; 3(5): 48-57.

50

【 0 5 4 5 】

Goula D, Benoist C, Mantero S, Merlo G, Levi G, Demeneix BA.による,
Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung.
Gene Ther. 1998 Sep; 5(9): 1291-5.

【 0 5 4 6 】

Gunji Y, Ochiai T, Shimada H, Matsubara H.による,
Gene therapy for cancer.
Surg Today. 2000; 30(11): 967-73. Review.

【 0 5 4 7 】

Guy J, Drabek D, Antoniou M.による,
Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene t
herapy.
Mol Biotechnol. 1995 Jun; 3(3): 237-48. Review.

10

【 0 5 4 8 】

Hartman GDおよびDuggan M Eによる(2000), Alpha(v)Beta(3) Integrin Antagonists As
Inhibitors of Bone Resorption., Expert Opin Investig Drugs 9: pp 1281-1291.

【 0 5 4 9 】

Heitner T, Moor A, Garrison JL, Marks C, Hasan T, Marks JD.による,
Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor ant
ibodies from a phage display library.
J Immunol Methods. 2001 Feb 1; 248(1-2): 17-30.

20

【 0 5 5 0 】

Huang SM, Harari PM.による,
Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rational
e and preliminary clinical results.
Invest New Drugs. 1999; 17(3): 259-69. Review.

【 0 5 5 1 】

Huang TFによる(1998), What Have Snakes Taught Us About Integrins? Cell Mol Life
Sci 54: pp 527-540.

【 0 5 5 2 】

Jane DE, Hoo K, Kamboj R, Deverill M, Bleakman DおよびMandelzys Aによる(1997), S
ynthesis of Willardiine and 6-Azawillardiine Analogs: Pharmacological Characteri
zation on Cloned Homomeric Human AMPA and Kainate Receptor Subtypes., J Med Chem
40: pp 3645-3650.

30

【 0 5 5 3 】

Jane.D.による, AMPA/Kainate receptors. WWW. 2001.
<http://www.bris.ac.uk/synaptic/info/pharmacology/AMPA.html>.

【 0 5 5 4 】

:Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Peng YF, Nakano K, Takai
shi K, Takai Y.による,
Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion
in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins.
Oncogene. 1999 Nov 18; 18(48): 6776-84.

40

【 0 5 5 5 】

Kang IC, Lee Y DおよびKim D Sによる(1999), A Novel Disintegrin Salmosin Inhibits
Tumor Angiogenesis., Cancer Res 59: pp 3754-3760.

【 0 5 5 6 】

Karecla PI, Green S J, Bowden S J, Coadwell JおよびKilshaw P Jによる(1996), Iden
tification of a Binding Site for Integrin AlphaEbeta7 in the N- Terminal Domain
of E-Cadherin., J Biol Chem 271: pp 30909-30915.

50

【 0 5 5 7 】

Kaufmann, O., Georgi, T.およびDietel, M.による, Utility of 123C3 monoclonal anti body against CD56 (NCAM) for the diagnosis of small cell carcinomas on paraffin sections., Hum.Pathol. 28[12], 1373-1378. 1997.

【 0 5 5 8 】

Kerr JS, Slee A MおよびMousa S Aによる(2000), Small Molecule Alpha(v) Integrin A ntagonists: Novel Anticancer Agents., Expert Opin Investig Drugs 9: pp 1271-1279
。

【 0 5 5 9 】

Kibbelaar, R. E., Moolenaar, K. E., Michalides, R. J., Van Bodegom, P. C., Vande 10
rschueren, R. G., Wagenaar, S. S., Dingemans, K. P., Bitter-Suermann, D., Dalesi
o, O.およびvan Zandwijk, N.による, Neural cell adhesion molecule expression, neu
roendocrine differentiation and prognosis in lung carcinoma., Eur. J. Cancer 27[
4], 431-435. 1991.

【 0 5 6 0 】

Kijima T, Osaki T, Nishino K, Kumagai T, Funakoshi T, Goto H, Tachibana I, Tanio
Y, Kishimoto T.による,
Application of the Cre recombinase/loxP system further enhances antitumour effec
ts in cell type-specific gene therapy against carcinoembryonic antigen-producing
cancer. 20

Cancer Res. 1999 Oct 1; 59(19): 4906-11.

【 0 5 6 1 】

Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, Wa
gner E.による,
Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery.
Gene Ther. 1997 May; 4(5): 409-18.

【 0 5 6 2 】

Kirkpatrick LL, Matzuk M M, Dodds D CおよびPerin M S 1 による(2000), Biochemical
Interactions of the Neuronal Pentraxins. Neuronal Pentraxin (NP) Receptor Binds
to Taipoxin and Taipoxin-Associated Calcium-Binding Protein 49 Via NP1 and NP2., 30
J Biol Chem 275: pp 17786-17792.

【 0 5 6 3 】

Kiselyov VV, Berezin V, Maar T E, Soroka V, Edvardsen K, Schousboe AおよびBock E
による(1997), The First Immunoglobulin-Like Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)
Domain Is Involved in Double-Reciprocal Interaction With the Second Immunoglobu
lin-Like NCAM Domain and in Heparin Binding., J Biol Chem 272: pp 10125-10134.

【 0 5 6 4 】

Krogsgaard-Larsen, P., Brehm, L., Johansen, J. S., Vinzents, P., Lauridsen, J.お
よびCurtis, D. R.による, Synthesis and structure-activity studies on excitatory
amino acids structurally related to ibotenic acid., J Med Chem. 28[5], 673-679. 40
1985.

【 0 5 6 5 】

:Le TL, Yap AS, Stow JL.による,
Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics.
J Cell Biol. 1999 Jul 12; 146(1): 219-32.

【 0 5 6 6 】

:Losman MJ, Qu Z, Krishnan IS, Wang J, Hansen HJ, Goldenberg DM, Leung SO.による
,
Generation and monitoring of cell lines producing humanized antibodies.
Clin Cancer Res. 1999 Oct; 5(10 Suppl): 3101s-3105s. 50

【 0 5 6 7 】

Madsen U, Stensbol T BおよびKrogsgaard-Larsen Pによる(2001), Inhibitors of AMPA and Kainate Receptors. *Curr Med Chem* 8: pp 1291-1301.

【 0 5 6 8 】

Mercer B, Markland FおよびMinkin Cによる(1998), Contortrostatin, a Homodimeric Snake Venom Disintegrin, Is a Potent Inhibitor of Osteoclast Attachment., *J Bone Miner Res* 13: pp 409-414.

【 0 5 6 9 】

Michalides R, Kwa B, Springall D, van Zandwijk N, Koopman J, Hilkens JおよびMooi Wによる(1994), NCAM and Lung Cancer. *Int J Cancer Suppl* 8: pp 34-37.

10

【 0 5 7 0 】

Minana R, Duran J M, Tomas M, Renau-Piqueras JおよびGuerri Cによる(2001), Neural Cell Adhesion Molecule Is Endocytosed Via a Clathrin-Dependent Pathway., *Eur J Neurosci* 13: pp 749-756.

【 0 5 7 1 】

Montgomery AM, Becker J C, Siu C H, Lemmon V P, Cheresch D A, Pancook J D, Zhao XおよびReisfeld R Aによる(1996), Human Neural Cell Adhesion Molecule L1 and Rat Homologue NILE Are Ligands for Integrin Alpha v Beta 3., *J Cell Biol* 132: pp 475-485.

【 0 5 7 2 】

Mountain A.による,
Gene therapy: the first decade.
Trends Biotechnol. 2000 Mar; 18(3): 119-28. Review.

20

【 0 5 7 3 】

Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R.による,
Gene therapy: designer promoters for tumour targeting.
Trends Genet. 2000 Apr; 16(4): 174-81. Review.

【 0 5 7 4 】

Nielsen LL, Maneval DC.による,
P53 tumor suppressor gene therapy for cancer.
Cancer Gene Ther. 1998 Jan-Feb; 5(1): 52-63. Review.

30

【 0 5 7 5 】

Nielsen UB, Marks JD.による,
Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage display libraries.
Pharm. Sci. Technol. Today. 2000 Aug; 3(8): 282-291.

【 0 5 7 6 】

:Norgaard P, Spang-Thomsen M, Poulsen HS.による,
Expression and autoregulation of transforming growth factor beta receptor mRNA in small-cell lung cancer cell lines.
Br J Cancer. 1996 May; 73(9): 1037-43.

40

【 0 5 7 7 】

:Ohyama H, Zhang X, Kohno Y, Alevizos I, Posner M, Wong DT, Todd R.による,
Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization.
Biotechniques. 2000 Sep; 29(3): 530-6.

【 0 5 7 8 】

:Parkes RJ, Hart SL.による,
Adhesion molecules and gene transfer.
Adv Drug Deliv Rev. 2000 Nov 15; 44(2-3): 135-52. Review.

50

【 0 5 7 9 】

:Pettengill OS, Sorenson GD, Wurster-Hill DH, Curphey TJ, Noll WW, Cate CC, Maurer LH.による,
Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small-cell carcinoma of the lung.
Cancer. 1980 Mar 1; 45(5): 906-18。

【 0 5 8 0 】

:Quinn KA, Treston AM, Unsworth EJ, Miller MJ, Vos M, Grimley C, Battey J, Mulshine JL, Cuttitta F.による,
Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines.
J Biol Chem. 1996 May 10; 271(19): 11477-831。 10

【 0 5 8 1 】

Riddell DR, Vinogradov D V, Stannard A K, Chadwick NおよびOwen J Sによる(1999),
Identification and Characterization of LRP8 (ApoER2) in Human Blood Platelets.,
J Lipid Res 40: pp 1925-1930。

【 0 5 8 2 】

Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D.による,
Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer.
Nat Med. 1996 Sep; 2(9): 985-91。 20

【 0 5 8 3 】

:Rotsch M, Maasberg M, Erbil C, Jaques G, Worsch U, Havemann K.による,
Characterization of insulin-like growth factor I receptors and growth effects in human lung cancer cell lines.
J Cancer Res Clin Oncol. 1992; 118(7): 502-8。

【 0 5 8 4 】

:Rygaard K, Moller C, Bock E, Spang-Thomsen M.による,
Expression of cadherin and NCAM in human small cell lung cancer cell lines and xenografts.
Br J Cancer. 1992 Apr; 65(4): 573-7。 30

【 0 5 8 5 】

Ronn LC, Olsen M, Ostergaard S, Kiselyov V, Berezin V, Mortensen M T, Lerche M H, Jensen P H, Soroka V, Saffell J L, Doherty P, Poulsen F M, Bock E, Holm AおよびSaffells J Lによる(1999), Identification of a Neuritogenic Ligand of the Neural Cell Adhesion Molecule Using a Combinatorial Library of Synthetic Peptides., Nat Biotechnol 17: pp 1000-1005。 40

【 0 5 8 6 】

:Schardt C, Rotsch M, Erbil C, Goke R, Richter G, Havemann K.による,
Characterization of insulin-like growth factor II receptors in human small cell lung cancer cell lines.
Exp Cell Res. 1993 Jan; 204(1): 22-9。 40

【 0 5 8 7 】

Taraszkas KS, Higgins J M, Tan K, Mandelbrot D A, Wang J HおよびBrenner M Bによる(2000), Molecular Basis for Leukocyte Integrin Alpha(E)Beta(7) Adhesion to Epithelial (E)-Cadherin., J Exp Med 191: pp 1555-1567。

【 0 5 8 8 】

Thomas NK, Wright R A, Howson P A, Kingston A E, Schoepp D DおよびJane D Eによる 50

(2001), (S)-3,4-DCPG, a Potent and Selective MGlu8a Receptor Agonist, Activates Metabotropic Glutamate Receptors on Primary Afferent Terminals in the Neonatal Rat Spinal Cord., *Neuropharmacology* 40: pp 311-318.

【 0 5 8 9 】

Turner JPおよびSalt TEによる(1999), Group III Metabotropic Glutamate Receptors Control Corticothalamic Synaptic Transmission in the Rat Thalamus in Vitro., *J Physiol* 519 Pt 2: pp 481-491.

【 0 5 9 0 】

Yoshimura K, Rosenfeld MA, Seth P, Crystal RG.による, Adenovirus-mediated augmentation of cell transfection with unmodified plasmid vectors. 10

J Biol Chem. 1993 Feb 5; 268(4): 2300-3.

【 0 5 9 1 】

Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML.による, Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 May; 87(9): 3410-4.

【 0 5 9 2 】

Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML.による, Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. 20

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 1; 89(17): 7934-8.

【 0 5 9 3 】

Wells A.による,

EGF receptor.

Int J Biochem Cell Biol. 1999 Jun; 31(6): 637-43. Review.

【 0 5 9 4 】

Yoneda Y, Kawajiri S, Sugimura M, Osanai K, Kito F, Ota EおよびMimura Tによる(2001), Synthesis of Diaminobutane Derivatives As Potent Ca(2+)-Permeable AMPA Receptor Antagonists., *Bioorg Med Chem Lett* 11: pp 2663-2666. 30

【 0 5 9 5 】

Yu A, Choi J, Ohno K, Levin B, Rom WNおよびMeruelo Dによる(2000), Specific Cell Targeting for Delivery of Toxins into Small-Cell Lung Cancer Using a Streptavidin Fusion Protein Complex., *DNA Cell Biol* 19: pp 383-388.

【 0 5 9 6 】

Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP.による, Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5; 96(1): 91-6.

【 図面の簡単な説明 】 40

【 0 5 9 7 】

【 図 1 】 図 1 は、標的遺伝子治療の原理を示す図である。

【 図 2 】 図 2 は、Chips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。この図は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のRT-PCRによるChips分析のRT-PCR確認に使用したcDNAの品質試験を示す。

【 図 3 】 図 3 は、Pro221 (IA-1) についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【 図 4 】 図 4 は、Pro30 (KIA0042) についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【 図 5 】 図 5 は、Pro41 (MAD2) についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の 50

比較を示す図である。

【図 6】図 6 は、Pro210 (ラミンB1) についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 7】図 7 は、Pro71 (CDKN2A) についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 8】図 8 は、細胞表面分子DR6についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 9】図 9 は、細胞表面分子LRP8についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 10】図 10 は、細胞表面分子NTPXRについてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。 10

【図 11】図 11 は、細胞表面分子NCAM1についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 12 A】図 12 A は、細胞表面分子GluR2 (GRIA2) についてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 12 B】図 12 B は、細胞表面分子ITGAVについてChips分析とRT-PCRにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 13】図 13 は、mGluR8についてChips分析とウェスタンブロッティングにより測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 14】図 14 は、NPTXRについてChips分析とウェスタンブロット分析により測定した遺伝子発現の比較を示す図である。 20

【図 15】図 15 は、NCAM1についてChips分析とウェスタンブロット分析により測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 16】図 16 は、GluR2 (GRIA2) についてChips分析とウェスタンブロット分析により測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【図 17】図 17 は、ITGAEについてChips分析とウェスタンブロット分析により測定した遺伝子発現の比較を示す図である。

【 図 5 】

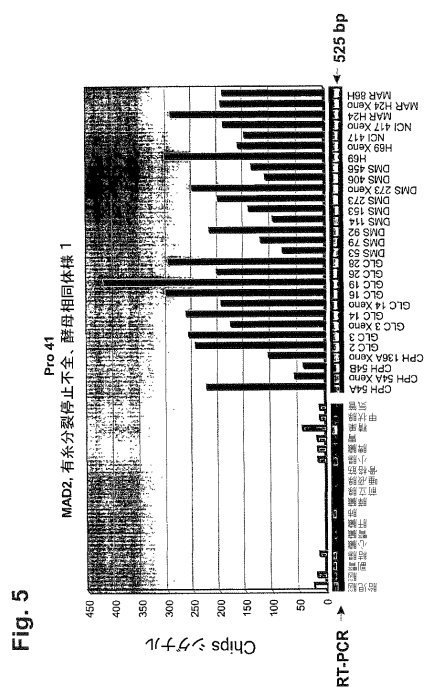


Fig. 5

【圖 7】

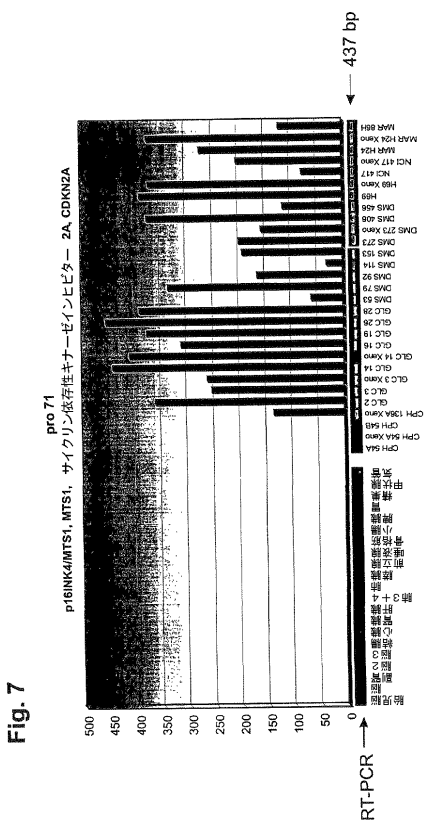


Fig. 7

【 図 6 】

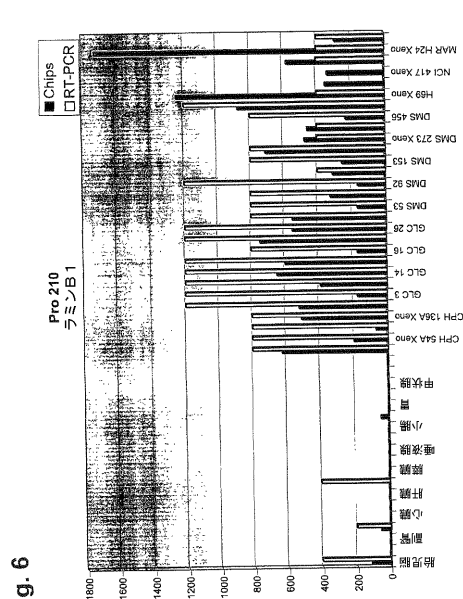


Fig. 6

【 図 8 】

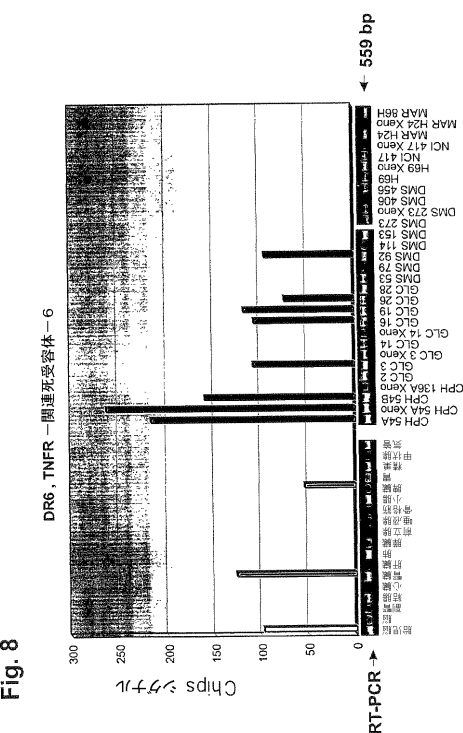
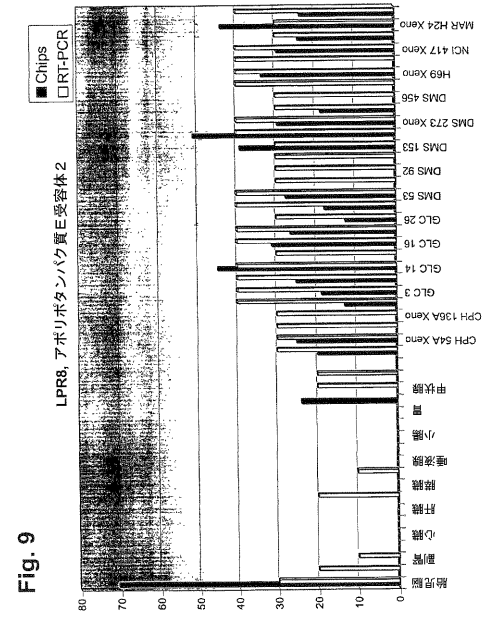
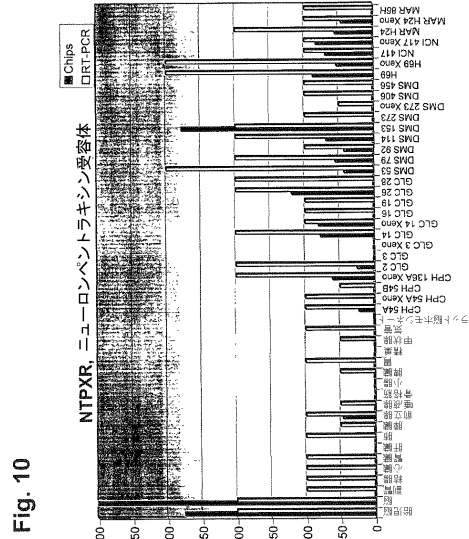


Fig. 8

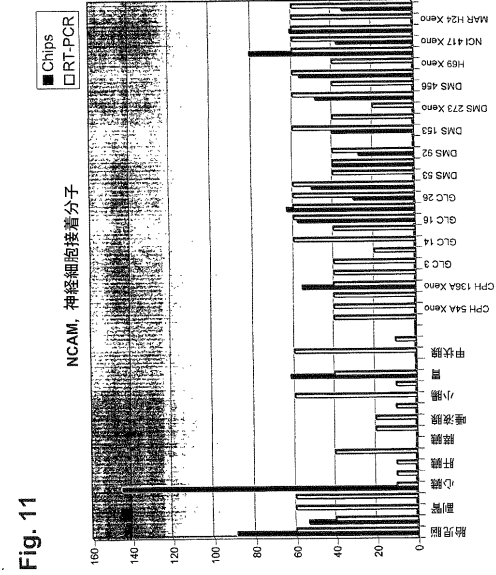
【 図 9 】



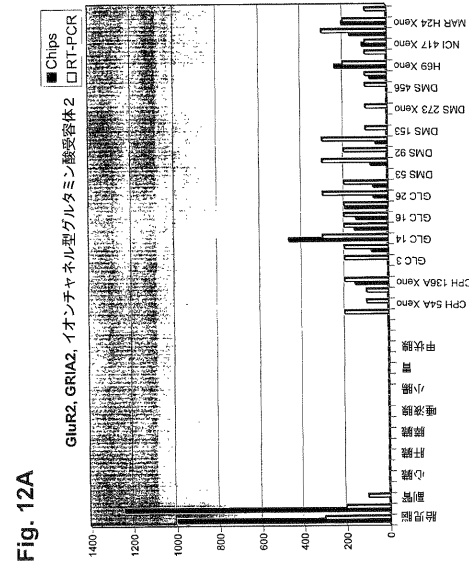
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 A 】



【 図 1 2 B 】

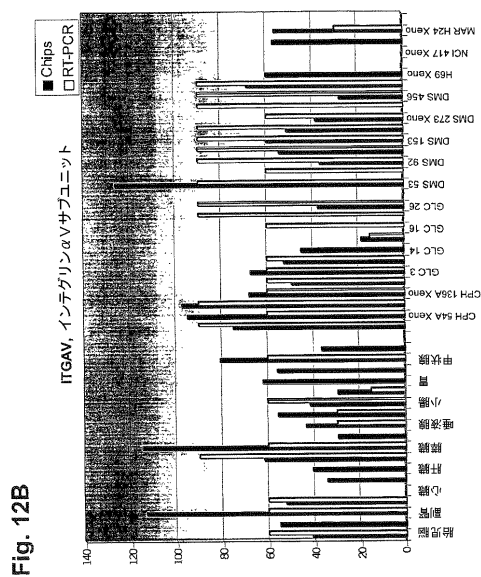


Fig. 12B

【 図 1 3 】

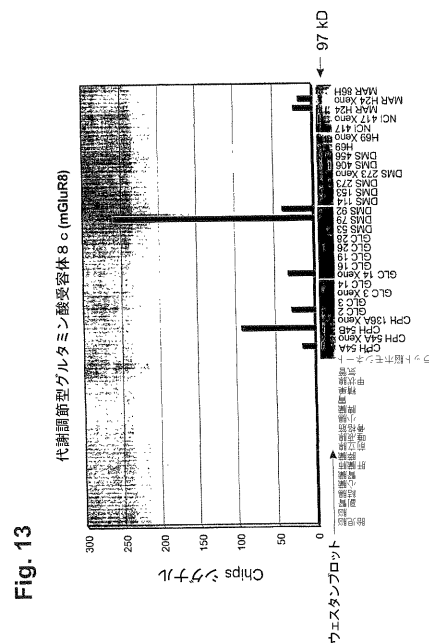


Fig. 13

【 図 1 4 】

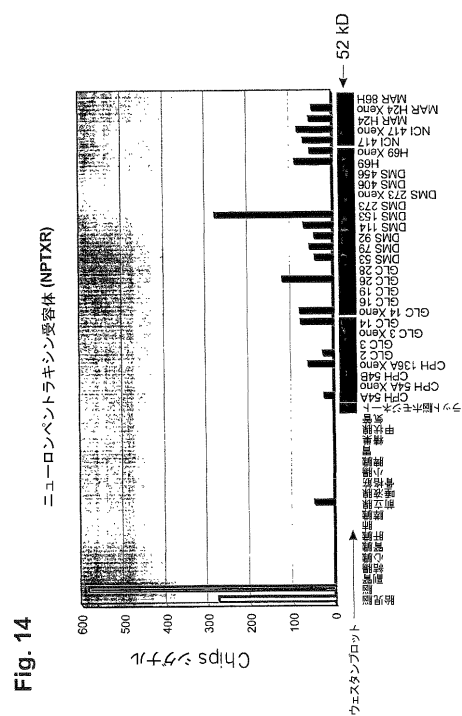


Fig. 14

【 図 1 5 】

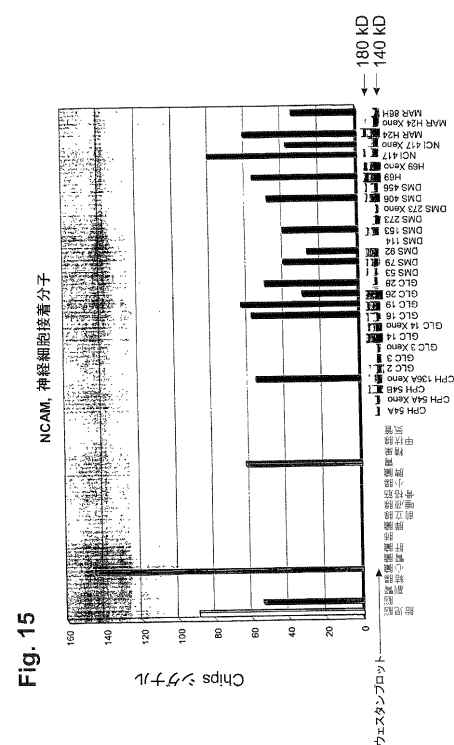
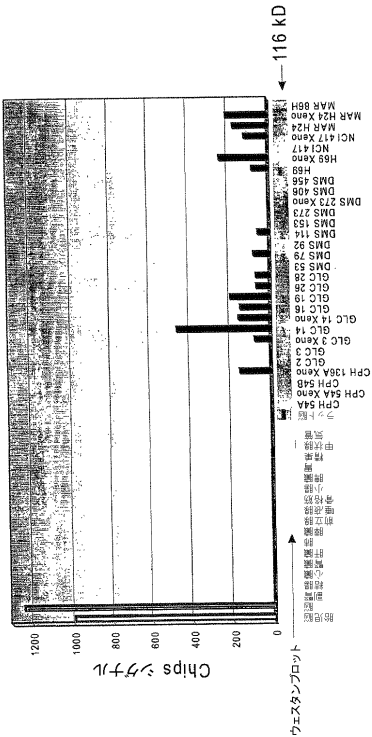


Fig. 15

【 図 1 6 】

Fig. 16

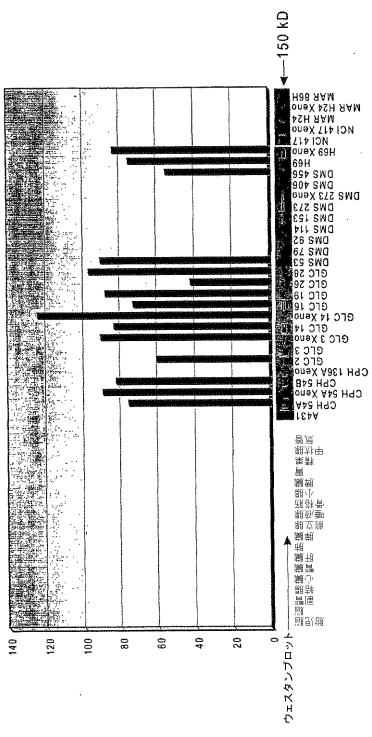
GLR2, GRIA2, イオンチャネル型グルタミン酸受容体 2, HBG2



【 図 1 7 】

Fig. 17

ITGA6, CD103, インテグリン α Eサブユニット



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/00928 A2

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/IB02/03534

(22) International Filing Date: 19 June 2002 (19.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PA 2001 00992 25 June 2001 (25.06.2001) DK
60/501,818 2 July 2001 (02.07.2001) US

(utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): ODIN MEDICAL A/S [DK/DK]; Blegdamsvej 9, DK-2100 Copenhagen Ø (DK).

(72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): POULSEN, Hans, Skovgaard [DK/DK]; Tuborg Boulevard 24 st. th, DK-2300 Hellerup (DK); PEDERSEN, Nina [DK/DK]; Landtloftsgade 46, st.tv., DK-2200 Copenhagen N. (DK); MORTENSEN, Shida [DK/DK]; Middelstvej 29, DK-2820 Gentofte (DK); SORESEN, Susanne, Berg [DK/DK]; Lille Strandvej 26, 1.m.fl., DK-2900 Hellerup (DK); PETERSEN, Mikkel, Wandahl [DK/DK]; Østerbrogade 139, 3.tv., DK-2100 Copenhagen Ø (DK); ELSNER, Henrik, Irgang [DK/DK]; Svend Gørges Vej 36, DK-2700 Brønshøj (DK).

(74) Agent: HOIBERG A/S; Store Kongensgade 59 B, DK-1264 Copenhagen K. (DK).

(81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW; ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/00928 A2

(54) Title: ONCOLOGY DRUG INNOVATION

(57) Abstract: The present invention describes methods for identification of molecules expressed at a different level on the cell surface of cancer cells compared to non-malignant cells and methods of identification of cancer specific promoters to be used singly or in combination for delivery and expression of therapeutic genes for treatment of cancer. The invention furthermore describes targeting complexes targeted to cell surface molecules identified by the methods of the invention. In embodiments of the invention said targeting complexes comprise the promoters identified by the methods of the invention. In addition the invention describes methods of identifying binding partners for the cell surface molecules and the binding partners per se. Methods of treatment using the targeting complexes and uses of the targeting complexes for the preparation of a medicament are also disclosed by the invention. Furthermore, the invention describes uses of the cell surface molecules or fragments thereof for preparation of vaccines.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

1

Oncology drug innovation**Field of invention**

- 5 The present invention relates to methods of identification of molecules on the cell surface of cancer cells and a method of identification of cancer specific promoters to be used singly or in combination for delivery and expression of therapeutic genes for treatment of cancer.

10 **Background of the invention**

- Approximately half of all patients with cancer have disseminated disease at the time of diagnosis. Existing cancer therapies are able to cure only 5-7% of these patients. Consequently, there is a great need for more effective drugs, which can be administered systemically alone or in combination with existing treatments. Methods utilizing gene therapy to deliver efficient and specific treatment of cancer cells is therefore a promising strategy. However, strategies applied to this date have only had limited success and the development of suitable delivery systems need further development.

20 **Delivery vectors**

- The choice of the delivery vector for gene therapy is a major issue. Many vector systems have been tested for their suitability for gene transfer, including viral vectors such as retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus, lentivirus and non viral vectors such as complexing with liposomes, cationic lipids or polycations. However, all of these vectors have specific advantages and limitations. Retrovirus requires mitotic division for transduction, but mediate long term expression, as they integrate in the genome. Adenovirus will transduce both dividing and non-dividing cells, but only transiently as they remain episomal. Adenovirus, however, are highly immunogenic and retrovirus are rapidly inactivated by the human complement system. Lentivirus does not induce immune response, but involve specific safety concerns, as it is a member of the immunodeficiency virus. More than 75% of all protocols so far have used viral vectors despite these are difficult and expensive to produce, there is a limited insert size of the therapeutic gene and there are many safety considera-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

2

- tions to be made. Therefore, the majority of the protocols used for adenoviral vectors have administered the therapeutic gene by local delivery (injection into the tumour) to increase the local titer of the virus and avoid immunogenic response, but even the highest titer system has not yet been sufficient to cure local tumours. A major disadvantage of viral vector systems is that their uptake is unspecific and not targeted to the cancer cells. However, as adenovirus still is the preferred vector due to its efficiency of delivery, ways of reducing the immune response and target the virus to specific cells are under development. On the other hand, liposomes and polycation complexes, which are less immunogenic, easier to produce and do not need the safety considerations of viral vectors have much lower transfection efficiency than viral transduction and also lack the cell specificity. However, polycations have the ability to compact and neutralise the charge of the delivered DNA and PEI complexes appear relatively stable in the blood system (Goula et al., 1998; reviewed in Mountain, 2000).
- To assure high specificity and to limit undesired side effects of the treatment, it is of importance to design a vector or vehicle, which targets and delivers the therapeutic gene in question to the cancer cells efficiently and with high specificity. However, as described below, this involves assembly of a multi component vector.
- Receptor targeting.**
- Functional receptors or other cell surface molecules, which can internalise by ligand or antibody binding on the cancer cell surfaces, can be used to target the gene delivery to the cells. Receptor targeted gene delivery by means of DNA conjugated to a ligand of the receptor offers a promising approach. The major advantages of targeted gene delivery are that receptor targeting can be performed without virus, thus eliminating many of the obstacles present in current strategies of gene therapy. Successful deliverance of genes to cancer cells using receptor targeting has been reported to a variety of different surface receptors including receptors for epidermal growth factor (Cristano and Roth, 1996, Frederiksen et al., 2000), folate (Gottschalk et al., 1994), transferrin (Wagner et al., 1990). High expression of a specific receptor is not always a pre-requisite for efficient receptor mediated uptake, as has been demonstrated for the epidermal growth factor receptor (Frederiksen et al., 2000). However, many of the receptors expressed by cancer cells are also expressed by normal cells to some extent, meaning that normal cells will often be targeted as well. This issue emphasises the need for further requirements for specificity for the expression or nature of the therapeutic gene.

Molecular conjugates

For targeted gene therapy it is essential that the ligand to be internalised and DNA expressing the therapeutic gene are physically associated for receptor mediated uptake. Several methods have been used for preparing non-viral, synthetic vectors of targeted DNA molecular conjugates by associating cationic polymers, such as poly-L-lysine (Frederiksen et al., 2000) or polyethylenimine (PEI) (Kircheis et al., 1997) (polyplexes) with the ligand and DNA. Successful gene targeting has been reported for a number of molecular conjugates. The ligand has either been covalently linked to the polycation, or biotinylated ligand and polylysine were complexed via streptavidine to form condensed conjugates with DNA, which are internalised by the receptor of the ligand. One of the advantages of these system over virus mediated transfer is the lack of size limitation of the DNA. PEI complexes, in addition, appear to be able to pass the capillary barrier in lung, making this compound one agent for molecular conjugates.

Endosomal release of molecular conjugate.

After endocytosis of the DNA/ligand conjugate by the receptor, the normal pathway would lead to degradation and loss of DNA. It has therefore proven essential to include an endosomolytic agent in the molecular conjugate. Adenovirus, replication deficient adenovirus and the viral capsid have all proven to be very efficient for endosomal lysis, when included in the molecular conjugate. However, all the reservations of unspecific uptake, safety and immunogenic response applying to use of using adenovirus as vectors also apply for this system. Inclusion of other fusogenic peptides containing amino acid sequences from e.g. influenza virus, toxins or synthetic peptides in the molecular conjugate have been tested for cytoplasmic release. These have the advantage of less immunogenicity and lower cost, but have been shown to be less effective in endosomal lysis than adenovirus. However, if the molecular conjugate is formed using the polycationic PEI, inclusion of endosomolytic agents are not necessary, as PEI has an intrinsic endosome-buffering capacity resulting in endosomal swelling and rupture.

Cancer specific promoters

An increase in the specificity of the targeting of a therapeutic gene to cancer cells can be obtained if a tumour specific promoter controlling the expression can be used (reviewed in Nettelbeck et al., 2000). Promoters for genes, whose expression is specific for the malignant phenotype, but show no tissue specificity such as telomer-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

4

ase have been used. Also, promoters regulating oncofetal antigens, which are not normally expressed in the adult, have been found to be active in tumor cells, such as carcinoembryonic antigen (CEA). However, the activity of these promoters (compared to strong, constitutive active viral promoters) have often proven not to mediate sufficient expression of the therapeutic gene, wherefore the tumour specific genes have been used for activation of another, stronger promoter controlling the therapeutic gene. Another disadvantage of oncofetal promoters is that these promoters will only be active in a subset of tumour types, depending on the tissue origin of the tumour. Alternatively, synthetic promoters have been designed taking advantage of the fact that many oncogenes which are overexpressed in cancer cells are transcription factors, which can mediate high transcriptional activity from their respective DNA recognition sequences.

Therapeutic genes

The product of a therapeutic gene must be able to effectively induce cell death. Gene therapy strategies for cancer treatment have used many different approaches. These include immunogene therapy such as cytokine stimulation of immune system (enhancing the immune response against tumour cells), selective prodrug activation, suicide genes, restoration of tumor suppressor genes and inhibition of activated oncogenes (reviewed in Frederiksen et al., 1999; Gunji et al., 2000). Indeed, most of the present therapeutic protocols in clinical trials against cancer involve immunotherapy. However, as the molecular phenotype of many types of cancer regarding aberrant expression or mutations of oncogenes and tumour suppressor genes, these are obvious candidates to target. Therapeutic gene products reducing expression or activity of oncogenes, such as antisense RNA or neutralising antibody fragments, have been tried and shown to inhibit proliferation. However, oncogene inactivation does not necessarily kill the cells and is therefore probably not applicable for short term treatment. One of the at present promising strategies is to reintroduce tumour suppressor genes, as most cancer cells exhibit loss of function of one or more of these genes. Of particular interest is the tumour suppressor gene *TP53* encoding p53, which is a transcription factor, which activates genes known to be involved in cell cycle arrest and induction of apoptosis. Reintroduction of wild type p53 has been shown to markedly reduce tumour cell growth or induce apoptosis of cancer cells in both in vitro and in vivo systems (Roth et al., 1996; Nielsen and Maneval, 1998). However, gene products rendering cells sensitive to otherwise harmless drugs has also been extensively used for gene therapy trials. In particular, the herpes simplex

WO 03/00928

PCT/IB02/03534

5

virus thymidine kinase (HSV-tk) in combination with the nucleoside analogue drug gancyclovir has been used. However, the conversion of the drug to a toxic nucleoside analogue by the enzyme only will kill cells, which are dividing. However, the toxic products are transmitted to surrounding cells by the so-called "by-stander" effect, making the approach potential for systems with low targeting efficiency.

Summary of the invention

- 10 Accordingly, it is a first objective of the present invention to provide methods for identifying a plurality of cell surface molecules, which are expressed at a different level in malignant cells compared with normal cells, comprising the steps of:
- 15 i) Providing at least 3 malignant cell lines selected from the group consisting of CPH 54 A, CPH 54 B, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86 MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446, SW 1271
 - 20 ii) Providing at least 3 total RNA samples derived from normal tissue selected from the group consisting of liver, heart, kidney, lung, adrenal gland, colon, pancreas, small intestine, spleen, skeletal muscle, trachea, prostate, placenta, salivary gland, testes, leucocytes, leucocytes, brain, adipose tissue, bladder, breast, cervix,
 - 25
 - 30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

6

esophagus, larynx, ovary, rectum, skin, spinal cord, stomach, thymus, thyroid and uterus.

- iii) Comparing the expression of mRNA in the cell lines according to step i) and tissue samples according to step ii)

5 iv) Identifying nucleic acid sequences, wherein

- a) there is a difference between the amount of mRNA expressed in one or more cell lines according to i) and the amount of mRNA expressed in one or more tissues according to ii); and/or

10

- b) there is essentially no difference in the amount of mRNA expressed in at least two cell lines according to i); and/or

15

- c) there is essentially no difference in the amount of mRNA expressed in at least two tissue samples according to ii); and

- v) Selecting among the nucleic acid sequences according to iv), nucleic acid sequences encoding for potential cell surface molecules.

20 It is a second objective of the present invention to provide methods of identifying first nucleic acid sequences, which are capable of directing expression of second nucleic acid sequences operably linked thereto, wherein the level of said expression is different in malignant cells compared with normal cells comprising the steps of:

- 25 i) Providing at least 3 malignant cell lines selected from the group consisting of CPH 54 A, CPH 54 B, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86 MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250,
- 30
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

7

- NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748,
 NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059,
 NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-
 H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-
 H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-
 H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446, SW 1271
- 5 ii) Providing at least 3 RNA samples derived from normal tissue
 samples derived from the group consisting of liver, heart, kidney,
 lung, adrenal gland, colon, pancreas, small intestine, spleen, skeletal
 10 muscle, trachea, prostate, placenta, salivary gland, testes,
 leucocytes, brain, adipose tissue, bladder, breast, cervix, esophagus,
 larynx, ovary, rectum, skin, spinal cord, stomach, thymus, thyroid and
 uterus.
- 15 iii) Comparing the expression of mRNA in the cell lines according to i)
 and tissue samples according to ii)
- iv) Identifying second nucleic acid sequences, wherein
- 20 a) there is a difference between the amount of
 mRNA expressed in one or more cell lines
 according to i) and the amount of mRNA
 expressed in one or more tissues according to ii);
 and/or
- b) there is essentially no difference in the amount of
 mRNA expressed in at least two cell lines
 according to i); and/or
- 25 c) there is essentially no difference in the amount of
 mRNA expressed in at least two tissue samples
 according to ii)
- v) Identifying first nucleic acid sequences operably linked to the second
 nucleotide sequences identified in step iv)
- 30
- It is a third objective of the present invention to provide uses of a pharmaceutically
 effective amount of the cell surface molecules identified according to the present
 invention for the preparation of a vaccine. Furthermore, the present invention pro-
 vides uses of a pharmaceutically effective amount of a nucleic acid sequence en-
 35 coding a cell surface molecule identified according to the methods of the present

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

8

invention for the preparation of a vaccine. The present invention also provides uses of a pharmaceutically effective amount of a cell surface molecule and/or a nucleic acid sequence encoding such a cell surface molecule for the preparation of a vaccine, wherein said cell surface molecule preferably comprises or essentially consists of or for example is GRIA2, such as LPR8, for example is CHRNA5, such as TMEFF, for example is NPTXR, such as Transferrin receptor; such as type II membrane protein clone; for example is HP10481; such as type II membrane protein clone; such as HP10390; for example is PG40; such as TRC8; for example is TR2-11; such as OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6. For example GPIIb; such as vitronectin receptor alpha subunit; for example is integrin alpha-7; such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3 chain; for example is RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein; FOR EXAMPLE GLVR1; for example is Mr 110,000 antigen; for example is syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63 antigen; such as multispinning membrane protein; for example is DDR; such as auto-crine motility factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as IGF1R, for example is insulin-like growth factor II receptor; such as SAS; for example is TAPA-1; such as MICB; for example is MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-chain; such as HLA-DP; for example is bone small proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor; such as metabotropic glutamate receptor type 4; for example is metabotropic glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very low density lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor homolog TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C; such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example is CD151; such as surface antigen; for example is

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

9

- MAG; such as GPR19; for example is pcta-1; such as PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-HT1D~); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR6; for example is tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OC15; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such as TGFBR2; for example is TGFBR3; such as precursor of epidermal growth factor receptor.
- It is a fourth objective of the present invention to provide uses of a cell surface molecule identified according to the methods described by the present invention as a drug target, wherein said drug target is capable of binding a binding partner and internalising said binding partner into cells expressing said cell surface molecule. Furthermore, the present invention provides uses of a cell surface molecule which preferably comprises or essentially consists of or for example is GRIA2, such as LPR8, for example is CHRNA5, such as TMEFF, for example is NPTXR, such as Transferrin receptor; such as type II membrane protein clone: for example is HP10481; such as type II membrane protein clone: such as HP10390; for example is PG40; such as TRC8; for example is TR2-11; such as OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6, For example GPIIb; such as vitronectin

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

10

receptor alpha subunit; for example is integrin alpha-7; such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3 chain; for example is RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein; FOR EXAMPLE 5 GLVR1; for example is Mr 110,000 antigen; for example is syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63 antigen; such as multispinning membrane protein; for example is DDR; such as autocrine motility 10 factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as IGF1R, for example is insulin-like growth factor II receptor; such as SAS; for example is TAPA-1; such as MICB; for example is MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-chain; such as HLA-DP; for example is bone small proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-gamma receptor alpha 15 chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor; such as metabotropic glutamate receptor type 4; for example is metabotropic glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as CD44; for example is low 20 density lipoprotein receptor; such as very low density lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor homolog TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C; such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such as L1-CAM; for 25 example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example is CD151; such as surface antigen; for example is MAG; such as GPR19; for example is pcta-1; such as PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-HT1D~); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR6; for example is 30 tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for 35 example is CRH2R; such as OC15; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

11

1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such as TGFBR2; for example is TGFBR3; such as precursor of epidermal growth factor receptor as drug target, wherein said drug target is capable of binding a binding partner and internalising said binding partner into cells expressing said cell surface molecule.

It is a fifth objective of the present invention to provide methods of identifying and/or preparing specific binding partners comprising the steps of

- i) Providing a cell surface molecule identified by the methods described by the present invention
- ii) Identifying and/or preparing binding partners capable of associating with said cell surface molecules

It is furthermore an objective of the present invention to provide methods of identifying and/or preparing specific binding partners comprising the steps of

- i) Providing a cell surface molecule which preferably comprises or essentially consists of or for example is Transferrin receptor; such as type II membrane protein clone: for example is HP10481; such as type II membrane protein clone: such as HP10390; for example is PG40; such as TRC8 ; for example is TR2-11; such as OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6, For example GPIIb; such as vitronectin receptor alpha subunit; for example is

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

12

integrin alpha-7; such as integrin alpha E precursor; for example is
 integrin alpha 6B; such as integrin alpha 5 subunit; for example is
 integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3 chain; for example is
 RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for
 5 example is putative transmembrane GTPase; such as membrane
 cofactor protein; FOR EXAMPLE GLVR1; for example is Mr 110,000
 antigen; for example is syndecan-1; such as putative seven
 transmembrane domain protein; for example is LCA-homolog/ LAR
 protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63 antigen;
 10 such as multispinning membrane protein; for example is DDR; such
 as autocrine motility factor receptor; for example is insulin receptor
 precursor; such as IGF1R; for example is insulin-like growth factor II
 receptor; such as SAS; for example is TAPA-1; such as MICB; for
 example is MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-
 15 chain; such as HLA-DP; for example is bone small proteoglycan I
 biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-
 gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric
 immunoglobulin receptor; such as metabotropic glutamate receptor
 type 4; for example is metabotropic glutamate receptor 8; such as
 20 CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as MAGE5a; for example is
 MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such as MAGE-9;
 for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such
 as CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very
 low density lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin
 25 B receptor homolog TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor
 binding protein precursor; such as NTR2 receptor; for example is
 RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C; such as alpha 2
 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such
 as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example
 30 is TE2; such as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for
 example is CD151; such as surface antigen; for example is MAG;
 such as GPR19; for example is pcta-1; such as PRAME; for example
 is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such
 as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor
 35 (5-HT1D-); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3;

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

13

- such as DR6; for example is tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OC15; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such as TGFBR2; for example is TGFBR3; such as precursor of epidermal growth factor receptor.
- 25 ii) Identifying and/or preparing binding partners capable of associating with said cell surface molecules.

A further objective of the present invention is to provide isolated and/or purified specific binding partners capable of associating with cell surface molecules, which are expressed at a different level in malignant cells compared with normal cells, identified by the methods provided by the present invention. The present invention also provides isolated and/or purified specific binding partners capable of associating with a cell surface molecule which preferably comprises or essentially consists of or for example is GRIA2, such as LPR8, for example is CHRNA5, such as TMEFF, for example is NPTXR, such as Transferrin receptor; such as type II

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

14

membrane protein clone; for example is HP10481; such as type II membrane protein clone; such as HP10390; for example is PG40; such as TRC8; for example is TR2-11; such as OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6; For example GPIIb; such as vitronectin receptor alpha subunit; for example is 5 integrin alpha-7; such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3 chain; for example is RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein; FOR EXAMPLE GLVR1; for example is Mr 110,000 10 antigen; for example is syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63 antigen; such as multispinning membrane protein; for example is DDR; such as autocrine motility factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as IGF1R, for example is insulin-like growth factor II receptor; such as SAS; for example is TAPA-1; such as MICB; for example is MHC class II HLA- 15 DR7-associated glycoprotein beta-chain; such as HLA-DP; for example is bone small proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor; such as metabotropic glutamate receptor type 4; for example is 20 metabotropic glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very low density lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor 25 homolog TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C; such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example 30 is CD151; such as surface antigen; for example is MAG; such as GPR19; for example is pcta-1; such as PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-HT1D~); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR6; for example is tumor necrosis factor receptor; such as 35 HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor;

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

15

for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OCI5; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such as TGFBR2; for example is TGFBR3; such as precursor of epidermal growth factor receptor.

20 It is also an objective of the present invention to provide methods of identifying novel drug targets, comprising the steps of

- i) Providing a binding partner as described in the present invention
- ii) Identifying potential drug targets capable of associating with said binding partner

25

It is yet another objective of the present invention to provide drug targets identified by the methods described by the present invention.

30 Furthermore, it is an objective of the present invention to provide targeting complexes comprising:

- i) A binding partner as described by the present invention; and
- ii) A bioreactive species

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

16

wherein the targeting complex is capable of binding a cell surface molecule identified according to the methods described by the present invention and capable of being internalised into cells bearing said cell surface molecule.

5 The present invention also provides uses of binding partners as describes by the invention for the preparation of targeting complexes according to the invention.

It is yet a further objective of the present invention to provide pharmaceutical compositions comprising of the targeting complexes described by the present
10 invention together with a pharmaceutically acceptable carrier.

It is even a further objective of the present invention to provide methods of treatment of a premalignant and/or malignant conditions in an individual in need thereof, comprising administering to said individual a pharmaceutically effective amount of the
15 targeting complexes described by the present invention.

Furthermore, it is an objective of the present invention to provide uses of the targeting complex described by the present invention for the preparation of a medicament for the treatment of a premalignant and/or malignant conditions in an
20 individual in need thereof.

Legend to figures

25 Fig. 1 illustrates the principle of targeted gene therapy.

Fig. 2 illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR. The figure shows a quality test of cDNA used for RT-PCR validation of Chips analysis by RT-PCR of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).
30

Fig. 3 illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR for Pro 221 (IA-1).

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

17

- Fig. 4. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of Pro 30 (KIA0042).
- 5 Fig. 5. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of Pro 41 (MAD2).
- Fig. 6. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of Pro 210 (lamin B1).
- 10 Fig. 7 illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of Pro 71 (CDKN2A).
- Fig. 8 illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of cell surface molecule DR6.
- 15 Fig. 9. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of cell surface molecule LRP8.
- Fig. 10. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of cell surface molecule NTPXR.
- 20 Fig. 11. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of cell surface molecule NCAM1.
- 25 Fig. 12A illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of cell surface molecule GluR2 (GRIA2).
- Fig. 12B illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and RT-PCR of cell surface molecule ITGAV.
- 30 Fig. 13 illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and western blotting of mGluR8.
- Fig. 14. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and western blot analysis for NPTXR.
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

18

Fig. 15. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and western blot analysis for NCAM1.

5 Fig. 16. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and western blot analysis for GluR2 (GRIA2).

Fig. 17. illustrates a comparison between gene expression measured by Chips analysis and western blot analysis for ITGAE.

10

Detailed description of the invention

Definitions

15 Binding partner: See "cell surface molecule binding partner".

Bioreactive species: Any molecule, which can directly or indirectly exert a biological influence on a target cell.

20 Bp: Base pair

Cell surface molecules: Molecules naturally associated with the cell surface.

25 Cell surface molecule binding partner: Any molecule that can associate specifically with a cell surface molecule. Throughout the text the terms "Cell surface molecule binding partner" and the shorter term "binding partner" are used interchangeably and both terms are equivalent to one another throughout the text.

30 Enhancer: Nucleic acid sequence, which can enhance the transcription of a second nucleic acid sequence operably linked thereto.

First nucleic acid sequences: Nucleic acid sequences, which are capable of directing expression of second nucleic acid sequences operably linked thereto.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

19

Normal cells: Non-malignant cells that are of non-malignant origin.

Normal tissue: Non-malignant tissue

5

Promoter: First nucleic acid sequences, which are capable of directing expression of second nucleic acid sequences operably linked thereto.

10

Second nucleic acid sequences: Nucleic acid sequences, which are capable of being expressed, such as mRNA may be transcribed from such nucleic acid sequences, when they are operably linked to first nucleic acid sequences.

15

Silencer: A nucleic acid sequence, which is capable of repressing the transcription of a second nucleic acid sequence operably linked thereto.

Targeting complex: Complex which comprises at least one binding partner and a bioreactive species and which is capable of be internalised into cells.

Embodiments of the invention

20

It is becoming increasingly obvious, that if gene therapy of cancer is to become an effective, alternative or adjuvant treatment of cancer, in particular of disseminated disease, several requirements must be resolved. These include for example i) targeting of the complex to be efficient and cancer specific; ii) expression of the therapeutic gene to be efficient and cancer specific and iii) that the molecular conjugate is non-immunogenic, has a high stability after systemic administration and is able to cross capillary barriers.

25

In one preferred embodiment, the present invention relates to the use of novel, high throughput screening methods for identification of genes specifically expressed by cancer cells and their application for double-targeted gene transfer and expression of therapeutic genes for treatment of cancer. An example of the principle of double-targeted gene transfer is outlined in figure 1. The screening methods according to the present invention enable the identification of novel molecules expressed by the cancer cells.

30

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

20

In one embodiment the method will be applied on identification of gene expression of suitable molecules expressed by small cell lung cancer (SCLC) cells. Small cell lung cancer is a highly aggressive neoplasm, comprising of approximately 25% of all lung cancer cases. The disease is almost always disseminated at the time of diagnosis. SCLC is treated with different chemotherapeutic drugs alone or in combination with radiation therapy. Despite intensive attempts to improve treatment, and regardless of the fact that most patients respond well to the treatment in the beginning, the mortality rate is high. Existing cancer treatments are able to cure only 5-7% of these patients and the 5-year survival rate is extremely poor (5-15%). SCLC patients therefore are in great need of the development of new therapies.

The molecular phenotype of the disease has been thoroughly characterised and the aberrant expression of oncogenes (particularly of the *myc*-family) in addition to the loss of function of several tumour suppressor genes (such as p53 and Rb) have been found for more than 80% of SCLC tumours. These phenotypes are also found most cell lines deriving from SCLC tumours (reviewed in Frederiksen et al., 1999), allowing the cell lines to be used as an experimental tool for *in vitro* testing of potential anticancer drugs. In addition, these cell lines can be propagated *in vivo* in nude mice, thus allowing testing of developed drugs in an *in vivo* situation. Therefore cell lines derived from SCLC will be used for the initial screening of gene expression for identification of cancer specific (or highly expressed) surface molecules and regions with particular transcriptional activity (promoters) in SCLC cells.

It is preferred that a variety of different SCLC cell lines established by different laboratories and from different patients are used with the present invention, in order to identify genes expressed in a large number of SCLCs. Furthermore, it is preferred that expression in these SCLC cell lines is compared with expression in a variety of normal tissues, which preferably is representative of different tissues of endodermal, ectodermal and mesodermal origin.

It is possible within the present invention to apply a biphasic strategy, however in certain embodiments of the present invention other strategies may be applied. A biphasic strategy according to the present invention may for example be a gene therapy drug that via systemic administration can target cancer cells effectively through binding to functional, transport-competent receptors on the surface and which subsequently allows expression of the gene effectively in the cancer cells by a promoter, which is specifically active or hyperactive in the cancer cells.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

21

Amino acids and nucleic acids

5 Throughout the description and claims either the one letter code or the three letter code for natural amino acids are used. Where the L or D form has not been specified it is to be understood that the amino acid in question has the natural L form, cf. Pure & Appl. Chem. Vol. (56(5) pp 595-624 (1984) or the D form, so that the peptides formed may be constituted of amino acids of L form, D form, or a sequence of mixed L forms and D forms.

10 Where nothing is specified it is to be understood that the C-terminal amino acid of a polypeptide of the invention exists as the free carboxylic acid, this may also be specified as "-OH". The N-terminal amino acid of a polypeptide comprise a free amino-group, this may also be specified as "H-".

15 Where nothing else is specified amino acid can be selected from any amino acid, whether naturally occurring or not, such as alpha amino acids, beta amino acids, and/or gamma amino acids. Accordingly, the group comprises but are not limited to: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, 20 Lys, Arg, His, Aib, Nal, Sar, Orn, Lysine analogues DAP and DAPA.

The term "nucleic acid" is meant to encompass DNA and RNA as well as derivatives thereof such as peptide nucleic acids (PNA) or locked nucleic acids (LNA) throughout the description.

25

Methods to identify cell surface molecules and promoters

The methods used to identify cell surface molecules and/or first nucleic acid sequences, which are capable of directing expression of second nucleic acid 30 sequences operably linked thereto according to the present invention preferably involve the comparison of levels of mRNA found in malignant cell lines with the levels of mRNA found in normal tissues.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

22

Preferably, the malignant cell lines according to the present invention are mammalian cell lines, more preferably human cell lines. Yet more preferably, the cell lines are derived from small cell lung carcinomas (SCLC). Even more preferably, the cell lines are selected from the group consisting of CPH 54 A, CPH 54 B, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI H69, NCI N417, MAR H24 and MAR 86 MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-44 and SW 1271. More preferably, the cell lines are selected from the group consisting of CPH 54 A, CPH 54 B, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI H69, NCI N417, MAR H24 and MAR 86 MI.

Yet even more preferably the cell lines are selected from the group consisting of CPH 54A, CPH 54 B, CHP 136A, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI-H69, NCI-N417, MAR H24 and MAR 86MI.

Most preferably, the cell lines are selected from the group consisting of DMS 53, DMS 70, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, NCI 417 and NCI H69.

Preferred cell lines according to the present invention are listed in table 1 together with their accession numbers.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

23

Table 1

5

Deposit Accession numbers of small cell lung cancer cell lines

SCLC cell line	Culture Collection	(Provisional) Accession no.	Depositor
CPH 54A	ECACC	01061905	ODIN Medical A/S
CPH 54B	ECACC	01061906	
GLC 2	ECACC	01061907	
GLC 3	ECACC	01061908	
GLC 14	ECACC	01061909	
GLC 16	ECACC	01061910	
GLC 19	ECACC	01061911	
GLC 26	ECACC	01061912	
GLC 28	ECACC	01061913	
DMS 406	ECACC	01061914	
DMS 456	ECACC	01061915	
MAR H 24	ECACC	01061916	
MAR 86 MI	ECACC	01061917	
DMS 53	ATTC	CRL-2062	O.S Pettengill; G. Sorensen
	ecacc	95062823	
DMS 79	ATTC	CRL-2049	
	ecacc	95062824	
DMS 92	ecacc	950662825	
DMS 114	ATTC	CRL-2066	
DMS 153	ATTC	CRL-2064	
	ecacc	95062827	
DMS 273	ecacc	95062830	A.M. Koros
SHP-77	Ecacc	98110201	
	ATTC	CRL-2195	

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

24

NCI-H2171	ATTC	CRL-5929	A.F. Gazdar; J.D. Minna
NCI-H2195		CRL-5931	
NCI-H2196		CRL-5932	
NCI-H2198		CRL-5933	
NCI-H2227		CRL-5934	
NCI-H2286		CRL-5938	
NCI-H2330		CRL-5940	
NCI-H735		CRL-5978	
NCI-H1339		CRL-5979	
NCI-H1963		CRL-5982	
NCI-H2107		CRL-5983	
NCI-H2108		CRL-5984	
NCI-H1304		CRL-5862	
NCI-H1341		CRL-5864	
NCI-H1417		CRL-5869	
NCI-H1436		CRL-5871	
NCI-H1522		CRL-5874	
NCI-H1618		CRL-5879	
NCI-H1672		CRL-5886	
NCI-H1694		CRL-5888	
NCI-H1836		CRL-5989	
NCI-H1870		CRL-5901	
NCI-H1876		CRL-5902	
NCI-H1882		CRL-5903	
NCI-H1926		CRL-5905	
NCI-H1930		CRL-5906	
NCI-H1994		CRL-5910	
NCI-H2029		CRL-5913	
NCI-H2059		CRL-5916	
NCI-H2066		CRL-5917	
NCI-H2081		CRL-5920	
NCI-H2141		CRL-5927	
NCI-H211		CRL-5824	
NCI-H220		CRL-5825	
NCI-H250		CRL-5828	

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

25

NCI-H524		CRL-5831	
NCI-H592		CRL-5832	
NCI-H711		CRL-5836	
NCI-H719		CRL-5837	
NCI-H740		CRL-5840	
NCI-H748		CRL-5841	
NCI-H774		CRL-5842	
NCI-H841		CRL-5845	
NCI-H847		CRL-5846	
NCI-H865		CRL-5849	
NCI-H1048		CRL-5853	
NCI-H1059		CRL-5854	
NCI-H1092		CRL-5855	
NCI-H1105		CRL-5856	
NCI-H1184		CRL-5858	
NCI-H1238		CRL-5859	
NCI-H1284		CRL-5861	
NCI-H1688		CCL-257	
NCI-H187		CRL-5804	
NCI-H378		CRL-5808	
NCI-H526		CRL-5811	
NCI-H660		CRL-5813	
NCI-H889		CRL-5817	
NCI-H60		CRL-5821	
NCI-H196		CRL-5823	
NCI-H446		HTB-171	
NCI-H209		HTB-172	
NCI-H146		HTB-173	
NCI-H82		HTB-175	
NCI-H460		HTB-177	
NCI-H345		HTB-180	
NCI-H510A		HTB-184	
NCI-128		HTB-120	A.F.Gazdar
NCI-446		HTB-171	
NCI H 69		HTB-119	
SW 1271		CRL-2177	W. McCombs

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

26

The methods for example involve at least 4, such as at least 5, for example at least 6, such as at least 8, for example at least 10, such as at least 12, for example at least 14, such as at least 16, for example at least 18, such as at least 20, for example 21, such as at least 25, for example at least 30, such as at least 40, for example at least 50, such as at least 60, for example at least 70, such as around 79 malignant cell lines selected from the group consisting of CPH 54 A, CPH 54 B, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI H69, NCI N417, MAR H24 and MAR 86 Mi, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446 and SW 1271.

In one preferred embodiment of the invention the method involve all of the cell lines DMS 53, DMS 70, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, NCI 417 and NCI H69.

The cell lines may be cultured by any suitable means, for example the cell lines may be cultured in an in vitro cell culture under suitable conditions known to the person skilled in the art. In one embodiment of the present invention, one or more cell lines are cultured in vivo in an animal as a xenograft. The animal may be any suitable animal, preferably a mammal, more preferably a rodent, most preferably a mouse. An example of how cell lines may be cultured in vivo as a xenograft is given in example 1.

It is also comprised within the present invention that the same cell line may cultured in an in vitro cell culture and may be cultured in vivo.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

27

- In general, in vivo culture conditions i.e. culturing as a xenograft in an animal more closely resembles a natural occurring tumour or cancer and hence it is usually preferred that at least one, such as at least 2, for example at least 3, such as at least 4, for example at least 5, such as at least 6, for example at least 7, such as at least 8 cell lines are cultured in vivo. More preferably, in the range of 1 to 79, such as 2 to 70, for example 3 to 60, such as 4 to 50, for example 5 to 40, such as 6 to 30, for example 7 to 20 cell lines are cultured in vivo. Even more preferably around 8 cell lines are cultured in vivo.
- 10 Preferably, the cell lines cultured in vivo are selected from the group of cell lines mentioned in table 1, even more preferably, the cell lines cultured in vivo are selected from the group consisting of CPH 54A, CHP 136A, GLC 3, GLC 14, DMS 273, NCI-H69, NCI-N417 and MAR H24.
- 15 Normal tissues are tissues, which are non-malignant. Preferably, such tissue is derived from an individual, which do not suffer from a premalignant and/or malignant condition. More preferably, the normal tissues are mammalian tissues, even more preferably, the tissues are human tissues. Yet more preferably, the tissues are selected from the group consisting of liver, heart, kidney, lung, adrenal gland, colon, pancreas, small intestine, spleen, skeletal muscle, trachea, prostate, placenta, salivary gland, testes, leucocytes, leucocytes, brain, adipose tissue, bladder, breast, cervix, esophagus, larynx, ovary, rectum, skin, spinal cord, stomach, thymus, thyroid and uterus. Even more preferably, the tissues are selected from the group consisting of brain, adrenal gland, lung, kidney, heart, trachea, prostate, salivary gland, thyroid, liver, pancreas, spleen, small intestine, skeletal muscle, colon, stomach and testes. Most preferably the tissues are selected from the group consisting of lung, liver, heart and kidney.
- 20
- 25
- 30 Preferably, the method involves at least 3, for example at least 4, such as at least 5, for example at least 6, such as at least 8, for example at least 10 total RNA samples.
- The method may be any method suitable to compare the level of mRNA found in malignant cell lines with the levels of mRNA found in normal tissues known to the person skilled in the art. In general such method involves purification of either
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

28

mRNA or total RNA. Purification of RNA may be performed according to any standard method known to the person skilled in the art as for example described in Sambrook et al, 1989 or herein below in the examples.

- 5 The RNA samples may be compared by a number of different techniques. Any suitable technique may be applied with the present invention. For example the RNA samples can be compared by differential display or by subtractive hybridisation. Furthermore, techniques involving hybridisation of labelled RNA or cDNA pools with known nucleic acid sequences are suitable with this invention. The known nucleic acids may for example be immobilised on a solid support prior to hybridisation for example on a membrane, such as a nitrocellulose membrane, or the solid support may be of plastic or of glass.

- 15 The labelled RNA or cDNA may be labelled with any directly or indirectly detectable label for example an enzyme, a radioactive isotope, chromophore, a fluorescent group or a heavy metal. Furthermore, the label may be one part of a pair of binding partners, wherein the second part is detectable, either directly or indirectly. For detection of an indirectly detectable label, it is possible to use a "sandwich" system, such as be one part of a pair of binding partners is recognised by the second part, which is in turn recognised by the first part, which may again be recognised by the second part. In every step the first and/or second part may be labelled. Examples of pairs of binding partners are antigen/antibodies or biotin/streptavidin. However, any other suitable pair can also be employed with the present invention.

- 25 In one embodiment of the present invention the method comprises the steps of:

- i) Isolating RNA comprising mRNA from the malignant cell lines
- ii) Preparing cDNA populations from said RNA, wherein one cDNA population is prepared from RNA isolated from one cell line or one tissue sample
- 30 iii) Labelling each cDNA population with a detectable label
- iv) Providing solid supports on which an array of known nucleic acid sequences has been immobilised
- v) Incubating each cDNA population with a solid support under conditions which allows for hybridisation
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

29

vi) Detecting said detectable label on the solid supports

Preferably said detectable label is an indirectly detectable label, more preferably the label is one part of a pair of binding partners, wherein the second part is detectable, either directly or indirectly. Most preferably the label is biotin. The biotin can be detected with a labelled streptavidin species, preferably a fluorescently labelled streptavidin. More preferably, the streptavidin may furthermore associate with an anti-streptavidin antibody labelled with biotin, which in turn may be detected by labelled streptavidin, preferably fluorescently labelled. The fluorescent label may for example be phycoerythrin or any other suitable fluorescent label.

In one preferred embodiment the solid support is a glass plate. Preferably, at least 1000, such as at least 5000, for example at least 10,000, such as at least 50,000, such as at least 100,000, for example at least 150,000, such as at least 200,000, for example around 240,000 different known nucleic acid sequences are immobilised on the solid support. These nucleic acid sequences may all be derived from different genes, however, more preferably, each gene is represented by more than one, such as more than 2, for example more than 4, such as more than 7, for example more than 10, such as more than 15, for example more than 20, preferably around 20 different nucleic acid sequences.

In one embodiment of the present invention the RNA samples may be compared by a CHIPS analysis or a GeneChips analysis. The terms CHIPS analysis and GeneChips analysis are used interchangeably throughout the description. An example of how to perform a CHIPS analysis is given in example 1.

Suitable cell surface molecules are selected according to several criteria. Preferably, there is a difference between the amount of mRNA expressed in one or more cell lines used in the method according to the present invention and the amount of mRNA expressed in one or more tissues according to the present invention. Preferably the difference is at least 1.1 fold, such as 1.2 fold, such as 1.5-fold, such as 1.75 fold, such as 2-fold, such as 2.5 fold, such as at least 3-fold, for example at least 4-fold, such as at least 5-fold, for example at least 7.5 fold, such as at least 10 fold difference in mRNA expression. In one preferred embodiment the difference is an in principle unlimited number of fold, such as there is no detectable mRNA expressed

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

30

in one or more cell lines and mRNA is detectable in one or more normal tissues, or there is no detectable mRNA expressed in one or more normal tissues and mRNA is detectable in one or more cell lines.

5 Furthermore, there is preferably essentially no difference in the amount of mRNA expressed in at least two, such as at least 3, for example at least 4, such as at least 5, for example at least 6, such as at least 8, for example at least 10, such as at least 12, for example at least 14, such as at least 16, for example at least 18, such at
10 least 20, for example 21, such at least 25, for example at least 30, such as at least 40, for example at least 50, such as at least 60, for example at least 70, such as around 79 malignant cell lines used in the method according to the present invention.

15 Additionally, there is preferably essentially no difference in the amount of mRNA expressed in at least two, such as at least 3, for example at least 4, such as at least 5, for example at least 6, such as at least 8, for example at least 10 tissue samples, from which total RNA was used according to the methods of the present invention.

20 Nucleic acid sequences encoding for potential cell surface molecules are selected from nucleic acid sequences that full fill the above criteria. In one particular preferred embodiment the potential cell surface molecules are identified as outlined in example 1 and selected according to the criteria described in that example.

25 To determine what nucleic acid sequences encode potential cell surface molecules different strategies may be employed. For example potential cell surface molecules may be selected according to information available in commonly accessible databases. Such databases may for example be selected from the group consisting of PubMed (NCBI), Nucleotide (NCBI), Protein (NCBI), Structure (NCBI), OMIM (NCBI) and LocusLink (NCBI). NCBI is the abbreviation for National Center for Biotechnol-
30 ogy Information. Furthermore, potential cell surface molecules may be selected based on the presence of one or more of selected terms in name of the potential cell surface molecules. For example said terms may be selected from the group consisting of receptor, membrane, adhesion, integrin, surface, antigen, syndecan, transport, channel, hormone, binding, glycoprotein, matrix, CAM, desmosome, gap
35 junction, delta, immunoglobulin, MHC, CD, HSPG, CSPG, integral and notch.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

31

Alternatively, nucleic acid sequences encoding for potential cell surface molecules are selected according to sequence homology with known cell surface molecules. Nucleic acid sequences encoding potential cell surface molecules should have at least 20%, for example at least 22.5%, such as at least 25%, for example at 27.5%, such as at least 30% sequence identify with nucleic acid sequences encoding known cell surface molecules.

The nucleic acid sequences encoding potential cell surface molecules may also be selected based on sequence homology with domains comprised within known cell surface molecules. Preferably, there is at least 20%, for example at least 22.5%, such as at least 25%, for example at 27.5%, such as at least 30%, for example at least 32.5%, such as at least 35%, for example at least 37.5%, such as at least 40%, for example at least 42.5%, such as at least 45%, for example at least 47.5%, such as at least 50% sequence identify between domains of the nucleic acids encoding potential cell surface molecules and nucleic acid sequences encoding domains of known cell surface molecules.

Nucleic acid sequences encoding potential cell surface molecules may also be selected based on that the potential cell surface molecules comprise a domain, which is often associated with the cell surface. Such a domain may for example be selected from the group consisting of hydrophobic regions and potential glycosylation sites.

In one embodiment of the present invention candidate cell surface molecules have been identified by a Chips analysis. Suitable cell surface molecules may then be selected based on several criteria. For example cell surface molecules, which scored present (P) in the absolute call and with an Average difference of for example >10, such as >20, for example >40, such as >50 may be included.

Furthermore, it is possible to make a point system to identify suitable cell surface molecules. For example a gene encoding a cell surface molecule may be set to score a number of points, such as one point for each cell line or tissue expressing the gene. The total scores for each gene may be summarised for normal tissue and the SCLC cell lines, respectively. Genes may then be selected, which were scored present in at least 3, such as 4, for example 5, such as 6, for example 7, such as 8,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

32

for example 9, such as 10, for example more than 10 of the SCLC lines. A preferred method of selecting cell surface molecules is described in example 1.

5 The present invention also provides methods for identifying first nucleic acid sequences, which are capable of directing expression of second nucleic acid sequences operably linked thereto. These methods involves identifying second nucleic acid sequences, which are expressed at a level, which is different in malignant cells compared with normal cells.

10 Accordingly, there is preferably a difference between the amount of second nucleic acid sequence mRNA expressed in one or more cell lines and the amount of second nucleic acid sequence mRNA expressed in one or more tissues. More preferably, the difference is at least 1.1 fold, such as 1.2 fold, such as 1.5-fold, such as 1.75 fold, such as 2-fold, such as 2.5 fold, such as at least 3-fold, for example at least 4-
15 fold, such as least 5-fold, for example at least 7.5 fold, such as least 10 fold difference in mRNA expression.

In one preferred embodiment the difference is an in principle unlimited number of fold, such as there is no detectable second nucleic sequence mRNA expressed in
20 one or more cell lines and said mRNA is detectable in one or more normal tissues, or there is no detectable second nucleic acid sequence mRNA expressed in one or more normal tissues and said mRNA is detectable in one or more cell lines.

25 Furthermore, there is preferably essentially no difference in the amount of second nucleic acid sequence mRNA expressed in at least two, such as at least 3, for example at least 4, such as at least 5, for example at least 6, such as at least 8, for example at least 10, such as at least 12, for example at least 14, such as at least 16, for example at least 18, such as at least 20, for example 21, such as at least 25, for example at least 30, such as at least 40, for example at least 50, such as at least
30 60, for example at least 70, such as around 79 malignant cell lines used with the methods of the present invention.

Additionally, there is preferably essentially no difference in the amount of second nucleic acid sequence mRNA expressed in at least two, such as at least 3, for

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

33

example at least 4, such as at least 5, for example at least 6, such as at least 8, for example at least 10 normal tissue samples.

- 5 In one particularly preferred embodiment the second nucleic acid sequences are identified according to the method described in example 1. Most preferably, the criteria outlined in that example are applied to select useful second nucleic acid sequences.
- 10 In one embodiment of the present invention candidate promoters have been identified by a Chips analysis. Suitable promoters may then be selected based on several criteria based on expression level of the gene which the promoter controls. For example only genes, which scored present (P) in the absolute call and with an Average difference of >10, such as >20, for example >30, such as >40, for example >50 (level of expression) may be included included. A point scoring system as
- 15 described herein above may be used. Genes that scored present in for example at least 3, such as at least 4, for example at least 5, such as at least 6, for example at least 7, such as at least 8, for example at least 9, such as at least 10, for example at least 11, such as at least 12 SCLC lines may for example be selected. If a gene scores present in one or more normal tissues, the median Average difference value
- 20 of the SCLC cell lines should preferably be 4 times or more above the median Average difference value of the normal tissue. Preferably promoters with an Average differences of expression for normal tissues <50 and for SCLC>100 are selected. More preferably, promoters with an Average differences of expression for normal tissues <50 and for SCLC>200. Most preferably, promoters with an Average
- 25 differences of expression for normal tissues <50 and for SCLC>400. Alternatively, promoters with an Average differences of expression in SCLC > 8 times higher than for normal tissue may be selected. . A preferred method of selecting cell surface molecules is described in example 1.
- 30 Once second nucleic acid sequences have been identified according to the above mentioned criteria, it is possible to identify first nucleic acid sequences operably linked to the second nucleotide sequences. This can be done according to any standard method known to the person skilled in the art. For example it is possible to take advantage of known human genome sequences.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

34

Cell surface molecules

5 A cell surface molecule according to the present invention is any molecule naturally associated with the cell surface. Cell surface molecules may not be associated with the cell surface throughout their life time, but may be associated with the cell surface only at specific times. Cell surface molecules within the scope of the present invention may be any kind of molecule associated with the cell surface, however the cell surface molecules according to the present invention preferably comprise a polypeptide.

10

In one embodiment of the present invention cell surface molecules are not associated with the cell surface, but rather are intracellular receptor. Intracellular receptors for example include nuclear steroid hormone receptors.

15

However, in other preferred embodiments of the invention, cell surface molecules include for example molecules that are associated directly with the cell surface for example via a transmembrane domain, a membrane anchoring domain or a covalently linked group, which can associate with the membrane such as for example a lipophilic group. A lipophilic group may for example be a glycosyl-phosphatidylinositol group (GPI). However, it also includes molecules which are indirectly associated with the cell surface for example molecules that can associate with other cell surface molecules which are either directly or indirectly associated with the cell surface.

20

25

In general a cell surface molecule comprise at least one extracellular domain, however a cell surface molecule may comprise more than one extracellular domain such as 2, for example 3, such as 4, for example 5, such as 6, for example 7, such as 8, for example 9, such as 10, for example more than 10 extracellular domains.

30

Frequently, cell surface molecules are glycosylated polypeptides.

35

In one preferred embodiment of the present invention, cell surface molecules are capable of associating with specific binding partners, and capable of internalising said specific binding partners upon association, i.e. after association between binding partner and cell surface molecule, the binding partner is transferred to the inte-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

35

rior of the cell expressing the cell surface molecule. Frequently, the binding partner will be internalised by receptor mediated endocytosis, but other mechanisms are also possible and within the scope of the present invention. Cell surface molecules capable of internalising a binding partner may for example be useful for radio-, toxin-
5 or gene therapy or cancer vaccines.

In another preferred embodiment of the present invention, cell surface molecules are capable of associating with specific binding partners at the cell surface, but are not capable of internalising said specific binding partners. Non-internalising cell
10 surface molecules may for example be useful for radio-therapy and cancer vaccines.

Accession numbers from GenBank and names of preferred cell surface molecules are given in table 2.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

36

Table 2

Accession	Cell surface molecule	Gene name	SEQ ID (cDNA/DNA)	SEQ ID (protein)
M11507	Transferrin receptor	Human transferrin receptor mRNA, complete cds.	1	2
X01060	Transferrin receptor	Human mRNA for transferrin receptor.	3	4
AB015633	HP10481	Homo sapiens mRNA for type II membrane protein, complete cds clone:HP10481.	5	6
M14219	PG40	Human chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan (PG40) core protein mRNA, complete cds.	7	8
AF064801	TRC8	Homo sapiens multiple membrane spanning receptor TRC8 (TRC8) mRNA, complete cd	9	10
M29960	TR2-11	Human steroid receptor (TR2-11) mRNA, complete cds.	11	12
X69398	OA3 antigenic surface determinant	H.sapiens mRNA for OA3 antigenic surface determinant	13	14
X53586	Integrin alpha 6	Human mRNA for integrin alpha 6.	15	16
M34480	GPIIb	Human platelet glycoprotein IIb (GPIIb) mRNA, complete cds	17	18
M14648	Vitronectin receptor alpha subunit; also designated ITGAV	Human cell adhesion protein (vitronectin) receptor alpha subunit; ITGAV mRNA, complete cds.	19	20
AF032108	Integrin alpha-7	Homo sapiens integrin alpha-7 mRNA,	21	22

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

37

		complete cds.		
M35011	Integrin beta-5 subunit	Human integrin beta-5 subunit mRNA, complete cds.	23	24
X53002		Human mRNA for integrin beta-5 subunit.	25	26
L25851	Integrin alpha E precursor; also designated ITGAE	Homo sapiens integrin alpha E precursor; ITGAE, mRNA, complete cds.	27	28
S66213	Integrin alpha 6B	Integrin alpha 6B [human, mRNA Partial, 528 nt].	29	30
X06256	Integrin alpha 5 subunit	Human mRNA for integrin alpha 5 subunit.	31	32
M59911	Integrin alpha-3 chain	Human integrin alpha-3 chain mRNA, complete cds.	33	34
S59184	RYK	RYK=related to receptor tyrosine kinase [human, hepatoma, mRNA, 3068 nt].	35	36
U50939	Amyloid precursor protein-binding protein 1	Human amyloid precursor protein-binding protein 1 mRNA, complete cds.	37	38
U95822	Putative transmembrane GTPase	Human putative transmembrane GTPase mRNA, partial cds.	39	40
X59408	Membrane cofactor protein	H.sapiens, gene for Membrane cofactor protein.	41	
L20859	GLVR1	Human leukemia virus receptor 1 (GLVR1) mRNA, complete cds.	42	43
D64154	Mr 110,000 antigen	Human mRNA for Mr 110,000 antigen, complete cds.	44	45

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

38

		Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain LIKE gene		47
Z48199	Syndecan-1	H.sapiens syndecan-1 gene (exons 2-5).	48	49
Y18007	Putative seven trans-membrane domain protein	Homo sapiens mRNA for putative seven transmembrane domain protein	50	51
Y00815	LCA-homolog/LAR protein	Human mRNA for LCA-homolog. LAR protein (leukocyte antigen related)	52	53
X64364	M6 antigen	H.sapiens mRNA for M6 antigen.	54	55
X62654	Me491/CD63 antigen	H.sapiens gene for Me491/CD63 antigen.	56	57
U94831	Multispanning membrane protein	Homo sapiens multispanning membrane protein mRNA, complete cds.	58	59
U48705	DDR	Human receptor tyrosine kinase DDR gene, complete cds.	60	61
M63175	Autocrine motility factor receptor	Human autocrine motility factor receptor mRNA.	62	63
AB015631	Type II membrane protein clone	Homo sapiens mRNA for type II membrane protein, complete cds, clone:HP10390.	64	65
Y00285	Insuline-like growth factor II receptor	Human mRNA for insuline-like growth factor II receptor.	66	67

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

39

U01160	SAS	Human transmembrane 4 superfamily protein (SAS) mRNA, complete cds	68	69
M33680	TAPA-1	Human 26-kDa cell surface protein TAPA-1 mRNA, complete cds	70	71
M16941	MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-chain	Human MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-chain mRNA complete cds.	72	73
J04599	Bone small proteoglycan I biglycan	Human hPGI mRNA encoding bone small proteoglycan I biglycan), complete cds	74	75
Y07593	CAR	H.sapiens mRNA for 46 kDa coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) protein.	76	77
U73682	MEA11	Human meningioma-expressed antigen 11 (MEA11) mRNA, partial cds.	78	79
U19247	Interferon-gamma receptor alpha chain	Homo sapiens interferon-gamma receptor alpha chain gene, exon 7 and complete cds.	80	81
X73079	Polymeric immunoglobulin receptor	Homo sapiens encoding Polymeric immunoglobulin receptor	82	83
X80818	Metabotropic glutamate receptor type 4	H.sapiens mRNA for metabotropic glutamate receptor type 4.	84	85
AF037339	CLPTM1	Homo sapiens cleft lip and palate transmembrane protein 1 (CLPTM1) mRNA, complete cds.	86	87
U10689	MAGE5a	Human MAGE-5a antigen (MAGE5a)	88	89

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

40

		gene, complete cds.		
U03735	MAGE-3	Human MAGE-3 antigen (MAGE-3) gene, complete cds.	90	91
M77481	MAGE-1	Human antigen (MAGE-1) gene, complete cds.	92	93
U10691	MAGE6	Human MAGE-6 antigen (MAGE6) gene, complete cds.	94	95
L33930	CD24	Homo sapiens CD24 signal transducer mRNA, complete cds and 3'region	96	97
M84349	CD59	Human transmembrane protein (CD59) gene, exon 4.	98	99
L00352	Low density lipoprotein receptor	Human low density lipoprotein receptor gene, exon 18.	100	101
AF023676	Lamin B receptor homolog TM7SF2	Homo sapiens lamin B receptor homolog TM7SF2 (TM7SF2) mRNA complete cds.	102	103
U41804	T1/ST2 receptor binding protein precursor	Human putative T1/ST2 receptor binding protein precursor mRNA, complete cds.	104	105
Y10148	NTR2 receptor	H.sapiens mRNA for NTR2 receptor.	106	107
U46194	RAGE-4	Human renal cell carcinoma antigen RAGE-4 mRNA, complete putative cds.	108	109
M90683	HLA-G1	Human lymphocyte antigen (HLA-G1) mRNA, complete cds.	110	111
AF104942	MOAT-C	Homo sapiens ABC transporter MOAT-C (MOAT-C) mRNA, complete cds.	112	113

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

41

AF042792	Alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I	Homo sapiens alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I mRNA, compl.cds.	114	115
Y00636	LFA-3	Human mRNA for lymphocyte function associated antigen-3 (LFA-3).	116	117
X59847	L1-CAM	H.sapiens mRNA for neural cell adhesion molecule L1 (HSNCAML1)	118	119
XM010168	AVPR2	Arginine-vasopressin receptor (AVPR2)		120
	C1 p115 C1	C1 p115		121
	TE2	ARD1 N-acetyl transferase related protein		122
	RbP	Renin binding protein		123
	HCF-1	Host cell factor 1		124
	IRAK	Interleukin-1-receptor associated kinase		125
D29963	CD151	Homo sapiens mRNA for CD151, complete cds.	126	127
M60922	Surface antigen	Human surface antigen mRNA, complete cds.	128	129
M29273	MAG	Human myelin-associated glycoprotein (MAG) mRNA, complete cds.	130	131
U64871	GPR19	Human putative G protein-coupled receptor (GPR19) gene, complete cds.	132	133
L78132	Pcta-1	Human prostate carcinoma tumor antigen (pcta-1) mRNA, complete cds.	134	135
U65011	PRAME	Human preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) mRNA, compl.cds.	136	137
X81882	Vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein	H.sapiens mRNA for vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein.	138	139
U65416	MICB	Human MHC class I molecule (MICB) gene, complete cds.	140	141
Y12505	Serotonin receptor 5-HT4B	H.sapiens mRNA for serotonin receptor 5-HT4B, splice variant	142	143

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

42

M38690	CD9	Human CD9 antigen mRNA, complete cds.	144	145
AF077820	LDL receptor member LR3	Homo sapiens LDL receptor member LR3 mRNA, complete cds.	146	147
U10688	MAGE-4b	Human MAGE-4b antigen (MAGE4b) gene, complete cds.	148	149
AF068868	DR6	Homo sapiens TNFR-related death receptor-6 (DR6) mRNA, complete cds.	150	151
D16532	Very low density lipoprotein receptor	Human gene for very low density lipoprotein receptor, exon 19	152	153
M81590	Serotonin 1D receptor (5-HT1D-)	Homo sapiens serotonin 1D receptor (5-HT1D-) mRNA, complete cds.	154	155
M58286	Tumour necrosis factor receptor	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor mRNA, complete cds.	156	157
AF062006	HG38	Homo sapiens orphan G protein-coupled receptor HG38 mRNA, complete cds.	158	159
U09937	Urokinase-type plasminogen receptor	Human urokinase-type plasminogen receptor, exon 7.	160	161
M22092	N-CAM; also designated NCAM1	Human neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene, exon SEC and partial cds.	162	163
M34641	FGF receptor	Human fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 mRNA, complete cds.	164	165
M14764	Nerve growth factor receptor	Human nerve growth factor receptor mRNA, complete cds.	166	167
U10694	MAGE-9	Human MAGE-9 antigen (MAGE9) gene, complete cds.	168	169
AB026891	Cystine/glutamate transporter	Homo sapiens mRNA for cystine/glutamate transporter, complete cds.	170	171
U73304	CB1 cannabinoid receptor (CNR1)	Human CB1 cannabinoid receptor (CNR1) gene, complete cds.	172	173
M69245	PSG	Human pregnancy-specific beta-1 glycoprotein (PSG) mRNA, complete cds.	174	175
AB000712	CPE receptor	Homo sapiens hCPE-R mRNA for CPE-receptor, complete cds.	176	177
AF011406	CRH2R	Homo sapiens corticotropin releasing hormone receptor type 2 beta isoform (CRH2R) mRNA, complete cds.	178	179
U50410	OC15	Human heparan sulphate proteoglycan (OC15) mRNA, complete cds.	180	181
AF016266	TRAIL receptor 2	Homo sapiens TRAIL receptor 2 mRNA, complete cds.	182	183

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

43

U87947	HNMP-1	Human hematopoietic neural membrane protein (HNMP-1) mRNA, complete cds.	184	185
J03853	Kidney alpha-2-adrenergic receptor	Human kidney alpha-2-adrenergic receptor mRNA, complete cds.	186	187
U10686	MAGE11	Human MAGE-11 antigen (MAGE11) gene, complete cds.	188	189
U25988	PSG13	Human pregnancy-specific glycoprotein 13 (PSG13) mRNA, complete cds.	190	191
M60459	Erythropoietin receptor	Human erythropoietin receptor mRNA, complete cds.	192	193
X15998	Chondroitin sulphate proteoglycan versican V1	H.sapiens mRNA for the chondroitin sulphate proteoglycan versican V1 splice-variant; precursor peptide.	194	195
U31216	mGlu1beta	Human metabotropic glutamate receptor 1 beta (mGluR1beta) mRNA, complete cds.	196	197
X94630	CD97	H.sapiens CD97 gene exon 1 (and joined CDS).	198	199
M90657	L6	Human tumor antigen (L6) mRNA, complete cds.	200	201
U87459	NY-ESO-1	Human autoimmunogenic cancer/testis antigen NY-ESO-1 mRNA, complete cds.	202	203
S71824	N-CAM; also designated NCAM1	N-CAM=145 kda neural cell adhesion molecule [human, small cell lung cancer cell line OS2-R, mRNA, 2960 nt].	204	205
AE000659	T-cell receptor alpha delta	Homo sapiens T-cell receptor alpha delta locus from bases 250472 to 501670 (section 2 of 5) of the Complete Nucleotide Sequence.	206	207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

44

				222
M97639	Ror2	Human transmembrane receptor (ror2) mRNA, complete cds.	223	224
M81830	SSTR2	Human somatostatin receptor isoform 2 (SSTR2) gene, complete cds	225	226
AF030339	VESPR	Homo sapiens receptor for viral semaphorin protein (VESPR) mRNA, complete cds.	227	228
X02160	Insulin receptor precursor	Human mRNA for insulin receptor precursor.	229	230
U12255	IgG Fc receptor	Human IgG Fc receptor hFcRn mRNA, complete cds.	231	232
X82068	Glutamate receptor subunit GluRC	H.sapiens mRNA for glutamate receptor subunit GluRC.	233	234
X75208	HEK2	H.sapiens HEK2 mRNA for protein tyrosine kinase receptor.	235	236
X64116	PVR	H.sapiens PVR gene for poliovirus receptor (exon 1),	237	
		poliovirus receptor γ		238
		poliovirus receptor β		239
		poliovirus receptor α		240
M29540	CEA	Human carcinoembryonic antigen mRNA (CEA), complete cds.	241	242
U94888	CC-chemokine-binding receptor JAB61	Homo sapiens CC-chemokine-binding receptor JAB61 mRNA, complete cds.	243	244
M97675	Ror1	Human transmembrane receptor (ror1) mRNA, complete cds.	245	246
M12036	HER2	Human tyrosine kinase-type receptor (HER2) gene, partial cds.	247	248
U87460	Putative endothelin receptor type B-like protein	Human putative endothelin receptor type B-like protein mRNA, complete cds.	249	250
L20852	GLVR2	Human leukemia virus receptor 2 (GLVR2) mRNA, complete cds.	251	252
L05424		Human cell surface glycoprotein CD44 (CD44) gene, 3' end of long tailed isoform	253	254
M59040	CD44	Human cell adhesion molecule (CD44) mRNA, complete cds	255	256

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

45

U83993	P2X4 purinoreceptor	Human P2X4 purinoreceptor mRNA, complete cds.	257	258
XM_015664	FLJ22357 similar to epidermal growth factor-related protein	Homo sapiens hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein (FLJ22357) mRNA.	261	262
NM_022450		Homo sapiens hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein (FLJ22357) mRNA.	259	260
M84562	FPRL1	Human formyl peptide receptor-like receptor (FPRL1) mRNA, complete cds.	263	264
M34309	HER3	Human epidermal growth factor receptor (HER3) mRNA, complete cds.	265	266
M83664	HLA-DP	Human MHC class II lymphocyte antigen (HLA-DP) beta chain mRNA, compl.cds.	267	268
AF025998	Atrial natriuretic peptide clearance receptor	Homo sapiens atrial natriuretic peptide clearance receptor (ANPRC) mRNA, complete cds.	269	270
XM_006034	Gastrin/CCK-B receptor	Homo sapiens cholecystokinin B receptor (CCKBR), mRNA.	271	272
M73482	Neuromedin B receptor	Human neuromedin B receptor (NMB-R) mRNA, complete cds.	273	274
NM_001496	GFRA3	Homo sapiens GDNF family receptor alpha 3 (GFRA3), mRNA.	275	276
XM_010317	GRPR	Homo sapiens gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), mRNA.	277	278
U92459	Metabotropic glutamate receptor 8; also designated GRM8 or GluR8	Human metabotropic glutamate receptor 8 (GluR8) mRNA, complete cds.; GRM8	279	280
XM_007840	CDH1	Homo sapiens cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)(CDH1),mRNA.	281	282
XM_016157	CDH2	Homo sapiens cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)(CDH2),mRNA.	283	284
XM_005591	TGFBR1	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kD) (TGFBR1), mRNA.	285	286
XM_003094	TGFBR2	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD) (TGFBR2), mRNA.	287	288
XM_001924	TGFBR3	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kD)(TGFBR3), mRNA.	289	290
NM_000875	IGF1R	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), mRNA.	291	292

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

46

X00588	Precursor of epidermal growth factor receptor	Human mRNA for precursor of epidermal growth factor receptor.	293	294
Z75190	LRP8	Homo sapiens apolipoprotein E receptor 2 (APOER2), also designated LRP8; mRNA	295	296
U62434	CHRNA 5	Nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit (CHRNA 5); mRNA	297	298
U19878	TMEFF1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1 (TMEFF1); mRNA	299	300
L20814	GRIA2; also designated GluR2	Human glutamate receptor 2 (HBGR2); also designated GluR2 or GRIA2; complete coding sequence	301	302
AL008583	NPTXR	Neuronal pentraxin receptor (NPTXR); DNA sequence	303	304

Even more preferred cell surface molecules according to the present invention are
 5 receptors which belong to one of the following groups:

- Members of receptor tyrosine kinases
- Members of the integrin family
- Members of the immunoglobulin superfamily adhesion molecules
- 10 Members of the heparan sulfate proteoglycan family
- Members of the chondroitin sulfate proteoglycan family
- Members of the MAGE family
- Members of the RAGE family
- Members of the low density lipoprotein receptor family
- 15 Members of the cadherin adhesion molecules
- Members of the metabotropic glutamate receptors
- Members of the steroid hormone families
- Members of the seven transmembrane receptor family
- Atrial natriuretic peptide clearance receptor
- 20 GFRA3
- Transferrin receptor
- Members of the serine/threonine kinase receptors

Yet more preferred cell surface molecules according to the present invention are cell
 25 surface molecules selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

47

CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and TMEFF1.

5 In one preferred embodiment of the present invention, cell surface molecules are capable of internalising specific binding partners upon association (see herein above). Preferred cell surface molecules according to the present invention capable of internalising a binding partner may be selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8 and CHRNA5.

10 In another preferred embodiment of the present invention, cell surface molecules are not capable of internalising their specific binding partners. Preferred cell surface molecules according to the present invention not capable of internalising binding partner(s) may be selected from the group consisting of GRIA2, GRM8, ITGAV and ITGAE

15 One especially preferred cell surface molecule according to the present invention is NCAM1 (NCAM, neural cell adhesion molecule, N-CAM, CD56). NCAM1 is highly expressed in most SCLC. The expression of NCAM1 has been shown by for example CHIPS analysis, RT-PCR and western blotting (see example 1, figure 11 and
20 figure 15). NCAM1 is capable of internalising binding partners. Binding partners capable of associating with NCAM1 are described herein below. NCAM1 has been shown to be internalised in astrocytes (Minana *et al.*, 2001) and has been demonstrated capable of very efficient internalisation of a very large molecule complex consisting of: anti-NCAM1 antibody-Protein A-Streptavidine-Biotin- β -galactosidase
25 enzyme (Yu *et al.*, 2000).

Another preferred cell surface molecule according to the present invention is NPTXR (Neuronal pentraxin receptor, NPR). NPTXR is expressed in most SCLC. The expression of NPTXR has been demonstrated by for example CHIPS analysis,
30 RT-PCR and western blotting (see example 1, figure 10 and figure 14). NPTXR is a highly internalising receptor. Binding partners capable of associating with NPTXR are described herein below.

Yet another preferred cell surface molecule according to the present invention is
35 LRP8 (low density lipoprotein receptor related protein, apolipoprotein E receptor 2).

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

48

LRP8 is expressed in all tested SCLC. The expression of LRP8 has been demonstrated by for example CHIPS analysis and RT-PCR (see example 1 and figure 9). LRP8 is a highly internalising receptor. Binding partners capable of associating with LRP8 are described herein below.

5

Yet another preferred cell surface molecule according to the present invention is CHRNA5 (nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit). Binding partners capable of associating with CHRNA5 are described herein below.

10

Yet another cell surface molecule that may be used with the present invention is L1CAM (neural cell adhesion molecule L1). L1 is known to be able to internalise binding partners. Binding partners capable of associating with L1CAM are described herein below.

15

Yet another preferred cell surface molecule according to the present invention is TNFRSF12 (DR6, tumor necrosis factor receptor superfamily member 21). TNFRSF12 is expressed in most SCLC. The expression of TNFRSF12 has been demonstrated by for example CHIPS analysis and RT-PCR (see example 1 and figure 8). Other members of the family to which TNFRSF12 belong are capable of

20

An especially preferred cell surface molecule according to the present invention is GRIA2 (Ionotropic glutamate receptor 2, GLUR2, GLURB, HBGR2, AMPA 2). GRIA2 is expressed in all tested SCLC and in the brain. GRIA2 is a highly specific SCLC receptor outside the brain. Expression of GRIA2 has for example been demonstrated by Chips analysis, RT-PCR and Western blotting (see example 1, figure 12A and figure 16).

25

Another preferred cell surface molecule according to the present invention is GRM8 (metabotropic glutamate 8 receptor, GLUR8, mGlu8, GPRC1H). GRM8 is highly specifically expressed in SCLC except for the brain and is expressed in most SCLC. The expression of GRM8 has been demonstrated by for example Chips analysis, RT-PCR and western blotting (see example 1 and figure 13). Binding partners capable of associating with GRM8 are described herein below.

30

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

49

Yet another preferred cell surface molecule according to the invention is ITGAV (Integrin subunit α v, vitronectin receptor, CD 51). ITGAV is highly expressed by SCLC. Expression has been demonstrated by for example CHIPS analysis and RT-PCR (see example 1 and figure 12B)

5

Yet another preferred cell surface molecule according to the present invention is ITGAE (integrin α E subunit-precursor, human mucosal lymphocyte-1 antigen, CD 103). ITGAE is expressed by all SCLC tested and ITGAE is highly specifically expressed in SCLC. Expression has been demonstrated by for example CHIPS analysis and western blotting (see example 1 and figure 17).

10

Yet another preferred cell surface molecule according to the present invention is GPR49 (orphan G protein-coupled receptor 67, GPR67, HG38).

15

Yet another preferred cell surface molecule according to the present invention is TMEFF1 (transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains).

20

However, the present invention is also directed towards cell surface molecules which comprises fragments, which are encoded by fragments of the nucleotide sequences given in table 2. In one preferred embodiment, the present invention is directed towards cell surface molecules encoded by splice variants of these sequences, which are encoded by the same gene. Splice variants of cell surface molecules outlined in table 2 may encode a polypeptide sequence which share fragments with said cell surface molecules; however splice variants may take advantage of an alternative reading frame, so that although the products of the two splice variants are encoded by nucleotide sequences that share common fragments, the polypeptide sequences may not be related.

25

30

Furthermore, the present invention is directed to fragments of the nucleotide sequences encoding cell surface molecules according to table 2. In particular, binding partners according to the present invention (see herein below) may associate with products of only one or more fragments of a cell surface molecule according to the present invention, but preferably not with all fragments of a cell surface molecule. Accordingly, it is possible to use fragments of the cell surface molecules to identify potential binding partners (see herein below).

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

50

- For example such fragments comprise the 5' half of the sequence or the 3' half of the sequences. Furthermore, the fragments may comprise part of the 5' half or part of the 3' half of the sequences. Preferably, such fragments are shorter than 5000 bp, such as shorter than 4000 bp, for example shorter than 3000 bp, such as shorter than 2500 bp, for example shorter than 2000 bp, such as shorter than 1750 bp, such as shorter than 1500 bp, for example shorter than 1250 bp, such as shorter than 1000 bp, for example shorter than 900 bp, such as shorter than 800 bp, for example shorter than 700 bp, such as shorter than 600 bp, for example shorter than 500 bp, such as shorter than 400 bp, for example shorter than 300 bp, such as shorter than 200 bp, for example shorter than 100 bp, such as shorter than 75 bp, for example shorter than 50 bp, such as shorter than 40 bp, for example shorter than 30 bp, such as shorter than 25 bp, for example shorter than 20 bp, such as shorter than 18 bp.
- Such fragments may be internal fragments or they may be comprise the 5' or the 3' terminal.
- In one preferred embodiment of the present invention the fragments comprise a plurality of building blocks of a predetermined length and wherein the building blocks are linked so that the fragments are identical to part of a native gene sequence, preferably the sequences outlined in table 2. Accordingly, fragments may comprise a plurality of building blocks of the predetermined length and a predetermined starting point.
- Building blocks are nucleic acid sequences, which have a predetermined length and starting point, so that the first building block starts at a given position in the nucleic acid sequence and the subsequent building blocks starts at the position following the position where the previous building block stops.
- Preferably, the building blocks are derived from any of the sequences SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 41, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44, SEQ ID NO. 48, SEQ ID NO. 50, SEQ ID NO. 52, SEQ ID NO.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

51

54, SEQ ID NO. 56, SEQ ID NO. 58, SEQ ID NO. 60, SEQ ID NO. 62, SEQ ID NO. 64, SEQ ID NO. 66, SEQ ID NO. 68, SEQ ID NO. 70, SEQ ID NO. 72, SEQ ID NO. 74, SEQ ID NO. 76, SEQ ID NO. 78, SEQ ID NO. 80, SEQ ID NO. 82, SEQ ID NO. 84, SEQ ID NO. 86, SEQ ID NO. 88, SEQ ID NO. 90, SEQ ID NO. 92, SEQ ID NO. 94, SEQ ID NO. 96, SEQ ID NO. 98, SEQ ID NO. 100, SEQ ID NO. 102, SEQ ID NO. 104, SEQ ID NO. 106, SEQ ID NO. 108, SEQ ID NO. 110, SEQ ID NO. 112, SEQ ID NO. 114, SEQ ID NO. 116, SEQ ID NO. 118, SEQ ID NO. 126, SEQ ID NO. 128, SEQ ID NO. 130, SEQ ID NO. 132, SEQ ID NO. 134, SEQ ID NO. 136, SEQ ID NO. 138, SEQ ID NO. 140, SEQ ID NO. 142, SEQ ID NO. 144, SEQ ID NO. 146, SEQ ID NO. 148, SEQ ID NO. 150, SEQ ID NO. 152, SEQ ID NO. 154, SEQ ID NO. 156, SEQ ID NO. 158, SEQ ID NO. 160, SEQ ID NO. 162, SEQ ID NO. 164, SEQ ID NO. 166, SEQ ID NO. 168, SEQ ID NO. 170, SEQ ID NO. 172, SEQ ID NO. 174, SEQ ID NO. 176, SEQ ID NO. 178, SEQ ID NO. 180, SEQ ID NO. 182, SEQ ID NO. 184, SEQ ID NO. 186, SEQ ID NO. 188, SEQ ID NO. 190, SEQ ID NO. 192, SEQ ID NO. 194, SEQ ID NO. 196, SEQ ID NO. 198, SEQ ID NO. 200, SEQ ID NO. 202, SEQ ID NO. 204, SEQ ID NO. 206, SEQ ID NO. 223, SEQ ID NO. 225, SEQ ID NO. 227, SEQ ID NO. 229, SEQ ID NO. 231, SEQ ID NO. 233, SEQ ID NO. 235, SEQ ID NO. 237, SEQ ID NO. 241, SEQ ID NO. 243, SEQ ID NO. 245, SEQ ID NO. 247, SEQ ID NO. 249, SEQ ID NO. 251, SEQ ID NO. 253, SEQ ID NO. 255, SEQ ID NO. 257, SEQ ID NO. 261, SEQ ID NO. 259, SEQ ID NO. 263, SEQ ID NO. 265, SEQ ID NO. 267, SEQ ID NO. 269, SEQ ID NO. 271, SEQ ID NO. 273, SEQ ID NO. 275, SEQ ID NO. 277, SEQ ID NO. 279, SEQ ID NO. 281, SEQ ID NO. 283, SEQ ID NO. 285, SEQ ID NO. 287, SEQ ID NO. 289, SEQ ID NO. 291, SEQ ID NO. 293, SEQ ID NO. 295, SEQ ID NO. 297, SEQ ID NO. 299, SEQ ID NO. 301 and SEQ ID NO. 303.

Each building block is preferably shorter than 1000 bp, for example shorter than 900 bp, such as shorter than 800 bp, for example shorter than 700 bp, such as shorter than 600 bp, for example shorter than 500 bp, such as shorter than 400 bp, for example shorter than 300 bp, such as shorter than 200 bp, for example shorter than 100 bp, such as shorter than 75 bp, for example shorter than 50 bp, such as shorter than 40 bp, for example shorter than 30 bp, such as shorter than 25 bp, for example shorter than 20 bp, such as shorter than 18 bp. In one embodiment the building block is around 18 bp.

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

52

The building blocks may start at position 1, such as position 2, for example position 3, such as position 4, for example position 5, such as position 6, for example position 7, such as position 8, for example position 9, such as position 10, for example position 11, such as position 12, for example position 13, such as position 14, for example position 15, such as position 16, for example position 17, such as position 18, for example position 19, such as position 20, such as any of the positions 20 to 100, for example any of the position 100 of any of the sequences outlined in table 2.

The fragments preferably comprise a plurality of building blocks, such as 2, for example 3, such as 4, for example 5, such as from 5 to 10, for example from 10 to 20, such as from 20 to 30, for example from 30 to 40, such as from 40 to 50, for example from 50 to 75, such as from 75 to 100, for example more than 100 building blocks.

In one embodiment the fragments comprise building blocks which are 100 base pairs long and which start at position 1.

Furthermore, fragments of cell surface molecules according to the present invention may be chimeric fragments, such chimeric fragments comprise more than one fragments which are not associated with each other according to the sequences outlined in table 2. Such chimeric fragments may comprise fragments from the same cell surface molecule or they may contain fragments from more than one cell surface molecule according to the invention.

Furthermore, the present invention is directed to fragments of the polypeptides sequences of cell surface molecules according to table 2. In particular, binding partners according to the present invention (see herein below) may associate with only one or more fragments of a cell surface molecule according to the present invention, but preferably not with all fragments of a cell surface molecule. Accordingly, it is possible to use fragments of the cell surface molecules to identify potential binding partners (see herein below).

Fragments of polypeptide sequences may be shorter than 3000 amino acids, such as shorter than 2500 amino acids, for example shorter than 2000 amino acids, such as shorter than 1750 amino acids, such as shorter than 1500 amino acids, for ex-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

53

ample shorter than 1250 amino acids, such as shorter than 1000 amino acids, for example shorter than 900 amino acids, such as shorter than 800 amino acids, for example shorter than 700 amino acids, such as shorter than 600 amino acids, for example shorter than 500 amino acids, such as shorter than 400 amino acids, for example shorter than 300 amino acids, such as shorter than 200 amino acids, for example shorter than 100 amino acids, such as shorter than 75 amino acids, for example shorter than 50 amino acids, such as shorter than 40 amino acids, for example shorter than 30 amino acids, such as shorter than 25 amino acids, for example shorter than 20 amino acids, such as shorter than 15 amino acids, for example shorter than 10 amino acids.

Preferably, the fragments are fragments of polypeptide sequences SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 43, SEQ ID NO. 45, SEQ ID NO. 47, SEQ ID NO. 49, SEQ ID NO. 51, SEQ ID NO. 53, SEQ ID NO. 55, SEQ ID NO. 57, SEQ ID NO. 59, SEQ ID NO. 61, SEQ ID NO. 63, SEQ ID NO. 65, SEQ ID NO. 67, SEQ ID NO. 69, SEQ ID NO. 71, SEQ ID NO. 73, SEQ ID NO. 75, SEQ ID NO. 77, SEQ ID NO. 79, SEQ ID NO. 81, SEQ ID NO. 83, SEQ ID NO. 85, SEQ ID NO. 87, SEQ ID NO. 89, SEQ ID NO. 91, SEQ ID NO. 93, SEQ ID NO. 95, SEQ ID NO. 97, SEQ ID NO. 99, SEQ ID NO. 101, SEQ ID NO. 103, SEQ ID NO. 105, SEQ ID NO. 107, SEQ ID NO. 109, SEQ ID NO. 111, SEQ ID NO. 113, SEQ ID NO. 115, SEQ ID NO. 117, SEQ ID NO. 119, SEQ ID NO. 120, SEQ ID NO. 121, SEQ ID NO. 122, SEQ ID NO. 123, SEQ ID NO. 124, SEQ ID NO. 125, SEQ ID NO. 126, SEQ ID NO. 127, SEQ ID NO. 129, SEQ ID NO. 131, SEQ ID NO. 133, SEQ ID NO. 135, SEQ ID NO. 137, SEQ ID NO. 139, SEQ ID NO. 141, SEQ ID NO. 143, SEQ ID NO. 145, SEQ ID NO. 147, SEQ ID NO. 149, SEQ ID NO. 151, SEQ ID NO. 153, SEQ ID NO. 155, SEQ ID NO. 157, SEQ ID NO. 159, SEQ ID NO. 161, SEQ ID NO. 163, SEQ ID NO. 165, SEQ ID NO. 167, SEQ ID NO. 169, SEQ ID NO. 171, SEQ ID NO. 173, SEQ ID NO. 175, SEQ ID NO. 177, SEQ ID NO. 179, SEQ ID NO. 181, SEQ ID NO. 183, SEQ ID NO. 185, SEQ ID NO. 187, SEQ ID NO. 189, SEQ ID NO. 191, SEQ ID NO. 193, SEQ ID NO. 195, SEQ ID NO. 197, SEQ ID NO. 199, SEQ ID NO. 201, SEQ ID NO. 203, SEQ ID NO. 205, SEQ ID NO. 207, SEQ ID NO. 208, SEQ ID NO. 209, SEQ ID NO. 210, SEQ ID NO. 211, SEQ

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

54

ID NO. 212, SEQ ID NO. 213, SEQ ID NO. 214, SEQ ID NO. 215, SEQ ID NO. 216, SEQ ID NO. 217, SEQ ID NO. 218, SEQ ID NO. 219, SEQ ID NO. 220, SEQ ID NO. 221, SEQ ID NO. 222, SEQ ID NO. 224, SEQ ID NO. 226, SEQ ID NO. 228, SEQ ID NO. 230, SEQ ID NO. 232, SEQ ID NO. 234, SEQ ID NO. 236, SEQ ID NO. 238, SEQ ID NO. 240, SEQ ID NO. 242 and SEQ ID NO. 244, SEQ ID NO. 246, SEQ ID NO. 248, SEQ ID NO. 250, SEQ ID NO. 252, SEQ ID NO. 254, SEQ ID NO. 256, SEQ ID NO. 258, SEQ ID NO. 260, SEQ ID NO. 262, SEQ ID NO. 264, SEQ ID NO. 266, SEQ ID NO. 268, SEQ ID NO. 270, SEQ ID NO. 272, SEQ ID NO. 274, SEQ ID NO. 276, SEQ ID NO. 278, SEQ ID NO. 280, SEQ ID NO. 282, SEQ ID NO. 284, SEQ ID NO. 286, SEQ ID NO. 288, SEQ ID NO. 290, SEQ ID NO. 292, SEQ ID NO. 294, SEQ ID NO. 296, SEQ ID NO. 298, SEQ ID NO. 300, SEQ ID NO. 302 and SEQ ID NO. 304. Furthermore, functional homologues of the fragments of the polypeptide sequences may also be comprised within cell surface molecules of the present invention, or the cell surface molecules may consist of functional homologues of the fragments of the polypeptide sequences. Functional homologues are defined herein below.

Particularly preferred fragments of the cell surface molecules according to the present invention are fragments that comprises one or more extracellular domains of the cell surface molecules. Additionally, fragments which comprise parts of extracellular domains are also preferred fragments within the scope of the present invention.

Most preferably, the fragments of the cell surface molecules according to the present invention are fragments that comprise one or more extracellular domains and which are capable of internalising a binding partner having affinity for said fragment.

In one embodiment the fragments comprise an extracellular domain or fragments thereof or derivatives thereof, wherein said extracellular domain may be selected from the group consisting of polypeptide sequences, which are encoded by the nucleotide sequences SEQ ID NO 3 nucleotide 1014 to 2450, SEQ ID NO 15 nucleotide 216 to 3179, SEQ ID NO. 31 nucleotide 147 to 2999, SEQ ID NO 52 nucleotide 419 to 4120, SEQ ID NO 66 nucleotide 268 to 7059, SEQ ID NO 82 nucleotide 235 to 2094, SEQ ID NO 104 nucleotide 160 to 663, SEQ ID NO 204 nucleotide 301 to 2250, SEQ ID NO 229 nucleotide 130 to 2880, SEQ ID NO 281 nucleotide 569 to 2152, SEQ ID NO 283 nucleotide 585 to 1901, SEQ ID NO 291 nucleotide 121 to 2836 and SEQ ID NO 293 nucleotide 259 to 2127.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

55

5 The cell surface molecule and the fragments of cell surface molecules as outlined herein above, may furthermore comprise posttranslational modifications. Examples of posttranslational modifications are phosphorylations, glycosylation, acetylations, methylation, sulfatation, polysialylation, farnesylation, myristoylation or palmitylation.

10 Functional homologues of the cell surface molecules outlined in table 2 are also contained within the present invention. SEQ ID NO of polypeptide sequences encoding preferred cell surface molecules according to the present invention are also given in table 2. Functional homologues of cell surface molecules according to the present invention are cell surface molecules which can associate with the binding partners according to the present invention and which preferably can internalise said binding partners.

15 Promoters

Promoters within the scope of the present invention are first nucleic acid sequences, which are capable of directing expression of second nucleic acid sequences operably linked thereto. Such first nucleic acid sequences are normally found
20 upstream on the chromosome of nucleic acid sequences that may be transcribed.

In one embodiment, preferably a first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise at least 15,000 base pairs upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.
25 However, the first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence may also comprise at least 12,500, such as at least 10,000, for example at least 8,000, such as at least 6,000, such as at least 5,000, such as at least 4,000, such as at least 3,000, for example at least 2,500, such as at least 2,000, such as at least 1,500, such as at least 1,000, for example at least 500, such as at least 400,
30 for example at least 300, such as at least 200, for example at least 150, such as at least 100, for example at least 50, such as at least 25, for example at least 10 base pairs upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome, or a fragment of any such sequences capable of directing gene expression.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

56

Furthermore, in another embodiment the first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence preferably comprises up to 10, such as up to 100, such as up to 500, for example up to 1000, such as up to 2500, for example up to 5000 base pairs upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome, or a fragment thereof capable of directing gene expression.

It is also within the scope of the present invention, that the first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence may comprise one or more intron sequences or fragments thereof found upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome. Furthermore, the first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence may comprise one or more intron sequences or fragments thereof found downstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.

The first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence may furthermore comprise an enhancer sequence located more than 15,000 base pairs upstream or downstream from the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.

The above mentioned first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence may also comprise deletions and/or additions of nucleic acids. Deletions and/or additions may be internal or they may be at the end of the nucleic acid sequence.

Accordingly, from a first nucleic acid sequence, which for example comprise up to 1000, such as up to 2500, for example up to 5000, such as up to 7500, such as up to 10,000, for example up to 15,000, such as up to 20,000 base pairs upstream from the translation start codon of a second nucleic acid sequence on the chromosome, at least 10 internal bp, such as at least 25 internal bp, for example at least 50 internal bp, such as at least 100 internal bp, for example 200 internal bp, such as at least 300 internal bp, for example at least 400 internal bp, such as at least 500

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

57

internal bp, for example at least 750 internal bp, such as at least 1000 internal bp, for example at least 1250, such as at least 1500, for example at least 1750, such as at least 2000, for example at least 2500, such as at least 3000, for example at least 3500, such as at least 4000, for example at least 4500 internal base pairs may be deleted.

5

Specific nucleic acid sequences may be more favourable to delete than others. For example sequences that suppress expression or sequences that do not alter expression of second nucleic acid sequences operably linked thereto may be deleted. Accordingly, the present invention also encompasses first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprising up to 1000, such as up to 2500, for example up to 5000, such as up to 7500, such as up to 10,000, for example up to 15,000, such as up to 20,000 base pairs upstream from the translation start codon of a second nucleic acid sequence on the chromosome, from which at least one silencer has been deleted.

10

15

It is also possible that the first nucleic acid sequence comprises more than one deletion, such as 2, for example 3, such as 4, for example 5, such as more than 5 deletions.

20

Furthermore, from a first nucleic acid sequence, which for example comprise up to 20,000, for example up to 15,000, such as up to 10,000, for example up to 7500, for example up to 5000, such as up to 2500, for example up to 1000 base pairs upstream from the translation start codon of a second nucleic acid sequence on the chromosome, at least 10, such as at least 25, for example at least 50, such as at least 100, for example 200, such as at least 300, for example at least 400, such as at least 500, for example at least 750, such as at least 1000, for example at least 1250, such as at least 1500, for example at least 1750, such as at least 2000, for example at least 2500, such as at least 3000, for example at least 3500, such as at least 4000, for example at least 4500 base pairs may be deleted from either one or the other end.

25

30

Additions of nucleic acid sequences may be done at the end or internally. First nucleic acid sequences may comprise more than one addition, for example 2, such as 3, for example 4, such as 5, for example more than 5 additions. It may be

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

58

addition of at least 10, such as at least 25, for example at least 50, such as at least 100, for example 200, such as at least 300, for example at least 400, such as at least 500, for example at least 750, such as at least 1000, for example at least 1250, such as at least 1500, for example at least 1750, such as at least 2000, for example at least 2500, such as at least 3000, for example at least 3500, such as at least 4000, for example at least 4500, such as more than 4500 base pairs.

For example it is possible to add nucleic acid sequences that alter the function of the first nucleic acid sequence. For example nucleic acid sequences which are recognised by specific transcription factors may be added. For example nucleic acid sequences that are recognised by nuclear steroid hormone receptors

Examples of preferred first nucleic acid sequences are given in table 3 and 4. Functional homologues as described herein below of these nucleic acid sequences as well as deletion and/or addition mutants as described herein above are also comprised with in the present invention.

Table 3 First nucleic acid sequences indicating accession no. in the Blast database Version: May 10, 2001

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs>)

No	Acc. No.	Chromosome	Region	Bases
pro4	J05614	20	NT_011387.3 -	4,073,925-4,125,777
pro12	AF059531	11	NT_009107.3 +	16,582,000-16,639,000
pro17	AA913812	1	NT_004705.3 +	145,236,000-145,282,000
pro18	W25866	1	NT_004705.3 +	145,240,856-145,281,103
pro28	W74442	15	NT_010358.3 -	87,186,215-87,226,899
pro37	U63743	1	NT_004808.3 -	73,601,528-73,642,295

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

59

pro49	AA203476	4	NT_006281.3 +	46.964.650-47.005.368
		8	NT_008166.3 +	66.825.152-66.865.799
pro53	M15205	17	NT_024874.3 ?	78.209.000-78.266.000
pro55	Z95118	6	NT_007577	
pro62	AL050306	X	NT_011553	
		11	NT_025842	
pro73	U18271	12	NT_009681.3 +	103.894.000-103.940.000
pro74	U03735	X	NT_011534.1 +	138.253.000-138.770.000
pro76	U89387	2	NT_005409.3 -	130.026.000-130.083.000
pro77	U10689	X	NT_011726.3 ?	137.038.000-137.108.000
pro83	AI553745	5	NT_023270.3 -	177.081.000-177.128.000
pro86	L18877	X	NT_011534.1 +	138.233.000-138.771.000
pro87	U10691	X	NT_011534.1 +	138.233.000-138.770.000
pro89	L18920	X	NT_011534.1 +	138.233.000-138.770.000
pro91	N23137	12	NT_009464.3 +	132.284.168-132.324.678
pro93	W28479	13	NT_024495.3 +	87.871.068-87.891.259
pro97	AF053305	6	NT_007592.3 +	37.167.152-37.207.246
		12	NT_009782.3 +	53.429.369-53.469.399
pro103	U77949	17	NT_024901.3 -	40.905.000-40.968.000
pro112	AL021546	12	NT_009775	

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

60

pro120	M31315	5	NT 023188.3 ?	176.642.000-176.692.000
pro121	D26468	1	NT 004680.3 +	214.431.387-214.471.483
pro122	AL021366	6	NT 007592.3 +	31.000.000-38.000.000
pro123	N58115	2	NT 005343.3 +	184.162.000-184.223.000
pro129	AL031427	1	NT 004424	
pro139	Y13115	8	NT 008176.3 +	39.029.000-39.073.000
pro142	AA151922	17	NT 010711.3 +	73.365.739-73.406.421
pro153	U07563	9	NT 008338	
pro154	W26762	1	NT 019273.3 +	115.514.000-115.557.000
pro156	AI950382	17	NT 010641.3 +	77.160.000-77.208.000
pro161	M21259	1	NT 004662.3 +	175.106.661-175.147.391
pro163	U75285	17	NT 024874	
pro166	AA926957	5	NT 016864.3 +	52.120.104-52.140.918
		17	NT 010692.3 +	1.029.000-1.077.000
pro171	M90354	13	NT 024495.3 +	89.323.836-89.365.575
pro172	AA143321	18	NT 010934.3 +	35.186.000-35.241.000
pro176	AA181196	13	NT 009799.3 +	49.703.000-49.752.000
pro178	AB002359	15	NT 010364.3 -	19.619.949-19.660.316
pro183	U13695	2	NT 022197.3 -	197.599.000-197.820.000

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

61

pro184	U65011	22	NT 011520.5 +	18.956.000-19.011.000
pro194	AF091754	1	NT 004734.3 +	233.039.886-233.081.072
pro198	AL049842	13	NT 009910	
pro202	AA810792	12	NT 009464.3 +	132.288.241-132.328.844
pro210	L37747	5	NT 023326.1 -	122.981.845-123.022.988
pro212	Z36714	2	NT 005370.3 -	212.774.647-212.814.782
pro216	X06745	X	NT 011821.1 ?	21.110.482-21.151.898
pro225	T75292	4	NT 006088.3 +	82.210.258-82.250.894
pro228	U38979	1	NT 021930.3 +	97.904.873-97.945.550
pro229	AL031778	6	NT 018968	
pro230	AA044787	5	NT 006864.3 -	154.054.000-154.122.000
pro232	M77481	X	NT 011534.1 +	138.236.000-138.766.000
pro234	AL021397	1	NT 004668	
pro239	AA595596	1	NT 004668	
pro240	W25874	4	NT 006088.3 +	82.210.000-82.256.000
pro241	AC004774	7	NT 007816	
Pro245	AF006010	8	NT 007978.3 -	104.966.000-105.280.000

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

62

pro254	AA733050	1	NT 004662.3 +	175.107.000-175.116.000
pro260	AF094481	3	NT 005791.3 -	84.866.000-84.938.000
pro268	L16991	5	NT 023126.3 -	20.814.448-20.854.499
pro273	AC004770	11	NT 004686; 11q12	64224936-64225035
pro280	AI985964	21	NT 011514.4 -	43.166.000-43.211.000
pro284	AA926959	5	NT 006687.3 -	48.821.840-48.862.512
pro292	U28386	4	NT 006109.2 -	: 89.638.000-89.682.000
pro299	AI087268	6	NT 007193.3 +	38.723.000-38.783.000
pro302	AF014837	14	NT 019583.3 +	18.376.000-18.432.000
pro303	AI570572	22	NT 011520.5 +	33.485.000-33.531.000
pro304	L17131	2	NT 005428.3 -	76.252.000-76.295.000
pro306	AI740522	6	NT 007234.3 -	128.840.581-128.881.528
pro328	M15796	X	NT 011568.3 +	33.655.000-33.706.000
		20	NT 011387.3 +	4.068.000-4.115.000
pro329	D00596	18	NT 011005.3 +	849.000.000-872.000.000
pro331	W27939	12	NT 009765.3 7	49.701.000-49.745.000
pro338	AA768912	10	NT 008609.3 +	26.001.705-26.042.334
pro341	AA877215	1	NT 019273.3 -	114.182.965-114.223.575

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

63

		13	NT_009952.3 +	98,753,071-98,793,770
pro344	X16277	2	NT_005380.3 +	10,809,000-10,860,000
pro347	AI032612	1	NT_019269.3 -	41,189,000-41,265,000
pro348	AI032612	12	NT_024394.3 -	101,992,000-102,107,000
pro352	AI525633	12	NT_009785.3 ?	49,699,479-49,740,007
pro358	N95406	7	NT_007816.3 ?	96,997,000-97,064,000
pro361	AA255502	6	NT_007592.3 +	28,000,000-32,000,000

Table 4 First nucleic acid sequences indicating accession no. in the human genome browser, 12 Dec 2000 draft assembly of the human genome Human genome browser

5

No	Acc. No.	Chromosome	Band	Bases
pro1	M87338	7	7q11.22	67380990-67396543
pro2	U73379	20	20q13.11	46319851-46338917
pro3	X05360	10	10q21.2	64194062-64211044
pro5	M25753	5	5q23.2	137604120-137622654
		5	5q22.2	121662724-121679510
		5	5q13.1	73649568-73666303
pro6	M74558	1	1p33	52577823-52592535
pro7	D38073	6	6p12.2	56968405-56986831
pro8	AF015254	17	17p12	9089031-9106502
pro9	J03626	3	3q21.2	135784683-135799798
pro10	U74612	12	12p13.33	3074066-3089514
pro13	D63880	12	12p13.31	6903002-6917288
pro14	D14657	15	15q22.2	60215632-60231472
pro15	AB024704	20	20q11.21	31872458-31887490

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

64

pro16	AI375913 (J04088)	17	17q21.2	42673095-42689004
pro19	U37426	10	10q23.33	99600001-99623479
pro20	AF098162	12	12q13.3	58470993-58506578
pro21	X74330	12	12q13.3	58801599-58817157
pro22	L47276	17	17q21.2	42703746-42719695
pro23	L25876	14	14q22.2	50958791-50974988
pro24	U65410	4	4q26	126153161-126168416
pro25	X13293	20	20q12	44147604-44164046
pro26	X51688	4	4q26	128042847-128058218
pro27	AL080146	15	15q22.1	55104198-55120101
pro29	D88357	10	10q21.2	64199199-64214445
pro30	D26361	1	1q32.1	224035414-224051265
pro31	D14678	6	6p21.31	36374334-36389597
pro32	AF011468	20	20q13.2	36844429-36859811 58763968-58779170
pro34	AB019987	3	3q25.33	175620714-175635845
pro36	AF053306	15	15q15.1	35625667-35641196
pro38	AF032862	5	5q34	178469476-178486752
pro39	U01038	16	16p21.1	28930379-28945875
pro40	D13633	14	14q22.3	29043898-29059035 51960394-51975921
pro41	AJ000186	4	4q26	126153146-126168525
pro42	D26018	11	11q13.4	79445361-79460511
pro43	X02308	18	18p11.32	931580-947280
pro44	AF016371	1	1p34.1	47366616-47382271
pro45	U05340	1	1p34.1	48138801-48153800
pro46	D80008	20	20p11.21	27258467-27274295
pro47	AB000449	14	14q32.2	96123633-96139456
pro48	AF017790	18	18p11.32	2615001-2630207
pro50	X51688	4	4q26	128041767-128057590
pro51	AF081280	10	10q24.32	109292185-109308954
pro52	M86699	6	6q14.1	85882001-85897200
pro54	X74794	8	8q11.22	50261007-50276309
pro56	AB006624	12	12q13.3	59174501-59189500
pro57	L38933	17	17q21.2	45056497-45072182
pro58	AB018334	5	5p13.2	40319301-40338000
pro59	AF091433	8	8q22.1	98382913-98396820
pro60	Z29066	1	1q32.3	237405001-237420000
pro61	D79988	12	12q24.31	133268001-133284000 133230501-133245500

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

65

pro63	AL050151	8	8q24.3	143930684-143952036
pro64	D79997	9	9p13.2	39124660-39148000
pro65	L07541	13	13q13.1	32415001-32433000
pro66	U37139	1	1p31.3	71792205-71807237
pro67	Y00272	10	10q21.2	64194599-64211207
pro68	D90070	18	18q21.32	62061499-62077998
pro69	U14518	2	2p23.3	26821351-26836883
pro70	X87843	14	14q23.1	57525402-57541401
pro71	U26727	9	9p21.3	23824001-23840000
pro72	X52142	1	1q42.12	251569001-251584900
pro75	L48692	2	2p13.3	69512098-69527598
pro78	L31801	1	1p13.2	124826201-124843002
				124490069-124506743
pro79	U15552	1	1p22.1	105019659-105034740
pro80	AF039652	17	17p11.2	20094899-20110488
pro81	U79266	11	11q13.2	67334001-67349000
pro82	X92106	17	17q11.2	31700001-31715000
pro84	L07540	12	12q24.23	126266001-126283000
pro85	U76638	2	2q35	219994976-220010675
pro88	L34600	2	2p16.1	56591445-56606916
pro90	D83781	11	11p11.2	48298842-48316506
pro92	X59618	X	Xp11.3	41625001-41640000
pro94	U73704	1	1p22.1	102963001-102978500
pro95	D50923	1	1q42.13	256927030-256942117
pro96	M85085	X	Xq22.1	100331001-100346000
pro98	AF025840	14	14q21.3	46340081-46355371
pro99	AF029670	17	17q23.2	63449001-63454000
pro100	AF070559	13	13q33.1	106141001-106156500
pro101	S78085	6	6q27	180902275-180917523
pro104	U39617	15	15q26.1	87983001-87998000
pro105	L23959	13	13q34	116658001-116673000
pro106	X77743	2	2q24.1	160044918-160062017
pro107	U10564	11	11p15.3	9127192-9142201
pro108	AB028069	7	7q21.12	68435001-68450000
pro109	AF053977	5	5q31.1	150402501-150422204
pro110	U09087	12	12q23.1	104568858-104585221
pro111	AF073362	11	11q21	101407914-101423315
pro113	L49054	3	3q25.32	173904528-173934748
pro114	X04327	7	7q33	139307570-139325937
pro115	AF074723	14	14q24.2	68654211-68669417
pro116	AF091092	1	1p32.3	58583305-58598434

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

66

pro117	AF058918	19	19q13.43	70037301-70052300
pro118	AF025441	15	15q15.1	36875108-36890661
pro119	AJ006591	4	4q31.1	148771296-148786657
pro124	L36529	18	18p11.32	254219-270019
pro125	X65550	10	10q26.2	138240294-138255077
pro126	M34065	5	5q31.2	150756331-150771379
pro127	L02547	20	20q13.2	58756755-58772000
pro128	U00238	4	4q12	59266501-59283500
pro130	L42450	2	2q31.1	176199115-176214588
pro131	X98253	X	Xq24	122031634-122047863
pro133	U58970	20	20q12	45447501-45463000
pro134	AF077953	18	18q21.1	47833501-47849000
pro135	J00140	5	5q14.1	86483185-86498573
		18	18q11.2	25676581-25692180
pro136	M74093	19	19q12	34192227-34207465
pro137	AF029669	17	17q23.1	63211106-63252789
pro138	AL050019	1	1p36.33	52302-67336
pro140	M68520	12	12q13.2	57983277-57998212
pro141	Y13467	17	17q12	41583543-41598142
pro143	U64805	17	17q21.31	45619001-45639000
pro144	U78082	14	14q24.2	68653184-68668183
pro145	Y15164	X	Xp22.22	13061501-13076500
pro146	AF008442	6	6p21.1	47871392-47886807
pro147	X16901	13	13q14.13	43972520-43990027
pro148	U06632	17	17q23.1	61863000-61878839
pro149	D26069	3	3q29	215253329-215270320
pro150	AF027150	14	14q21.1	35344279-35359694
pro152	D13413	3	3q29	211580067-211591811
pro155	L20320	5	5q13.1	73642669-73657617
pro157	AJ223728	22	22q11.21	16393966-16409005
pro158	AB023215	14	14q24.3	74118287-74135032
pro159	D32002	9	9q22.33	98867915-98884079
pro160	Y18046	6	6q27	177044740-177060727
pro162	U27459	2	2q33.2	206003518-206019965
pro164	D86322	4	4q31.1	147998675-148013849
pro165	Z46376	2	2p12	75788712-75806284
pro167	AF003540	11	11p15.5	2576355-2591604
pro168	D38553	2	2q11.1	94745291-94760990
pro169	M60725	17	17q23.2	64866487-64881241
pro173	L34673	3	3q24	162499055-162515000
pro174	U93867	1	1q21.1	162966980-162983139

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

67

pro175	U44754	14	14q23.1	58567756-58562473
pro177	AL050405	X	Xq26.1	132444071-132459420
pro179	U18937	5	5q31.3	153395323-153411137
pro180	X76388	4	4q31.21	152639006-152654005
pro181	AF038662	3	3q13.32	129394716-129409918
pro182	AF042169	10	10q22.1	74034210-74049959
pro185	U07804	20	20q12	41507121-41523513
pro187	M97388	1	1p22.1	104042438-104058335
pro189	L35546	1	1p22.1	104986774-105006727
pro191	AB007962	1	1q21.3	170103257-170119230
pro193	AF006259	12	12p13.22	4781441-4796771
pro195	X78627	2	2q14.3	123494635-123511228
pro196	M62810	10	10q21.1	61677452-61693234
pro197	AL080116	6	6q15	94998657-95013656
pro199	U79256	10	10q24.1	104501013-104516982
pro201	AL080088	16	16p13.2	11860550-11875029
pro203	M27878	12	12q24.33	144471103-144484312
pro204	AF091090	1	1p22.2	99597586-99612101
pro205	AF067656	10	10q21.1	59448924-59463923
pro206	U03911	2	2p16.3	48415852-48431851
pro207	U61145	7	7q36.1	155082360-155098279
pro208	D78335	1	1q23.3	187227102-187243552
pro209	U30872	1	1q41	240503771-240519770
pro211	U97188	7	7p15.3	23230613-23248257
		6	6q27	176760451-176776177
pro213	D38550	6	6p22.3	22232782-22247803
pro215	X15331	X	Xq22.3	108009046-108024961
pro217	D67448	3	3q22.1	146018136-146033999
pro219	U31556	8	8q21.3	88467142-88482608
pro220	X66113	1	1p36.22	11562649-11578096
pro221	M93119	20	20p11.23	21882614-21898000
pro222	AB020670	18	18q23	83636442-83651891
pro223	AF000430	12	12p11.21	33648020-33661381
pro224	U73960	7	7p21.3	11968001-11983000
pro226	X76029	4	4q12	58426181-58442374
pro227	AF063020	9	9p22.3	16919890-16934979
pro231	AJ132440	1	1q32.1	226438005-226453537
pro233	AB024401	13	13q34	113595323-113611692
pro235	AL049266	2	2q32.1	190196543-190212071
pro236	AB014550	18	18p11.32	2784040-2799481
pro237	X78932	7	7q11.21	64013301-64028356

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

68

pro238	U22377	1	1p34.2	44683920-44699429
pro242	L16782	10	10q23.31	96533196-96548690
pro243	AJ001810	16	16q12.2	63707495-63722576
pro244	U16028	2	2q31.1	178830447-178845919
pro246	L08424	12	12q23.2	109949544-109964900
pro247	U07559	5	5q11.2	53964473-53980257
pro248	Y10043	X	Xq28	155144719-155160284
pro249	S74445	15	15q24.2	74840231-74855495
pro250	U25165	3	3q26.33	196934501-196950372
pro251	U63336	6	6p21.33	33662019-33677856
pro253	U13022	7	7q35	149686107-149702331
pro255	AB019494	5	5p13.2	39907204-39922203
pro256	L07919	2	2q31.1	175756788-175772636
pro257	AB029006	2	2p22.3	32520144-32540169
pro258	AB028995	17	17q23.2	63475124-63497063
pro259	U62325	2	2q35	223126524-223141423
pro262	X54942	9	9q22.1	87899001-87915976
pro263	U10860	4	4p16.1	9058241-9073583
pro264	M87339	3	3q27.3	204899461-204915188
pro267	X59543	11	11p15.5	3340168-3358000
pro269	M76180	7	7p12.2	51709937-51727010
pro270	M92299	17	17q21.32	52711008-52726713
pro271	AB028021	20	20p11.21	25363017-25378980
pro272	Y16752	6	6p22.2	27692102-27707775
pro275	U96131	5	5p15.33	1133261-1148076
pro277	X84194	14	14q24.3	73530456-73545798
pro278	D62345	X	Xq22.1	102209954-102227610
pro279	L36818	11	11q13.4	76825241-76843255
pro282	V00568	8	8q24.13	130952716-130971510
pro283	U87459	X	Xq28	157900553-157917852
pro285	X16396	2	2p12	74933738-74953722
pro286	AF007140	19	19p13.2	10684785-10702574
pro287	AF053641	20	20q13.13	50999953-51020590
pro289	X55110	11	11p11.2	47010261-47026357
pro290	U84573	3	3q24	159499984-159525599
		X	Xq26.2	137568108-137581997
pro291	M97856	1	1p34.1	50925640-50946744
pro293	AB011173	1	1p36.12	25196653-25221848
pro294	U34994	3	3p24.3	25352447-25367957
pro295	Y18004	X	Xp22.13	18909706-18961865
pro296	D78611	7	7q32.2	133415266-133433462

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

69

pro297	D55716	7	7q22.1	101656642-101674644
pro298	L19183	17	17q11.2	29841430-29862449
pro300	X00737	14	14q11.2	16658977-16678611
pro301	X14850	9	9q21.12	73041595-73057571
pro305	M63180	5	5p13.3	32613067-32631841
pro307	AB014458	1	1p31.3	70502659-70519495
pro308	L07493	7	7p22.1	6711371-6728698
pro309	AF041474	3	3q26.33	198844404-198867622
pro310	Y18418	3	3q21.3	139858490-139872261
pro311	M94362	NA_random		1360953-1386439
pro312	U50939	16	16q22.1	75154638-75172659
pro313	D64110	21	21q11.2	15926421-15943327
pro315	M91670	17	17p11.2	17349263-17365467
		10	10p11.21	38991035-39007459
pro316	X64229	6	6p22.3	19889797-19909681
pro317	X53793	4	4q12	59189280-59209671
pro318	AL080119	1	1p31.2	76612579-76631294
pro319	D28423	6	6p21.31	40691099-40706383
pro320	U35451	17	17q21.32	52107808-52124651
pro321	U94319	9	9p22.3	16952805-16970295
pro322	M30938	2	2q35	221329992-221351121
pro323	AF047473	10	10q26.12	132970590-132988540
pro324	L33830	6	6q21	114313634-114328131
pro326	X62534	4	4q34.1	182348719-182364558
pro327	D84557	2	2q22.1	138897866-138715350
pro330	D21063	3	3q21.3	139528312-139551423
pro332	U90426	19	19p13.13	15547854-15568398
pro333	D00762	14	14q23.1	55012125-55034336
pro334	U72066	18	18q11.2	22625608-22643453
pro335	M86737	11	11q12.1	57630355-57653499
pro336	D13627	21	21q21.3	27298411-27317280
pro337	X01060	3	3q29	216708325-216729920
pro339	AF039022	20	20q11.22	34329184-34345180
pro340	L27706	7	7p11.2	57350245-57365971
pro346	AF035316	6	6p25.2	3491115-3506631
pro349	U25182	X	Xp22.12	22338422-22357291
pro353	X74262	1	1p35.1	35716074-35777340
pro354	J02645	14	14q23.3	64971951-64997045
pro355	M37583	4	4q24	104191912-104207386
pro356	U37689	3	3q27.2	202022093-202041189
pro359	U09510	7	7p14.3	30543349-30559412

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

70

Pro362	X04/41	4	4p4	39926899-39927127
--------	--------	---	-----	-------------------

Preferably, the first nucleic acid sequences are selected from the group consisting of

5 pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12, pro13, pro14,
 pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro20, pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26,
 pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40,
 pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52,
 pro53, pro54, pro55, pro56, pro57, pro58, pro59, pro60, pro61, pro62, pro63, pro64,
 pro65, pro66, pro67, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76,
 10 pro77, pro78, pro79, pro80, pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, pro86, pro87, pro88,
 pro89, pro90, pro91, pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99,
 pro100, pro101, pro103, pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109, pro110,
 pro111, pro112, pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119, pro120,
 pro121, pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128, pro129, pro130,
 15 pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, pro137, pro138, pro139, pro140, pro141,
 pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147, pro148, pro149, pro150, pro152,
 pro153, pro154, pro155, pro156, pro157, pro158, pro159, pro160, pro161, pro162,
 pro163, pro164, pro165, pro166, pro167, pro168, pro169, pro171, pro172, pro173,
 pro174, pro175, pro176, pro177, pro178, pro179, pro180, pro181, pro182, pro183,
 20 pro184, pro185, pro187, pro189, pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197,
 pro198, pro199, pro201, pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro208,
 pro209, pro210, pro211, pro212, pro213, pro215, pro216, pro217, pro219, pro220,
 pro221, pro222, pro223, pro224, pro225, pro226, pro227, pro228, pro229, pro230,
 pro231, pro232, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237, pro238, pro239, pro240,
 25 pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246, pro247, pro248, pro249, pro250,
 pro251, pro253, pro254, pro255, pro256, pro257, pro258, pro259, pro260, pro262,
 pro263, pro264, pro267, pro268, pro269, pro270, pro271, pro272, pro273, pro275,
 pro277, pro278, pro279, pro280, pro282, pro283, pro284, pro285, pro286, pro287,
 pro289, pro290, pro291, pro292, pro293, pro294, pro295, pro296, pro297, pro298,
 30 pro299, pro300, pro301, pro302, pro303, pro304, pro305, pro306, pro307, pro308,
 pro309, pro310, pro311, pro312, pro313, pro315, pro316, pro317, pro318, pro319,
 pro320, pro321, pro322, pro323, pro324, pro326, pro327, pro328, pro329, pro330,
 pro331, pro332, pro333, pro334, pro335, pro336, pro337, pro338, pro339, pro340,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

71

pro341, pro344, pro346, pro347, pro348, pro349, pro352, pro353, pro354, pro355,
pro356, pro358, pro359 and pro361.

5 More preferably, the first nucleic acid sequence is selected from the group consist-
ing of pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12, pro13,
pro14, pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26,
pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40,
pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52,
pro53, pro54, pro56, pro58, pro59, pro62, pro64, pro65, pro66, pro68, pro69, pro70,
10 pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro77, pro78, pro81, pro82, pro85, pro86, pro87,
pro89, pro90, pro92, pro98, pro103, pro105, pro108, pro120, pro125, pro128,
pro130, pro133, pro135, pro136, pro137, pro157, pro184, pro205, pro206, pro207,
pro209, pro210, pro211, pro212, pro216, pro217, pro219, pro221, pro227, pro231,
pro233, pro241, pro246, pro248, pro249, pro253 and pro256.

15 Yet more preferably, the first nucleic acid sequences are selected from the group
consisting of pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro7, pro8, pro14, pro15, pro16, pro22,
pro23, pro24, pro26, pro27, pro29, pro34, pro37, pro38, pro39, pro40, pro45, pro46,
pro48, pro49, pro50, pro52, pro59, pro69, pro71, pro74, pro77, pro86, pro87, pro89,
20 pro184, pro205, pro206, pro207, pro209, pro210, pro211, pro221, pro241, pro246,
pro248 and pro256.

Even more preferably, the first nucleic acid sequences are selected from the group
consisting of pro2, pro4, pro8, pro14, pro15, pro16, pro22, pro49, pro74, pro86,
25 pro87, pro89, pro205, pro221, pro246,

Most preferably, the first nucleic acid sequences are selected from the group con-
sisting of pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8,
pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273
30 and pro362.

In another preferred embodiment the first nucleic acid sequences are selected from
the group consisting of pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10,
pro12, pro13, pro14, pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro20, pro21, pro22, pro23,
35 pro24, pro25, pro26, pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36, pro37,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

72

pro38, pro39, pro40, pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52, pro53, pro54, pro55, pro56, pro57, pro58, pro59, pro60, pro61, pro62, pro63, pro64, pro65, pro66, pro67, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76, pro77, pro78, pro79, pro80, pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, pro86, pro87, pro88, pro89, pro90, pro91, pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99, pro100, pro101, pro103, pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109, pro110, pro111, pro112, pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119, pro120, pro121, pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128, pro129, pro130, pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, pro137, pro138, pro139, pro140, pro141, pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147, pro148, pro149, pro150, pro152, pro153, pro154, pro155, pro156, pro157, pro158, pro159, pro160, pro161, pro162, pro163, pro164, pro165, pro166, pro167, pro168, pro169, pro171, pro172, pro173, pro174, pro175, pro176, pro177, pro178, pro179, pro180, pro181, pro182, pro183, pro184, pro185, pro187, pro189, pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197, pro198, pro199, pro201, pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro209, pro210, pro211, pro212, pro213, pro216, pro217, pro219, pro220, pro221, pro222, pro223, pro224, pro225, pro227, pro228, pro229, pro230, pro231, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237, pro238, pro239, pro240, pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246, pro248, pro249, pro250, pro251, pro253, pro254, pro255, pro256, pro257, pro258, pro259, pro260, pro269, pro278, pro282, pro283, pro284, pro285, pro297, pro315, pro326, pro327, pro328 and pro329.

In one especially preferred embodiment of the present invention, the first nucleic acid sequence is pro 221 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro221 is the promoter of the gene encoding Insulinoma-associated antigen, IA-1, INSM1. Insulinoma-associated antigen mRNA is expressed at very high levels by all SCLC tested and only expressed at very low levels in brain and adrenal gland. Expression has been demonstrated by for example CHIPS analysis and RT-PCR (see example 1 and figure 3).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro210 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro210 is the promoter of the gene encoding lamin B, LMNB1. LMNB1 mRNA is expressed at very high levels by all tested SCLC and is only expressed at very low levels in

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

73

spleen, colon and lung. Expression of LMNB1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis and RT-PCR (see example 1 and figure 6).

5 In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro71 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro71 is the promoter of the gene encoding p16INK4/MTS1, MTS1, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A. p16INK4/MTS1 mRNA is expressed at very high levels by most SCLC and is only expressed at very low levels or not at all in normal tissues. Expression of LMNB1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis and
10 RT-PCR (see example 1 and figure 7).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro41 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro41 is the promoter of the gene encoding human MAD2L1, mitotic arrest deficient, yeast
15 homolog-like 1. MAD2L1 mRNA is expressed at very high levels in SCLC and expressed at high levels in testes, but only at low levels in other normal tissues. Expression of MAD2L1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis and RT-PCR (see example 1 and figure 5).

20 In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro30 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro30 is the promoter of the human *KIAA0042* gene. *KIAA0042* RNA is expressed at very high levels in most SCLC and in normal tissues it is only expressed at low levels in testes. Expression of *KIAA0042* has been demonstrated by for example CHIPS
25 analysis and RT-PCR (see example 1 and figure 4).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro2 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro2 is the promoter of the human gene encoding Human cyclin-selective ubiquitin carrier protein, UBE2C. UBE2C mRNA is expressed at very high levels in most SCLC and in
30 normal tissues it is expressed at low levels in spleen and testes. Expression of UBE2C has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro209 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro209 is
35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

74

the promoter of the human gene encoding mitotin, CENPF, centromere protein F. CENPF mRNA is expressed at high levels in most SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in testes. Expression of CENPF has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

5

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro14 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro14 is the promoter of the human KIAA0101 gene. KIAA0101 RNA is expressed at high levels in most SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in 7 tissues. Expression of KIAA0101 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

10

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro4 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro4 is the promoter of the human gene encoding Cyclin protein gene, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). PCNA mRNA is expressed at high levels in most SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in colon, spleen and testes. Expression of PCNA has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

15

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro8 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro8 is the promoter of the human gene encoding serine/threonine kinase, STK-1, STK12, fms-related tyrosine kinase 3. STK-1mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in colon, spleen and testes. Expression of STK-1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

20

25

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro246 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro246 is the promoter of the human gene encoding Achaete scute homologous protein, ASH1, ASCL1. ASH1 mRNA is expressed at high levels in many SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in brain. Expression of ASH1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

30

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro16 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro16 is

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

75

the promoter of the human gene encoding DNA topoisomerase II alpha (170 kD), TOP2A. TOP2A mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in 9 tissues and at high levels in testes. Expression of TOP2A has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

5

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro27 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro27 is the promoter of the human gene encoding Cyclin B2, CCNB2. Cyclin B2 mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in spleen and trachea and at high levels in testes. Expression of Cyclin B2 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

10

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro5 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro5 is the promoter of the human gene encoding Cyclin B1, CCNB1. Cyclin B1 mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in colon, spleen and trachea and at high levels in testes. Expression of Cyclin B1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

15

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro49 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro49 is the promoter of the human gene encoding Pituitary tumor-transforming 1, PTTG1. PTTG1 mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in thyroid, spleen and trachea and at high levels in testes. Expression of PTTG1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

20

25

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro19 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro19 is the promoter of the human gene encoding Kinesin-like spindle protein HKSP, KNSL1. KNSL1 mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in colon, small intestine and testes. Expression of KNSL1 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

76

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro140 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro140 is the promoter of the human gene encoding cdc2-related protein kinase, CDK2. CDK2 mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at high levels in spleen. Expression of CDK2 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro139 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro139 is the promoter of the human gene encoding Serine/threonine protein kinase SAK. SAK mRNA is expressed at high levels in most SCLC and in normal tissues it is expressed at high levels in testes. Expression of SAK has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro207 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro207 is the promoter of the human gene encoding Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2). EZH2 mRNA is expressed at high levels in SCLC and in normal tissues it is expressed at high levels in testes. Expression of EZH2 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro81 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro81 is the promoter of the human *HSU79266* gene. *HSU79266* RNA is expressed at high levels in most SCLC and in normal tissues it is expressed in testes and spleen. Expression of *HSU79266* has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro273 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro273 is the promoter of the human gene encoding Rad2, flap structure-specific endonuclease 1, FEN1. Rad2 mRNA is expressed at high levels in most SCLC and in normal tissues it is at low levels in 12 tissues. Expression of Rad2 has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

77

In another preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence is pro362 or a fragment thereof or a functional homologue thereof. Pro362 is the promoter of the human gene encoding Protein gene product PGP, ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, ubiquitin thiolesterase. PGP mRNA is expressed at high levels in most SCLC and in normal tissues it is expressed at low levels in kidney and high levels in brain. Expression of PGP has been demonstrated by for example CHIPS analysis (see example 1).

Functional homologues

Functional homologues of polypeptides according to the present invention is meant to comprise any polypeptide sequence which comprise the same function. For example functional homologues of cell surface molecules are molecules associated with the cell surface which can associate with a binding partner and preferably is capable of internalising the binding partner. Functional homologues of binding partners are molecules which can associate with the cell surface molecule and which preferably is capable of being internalised into cells expressing the cell surface molecule.

Functional homologues according to the present invention comprise polypeptides with an amino acid sequence, which are sharing at least some homology with the predetermined polypeptide sequences as outlined herein above. For example such polypeptides are at least about 40 percent, such as at least about 50 percent homologous, for example at least about 60 percent homologous, such as at least about 70 percent homologous, for example at least about 75 percent homologous, such as at least about 80 percent homologous, for example at least about 85 percent homologous, such as at least about 90 percent homologous, for example at least 92 percent homologous, such as at least 94 percent homologous, for example at least 95 percent homologous, such as at least 96 percent homologous, for example at least 97 percent homologous, such as at least 98 percent homologous, for example at least 99 percent homologous with any of the predetermined polypeptide sequences as outlined herein.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

78

The homology between amino acid sequences may be calculated using well known algorithms such as for example any one of BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, and BLOSUM 90.

5

Functional homologues may comprise an amino acid sequence that comprises at least one substitution of one amino acid for any other amino acid. For example such a substitution may be a conservative amino acid substitution or it may be a non-conservative substitution.

10

A conservative amino acid substitution is a substitution of one amino acid within a predetermined group of amino acids for another amino acid within the same group, wherein the amino acids within a predetermined groups exhibit similar or substantially similar characteristics. Within the meaning of the term "conservative amino acid substitution" as applied herein, one amino acid may be substituted for another within groups of amino acids characterised by having

15

i) polar side chains (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, and Cys.)

20

ii) non-polar side chains (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, and Met)

iii) aliphatic side chains (Gly, Ala Val, Leu, Ile)

iv) cyclic side chains (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)

25

v) aromatic side chains (Phe, Tyr, Trp)

vi) acidic side chains (Asp, Glu)

30

vii) basic side chains (Lys, Arg, His)

viii) amide side chains (Asn, Gln)

ix) hydroxy side chains (Ser, Thr)

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

79

- x) sulphur-containing side chains (Cys, Met), and
- xi) amino acids being monoamino-dicarboxylic acids or monoamino-monocarboxylic-monoamidocarboxylic acids (Asp, Glu, Asn, Gln).

5

Non-conservative substitutions are any other substitutions. A non-conservative substitution leading to the formation of a functional homologue would for example i) differ substantially in hydrophobicity, for example a hydrophobic residue (Val, Ile, Leu, Phe or Met) substituted for a hydrophilic residue such as Arg, Lys, Trp or Asn, or a hydrophilic residue such as Thr, Ser, His, Gln, Asn, Lys, Asp, Glu or Trp substituted for a hydrophobic residue; and/or ii) differ substantially in its effect on polypeptide backbone orientation such as substitution of or for Pro or Gly by another residue; and/or iii) differ substantially in electric charge, for example substitution of a negatively charged residue such as Glu or Asp for a positively charged residue such as Lys, His or Arg (and vice versa); and/or iv) differ substantially in steric bulk, for example substitution of a bulky residue such as His, Trp, Phe or Tyr for one having a minor side chain, e.g. Ala, Gly or Ser (and vice versa).

Functional homologues according to the present invention may comprise more than one such substitution, such as e.g. two amino acid substitutions, for example three or four amino acid substitutions, such as five or six amino acid substitutions, for example seven or eight amino acid substitutions, such as from 10 to 15 amino acid substitutions, for example from 15 to 25 amino acid substitution, such as from 25 to 30 amino acid substitutions, for example from 30 to 40 amino acid substitution, such as from 40 to 50 amino acid substitutions, for example from 50 to 75 amino acid substitution, such as from 75 to 100 amino acid substitutions, for example more than 100 amino acid substitutions.

The addition or deletion of an amino acid may be an addition or deletion of from 2 to 5 amino acids, such as from 5 to 10 amino acids, for example from 10 to 20 amino acids, such as from 20 to 50 amino acids. However, additions or deletions of more than 50 amino acids, such as additions from 50 to 200 amino acids, are also comprised within the present invention.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

80

The polypeptides according to the present invention, including any variants and functional homologues thereof, may in one embodiment comprise more than 5 amino acid residues, such as more than 10 amino acid residues, for example more than 20 amino acid residues, such as more than 25 amino acid residues, for example more than 50 amino acid residues, such as more than 75 amino acid residues, for example more than 100 amino acid residues, such as more than 150 amino acid residues, for example more than 200 amino acid residues.

Additional factors may be taken into consideration when determining functional homologues according to the meaning used herein. For example functional homologues may be capable of associating with antisera which are specific for the polypeptides according to the present invention.

In a further embodiment the present invention relates to functional equivalents which comprise substituted amino acids having hydrophilic or hydrophobic indices that are within ± 2.5 , for example within ± 2.3 , such as within ± 2.1 , for example within ± 2.0 , such as within ± 1.8 , for example within ± 1.6 , such as within ± 1.5 , for example within ± 1.4 , such as within ± 1.3 for example within ± 1.2 , such as within ± 1.1 , for example within ± 1.0 , such as within ± 0.9 , for example within ± 0.8 , such as within ± 0.7 , for example within ± 0.6 , such as within ± 0.5 , for example within ± 0.4 , such as within ± 0.3 , for example within ± 0.25 , such as within ± 0.2 of the value of the amino acid it has substituted.

The importance of the hydrophilic and hydrophobic amino acid indices in conferring interactive biologic function on a protein is well understood in the art (Kyte & Doolittle, 1982 and Hopp, U.S. Pat. No. 4,554,101, each incorporated herein by reference).

The amino acid hydrophobic index values as used herein are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5) (Kyte & Doolittle, 1982).

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

81

The amino acid hydrophilicity values are: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0, +1); glutamate (+3.0, +1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5, +1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4) (U.S. 4,554,101).

Substitution of amino acids can therefore in one embodiment be made based upon their hydrophobicity and hydrophilicity values and the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, including charge, size, and the like. Exemplary amino acid substitutions which take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

In addition to the polypeptide compounds described herein, sterically similar compounds may be formulated to mimic the key portions of the peptide structure and that such compounds may also be used in the same manner as the peptides of the invention. This may be achieved by techniques of modelling and chemical designing known to those of skill in the art. For example, esterification and other alkylations may be employed to modify the amino terminus of, e.g., a di-arginine peptide backbone, to mimic a tetra peptide structure. It will be understood that all such sterically similar constructs fall within the scope of the present invention.

Peptides with N-terminal alkylations and C-terminal esterifications are also encompassed within the present invention. Functional equivalents also comprise glycosylated and covalent or aggregative conjugates, including dimers or unrelated chemical moieties. Such functional equivalents are prepared by linkage of functionalities to groups which are found in fragment including at any one or both of the N- and C-termini, by means known in the art.

Functional equivalents may thus comprise fragments conjugated to aliphatic or acyl esters or amides of the carboxyl terminus, alkylamines or residues containing carboxyl side chains, e.g., conjugates to alkylamines at aspartic acid residues; O-acyl derivatives of hydroxyl group-containing residues and N-acyl derivatives of the amino terminal amino acid or amino-group containing residues, e.g. conjugates with

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

82

Met-Leu-Phe. Derivatives of the acyl groups are selected from the group of alkyl-moieties (including C3 to C10 normal alkyl), thereby forming alkanoyl species, and carbocyclic or heterocyclic compounds, thereby forming aroyl species. The reactive groups preferably are difunctional compounds known per se for use in cross-linking

5 proteins to insoluble matrices through reactive side groups.

Homologues of nucleic acid sequences within the scope of the present invention are nucleic acid sequences, which

- 10 i) encodes an RNA and/or a protein with similar biological function;
or
ii) is capable of exerting a similar biological influence;

and which is

- 15 a) at least 50% identical, such as at least 60% identical, for example at least 70% identical, such as at least 75% identical, for example at least 80% identical, such as at least 85% identical, for example at least 90% identical, such as at least 95% identical
- 20 b) or able to hybridise to the complementary strand of said nucleic acid sequence under stringent conditions.

A similar biological influence within this context may for example be that the nucleic acid sequence is capable influencing transcription of second nucleic acid sequences

25 operably linked thereto in a fashion similar to functional homologous thereof.

Stringent conditions as used herein shall denote stringency as normally applied in connection with Southern blotting and hybridisation as described e.g. by Southern E. M., 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517. For such purposes it is routine practise to include

30 steps of prehybridization and hybridization. Such steps are normally performed using solutions containing 6x SSPE, 5% Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamide, 100 µg/ml denaturated salmon testis DNA (incubation for 18 hrs at 42°C), followed by washings with 2x SSC and 0.5% SDS (at room temperature and at 37°C), and a washing with 0.1x SSC and 0.5% SDS (incubation at 68°C for 30 min), as described

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

83

by Sambrook et al., 1989, in "Molecular Cloning/A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor), which is incorporated herein by reference.

Homologous of nucleic acid sequences also encompass nucleic acid sequences which comprise additions and/or deletions. Such additions and/or deletions may be internal or at the end. Additions and/or deletions may be of 1-5 nucleotides, such as 5 to 10 nucleotide, for example 10 to 50 nucleotides, such as 50 to 100 nucleotides, for example at least 100 nucleotides.

10 Vaccine

In one embodiment of the present invention the cell surface molecules may be used for the preparation of a vaccine. Preferably such a vaccine is capable of raising an immune response against the cell surface molecule. Such an immune response preferably results in specific killing of cells expressing said cell surface molecule. Most preferably, the cells expressing the cell surface molecule are malignant cells, such as the vaccine results in specific killing of malignant cells.

Accordingly, the vaccine is preferably suitable for ameliorating and/or curative and/or prophylactic treatment of a premalignant and/or malignant condition. Hence, the vaccine preferably should be administrated to an individual suffering from a premalignant and/or malignant conditions, preferably cancer. The individual may be any animal, however preferably the individual is a human being.

It is possible to use either the cell surface molecule or fragments thereof or derivatives thereof as well as nucleic acids encoding the cell surface molecule or fragments thereof or derivatives thereof. Preferred cell surface molecules to use with such a vaccine are cell surface molecules which are expressed at a higher level in malignant cells in vivo and/or malignant cell lines than in normal tissues. For example such a cell surface molecule may be identified according to the methods outlined herein above. However, other suitable cell surface molecules may also be employed.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

84

Preferably, the cell surface molecule comprises or essentially consists of or for
 example is GRIA2, such as LPR8, for example is CHRNA5, such as TMEFF, for
 example is NPTXR, such as Transferrin receptor; such as type II membrane protein
 clone; for example is HP10481; such as type II membrane protein clone; such as
 5 HP10390; for example is PG40; such as TRC8; for example is TR2-11; such as
 OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6, For example
 GPIIb; such as vitronectin receptor alpha subunit; for example is integrin alpha-7;
 such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin
 alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3
 10 chain; for example is RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for
 example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein;
 FOR EXAMPLE GLVR1; for example is Mr 110,000 antigen; for example is
 syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is
 LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63
 15 antigen; such as multispanning membrane protein; for example is DDR; such as
 autocrine motility factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as
 IGF1R, for example is insulin-like growth factor II receptor; such as SAS; for
 example is TAPA-1; such as MICB; for example is MHC class II HLA-DR7-
 associated glycoprotein beta-chain; such as HLA-DP; for example is bone small
 20 proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-
 gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor;
 such as metabotropic glutamate receptor type 4; for example is metabotropic
 glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as
 MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such
 25 as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as
 CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very low density
 lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor homolog
 TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as
 NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C;
 30 such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such
 as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such
 as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example is CD151; such as surface
 antigen; for example is MAG; such as GPR19; for example is pcta-1; such as
 PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like
 35 protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-

WO 03/00928

PCT/IB02/03534

85

HT1D-); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR8; for example is tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1

5 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OC15; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican

10 V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal

15 growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such

20 as TGFBR2; for example is TGFBR3; such as precursor of epidermal growth factor receptor.

More preferably, the cell surface molecule is selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12,

25 L1CAM, GPR49 and TMEFF1.

In one preferred embodiment the vaccine furthermore comprise a non-self antigen covalently linked to said cell surface molecule. Alternatively, when nucleic acid sequences encoding cell surface molecules are used, the vaccine may comprise

30 second nucleic acid sequences encoding a non-self antigen linked to the nucleic acid sequences.

Examples of non-self antigens which may be used with the present invention are invention are T-cell epitopes, preferably polypeptides or peptide.

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

86

It is also possible that the vaccine comprises more than one antigen, such as 2, for example 3, such as 4, for example 5, such as more than 5 different antigens. The antigens may be self antigens or non-self antigens.

5 The vaccine according to the present invention may furthermore comprise an adjuvant and /or a carrier. The carrier or adjuvant could be any carrier or adjuvant known in the art including functional equivalents thereof. Functionally equivalent carriers are capable of presenting the same antigen in essentially the same steric conformation when used under similar conditions. Functionally equivalent adjuvants
10 are capable of providing similar increases in the efficacy of the composition when used under similar conditions.

Preferably, said compositions comprise potent, nontoxic adjuvants that will enhance and/or modulate the immunogenicity of immunogenic determinants including anti-
15 genic determinants including haptenic determinants represent one group of preferred adjuvants. In addition, such adjuvants preferably also elicit an earlier, more potent, or more prolonged immune response. Such an adjuvant would also be useful in cases where an antigen supply is limited or is costly to produce.

20 Adjuvants pertaining to the present invention may be grouped according to their origin, be it mineral, bacterial, plant, synthetic, or host product. The first group under this classification is the mineral adjuvants, such as aluminum compounds. Antigens precipitated with aluminum salts or antigens mixed with or adsorbed to performed aluminum compounds have been used extensively to augment immune responses
25 in animals and humans. Aluminium particles have been demonstrated in regional lymph nodes of rabbits seven days following immunisation, and it may be that another significant function is to direct antigen to T cell containing areas in the nodes themselves. Adjuvant potency has been shown to correlate with intimation of the draining lymph nodes. While many studies have confirmed that antigens administered with aluminium salts lead to increased humoral immunity, cell mediated immu-
30 nity appears to be only slightly increased, as measured by delayed-type hypersensitivity. Aluminium hydroxide has also been described as activating the complement pathway. This mechanism may play a role in the local inflammatory response as well as immunoglobulin production and B cell memory. Furthermore, aluminium hydroxide can protect the antigen from rapid catabolism. Primarily because of their
35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

87

excellent record of safety, aluminum compounds are presently the only adjuvants used in humans.

Another large group of adjuvants is those of bacterial origin. Adjuvants with bacterial origins can be purified and synthesised (e.g. muramyl dipeptides, lipid A) and host mediators have been cloned (Interleukin 1 and 2). The last decade has brought significant progress in the chemical purification of several adjuvants of active components of bacterial origin: Bordetella pertussis, Mycobacterium tuberculosis, lipopolysaccharide, Freund's Complete Adjuvant (FCA) and Freund's Incomplete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) and Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.). Additionally suitable adjuvants in accordance with the present invention are e.g. Titermax Classical adjuvant (SIGMA-ALDRICH), ISCOMS, Quil A, ALUN, see US 58767 and 5,554,372, Lipid A derivatives, cholera toxin derivatives, HSP derivatives, LPS derivatives, synthetic peptide matrixes, GMDP, and other as well as combined with immunostimulants (US 5,876,735).

B. pertussis is of interest as an adjuvant in the context of the present invention due to its ability to modulate cell-mediated immunity through action on T-lymphocyte populations. For lipopolysaccharide and Freund's Complete Adjuvant, adjuvant active moieties have been identified and synthesised which permit study of structure-function relationships. These are also considered for inclusion in immunogenic compositions according to the present invention.

Lipopolysaccharide and its various derivatives, including lipid A, have been found to be powerful adjuvants in combination with liposomes or other lipid emulsions. It is not yet certain whether derivatives with sufficiently low toxicity for general use in humans can be produced. Freund's Complete Adjuvant is the standard in most experimental studies.

Mineral oil may be added to vaccine formulation in order to protect the antigen from rapid catabolism.

Many other types of materials can be used as adjuvants in immunogenic compositions according to the present invention. They include plant products such as saponin, animal products such as chitin and numerous synthetic chemicals.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

88

- Adjuvants according to the present invention can also be categorised by their proposed mechanisms of action. This type of classification is necessarily somewhat arbitrary because most adjuvants appear to function by more than one mechanism.
- 5 Adjuvants may act through antigen localisation and delivery, or by direct effects on cells making up the immune system, such as macrophages and lymphocytes. Another mechanism by which adjuvants according to the invention enhance the immune response is by creation of an antigen depot. This appears to contribute to the adjuvant activity of aluminum compounds, oil emulsions, liposomes, and synthetic
- 10 polymers. The adjuvant activity of lipopolysaccharides and muramyl dipeptides appears to be mainly mediated through activation of the macrophage, whereas B. pertussis affects both macrophages and lymphocytes. Further examples of adjuvants that may be useful when incorporated into immunogenic compositions according to the present invention are described in US 5,554,372.
- 15 In one preferred embodiment, adjuvants according to the present invention are selected from the group consisting of aluminium compounds, Freund's incomplete adjuvant, Titermax classical adjuvant and oil emulsions.
- 20 There is also provided an embodiment of the present invention wherein the immunogenic composition further comprises a carrier. The carrier may be present independently of an adjuvant. The purpose of conjugation and/or co-immunisation of an antigen and a carrier can be e.g. to increase the molecular weight of the antigen in order to increase the activity or immunogenicity of the antigen, to confer stability to
- 25 the antigen, to increase the biological activity of the determinant, or to increase its serum half-life. The carrier protein may be any conventional carrier including any protein suitable for presenting antigens. Conventional carrier proteins include, but are not limited to, keyhole limpet hemocyanin, serum proteins such as transferrin, bovine serum albumin, or human serum albumin, an ovalbumin, immunoglobulins, or hormones, such as insulin.
- 30 While any suitable pharmaceutical carrier known to those of ordinary skill in the art may be employed in the vaccine of this invention, the type of pharmaceutical carrier will vary depending on the mode of administration and whether a sustained release administration is desired. For parenteral administration, such as subcutaneous in-
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

89

jection, the pharmaceutical carrier may e.g. comprise water, saline, alcohol, fat, a wax or a buffer. Biodegradable microspheres (e.g., polylactic galactide) may also be employed as pharmaceutical carriers for the pharmaceutical compositions of this invention.

5

In one embodiment of the present invention, the vaccine involves the use of dendritic cells. Such an embodiment preferably comprises the steps of

- i) providing dendritic cells; and
- 10 ii) transferring nucleic acid sequences encoding a cell surface molecule according to the present invention operably linked to second nucleic acid sequences directing expression thereof to the dendritic cells or transferring a cell surface molecule or a fragment thereof to the dendritic cells; and
- 15 iii) displaying said cell surface molecules or fragments thereof on the cell surface of the dendritic cells; and
- iv) transferring said dendritic cells to the individual to be treated

20 Preferably, the dendritic cells are cells derived from the individual to be treated, however the dendritic cells may also be derived from another individual. When the dendritic cells are derived from another individual, preferably, the cells are derived from the same species as the individual to be treated. For example, if the individual to be treated is a human being, preferably, the dendritic cells are derived from a human being.

25

Preferably, the cell surface molecules are displayed on the cell surface as fragments, such as peptide fragments in the context on MHC molecules.

Drug target

30

Cell surface molecules, which are capable of binding a binding partner and internalising said binding partner into cells expressing said cell surface molecule, may also be used as drug targets. Preferably, such cell surface molecules are expressed at a different level in malignant cell lines compared with normal tissues.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

90

More preferably, the cell surface molecules are identified according to the methods outlined in the present invention.

More preferably the cell surface molecule comprises or essentially consists of or for
 5 example is GRIA2, such as LPR8, for example is CHRNA5, such as TMEFF, for
 example is NPTXR, such as Transferrin receptor; such as type II membrane protein
 clone; for example is HP10481; such as type II membrane protein clone; such as
 HP10390; for example is PG40; such as TRC8; for example is TR2-11; such as
 10 OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6, For example
 GPIIb; such as vitronectin receptor alpha subunit; for example is integrin alpha-7;
 such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin
 alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3
 chain; for example is RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for
 example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein;
 15 FOR EXAMPLE GLVR1; for example is Mr 110,000 antigen; for example is
 syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is
 LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63
 antigen; such as multispinning membrane protein; for example is DDR; such as
 autocrine motility factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as
 20 IGF1R, for example is insulin-like growth factor II receptor; such as SAS; for
 example is TAPA-1; such as MICB; for example is MHC class II HLA-DR7-
 associated glycoprotein beta-chain; such as HLA-DP; for example is bone small
 proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-
 gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor;
 25 such as metabotropic glutamate receptor type 4; for example is metabotropic
 glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as
 MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such
 as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as
 CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very low density
 30 lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor homolog
 TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as
 NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C;
 such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such
 as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such
 35 as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example is CD151; such as surface

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

91

- antigen; for example is MAG; such as GPR19; for example is pcta-1; such as PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-HT1D-); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR6; for example is tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OC15; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such as TGFBR2; for example is TGFBR3; such as precursor of epidermal growth factor receptor.
- Yet more preferably, the cell surface molecule is selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and TMEFF1.
- A drug target within the scope of the present invention is a molecule, which can be used as a bait, to identify molecules that associates with the drug target and accordingly are potential candidates for drugs. Especially such drugs can be used in the treatment of a premalignant and/or malignant conditions, when formulated accordingly.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

92

The present invention furthermore is concerned with methods for identifying novel drug targets, which can interact with the binding partners according to the present invention (see herein below).

- 5 Preferably, such a novel drug target comprise a polypeptide, which is a cell surface molecule expressed at a different level in malignant cells compared with normal cells.

- 10 Additionally, the present invention also is concerned with the novel drug targets identified by the above methods.

Methods to identify binding partners

- 15 The present invention furthermore provides methods of identifying specific binding partners. Additionally, the invention provides methods of preparing specific binding partners.

- 20 A specific binding partner may be identified/prepared by a number of different methods. Any suitable method known to the person skilled in the art may be used with the present invention depending of the specific embodiment.

- 25 In one embodiment of the present invention, the binding partner is prepared by standard methods for preparing specific antibodies. For example such a method may involve the following steps:

- 30 i) immunising an animal with said cell surface molecule or a fragment of said cell surface molecule; and
ii) obtaining antibodies from said animal; or
iii) obtaining cells producing antibodies from said animal and obtaining antibodies from said cells

The animal to be immunised may be any animal, preferably a mammal, more preferably the animal is selected from the group comprising rabbit, mouse, rat, donkey, goat and sheep.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

93

The antibodies are preferably obtained from a serum of the immunised animal. They may be purified by any standard method, such as for example by affinity chromatography. Antibodies thus obtained are preferably polyclonal antibodies.

5

Cell producing antibodies are preferably obtained from the spleen of the immunised animals, preferably the cells are B-cells. The antibody producing cells may be fused with other cells subsequent to purification from the animal, in order to obtain immortal cells. The cells may be cultivated in vitro and antibodies may for example be recovered from the tissue culture supernatant by any standard method such as for example affinity chromatography, or protein A or protein G chromatography. These antibodies are often monoclonal antibodies.

10

Subsequently, the antibodies may be humanised by any suitable method known to the person skilled in the art.

15

Antibodies may however also be prepared or identified by other means. For example naturally occurring antibodies may be purified from any suitable animal including a human being. Antibodies may also be obtained from an expression library (see herein below).

20

In another embodiment of the present invention the binding partner consists of or comprises a polypeptide, which may be identified by screening an expression library. Any suitable expression library may be used with the present invention.

25

The library may be contained within any suitable host cells, for example the host cells may be bacterial cells, yeast cells, insect cells or mammalian cells. The library may contain nucleic acid sequences encoding polypeptides and/or oligopeptides derived from any species, for example viruses, bacteria, yeast, fungi, plants or animal. Animals may be any animal, preferably mammals, more preferably human beings. The library may also contain nucleic acid sequences encoding polypeptides and/or oligopeptides, which are synthetic and not naturally occurring. The nucleic acid sequences may be contained within any suitable vector, for example a plasmid, a virus, a virus derived vector, a phage, an artificial chromosome or a cosmid.

30

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

94

- For example the binding partners may be selected from an expression library expressing polypeptides and/or oligopeptides. They may also be selected from a synthetic combinatorial library expressing polypeptides and/or oligopeptides.
- 5 The binding partner may furthermore be identified by screening a phage display library of antibodies. Preferably the phage display library is a library of human antibodies.
- 10 In yet another embodiment the binding partners are selected from a library of small chemical compounds. Such a library may comprise any number of different chemical compounds, which may be produced, by a number of different reactions. Suitable libraries such as for example combinatorial libraries are known to the person skilled in the art.
- 15 Once a specific binding partner, which can associate with a cell surface molecule or a fragment of a cell surface molecule has been identified/prepared, such a binding partner should preferably be tested for capability of being internalised. Such tests can be performed in a number of suitable ways depending on the nature of the binding partner.
- 20 For example, the binding partner may be incubated with cells expressing the cell surface molecule or fragment thereof, with which the binding partner can associate. Following incubation, the presence and/or absence of the binding partner in the cell interior may be detected. Detection may for example be performed taking advantage
- 25 of that the binding partner may have been labelled with a directly or indirectly detectable label. Alternatively, the presence of the binding partner may be determined using a first species which can interact specifically with the binding partner. Such a species may be directly or indirectly labelled or it may be detected using a second species, which can interact specifically with the first species and
- 30 which may be labelled. It is possible to use a third species, which can interact with the second, forth which can interacts with the third and so forth.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

95

Binding partners

- 5 The specific binding partners according to the present invention are capable of interacting with at least one cell surface molecule. However, a specific binding partner may be capable of associating with more than one different cell surface molecules.
- 10 In one embodiment of the present invention binding partners within are preferably binding partners, which are capable of being internalised into a cell expressing a cell surface molecule following association with the cell surface molecule.
- The binding partners according to the present invention may be identified by any of the methods outlined herein above. However, the binding partner may also be
- 15 identified by any other method known to the person skilled in the art.
- Preferably, the binding partner according to the present invention is capable of associating with one or more cell surface molecules selected from the group consisting
- 20 of receptors which belong to one of the following groups:
- Members of receptor tyrosine kinases
 - Members of the integrin family
 - Members of the immunoglobulin superfamily adhesion molecules

25 Members of the heparan sulfate proteoglycan family

 - Members of the chondroitin sulfate proteoglycan family
 - Members of the MAGE family
 - Members of the RAGE family
 - Members of the low density lipoprotein receptor family

30 Members of the cadherin adhesion molecules

 - Members of the metabotropic glutamate receptors
 - Members of the steroid hormone families
 - Members of the seven transmembrane receptor family

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

96

Atrial natriuretic peptide clearance receptor

GFRA3

Transferrin receptor

Members of the serine/threonine kinase receptors

5

More preferably, the binding partner according to the present invention is capable of associating with one or more cell surface molecules selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and TMEFF1.

10

Yet more preferably, the binding partner may associate with one or more fragments of a cell surface molecule. Preferred fragments of cell surface molecules are outlined herein above. Most preferably, the fragments of the cell surface molecules are derived from the extracellular part of the cell surface molecule.

15

It is preferred that the binding partners according to the present invention may be used in pharmaceutical compositions for the treatment of a premalignant and/or malignant conditions.

20

In one embodiment of the present invention the binding partner comprises or essentially consists of a polypeptide or an oligopeptide. A polypeptide and/or an oligopeptide according to the present invention may be naturally occurring or it may be a synthetic polypeptide.

25

In one preferred embodiment the binding partner is an antibody or a fragment of an antibody. The antibody may be a polyclonal antibody or a binding fragment thereof or it may be a monoclonal antibody or a binding fragment thereof.

30

The antibody may be derived from an animal, preferably a mammal, more preferably a mammal selected from the group consisting of rat, rabbit, mouse, human, donkey, goat and sheep. In one embodiment the binding partner is a monoclonal antibody derived from a mouse or a rat, for example the binding partner is a murine monoclonal antibody.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

97

The antibody may however also be combinatorial antibody, such as one part of the antibody is derived from one species and the other part is derived from another species. Furthermore, the antibody may be a synthetic antibody, which is not naturally produced.

5

For many purposes it is preferred that the antibody is a humanised antibody. Especially, if the binding partner should be used for the treatment of a premalignant and/or malignant conditions in a human being, it is desirable that the antibody is humanised.

10

The antibody may also be human antibody. A human antibody may be a naturally produced human antibody or it may be identified from a phage display library. Furthermore it may be a combinatorial antibody that also comprise parts derived from human antibodies, for example identified from a combinatorial library. Such an antibody need no further humanisation.

15

The antibody preferably, may interact with the extracellular part of the cell surface molecule (see herein above). The antibody may also associate with a posttranslational modification of the extracellular part of the cell surface molecule.

20

Alternatively, the antibody may interacts with any of the fragments of the cell surface molecule as outlined herein above.

Most preferably the antibody is capable of being internalised upon association with said cell surface molecule. Many antibodies, which associate with a cell surface molecule, are not internalised into a cell expressing the cell surface molecule upon association. Preferred antibodies within the scope of the present invention are antibodies, which may be internalised into a cell expressing the cell surface molecule following association.

25

In another embodiment of the present invention the binding partner is a naturally occurring ligand for said cell surface molecule. A naturally occurring ligand is a compound, which under natural conditions associates with the cell surface molecule. A naturally occurring ligand may for example selected from the group consisting of polypeptides, oligopeptides, hormones, lipids, saccharides, amino acids, neurotransmitters, nucleotide, nucleoside and combinations thereof.

30

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

98

A hormone could for example be a steroid hormone. Steroid hormones may be selected from the group consisting of androgens, estrogens, progestogens and corticoids.

5

Androgens can for example be selected from the group consisting of testosterone, dihydrotestosterone, androstenediol, androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and derivatives thereof.

10

Estrogens can for example be selected from the group consisting of estrion, estradiol, estriol and derivatives thereof.

A naturally occurring ligand may be purified from an animal including a human being by any conventional technique suitable for the ligand of the embodiment. However, a natural ligand may also be produced in vitro by any method known to the person skilled in the art.

15

In one embodiment of the present invention the binding partner is a recombinantly produced ligand for said cell surface molecule. If the ligand is a polypeptide or an oligopeptide, the ligand may be produced by transforming a suitable host, such as bacteria, yeast, protozoa, animals such as for example mammals, plants, animal cells or plant cells with a nucleic acid sequence encoding the ligand operably linked to nucleic acid sequences that direct transcriptions and/or translation of the nucleic acid sequence in the particular host. Transformation may be performed according to any conventional technique. Subsequently the ligand may be purified according to any standard method.

20

25

In another embodiment the binding partner is a viral protein or comprise a viral protein or fragments thereof. A large number of viral proteins are capable of associating with cell surface molecule. Frequently such an association results in internalisation of the virus particle, and hence viral proteins are suitable binding partners according to the present invention.

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

99

Preferably, a viral protein is a viral capsid protein, more preferably the viral capsid protein is capable of being internalised into a cell expressing the cell surface molecule.

- 5 The viral protein may be derived from any virus, preferably a virus which is capable of infecting cells which naturally expresses the cell surface molecule. The virus could for example be selected from the group consisting of adenovirus, herpes simplex virus, influenza virus and members of the lentivirus family.
- 10 The binding partner may be recombinantly produced (see herein above) and comprise viral capsid protein sequences. Preferably the viral capsid protein sequences are the sequences of the viral protein which can associate with the cell surface molecule and result in internalisation.
- 15 In yet another embodiment of the present invention the binding partner is a small chemical compound. Such a small chemical compound is usually synthetically produced. It can be produced by any process or combination of processes known to the person skilled in the art.
- 20 Preferred small chemical compounds can interact with the cell surface molecules and/or the fragments of cell surface molecules as outlined herein above. More preferably, the small chemical compounds are capable of being internalised into cells expressing said cell surface molecules.
- 25 In one embodiment the binding partner may be a polypeptide selected from the group consisting of EGF, TGF- α , TGF- β , amphiregulin, HB-EGF, epiregulin, beta-cellulin, IGF-1, IGF-2, collagen, fibronectin, vitronectin, laminin, amyloid beta-protein precursor, interferon γ , transferrin, autocrine motility factor, L1, NCAM, cadherin, bombesin, neuromedin B, TNF, erythropoietin, interleukin and cholecystokinin B.
- 30 Furthermore, the binding partner may for example be an organic compound selected from the group consisting of cannabinoid, acetylcholin, dopamine, norepinephrine, serotonin and GABA. In addition the binding partner may for example be an oligopeptide selected from the group consisting of formyl peptide and atrial natriuretic peptide. Furthermore the binding partner may for example be an amino acid, the binding partner may be any amino acid, preferably the amino acid is selected from the group
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

100

consisting of glutamate, glycine and histamine. Additionally, the binding partner may for example be a nucleotide selected from the group consisting of ATP and GTP. Furthermore, the binding partner may be a hormone such as estrogen, a lipid or a saccharide.

5

Furthermore, the binding partner according to the present invention may be selected from the group consisting of EGF, TGF- α , heregulins, insulin, IGF-1, PDGF, CSF-1, SCF, Flt-3L, VEGF, FGFs1-9, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, HGF, MSP, Gas6, Angiopoietin-1, ephrinA1-5, ephrinB1-3, GDNF, PEPHC1, TGF- β , Angiotensin, Thrombin, Adenosine, Adrenalin, Serotonin, deltorphin, Dopamine, PTH, Secretin, VIP, PACAP, Glucagon, CRF, Bombesin, Bradykinin, NPY, Glutamate, Ca²⁺, GABA, Chemokines and Opioids.

10

More preferably, the binding partner may be selected from the group consisting of L-glutamate, kainate, 5-(bromomethyl)-4-isoxazolepropionic acid (γ), analogues of glutamate, substituted quinoxaline 2,3 diones, GYKI52466, 5-l-Willardine, 5-F-Willardine, agonist and antagonist ligands to the AMPA ((RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, NBQX, CNQX, DNQX, GYKI 52466, 6-Chlorokynurenic acid, JSTX, L-APA, L-SOP, ACPT, (R,S)-PPG, CPPG, MAP4, (S)-3,4-DCPG, vitronectin, cytoactin, fibronectin, fibrinogen, laminin, MMP-2, osteopontin, prothrombin, thrombospondin, von Willebrandts Factor, recombinant fragments of L1CAM, salmosin, E-cadherin and peptides thereof, including the peptide: NRDKETKV, NCAM1 domain Ig I+II, NCAM1 domain IgIII and peptides thereof, peptides C3: ASKKPKRNIKA (SEQ ID NO. 305), D3: AKKERQRKDTU (SEQ ID NO 306), D4: ARALNWGAKP (SEQ ID NO 307), monoclonal antibody 123C3, NPTX1, NPTX2, taipoxin, TCBP49, Oxynor, ApoE2, ApoE3, ApoE4, peptides from ApoE (E₍₁₄₁₋₁₅₅₎: LRKLRKRLRDADDL (SEQ ID NO 308) and its tandem E₍₁₄₁₋₁₅₅₎₂: LRKLRKRLRDADDL-LRKLRKRL RDADDL (tandem of SEQ ID NO 308)) reelin, nicotine, acetylcholine, α -bungarotoxin and carbachol.

20

The binding partner according to the present invention should be selected according to cell surface molecule employed in the specific embodiment of the invention.

Hence, in embodiments of the invention, wherein the cell surface molecule is capable of internalising a binding partner or a targeting complex, the binding partner is

25

30

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

101

preferably selected from the group consisting of NCAM1 domain Ig I+II, NCAM1 domain IgIII and peptides thereof, peptides C3: ASKKPKRNIKA (SEQ ID NO 305), D3: AKKERQRKDTU (SEQ ID NO 306), D4: ARALNWGAKP (SEQ ID NO 307), monoclonal antibody 123C3, NPTX1, NPTX2, taipoxin, TCBP49, Oxynor, ApoE2, ApoE3, ApoE4, peptides from ApoE (E₁₄₁₋₁₅₅: LRKLRKLLRDADDL (SEQ ID NO 308) and its tandem E₁₄₁₋₁₅₅: LRKLRKLLRDADDL-LRKLRKLL RDADDL (tandem of SEQ ID NO 308)) reelin, nicotine, acetylcholine, α -bungarotoxin, carbachol and specific internalising antibodies directed against said cell surface molecules.

10 In embodiments of the invention wherein the cell surface molecule is not capable of internalising a binding partner or a targeting complex, the binding partner is preferably selected from the group consisting of L-glutamate, kainate, 5-(bromomethyl)-4-isoxazolepropionic acid (), analogues of glutamate, substituted quinoxaline 2,3 diones, GYKI52466, 5-l-Willardine, 5-F-Willardine, agonist and antagonist ligands to the AMPA ((RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, NBQX, 15 CNQX, DNQX, GYKI 52466, 6-Chlorokynurenic acid, JSTX, L-APA, L-SOP, ACPT, (R,S)-PPG, CPPG, MAP4, (S)-3,4-DCPG, vitronectin, cytactin, fibronectin, fibrinogen, laminin, MMP-2, osteopontin, prothrombin, thrombospondin, von Willebrandts Factor, recombinant fragments of L1CAM, salmosin, E-cadherin and peptides 20 thereof, including the peptide: NRDKETKV (SEQ ID NO 309) and specific antibodies directed to said cell surface molecules.

In one especially preferred embodiment of the present invention the cell surface molecule is NCAM1. When the cell surface molecule is NCAM1, then the binding 25 partner is preferably selected from the group consisting of the first and second Immunoglobulin domains (Ig) of NCAM1 (Kiselyov *et al.*, 1997), the third Ig domain of NCAM1, the adhesion molecule L1 and proteoglycans. Furthermore, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of synthetic binding partners capable of associating with NCAMs including for example a large number 30 of peptides (11 amino acids) identified from a combinatorial peptide library (Rønn *et al.*, 1999), including for example C3: ASKKPKRNIKA (SEQ ID NO 305), D3: AKKERQRKDTU (SEQ ID NO 306) and D4: ARALNWGAKPK (SEQ ID NO 307) (Rønn *et al.*, 1999). In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against NCAM1, preferably monoclonal antibodies 35 against NCAM1, for example antibody (123C3) which causes internalisation.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

102

In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is NPTXR. When the cell surface molecule is NPTXR, then the binding is preferably selected from the group consisting of Neuronal pentraxin 1 (NP1, NPTX1) and Neuronal pentraxin 2 (NP2, NPTX2) (Kirkpatrick *et al.*, 2000; Dodds *et al.*, 1997). Furthermore, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of the snake venom taipoxin and taipoxin associated calcium-binding protein 49 (TCBP49) and the taipoxin analogue, Oxynor. In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against NPTXR, preferably monoclonal antibodies against NPTXR.

In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is LRP8. When the cell surface molecule is LRP8, then the binding partner is preferably selected from the group consisting of ApoE2, ApoE3 and ApoE4 and reelin. Furthermore, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of various recombinant ApoE isoforms some of which are commercially available. However, the natural ApoE isoforms are capable of associating with several receptors. In addition, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of peptides from ApoE, for example (E₁₄₁₋₁₆₅), LRKLRKLLRDADDL (SEQ ID NO 308) and its tandem E₁₄₁₋₁₆₅2, LRKLRKLLRDADDL-LRKLRKLL RDADDL), both have been shown to inhibit receptor function (Riddell *et al.*, 1999). In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against LRP8, preferably monoclonal antibodies against LRP8.

In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is CHRNA5. When the cell surface molecule is CHRNA5, then the binding partner is preferably selected from the group consisting of nicotine, acetylcholine and the toxin α -bungarotoxin. Furthermore, the binding partner may be selected from the group consisting of synthetic agonists of CHRNA5, for example carbachol. In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against CHRNA5, preferably monoclonal antibodies against CHRNA5.

In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is L1CAM. When the cell surface molecule is L1CAM, then the binding partner may for

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

103

example comprise an adhesion molecule of the integrin family or a fragment thereof. L1CAM is known to bind several adhesion molecules of the integrin family through an RGD sequence and of the immunoglobulin family via an oligomannosidic carbohydrate. In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against L1CAM, preferably monoclonal antibodies against L1CAM.

In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is TNFRSF12. When the cell surface molecule is TNFRSF12, then the binding partner may for example an antibody against TNFRSF12, preferably a monoclonal antibody against TNFRSF12, for example a monoclonal antibody to the extracellular domain of TNFRSF12.

In one especially preferred embodiment of the present invention the cell surface molecule is GRIA2. When the cell surface molecule is GRIA2, then the binding partner is preferably selected from the group consisting of L-glutamate and kainate. Furthermore, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of synthetic ligands to GRIA2, for example agonist and antagonist ligands to the AMPA ((RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptors. AMPA receptor ligands are generally either analogues of glutamate or substituted quinoxaline 2,3 diones. The antagonists are divided into competitive and modulatory site antagonists (reviewed in (Bräuner-Osborne *et al.*, 2000; Madsen *et al.*, 2001)). In addition, one AMPA antagonist, GYKI52466, has been shown to inhibit tumor cell growth (Cavalheiro and Olney, 2001) on cells expressing the GRIA2 receptor. As the receptor binding of the ligands involves binding of the major portions of the ligand, substitutions (such as halogens) can only be performed at very few sites. A bromo substituted form of AMPA (ABPA) was shown to act as a potent agonist of AMPA receptors (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1985). The agonist may also be a halogenated form of an agonist, for example willardiine and analogues with different AMPA receptor affinities (Jane.D, 2001). Many of these show many fold higher affinity for AMPA receptors than AMPA itself. Synthesis of Willardiine and 6-azowillardiine halogenated analogues is described in detail in (Jane *et al.*, 1997). 5-Willardiine and 5-F-Willardiine are commercially available, also in a ^3H - forms. In addition the binding partner may be selected from the group consisting of small molecule antagonists, for example the commercially available NBQX, CNQX,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

104

DNQX, GYKI 52466 and 6-Chlorokynurenic acid and the group of larger polyamine antagonists of AMPA receptor channels related to the spider toxin JSTX-3 (Yoneda *et al.*, 2001). In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against GRIA2, preferably monoclonal antibodies against GRIA2.

In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is GRM8. When the cell surface molecule is GRM8, then the binding partner may preferably be L-glutamate. Furthermore, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of agonists and antagonists, for example the commercially available L-APA, L-SOP, ACPT, (R,S)-PPG, CPPG, MAP4, (S)-3,4-DCPG and MSOP and their ³H labelled forms. One agonist, (R,S)-PPG has a 25 fold preference for GRM8 (Gasparini *et al.*, 1999) and the agonist (S)-3,4-DCPG displays more than 100 fold selectivity for GRM8 (Bruno *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Turner and Salt, 1999). In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against GRM8, preferably monoclonal antibodies against GRM8.

In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is ITGAV. When the cell surface molecule is ITGAV, then the binding partner may preferably be selected from the group consisting of vitronectin, cytoactin, fibronectin, fibrinogen, laminin, MMP-2, osteopontin, prothrombin, thrombospondin von Willebrandts Factor and $\alpha v \beta 3$. $\alpha v \beta 3$ has been shown to bind recombinant fragments of the neural cell adhesion molecule L1 through the αv subunit (Montgomery *et al.*, 1996). The natural ligands, such as vitronectin, are also ligands for a number of other, ubiquitously expressed integrins and therefore not optimal for specific targeting. Furthermore, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of disintegrins and ADAMs, for example salmosin or contortrostatin. Disintegrins and ADAMs (A Disintegrin and A Metalloprotease) are a large number of proteins from snake venoms, which bind with different specificities to different integrins (Evans, 2001; Huang, 1998). Several disintegrins specific for $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ have been identified, including recombinantly produced salmosin (Kang *et al.*, 1999) and contortrostatin (Mercer *et al.*, 1998). In addition, the binding partner may preferably be selected from the group consisting of small cyclic peptides and non-peptide compounds, which are antagonists of $\alpha v \beta 3$ binding (Boger *et al.*, 2001; Hartman and

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

105

Duggan, 2000; Kerr *et al.*, 2000; Batt *et al.*, 2000). In addition the binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against ITGAV, preferably monoclonal antibodies against ITGAV.

- 5 In another preferred embodiment of the invention the cell surface molecule is ITGAE. When the cell surface molecule is ITGAE, then the binding partner may preferably be the cell adhesion molecule E-cadherin or a fragment thereof. The heterophilic binding site on E-cadherin for $\alpha E\beta 7$ differs from the homophilic binding site of E-cadherin with another E-cadherin (Karecla *et al.*, 1996; Taraszka *et al.*, 2000).
- 10 Preferably the fragment comprises or even more preferably consists of a short peptide sequence from the first domain of E-cadherin (amino acids 27-34: NRDKETKV (SEQ ID NO 309), which are capable of interfering with the binding of $\alpha E\beta 7$ to E-cadherin. Furthermore, the binding partner may be selected from the group consisting of specific $\alpha E\beta 7$ specific peptides (Brenner and Cepek, 2001). In addition the
- 15 binding partner may preferably be selected from the group consisting of antibodies against ITGAE, preferably monoclonal antibodies against ITGAE, such as αE specific antibodies that may be used as antagonists.

Complex

- 20 In one embodiment the present invention relates to a complex comprising a cell surface molecule and a binding partner. Preferably the cell surface molecule is identified by the method disclosed by the present invention. Preferably, the cell surface molecule comprises or essentially consists of or for example is GRIA2, such
- 25 as LPR8, for example is CHRNA5, such as TMEFF, for example is NPTXR, such as Transferrin receptor; such as type II membrane protein clone: for example is HP10481; such as type II membrane protein clone: such as HP10390; for example is PG40; such as TRC8; for example is TR2-11; such as OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6, For example GPIIb; such as vitronectin
- 30 receptor alpha subunit; for example is integrin alpha-7; such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3 chain; for example is RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein; FOR EXAMPLE

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

106

GLVR1; for example is Mr 110,000 antigen; for example is syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63 antigen; such as multispanning membrane protein; for example is DDR; such as autocrine motility factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as IGF1R, for example is insulin-like growth factor II receptor; such as SAS; for example is TAPA-1; such as MICB; for example is MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-chain; such as HLA-DP; for example is bone small proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor; such as metabotropic glutamate receptor type 4; for example is metabotropic glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very low density lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor homolog TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C; such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example is CD151; such as surface antigen; for example is MAg; such as GPR19; for example is pct-1; such as PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-HT1D-); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR6; for example is tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13'; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OCI5; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

107

- subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as
- 5 GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFB1; such as TGFB2; for example is TGFB3; such as precursor of epidermal growth factor receptor.
- 10 More preferably the cell surface molecule may be selected from the group consisting of
- Members of receptor tyrosine kinases
 - Members of the integrin family
 - 15 Members of the immunoglobulin superfamily adhesion molecules
 - Members of the heparan sulfate proteoglycan family
 - Members of the chondroitin sulfate proteoglycan family
 - Members of the MAGE family
 - Members of the RAGE family
 - 20 Members of the low density lipoprotein receptor family
 - Members of the cadherin adhesion molecules
 - Members of the metabotropic glutamate receptors
 - Members of the steroid hormone families
 - Members of the seven transmembrane receptor family
 - 25 Atrial natriuretic peptide clearance receptor
 - GFRA3
 - Transferrin receptor
 - Members of the serine/threonine kinase receptors
- 30 More preferably, the cell surface molecule is selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNAS, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and TMEFF1.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

108

The binding partner of the complex may be any specific binding partner capable of interacting with the cell surface molecule. Examples of binding partners are given herein above.

5 Targeting complex

The present invention provides targeting complexes, which comprise a binding partner and a bioreactive species. The binding partner should be capable of associating with one or more cell surface molecules or fragments thereof as outlined
10 herein above.

In one preferred embodiment of the present invention, the cell surface molecule, which can associate with the binding partner of the targeting complex, is capable of internalising the targeting complex. However, in another preferred embodiment of
15 the present invention, the cell surface molecule is not capable of internalising the targeting complex, but merely is capable of associating with the targeting complex.

More preferably, the cell surface molecule comprises or essentially consists of or for example is Transferrin receptor; such as type II membrane protein clone: for example is HP10481; such as type II membrane protein clone: such as HP10390; for example is PG40; such as TRC8 ; for example is TR2-11; such as OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6, For example GPIIb; such as vitronectin receptor alpha subunit; for example is integrin alpha-7; such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3 chain; for example is
25 RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein; FOR EXAMPLE GLVR1; for example is Mr 110,000 antigen; for example is syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63 antigen; such as multi-spanning membrane protein; for example is DDR; such as autocrine motility factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as IGF1R, for example is insulin-like growth factor II receptor; such as SAS; for example is TAPA-1; such as
30 MICB; for example is MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-chain;

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

109

such as HLA-DP; for example is bone small proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor; such as metabotropic glutamate receptor type 4; for example is metabotropic glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very low density lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor homolog TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C; such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example is CD151; such as surface antigen; for example is MAG; such as GPR19; for example is pcta-1; such as PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-HT1D~); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR6; for example is tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OC15; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gas-trin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such as

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

110

TGFB2; for example is TGFB3; such as precursor of epidermal growth factor receptor, yet more preferably the cell surface molecule is selected from the group consisting of receptors which belong to one of the following groups:

- 5 Members of receptor tyrosine kinases
- Members of the integrin family
- Members of the immunoglobulin superfamily adhesion molecules
- Members of the heparan sulfate proteoglycan family
- Members of the chondroitin sulfate proteoglycan family
- 10 Members of the MAGE family
- Members of the RAGE family
- Members of the low density lipoprotein receptor family
- Members of the cadherin adhesion molecules
- Members of the metabotropic glutamate receptors
- 15 Members of the steroid hormone families
- Members of the seven transmembrane receptor family
- Atrial natriuretic peptide clearance receptor
- GFRA3
- Transferrin receptor
- 20 Members of the serine/threonine kinase receptors

Even more preferably, the cell surface molecules selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and TMEFF1.

25

- The bioreactive species according to the present invention may be any species, which can directly or indirectly exert a biological influence on a target cell, wherein the target cell, is any cell expressing the cell surface molecule and which can
- 30 internalise the targeting construct. The biological influence according to the present invention may for example be selected from the group consisting of cell cycle arrest, protection of cell against toxins and cell death.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

111

The bioreactive species may any compound for example it may be a nucleic acid sequence, a polypeptide, an oligopeptide, a toxin, a small chemical compound or a radioactive isotope.

- 5 In one preferred embodiment the bioreactive species is a nucleic acid sequence. Preferably, the nucleic acid sequence comprises a second nucleic acid operably linked to a first nucleic acid sequence comprising an expression signal.
- 10 The second nucleic acid sequence may in one preferred embodiment encode a therapeutic protein (see herein below). The nucleic acid sequence encoding a therapeutic protein may comprise complementary DNA (cDNA). The term "cDNA" used here, is intended to refer to DNA prepared using messenger RNA (mRNA) as template. The advantage of using a cDNA, as opposed to genomic DNA or DNA polymerised from a genomic DNA or non- or partially-processed RNA template, is
- 15 that the cDNA does not contain any non-coding intron sequences but, rather comprise the uninterrupted coding region of the corresponding protein. There may be times when the full or partial genomic sequence is preferred, however, such as where the non-coding regions are required for optimal expression.
- 20 In another embodiment the second nucleic acid sequence encodes an antisense RNA or part of an antisense RNA. Alternatively, the second nucleic acid sequence may comprise or essentially consist of an antisense RNA or part of an antisense RNA.
- 25 In the context of the present invention the term "antisense RNA" is intended to encompass an RNA sequence transcribed from the non-coding DNA strand of a gene or an RNA sequence that is capable of hybridising to an mRNA or fragments thereof under stringent conditions.
- 30 Preferably, the antisense RNA within the context of the present invention is the antisense RNA of a gene encoding a protein, which promotes cell survival, cell growth and/or cell mobility. More preferably, the antisense RNA is the antisense RNA of an oncogene or a growth factor.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

112

In another embodiment the second nucleic acid sequence encodes or comprises a ribozyme. A ribozyme within the present context is a molecule, which comprises at least one RNA, which comprises an enzymatic activity. Preferably, ribozymes according to the present invention is targeted against RNA of an oncogene or a protooncogene or growth factors.

5

Accordingly, in preferred embodiments of the present invention antisense RNAs or ribozymes are targeted against RNA of an oncogene or proto-oncogene or growth factors. Examples of growth factors are indicated herein below.

10

Oncogenes are a diverse class of genes, whose products may contribute to the development and/or advancement of cancer. Proto-oncogenes may under certain circumstances or after due to mutations contribute to the development and/or advancement of cancer. Oncogene or proto-oncogene may for example be selected from the group consisting of Ras, Raf, Myc, Syn, Pim, BMI-1, FOP, Sis, KGF, Fms, Flg, Neu, Trk, Kit, Met, Src, Fyn, Mas, Fes/Fps, Tre, Mer, ABL, BCL3, int-2, Cym, Ets, Elk, RhoA, Ski, Wnt-5a, Spi-1, Rap2, p55 and c-tyr. This is not an exhaustive list of oncogenes and proto-oncogenes, which may be used with the present invention, but merely comprises illustrative examples.

15

20

The second nucleic acid sequences may also encode a tumour suppressor gene to be introduced into the cell expressing the cell surface molecule in order to correct any endogenous mutations of said tumour suppressor within the cell. The tumour suppressor may be any tumour suppressor for example any of the tumour suppressors indicated herein below.

25

The first nucleic acid sequences according to the present invention preferably comprise an expression signal. Such an expression signal should preferably influence the transcription of second nucleic acid sequences operably linked thereto. Preferably, the first nucleic acids sequences according to the present invention influence transcription such as they enhance transcription under specific circumstances.

30

In one embodiment of the present invention the first nucleic acid sequence comprises an expression signal, which directs a lower level of expression of a

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

113

second nucleic acid sequence in malignant cells, compared with non-malignant cells. In another embodiment the first nucleic acid sequence comprises an expression signal, which directs approximately the same level of expression of a second nucleic acid sequence in malignant cells, compared with non-malignant cells.

However, in a preferred embodiment of the present invention the first nucleic acid sequences directs a higher level of expression of a second nucleic acid sequence in malignant cells compared with non-malignant cells. In particular, the first nucleic acid sequences may be selected from the group consisting of first nucleic acid sequences identified according to the methods outlined herein above.

Preferably, the first nucleic acid sequence is selected from the group consisting of

pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12, pro13, pro14,
pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro20, pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26,
pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40,
pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52,
pro53, pro54, pro55, pro56, pro57, pro58, pro59, pro60, pro61, pro62, pro63, pro64,
pro65, pro66, pro67, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76,
pro77, pro78, pro79, pro80, pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, pro86, pro87, pro88,
pro89, pro90, pro91, pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99,
pro100, pro101, pro103, pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109, pro110,
pro111, pro112, pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119, pro120,
pro121, pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128, pro129, pro130,
pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, pro137, pro138, pro139, pro140, pro141,
pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147, pro148, pro149, pro150, pro152,
pro153, pro154, pro155, pro156, pro157, pro158, pro159, pro160, pro161, pro162,
pro163, pro164, pro165, pro166, pro167, pro168, pro169, pro171, pro172, pro173,
pro174, pro175, pro176, pro177, pro178, pro179, pro180, pro181, pro182, pro183,
pro184, pro185, pro187, pro189, pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197,
pro198, pro199, pro201, pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro208,
pro209, pro210, pro211, pro212, pro213, pro215, pro216, pro217, pro219, pro220,
pro221, pro222, pro223, pro224, pro225, pro226, pro227, pro228, pro229, pro230,
pro231, pro232, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237, pro238, pro239, pro240,
pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246, pro247, pro248, pro249, pro250,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

114

pro251, pro253, pro254, pro255, pro256, pro257, pro258, pro259, pro260, pro262,
 pro263, pro264, pro267, pro268, pro269, pro270, pro271, pro272, pro273, pro275,
 pro277, pro278, pro279, pro280, pro282, pro283, pro284, pro285, pro286, pro287,
 pro289, pro290, pro291, pro292, pro293, pro294, pro295, pro296, pro297, pro298,
 5 pro299, pro300, pro301, pro302, pro303, pro304, pro305, pro306, pro307, pro308,
 pro309, pro310, pro311, pro312, pro313, pro315, pro316, pro317, pro318, pro319,
 pro320, pro321, pro322, pro323, pro324, pro326, pro327, pro328, pro329, pro330,
 pro331, pro332, pro333, pro334, pro335, pro336, pro337, pro338, pro339, pro340,
 pro341, pro344, pro346, pro347, pro348, pro349, pro352, pro353, pro354, pro355,
 10 pro356, pro358, pro359 and pro361.

The first nucleic acid sequences may furthermore comprise and/or essentially consist of fragments of nucleic acid sequences selected from the group consisting of
 pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12, pro13, pro14,
 15 pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro20, pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26,
 pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40,
 pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52,
 pro53, pro54, pro55, pro56, pro57, pro58, pro59, pro60, pro61, pro62, pro63, pro64,
 pro65, pro66, pro67, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76,
 20 pro77, pro78, pro79, pro80, pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, pro86, pro87, pro88,
 pro89, pro90, pro91, pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99,
 pro100, pro101, pro103, pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109, pro110,
 pro111, pro112, pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119, pro120,
 pro121, pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128, pro129, pro130,
 25 pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, pro137, pro138, pro139, pro140, pro141,
 pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147, pro148, pro149, pro150, pro152,
 pro153, pro154, pro155, pro156, pro157, pro158, pro159, pro160, pro161, pro162,
 pro163, pro164, pro165, pro166, pro167, pro168, pro169, pro171, pro172, pro173,
 pro174, pro175, pro176, pro177, pro178, pro179, pro180, pro181, pro182, pro183,
 30 pro184, pro185, pro187, pro189, pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197,
 pro198, pro199, pro201, pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro208,
 pro209, pro210, pro211, pro212, pro213, pro215, pro216, pro217, pro219, pro220,
 pro221, pro222, pro223, pro224, pro225, pro226, pro227, pro228, pro229, pro230,
 pro231, pro232, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237, pro238, pro239, pro240,
 35 pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246, pro247, pro248, pro249, pro250,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

115

pro251, pro253, pro254, pro255, pro256, pro257, pro258, pro259, pro260, pro262,
 pro263, pro264, pro267, pro268, pro269, pro270, pro271, pro272, pro273, pro275,
 pro277, pro278, pro279, pro280, pro282, pro283, pro284, pro285, pro286, pro287,
 pro289, pro290, pro291, pro292, pro293, pro294, pro295, pro296, pro297, pro298,
 5 pro299, pro300, pro301, pro302, pro303, pro304, pro305, pro306, pro307, pro308,
 pro309, pro310, pro311, pro312, pro313, pro315, pro316, pro317, pro318, pro319,
 pro320, pro321, pro322, pro323, pro324, pro326, pro327, pro328, pro329, pro330,
 pro331, pro332, pro333, pro334, pro335, pro336, pro337, pro338, pro339, pro340,
 pro341, pro344, pro346, pro347, pro348, pro349, pro352, pro353, pro354, pro355,
 10 pro356, pro358, pro359 and pro361.

Even more preferably, the first nucleic acid sequences are selected from the group
 consisting of pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8,
 pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273
 15 and pro362 and fragments thereof.

The first nucleic acid sequence may also comprise more than one fragment of
 nucleotide sequences selected from the above-mentioned group.

20 It is also contained within the present invention that the first nucleic acid sequence
 further comprises nucleic acid sequences not natively associated therewith. The
 nucleic acid sequences not natively associated therewith may for example be a
 transcription factor binding sites, preferably one or more steroid hormone receptor
 binding sites.

25 In preferred embodiments of the present invention the first nucleic acid sequences
 may be any first nucleic acid sequence as outlined herein above.

30 In certain embodiments, nucleic acid sequences are stably integrated into the ge-
 nome of the cell. This integration may be in the cognate location and orientation via
 homologous recombination (gene replacement) or it may be integrated in a random,
 non-specific location (gene augmentation). In further embodiments, the nucleic acid
 sequences may be stably maintained in the cell as a separate, episomal segment of
 DNA. Such nucleic acid segments or "episomes" encode sequences sufficient to

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

116

permit maintenance and replication independent of or in synchronisation with the host cell cycle.

5 The targeting complex may in addition to a binding partner and a bioreactive species further comprise additional components. Additional components may for example be protective components.

10 When the bioreactive species is a nucleic acid the targeting complex may further comprise a protective capping, wherein said protective capping consists of nucleic acid sequences attached to the first and/or second nucleic acid sequences. The nucleic acid sequences with protective properties may for example comprise a modified nucleotide. The modified nucleotide may for example be modified with one or more amino acids, amine groups or biotin groups.

15 In one embodiment of the present invention the bioreactive species is a toxin. A toxin is any species which is toxic to a cell expressing the cell surface molecule. For example the toxin may be selected from the group consisting of ricin, diphtheria toxin, pseudomonas exotoxin, streptozotocin or cholera toxin. However, this list of toxins is not complete and should not be regarded as limiting to the invention.

20 In another embodiment of the present invention the bioreactive species is an inducer of apoptosis. Any compound, which is capable of inducing apoptosis directly or indirectly, in a cell expressing a cell surface molecule, is an inducer of apoptosis within the meaning of the present invention.

25 An inducer of apoptosis may be a polypeptide (see herein below) or it may be any other kind of compound. For example the inducer of apoptosis may be selected from the group consisting of retinoic acid, A23187, Okadaic Acid, Puromycin, Staurosporine, Thapsigargin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximide, 30 Dexamethasone, Etoposide and Glucocorticoid. However, any other inducer of apoptosis is also contained within the present invention.

In yet another embodiment of the present invention the bioreactive species is a radioactive isotope. A radioactive isotope may be selected from the group consisting of (125)I, (131)I, (123)I, (111)In, (205)Bi, (206)Bi, (213)Bi, (186)Re, (188)Re, 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

117

(225)Ac, ^{99m}Tc, (68)Ga, (62)Cu, (90)Y, (64)Cu, (211)At, (212)Bi, (177)Lu, (153)Sm and (157)Gd. In one embodiment, the radioactive active species may be covalently linked to another species, for example the radioactive species may be covalently linked to a binding partner.

5

In a still further embodiment of the present invention the bioreactive species is a cytostatic. A cytostatic may for example be a drug, which can be used for chemotherapy. Drugs suitable for use in chemotherapy are mentioned herein below.

10

The bioreactive species according to the present invention may be an antagonist of a hormone, preferably an antagonist of a hormone selected from the group consisting of estrogens, androgens, progesterones, LH and RH.

15

Androgens can for example be selected from the group consisting of testosterone, dihydrotestosterone, androstenediol, androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and derivatives thereof.

Estrogens can for example be selected from the group consisting of estrion, estradiol, estriol and derivatives thereof.

20

Alternatively, the bioreactive species may be an aromatase inhibitor.

In one preferred embodiment of the present invention the bioreactive species comprises or essentially consists of a polypeptide. In particular such a polypeptide may be a therapeutic protein.

25

The term "therapeutic protein" is intended to refer to any polypeptide introduced into a cell for the potential benefit of the cell or to an organism comprising said cell.

30

A therapeutic protein may belong to a number of different classes. For example a therapeutic protein may be a tumour suppressor, a toxic substance or it may be an inducer of apoptosis. The therapeutic protein according to the present invention may be a protein, which can contribute to a cell cycle arrest.

In the context of cancer treatment modalities, a particularly useful gene is a tumour suppressor. During the process of transformation of normal cells to neoplastic cells,

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

118

the mutation of tumour suppressor genes is thought to play an important role. One of the most important functions of a tumour suppressor gene is to attenuate cell division and mediate apoptosis of mutated cells. Tumour suppressor genes are highly effective, so that mutation of both alleles of the tumour suppressor gene is necessary to obviate its function. The introduction of a functional tumour suppressor gene into a cancer cell with a mutated phenotype is therefore often sufficient to induce cell cycle arrest and apoptosis. p53, p73 and p16 are tumour suppressor genes frequently mutated in lung cancer. Introduction of a wild type version of these genes into cancer cells using a therapeutic gene-delivering vector to induce apoptosis is a possible way to kill cancer cells selectively. There are numerous tumour suppressors well known to those in the art, preferred examples include p53, p73, p16, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC and MCC. This list is not intended to be exhaustive of the various tumour suppressors known in the art but, rather, is exemplary of the more common tumour suppressors.

Preferably, the therapeutic protein is a tumour suppressor selected from the group consisting of p73, p16, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-1, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, MSH2, PTCH, DPCH, TSC2, CDKN2A and ARF. More preferably, the therapeutic protein is p53.

The important endpoint of therapy for cancer is the killing or elimination of cancer cells. One of the commonly used approaches for induction of this event is the introduction of wild type p53 into cancer cells with mutated p53, resulting in cell cycle arrest and induction of apoptosis. The use of p53 as a therapeutic gene is dependent on the status of the endogenous p53 in the cancer cell. Wild type overexpression is often efficient, however, overexpression of p53 in combination with overexpression of cell cycle regulating genes, such as p16, may enhance the effect. Other cell cycle regulating genes such as p15, p17, p18 or p19 may also be effective in combination with p53 or other genes from the p53 family, such as p73. It is also possible that combination therapy with chemotherapeutic drugs or ionising radiation can markedly augment the therapeutic response to p53 gene therapy.

The Bcl-2 family of proteins are important regulators of cell death. They are comprised of two opposing factions, the proapoptotic versus the antiapoptotic members. All bcl-2 family members share one or more of four highly conserved domains, BH1,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

119

- BH2, BH3 and BH4. Bcl-2 family members include, but are not limited to, A1, mcl-1, bcl-2, bcl-w, bcl-x, bax, bad and bak. A1, bcl-2, mcl-1, bcl-w and bcl-xl (a long form of bcl-x) genes encode intracellular membrane proteins shown to block or delay apoptosis. Overexpression of these genes has been shown to confer resistance to apoptosis including that induced by chemotherapy. Antisense oligonucleotides or ribozymes directed against these genes and their proteins can be used therapeutically to induce apoptosis.
- In contrast, bax, bad, bak and bcl-xs (a short form of bcl-x) are presently known to promote cell death by inhibiting the protective effects of the antiapoptotic bcl-2 family members. A possible method of inducing apoptosis in tumour cells is by introduction and overexpression of these genes.
- Caspases (cysteine-aspartic-acid-proteases) are a class of proteins central to the apoptotic program. These proteases are primarily responsible for the degradation of cellular proteins that lead to the morphological changes seen in cells undergoing apoptosis. Caspases are present as inactive pro-enzymes that are activated by proteolytic cleavage. At least 12 caspases has been identified in humans. Caspases 8, 9 and 3 are situated at pivotal junctions in apoptosis pathways. Caspase 8 and caspase 9 activate caspase 3 by proteolytic cleavage and caspase 3 then cleaves vital cellular proteins or other caspases. It is contemplated that the introduction and overexpression of one of these caspases will lead to apoptosis in cancer cells.
- Preferably, the therapeutic protein is an inducer of apoptosis selected from the group consisting of Fas/Apo1, TNF, TRAIL, TGF- β , caspases, Bak, Bax, Bid, Bik and GZMB.
- The bioreactive species according to the present invention may furthermore be an antibody that bind oncogenic proteins or other proteins involved in the formation of cancer. A list of oncogenic protein are given herein above.
- Cancer cells often produce growth factors and growth factor receptors to sustain autocrine or paracrine loops that mediate proliferation, angiogenesis and evasion of the immune system. Accordingly, the bioreactive species may be an antibody, for

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

120

example an intracellular single chain that inhibits one or more growth factors selected from the group consisting of TGF- β , VEGF, IGF and growth factor receptors such as EGFR.

- 5 Additionally the therapeutic protein may be a protein capable of protecting the cell against a toxic agent or it may be a protein which is capable of catalysing the synthesis of a toxic substance.

- 10 Different systems have been developed where a protein is introduced that mediates the conversion of a prodrug to a cytotoxic compound. The herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) gene converts specific protoxic nucleoside analogs such as acyclovir and gancyclovir into potent DNA synthesis inhibitors. Cells capable of expressing HSV-tk are rendered extremely sensitive to the drug, while non-HSV-tk expressing cells are relatively insensitive. The effects of the prodrug conversion is
15 not only seen in the HSV-tk transduced cell, but also in the surrounding cells. This effect is termed the bystander effect, which is a therapeutic advantage, as it avoids the need to transduce 100% of the tumour cells with the HSV-tk gene.

- 20 Another such drug susceptibility therapeutic protein is the cytosine deaminase (CD). The CD protein catalyses the conversion of the prodrug 5-fluorocytosine (5FC) to 5-fluorouracil (5FU); treatment of CD transduced cells with 5FC results in the conversion of the 5FC into the antitumour drug 5FU into CD-positive tumour cells.

- 25 The therapeutic protein may furthermore be a toxic protein, such as cytokines, to be introduced to interfere with the expression of oncogenes and thus inhibit neoplastic cell growth.

- 30 The targeting complex according to the present invention may comprise more than one different bioreactive species, such as 2, for example 3, such as 4, for example 5, such as more than 5 different bioreactive species. For example the targeting complex may comprise more than one first nucleotide sequence encoding a therapeutic protein or more than one therapeutic protein, for example 2, such as 3, for example 4, such as 5, for example more than 5 first nucleotide sequences encoding a therapeutic protein and/or therapeutic proteins.

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

121

In some embodiments of the present invention the targeting complex further comprises a nuclear targeting signal. The nuclear targeting signal directs translocation into the nucleus. Certain bioreactive species must enter the nucleus to be active and accordingly it is advantageous if they are attached to a nuclear localisation signal. For example DNA sequences must enter the nucleus in order to be transcribed.

The nuclear targeting signal according to the present invention may be any nuclear targeting signal, which is capable of localising to the nucleus. The nuclear targeting signal may for example be an oligopeptide, preferably the nuclear targeting signal is selected from the group consisting of oligopeptide with the following sequences:

RRMKWKK PDX (SEQ ID 310)
 RVHPYQR QKI (SEQ ID NO 311)
 KRPACKLKPECVQQLLVCSQEAKK HCDA (SEQ ID NO 312)
 15 PKKKRKV (SEQ ID NO 313) (SV40 LrgT)
 GKRRSKA (SEQ ID NO 314) (H2B)
 KAKRQR (SEQ ID NO 315) (v-Rel)
 RGRRRRQR (SEQ ID NO 316)
 RKRRR (SEQ ID NO 317)
 20 PPVKRERTS (SEQ ID NO 318) (RanBP3)
 PYLNKRKGKP (SEQ ID NO 319) (Pho4p)
 CYGSKNTGAKKRKIDDA (SEQ ID NO 320) (DNAhelicaseQ1)
 KKKKRKREK (SEQ ID NO 321) (LEF-1)
 KKKRRSREK (SEQ ID NO 322) (TCF-1)
 25 Krx{7,9}PQPKKKP (SEQ ID NO 323) (p53)
 KVTKRKHDNEGSGSKRPK (SEQ ID NO 324) (Hum-Ku70)
 RLKKLKCSKx{19}KTKR (SEQ ID NO 325) (GAL4)
 RKRIREDRKx{18}RKRRKRCPTP (SEQ ID NO 326)
 RRERx{4}RPRKIPR (SEQ ID NO 327) (BDV-P)
 30 KKKKKKEEGEGKKK (SEQ ID NO 328) (act/inh betaA)
 PRPRKIPR (SEQ ID NO 329) (BDV-P)
 PPRIYPQLPSAPT (SEQ ID NO 330) (BDV-P)

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

123

- KKKQKK (SEQ ID NO 361)
REKKEKEQKEKCA (SEQ ID NO 362)
LEKKVKKKFDWCA (SEQ ID NO 363)
TEKK[QG]KSILYDCA (SEQ ID NO 364)
5 SDKKVRSRLIECA (SEQ ID NO 365)
LKRKLQR (SEQ ID NO 366)
RRKGKEK (SEQ ID NO 367)
CKRKTTNADRRKA (SEQ ID NO 368)
VNEAFETLKRC (SEQ ID NO 369)
10 MPTEERVRRKRESNRESARRSRYRKAHLK (SEQ ID NO 370)
KVNSRRRKEVPGPNGATEED (SEQ ID NO 371)
PRRGPR HCV (SEQ ID NO 372)
PRGRRQPIKARQP (SEQ ID NO 373)
KRSAGGNPPKPLKLR (SEQ ID NO 374)
15 KRKx(1)KKKSKK (SEQ ID NO 375)
EYLSRKGLLEL (SEQ ID NO 376)
PKRPRDRHDGELGGRKRARG (SEQ ID NO 377)
KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO 378)
KRKKEMANKSAPEAKKKK (SEQ ID NO 379)
20 RKRAFHGDDPFGEGPPDKK (SEQ ID NO 380)
GGGx(3)KNRRx(6)RGGRN (SEQ ID NO 381)
YNNQSSNFGPMKGGN (SEQ ID NO 382)
PAAKRVKLD (SEQ ID NO 383)
KRPAEDMEEQAFKRSR SxGTKRSYxxM (SEQ ID NO 384)
25 MNKIPIKDLLNPG (SEQ ID NO 385)
PKKARED (SEQ ID NO 386)
VSRKRPR (SEQ ID NO 387)
APTKRKGS (SEQ ID NO 388)
PNKKKRK (SEQ ID NO 389)
30 EEDGPQKKRRRL (SEQ ID NO 390)
PLLKKIKQ (SEQ ID NO 391)

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

124

PPQKKIKS (SEQ ID NO 392)

PQPKKKP (SEQ ID NO 393)

SKRVAKRKL (SEQ ID NO 394)

IKYFKKFPKD (SEQ ID NO 395)

5 KTRKHRG (SEQ ID NO 396)

KHKHPG (SEQ ID NO 397)

PQSRKKLR (SEQ ID NO 398)

HRKYEAPRH₆PRKR (SEQ ID NO 399)

KKEKKSKK (SEQ ID NO 400)

10

Wherein the name of the protein from which they have been derived is indicated in brackets and wherein '[KR]' indicates 'K or R', i.e. any of the two amino acids valid at that position, 'x' for 'any amino acid', 'x₉' for '9 times x', and 'x_{7,9}' for 'at least 7, at most 9 times x'. Amino acids are given in their one-letter code.

15

Furthermore, nuclear localisation signal according to the present invention may also be mutants of the above mentioned sequences, such as mutants wherein 1, such as 2, for example 3, such as 4, for example 5, such as 6, for example 7, such as 8, for example 9, such as 10 amino acids have been substituted for any another amino

20

acid, preferably it is a conservative amino acid substitution (see herein above). Mutants wherein 1, such as 2, for example 3, such as 4, for example 5, such as 6, for example 7, such as 8, for example 9, such as 10 amino acids have been deleted are nuclear localisation signal according to the present invention.

25

More preferably, the nuclear targeting signal is the nuclear localisation signal of simian virus 40 large tumour antigen.

30

In certain embodiments of the present invention the targeting complex further comprises an endosomal lytic agent. The targeting complex is frequently taken up into cells expressing the cell surface molecule by a process known as receptor mediated endocytosis and accordingly the targeting complex enters the cell in an endosome, which it has to escape in order to avoid degradation. Hence, the targeting complex often comprise an endosomal lytic agent.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

122

- KDCVINKHHRNRCQYCLQR (SEQ ID NO 331) (TR2)
Krx(9)KTKK (SEQ ID NO 332) (THOV NP)
APKRKSGVSKC (SEQ ID NO 333) (PolyomaVP1)
RKKRRQRRR (SEQ ID NO 334) (HIV-1 Tat)
5 RQARRNRRRRWR (SEQ ID NO 335) (HIV-1 Rev)
MPKTRRRPRRSQKRPT (SEQ ID NO 336) (Rex)
KRPMNAFVWSRDQRRK (SEQ ID NO 337) (SRY)
PRRRK (SEQ ID NO 338) (SRY)
KRPMNAFMVWAQAARRK (SEQ ID NO 339) (SOX9)
10 PRRRK (SEQ ID NO 338) (SOX9)
[KAR]TPIQKHWRTVLTEGPPVKIRIETGEWE[K]A (SEQ ID NO 340)
PPRKKRTVV (SEQ ID NO 341)
YKRPCKRSFIRFI (SEQ ID NO 342)
LKDVRRKRLGPGH (SEQ ID NO 343)
15 KRPRP (SEQ ID NO 344)
RKRRK (SEQ ID NO 345)
RRSMKRK hVDR (SEQ ID NO 346)
PAKRARRGYK (SEQ ID NO 347)
RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO 348)
20 RRERNKMAAAKCRNRRR (SEQ ID NO 349)
KRMNRNIAASKCRKRKL (SEQ ID NO 350)
KSKKGRQEALERLKKA (SEQ ID NO 351)
RKEWLTNFMEDRRQRKL (SEQ ID NO 352)
KKQTTLAFKPIKKGKKR (SEQ ID NO 353)
25 RKRRKMPASQRSKRRKT (SEQ ID NO 354)
RAIKRRPGLDFDDGEGNSKFLR (SEQ ID NO 355)
SxGTKRSYxxM (SEQ ID NO 356)
TKRSxxM (SEQ ID NO 357)
RIRKKLR (SEQ ID NO 358)
30 KRAAEDDEDDVDTKKQK (SEQ ID NO 359)
GRKKKKRT (SEQ ID NO 360)

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

125

Many viruses have developed strategies to escape the endosome and accordingly an attenuated virus or parts of a virus may be useful endosomal lytic agents.

Preferably, the endosomal lytic agent is selected from the group consisting of polyethylenimine (PEI), a replication defective virus and a viral protein capsid.

5 More preferably, the endosomal lytic agent may comprise a membrane destabilising polypeptide.

In one embodiment of the present invention the targeting complex further comprises chloroquine. Chloroquine may protect against endosomal degradation and its

10 presence is accordingly desirable in some embodiments of the invention.

In preferred embodiments of the present invention the bioreactive species and the binding partner associates with one another either directly or indirectly. If the bioreactive species is a nucleic acid sequence, the binding partner may for example

15 associate with the bioreactive species via a nucleic acid binding agent covalently attached to said binding partner.

Nucleic acid-binding agents include proteins, polypeptides, peptides, antibodies, nucleotides, carbohydrates, fatty acids, organic or inorganic compounds as well as a

20 combination of these and others.

Nucleic acid-binding agents may bind to single-stranded or double-stranded DNA, to single-stranded or double stranded RNA, by chemical or physical forces or by a combination of the two. A nucleic acid-binding agent may (i) have affinity only for the

25 nucleic acid itself, (ii) have affinity for both the nucleic acid and another molecule, thereby forming a bridge between the two or (iii) have indirect affinity for the nucleic acid via affinity for another molecule that has affinity for the nucleic acid.

According to the present invention, the coupling of a nucleic acid-binding agent and the binding partner must occur in a manner that does not interfere with the binding

30 of the binding partner with the cell surface molecule. Preferably, internalisation of the targeting complex via receptor-mediated endocytosis is also retained. In an even more preferred embodiment, this recognition and internalisation delivers the nucleic acid sequences into a target cell in a form suitable for the expression or for interaction

35 with target endogenous nucleic acid.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

126

In one embodiment, the nucleic acid-binding agent may insert itself between base pairs of double-stranded nucleic acids in an intercalative manner or bind in the minor or major groves of double-stranded nucleic acids.

5

This binding may be sequence-specific or completely unrelated to sequence. In other embodiments, nucleic acids may be cross-linked with other molecules with chemically or photochemically reactive groups.

10

In another embodiment of the invention, the nucleic acid-binding agent covalently links the nucleic acid to another molecule. In one embodiment, the nucleic acid binding agent is one of the coupling agents, such as carbodiimide. However, covalent coupling of the nucleic acid may alter its specificity and preclude proper gene expression or target nucleic acid recognition. Furthermore, linear or single stranded nucleic acid may be a requirement for covalent coupling of the nucleic acid to the binding partner. Finally, nucleic acids are negatively charged molecules which means that they may be repelled from cell surfaces, making transfer difficult via the endosomal lysis pathway. Therefore, a size and type restriction may be necessary for the efficient delivery of nucleic acid directly bound to binding partner.

15

20

An example of a nucleic acid-binding agent, is a polycationic agent that depends on electrostatic-dominated binding involving sequence-neutral interactions between the cationic groups and the negatively charged phosphates on nucleic acid similar to the DNA-binding agent described in WO 96/30536.

25

The polycationic agent binds DNA strongly resulting in the formation of a toroid complex where the negative charge of nucleic acid molecule is completely neutralised. This soluble toroid complex may be internalised via normal receptor-mediated endocytosis.

30

Any type of nucleic acid may be used, from single stranded mRNA to double stranded circular plasmids.

35

Furthermore, any size of nucleic acid may be used, as long as there is a source of negative charge for the polycationic agent to bind. In certain embodiments, these

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

127

polycationic moieties may include a natural polyamine such as spermine and/or spermidine. In a preferred embodiment, the polycationic agent may be an artificially produced agent, such as polylysine or polyethyleneimine.

- 5 In order for the invention to function properly, certain criteria with regard to the nucleic acid-binding agent need to be fulfilled. First, the nucleic acid to be delivered into the cell must bind to the nucleic acid binding agent without losing its integrity in any way.
- 10 Secondly, the complex comprising of ligand, nucleic acid binding agent and nucleic acid must be in soluble form to allow greater accessibility of the complex to cells *in vitro* and *in vivo*. Thirdly, once the complex is internalised within the host cell, the nucleic acid must have access to its target sequence while avoiding degradation.
- 15 The nucleic acid binding agent may include agents such as carbodiimides, N-succinimidyl, 3 (2-pyridyldithio) propionate, succinimidyl, 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, diisocyanates, glutaraldehyde, diazobenzenes, and hexamethylene diamines. This list is not intended to be exhaustive of the various coupling agents known in the art but, rather, is exemplary of the more common linking agents that may be used.
- 20 Preferably, the nucleic acid binding agent is selected from the group consisting of poly-L-lysine (PLL), spermine, spermidine and histone proteins.
- 25 When the nucleic acid binding agent is PLL, PLL may be comprising from 15 to 1000, such as from 50 to 750, for example from 100 to 500, such as from 200 to 400 residues.
- 30 In one embodiment of the present invention the binding partner associates with the bioreactive species indirectly via a pair of specific interacting components wherein one component is covalently attached to the bioreactive species and the second component is covalently attached to the binding partner.
- 35 One example of such a pair of specific interacting components is biotin and streptavidin, however other pairs of interacting components may also be used.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

128

Complex comprising cell surface molecule and targeting complex

5 It is one objective of the present invention to provide complexes that comprise a cell surface molecule, a binding partner and a bioreactive species. Example of cell surfaces molecules, binding partner and bioreactive species are given herein above.

10 Preferably, the complex may comprise a cell surface molecule identified according to any of the methods according to the present invention and a targeting complex as described herein above.

Alternatively, the complex may comprise a cell surface molecule and a targeting complex as described herein above, wherein said cell surface molecule preferably comprises or essentially consists of or for example is GRIA2, such as LPR8, for
 15 example is CHRNA5, such as TMEFF, for example is NPTXR, such as Transferrin receptor; such as type II membrane protein clone: for example is HP10481; such as type II membrane protein clone: such as HP10390; for example is PG40; such as TRC8 ; for example is TR2-11; such as OA3 antigenic surface determinant; for example is integrin alpha 6, For example GPIIb; such as vitronectin receptor alpha
 20 subunit; for example is integrin alpha-7; such as integrin alpha E precursor; for example is integrin alpha 6B; such as integrin alpha 5 subunit; for example is integrin beta-5 subunit; such as integrin alpha-3 chain; for example is RYK; such as amyloid precursor protein-binding protein 1; for example is putative transmembrane GTPase; such as membrane cofactor protein; FOR EXAMPLE GLVR1; for example
 25 is Mr 110,000 antigen; for example is syndecan-1; such as putative seven transmembrane domain protein; for example is LCA-homolog/ LAR protein; such as M6 antigen; for example is Me491/CD63 antigen; such as multispinning membrane protein; for example is DDR; such as autocrine motility factor receptor; for example is insulin receptor precursor; such as IGF1R, for example is insulin-like growth factor
 30 II receptor; such as SAS; for example is TAPA-1; such as MICB; for example is MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta-chain; such as HLA-DP; for example is bone small proteoglycan I biglycan; such as CAR; for example is MEA11; such as interferon-gamma receptor alpha chain; for example is Polymeric immunoglobulin receptor; such as metabotropic glutamate receptor type 4; for

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

129

example is metabotropic glutamate receptor 8; such as CLPTM1; for example is MAGE-4b; such as MAGE5a; for example is MAGE-3; such as MAGE-1; for example is MAGE6; such as MAGE-9; for example is MAGE11; such as CD24; for example is CD59; such as CD44; for example is low density lipoprotein receptor; such as very low density lipoprotein receptor; for example is N-CAM; such as lamin B receptor homolog TM7SF2; for example is putative T1/ST2 receptor binding protein precursor; such as NTR2 receptor; for example is RAGE-4; such as HLA-G1; for example is MOAT-C; such as alpha 2 delta calcium channel subunit isoform I; for example is LFA-3; such as L1-CAM; for example is AVPR2; such as C1 p115 C1; for example is TE2; such as RbP; for example is HCF1; such as IRAK; for example is CD151; such as surface antigen; for example is MAG; such as GPR19; for example is pcta-1; such as PRAME; for example is vasopressin activated calcium mobilizing receptor-like protein; such as serotonin receptor 5-HT4B; for example is serotonin 1D receptor (5-HT1D~); such as CD9; for example is LDL receptor member LR3; such as DR6; for example is tumor necrosis factor receptor; such as HG38; for example is urokinase-type plasminogen receptor; such as FGF receptor; for example is nerve growth factor receptor; such as cystine/glutamate transporter; for example is CB1 cannabinoid receptor (CNR1); such as PSG; for example is PSG13; such as CPE-receptor; for example is CRH2R; such as OCI5; for example is TRAIL receptor 2; such as HNMP-1; for example is kidney alpha-2-adrenergic receptor; such as erythropoietin receptor; for example is chondroitin sulphate proteoglycan versican V1; for example is mGluR1beta; such as CD97; for example is L6; such as NY-ESO-1; for example is T-cell receptor alpha delta; such as ror1; for example is ror2; such as SSTR2; for example is VESPR; such as IgG Fc receptor; for example is glutamate receptor subunit GluRC; such as HEK2; for example is PVR; such as CEA; for example is CC-chemokine-binding receptor JAB61; such as HER2; for example is HER3; such as hypothetical protein FLJ22357 similar to Epidermal growth factor receptor-related protein; for example is putative endothelin receptor type B-like protein; such as GLVR2; for example is P2X4 purinoreceptor; such as FPRL1; for example is Atrial natriuretic peptide clearance receptor; for example is gastrin/CCK-B receptor; such as Neuromedin B receptor; for example is GFRA3; such as GRPR; for example is CDH1; such as CDH2; for example is TGFBR1; such as TGFBR2; for example is TGFBR3; such as precursor of epidermal growth factor receptor.

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

130

More preferably, the cell surface molecule may be selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and TMEFF1.

5 **Conditions**

A premalignant and/or malignant conditions may for example be cancer or a conditions which may develop into a cancer. The term cancer within the scope of the present invention covers both malignant and benign tumours, as well as leukaemia.

10

Cancer may for example be adenomas, carcinomas or sarcomas. Cancer may for example be selected from the group consisting of melanoma, brain tumours, neuroblastomas, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, cervix cancer, uterine cancer, ovarian cancer, leukaemia, colon cancer, rectum cancer, cancer of the testis, cancer of the kidney, cancer of the liver, cancer of the lip, cancer of the tongue, cancer of the stomach, skin cancer, sarcomas, mesotheliomas, bladder cancer, bone tumours, malignant pleural effusions, ascites, meningeal carcinomatosis, head and neck cancers and cancers of endocrine organs such as: thyroid gland, pituitary gland and suprarenal gland.

20

Lung cancer may for example be cancers selected from the group comprising small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). Preferably, the premalignant and/or malignant conditions is small cell lung cancer.

25

In one preferred embodiment the premalignant and/or malignant conditions is breast cancer.

In another preferred embodiment the premalignant and/or malignant conditions is a brain tumour. Brain tumours may for example be selected from the group comprising glioblastomas, neuroblastomas, astrocytomas, oligodendrogliomas, meningiomas, medulloblastomas, neuronomas, ependymomas, craniopharyngiomas, pineal tumours, germ cell tumours and schwannomas.

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

131

Administration and pharmaceutical compositions

The individual to receive treatment is any animal, however, preferably the individual is a human being.

- 5 The treatment according to the present invention may be ameliorating treatment, it may be curative treatment and/or it may be prophylactic treatment.

- 10 The main routes of drug delivery according to the present invention are intravenous, oral and subcutaneous, as will be described below. Other drug-administration methods, such as topical delivery, which are effective to deliver the drug to a target site or to introduce the drug into the bloodstream, are also contemplated. The compounds may also be administered by inhalation, that is by intranasal and oral inhalation administration.

- 15 The mucosal membrane to which the pharmaceutical preparation of the invention is administered may be any mucosal membrane of the mammal to which the biologically active substance is to be given, e.g. in the nose, vagina, eye, mouth, genital tract, lungs, gastrointestinal tract, or rectum.

- 20 Compounds of the invention may preferably be administered parenterally, that is by intravenous, intramuscular, subcutaneous intranasal, intrarectal, intravaginal or intraperitoneal administration. The subcutaneous and intramuscular forms of parenteral administration are generally preferred. Appropriate dosage forms for such administration may be prepared by conventional techniques.

- 25 Preferably, the targeting complex according to the present invention is administered parenterally, more preferably the targeting complex is administered by intravenous injection and/or by subcutaneous injection.

- 30 The compounds according to the invention may be administered with at least one other compound. The compounds may be administered simultaneously, either as separate formulations or combined in a unit dosage form, or administered sequentially.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

132

The dosage requirements will vary with the particular drug composition employed, the route of administration and the particular individual being treated. Ideally, an individual to be treated by the present method will receive a pharmaceutically effective amount of the compound in the maximum tolerated dose, generally no higher than that required before drug resistance develops.

The individual dosages of a targeting complex will be determined by the nature and extent of the condition being treated, the form, route and site of administration, and the particular patient being treated, and that such optimums can be determined by conventional techniques. It will also be appreciated by one of skill in the art that the optimal course of treatment, i.e., the number of doses of a compound or a pharmaceutically acceptable salt thereof given per day for a defined number of days, can be ascertained by those skilled in the art using conventional course of treatment determination tests.

The term "unit dosage form" as used herein refers to physically discrete units suitable as unitary dosages for human and animal individuals, each unit containing a predetermined quantity of a compound, alone or in combination with other agents, calculated in an amount sufficient to produce the desired effect in association with a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or vehicle. The specifications for the unit dosage forms of the present invention depend on the particular compound or compounds employed and the effect to be achieved, as well as the pharmacodynamics associated with each compound in the host. The dose administered should be an "effective amount" or an amount necessary to achieve an "effective level" in the individual patient.

Since the "effective level" is used as the preferred endpoint for dosing, the actual dose and schedule can vary, depending on interindividual differences in pharmacokinetics, drug distribution, and metabolism. The "effective level" can be defined, for example, as the blood or tissue level desired in the individual that corresponds to a concentration of one or more compounds according to the invention.

Pharmaceutical compositions containing a compound of the present invention may be prepared by conventional techniques, e.g. as described in Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

133

Company, 19th edition, Easton, Pa. The compositions may appear in conventional forms, for example capsules, tablets, aerosols, solutions, suspensions or topical applications.

- 5 Pharmaceutical acceptable salts of the compounds according to the present invention should also be considered to fall within the scope of the present invention. Pharmaceutically acceptable salts are prepared in a standard manner. If the parent compound is a base it is treated with an excess of an organic or inorganic acid in a suitable solvent. If the parent compound is an acid, it is treated with an inorganic or
10 organic base in a suitable solvent.

- The compounds of the invention may be administered in the form of an alkali metal or earth alkali metal salt thereof, concurrently, simultaneously, or together with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent, especially and preferably in the form
15 of a pharmaceutical composition thereof, whether by oral, rectal, or parenteral (including subcutaneous) route, in an effective amount.

- Examples of pharmaceutically acceptable acid addition salts for use in the present inventive pharmaceutical composition include those derived from mineral acids,
20 such as hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, metaphosphoric, nitric and sulfuric acids, and organic acids, such as tartaric, acetic, citric, malic, lactic, fumaric, benzoic, glycolic, gluconic, succinic, p-toluenesulphonic acids, and arylsulphonic, for example.

- 25 Whilst it is possible for the compounds or salts of the present invention to be administered as the raw chemical, it is preferred to present them in the form of a pharmaceutical formulation. Accordingly, the present invention further provides a pharmaceutical formulation, for medicinal application, which comprises a compound of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof, as herein
30 defined, and a pharmaceutically acceptable carrier therefor.

- The compounds of the present invention may be formulated in a wide variety of oral administration dosage forms. The pharmaceutical compositions and dosage forms may comprise the compounds of the invention or its pharmaceutically acceptable
35 salt or a crystal form thereof as the active component. The pharmaceutically accept-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

134

able carriers can be either solid or liquid. Solid form preparations include powders, tablets, pills, capsules, cachets, suppositories, and dispersible granules. A solid carrier can be one or more substances which may also act as diluents, flavouring agents, solubilisers, lubricants, suspending agents, binders, preservatives, wetting agents, tablet disintegrating agents, or an encapsulating material.

Preferably, the composition will be about 0.5% to 75% by weight of a compound or compounds of the invention, with the remainder consisting of suitable pharmaceutical excipients. For oral administration, such excipients include pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, talcum, cellulose, glucose, gelatin, sucrose, magnesium carbonate, and the like.

In powders, the carrier is a finely divided solid which is a mixture with the finely divided active component. In tablets, the active component is mixed with the carrier having the necessary binding capacity in suitable proportions and compacted in the shape and size desired. The powders and tablets preferably containing from one to about seventy percent of the active compound. Suitable carriers are magnesium carbonate, magnesium stearate, talc, sugar, lactose, pectin, dextrin, starch, gelatin, tragacanth, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, a low melting wax, cocoa butter, and the like. The term "preparation" is intended to include the formulation of the active compound with encapsulating material as carrier providing a capsule in which the active component, with or without carriers, is surrounded by a carrier, which is in association with it. Similarly, cachets and lozenges are included. Tablets, powders, capsules, pills, cachets, and lozenges can be as solid forms suitable for oral administration.

Drops according to the present invention may comprise sterile or non-sterile aqueous or oil solutions or suspensions, and may be prepared by dissolving the active ingredient in a suitable aqueous solution, optionally including a bactericidal and/or fungicidal agent and/or any other suitable preservative, and optionally including a surface active agent. The resulting solution may then be clarified by filtration, transferred to a suitable container which is then sealed and sterilized by autoclaving or maintaining at 98-100°C for half an hour. Alternatively, the solution may be sterilised by filtration and transferred to the container aseptically. Examples of bactericidal and fungicidal agents suitable for inclusion in the drops are phenylmercuric nitrate or

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

135

acetate (0.002%), benzalkonium chloride (0.01%) and chlorhexidine acetate (0.01%). Suitable solvents for the preparation of an oily solution include glycerol, diluted alcohol and propylene glycol.

5 Also included are solid form preparations, which are intended to be converted, shortly before use, to liquid form preparations for oral administration. Such liquid forms include solutions, suspensions, and emulsions. These preparations may contain, in addition to the active component, colorants, flavours, stabilisers, buffers, artificial and natural sweeteners, dispersants, thickeners, solubilising agents, and
10 the like.

Other forms suitable for oral administration include liquid form preparations including emulsions, syrups, elixirs, aqueous solutions, aqueous suspensions, toothpaste, gel dentrifice, chewing gum, or solid form preparations which are intended to be converted shortly before use to liquid form preparations. Emulsions may be prepared in
15 solutions in aqueous propylene glycol solutions or may contain emulsifying agents such as lecithin, sorbitan monooleate, or acacia. Aqueous solutions can be prepared by dissolving the active component in water and adding suitable colorants, flavours, stabilising and thickening agents. Aqueous suspensions can be prepared by dispersing the finely divided active component in water with viscous material, such as
20 natural or synthetic gums, resins, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, and other well known suspending agents. Solid form preparations include solutions, suspensions, and emulsions, and may contain, in addition to the active component, colorants, flavours, stabilisers, buffers, artificial and natural sweeteners, dispersants, thickeners, solubilising agents, and the like.
25

The compounds of the present invention may be formulated for parenteral administration (e.g., by injection, for example bolus injection or continuous infusion) and may be presented in unit dose form in ampoules, pre-filled syringes, small volume
30 infusion or in multi-dose containers with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions, or emulsions in oily or aqueous vehicles, for example solutions in aqueous polyethylene glycol. Examples of oily or nonaqueous carriers, diluents, solvents or vehicles include propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils (e.g., olive oil), and injectable organic esters (e.g., ethyl oleate), and may contain formulatory agents such as preserving, wetting,
35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

136

emulsifying or suspending, stabilising and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form, obtained by aseptic isolation of sterile solid or by lyophilisation from solution for constitution before use with a suitable vehicle, e.g., sterile, pyrogen-free water.

5

Oils useful in parenteral formulations include petroleum, animal, vegetable, or synthetic oils. Specific examples of oils useful in such formulations include peanut, soybean, sesame, cottonseed, corn, olive, petrolatum, and mineral. Suitable fatty acids for use in parenteral formulations include oleic acid, stearic acid, and isostearic acid.

10

Ethyl oleate and isopropyl myristate are examples of suitable fatty acid esters.

Suitable soaps for use in parenteral formulations include fatty alkali metal, ammonium, and triethanolamine salts, and suitable detergents include (a) cationic detergents such as, for example, dimethyl dialkyl ammonium halides, and alkyl pyridinium halides; (b) anionic detergents such as, for example, alkyl, aryl, and olefin sulfonates, alkyl, olefin, ether, and monoglyceride sulfates, and sulfosuccinates, (c) nonionic detergents such as, for example, fatty amine oxides, fatty acid alkano-

15

20

lamides, and polyoxyethylenepolypropylene copolymers, (d) amphoteric detergents such as, for example, alkyl-.beta.-aminopropionates, and 2-alkyl-imidazoline quaternary ammonium salts, and (e) mixtures thereof.

The parenteral formulations typically will contain from about 0.5 to about 25% by weight of the active ingredient in solution. Preservatives and buffers may be used. In order to minimise or eliminate irritation at the site of injection, such compositions may contain one or more nonionic surfactants having a hydrophile-lipophile balance (HLB) of from about 12 to about 17. The quantity of surfactant in such formulations will typically range from about 5 to about 15% by weight. Suitable surfactants include polyethylene sorbitan fatty acid esters, such as sorbitan monooleate and the high molecular weight adducts of ethylene oxide with a hydrophobic base, formed by the condensation of propylene oxide with propylene glycol. The parenteral formulations can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampoules and vials, and can be stored in a freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of the sterile liquid excipient, for example, water, for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions can be

25

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

137

prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described.

5 The compounds of the invention can also be delivered topically. Regions for topical administration include the skin surface and also mucous membrane tissues of the vagina, rectum, nose, mouth, and throat. Compositions for topical administration via the skin and mucous membranes should not give rise to signs of irritation, such as swelling or redness.

10 The topical composition may include a pharmaceutically acceptable carrier adapted for topical administration. Thus, the composition may take the form of a suspension, solution, ointment, lotion, sexual lubricant, cream, foam, aerosol, spray, suppository, implant, inhalant, tablet, capsule, dry powder, syrup, balm or lozenge, for example. Methods for preparing such compositions are well known in the pharmaceutical industry.

15 The compounds of the present invention may be formulated for topical administration to the epidermis as ointments, creams or lotions, or as a transdermal patch. Creams, ointments or pastes according to the present invention are semi-solid formulations of the active ingredient for external application. They may be made by mixing the active ingredient in finely-divided or powdered form, alone or in solution or suspension in an aqueous or non-aqueous fluid, with the aid of suitable machinery, with a greasy or non-greasy base. The base may comprise hydrocarbons such as hard, soft or liquid paraffin, glycerol, beeswax, a metallic soap; a mucilage; an oil of natural origin such as almond, corn, arachis, castor or olive oil; wool fat or its derivatives or a fatty acid such as steric or oleic acid together with an alcohol such as propylene glycol or a macrogel. The formulation may incorporate any suitable surface active agent such as an anionic, cationic or non-ionic surfactant such as a sorbitan ester or a polyoxyethylene derivative thereof. Suspending agents such as natural gums, cellulose derivatives or inorganic materials such as siliceous silicas, and other ingredients such as lanolin, may also be included.

20 Lotions according to the present invention include those suitable for application to the skin or eye. An eye lotion may comprise a sterile aqueous solution optionally containing a bactericide and may be prepared by methods similar to those for the

25

30

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

138

preparation of drops. Lotions or liniments for application to the skin may also include an agent to hasten drying and to cool the skin, such as an alcohol or acetone, and/or a moisturiser such as glycerol or an oil such as castor oil or arachis oil.

- 5 The pharmaceutical active compound described herein can be administered transdermally. Transdermal administration typically involves the delivery of a pharmaceutical agent for percutaneous passage of the drug into the systemic circulation of the patient. The skin sites include anatomic regions for transdermally administering the drug and include the forearm, abdomen, chest, back, buttock, mastoidal area, and
- 10 the like.

- Transdermal delivery is accomplished by exposing a source of the active compound to a patient's skin for an extended period of time. Transdermal patches have the added advantage of providing controlled delivery of a pharmaceutical agent-chemical modifier complex to the body. See Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); and Transdermal Delivery of Drugs, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987). Such dosage forms can
- 15 be made by dissolving, dispersing, or otherwise incorporating the pharmaceutical active compound in a proper medium, such as an elastomeric matrix material. Absorption enhancers can also be used to increase the flux of the compound across the skin. The rate of such flux can be controlled by either providing a rate-controlling membrane or dispersing the compound in a polymer matrix or gel.

- 25 The compounds of the present invention may be formulated for administration as suppositories. A low melting wax, such as a mixture of fatty acid glycerides or cocoa butter is first melted and the active component is dispersed homogeneously, for example, by stirring. The molten homogeneous mixture is then poured into convenient
- 30 sized molds, allowed to cool, and to solidify.

- The active compound may be formulated into a suppository comprising, for example, about 0.5% to about 50% of a compound of the invention, disposed in a polyethylene glycol (PEG) carrier (e.g., PEG 1000 [96%] and PEG 4000 [4%]).

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

139

The compounds of the present invention may be formulated for vaginal administration. Pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams or sprays containing in addition to the active ingredient such carriers as are known in the art to be appropriate.

- 5 When desired, formulations can be prepared with enteric coatings adapted for sustained or controlled release administration of the active ingredient.

Pharmaceutical compositions usually comprise a carrier. Illustrative solid carrier include lactose, terra alba, sucrose, talc, gelatin, agar, pectin, acacia, magnesium stearate, stearic acid and the like. A solid carrier can include one or more substances which may also act as flavoring agents, lubricants, solubilizers, suspending agents, fillers, glidants, compression aids, binders or tablet-disintegrating agents; it can also be an encapsulating material. In powders, the carrier is a finely divided solid which is in admixture with the finely divided active ingredient. In tablets, the active ingredient is mixed with a carrier having the necessary compression properties in suitable proportions, and compacted in the shape and size desired. The powders and tablets preferably contain up to 99% of the active ingredient. Suitable solid carriers include, for example, calcium phosphate, magnesium stearate, talc, sugars, lactose, dextrin, starch, gelatin, cellulose, methyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, low melting waxes and ion exchange resins.

Illustrative liquid carriers include syrup, peanut oil, olive oil, water, etc. Liquid carriers are used in preparing solutions, suspensions, emulsions, syrups, elixirs and pressurized compositions. The active ingredient can be dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable liquid carrier such as water, an organic solvent, a mixture of both or pharmaceutically acceptable oils or fats. The liquid carrier can contain other suitable pharmaceutical additives such as solubilisers, emulsifiers, buffers, preservatives, sweeteners, flavouring agents, suspending agents, thickening agents, colours, viscosity regulators, stabilisers or osmo-regulators. Suitable examples of liquid carriers for oral and parenteral administration include water (partially containing additives as above, e.g. cellulose derivatives, preferably sodium carboxymethyl cellulose solution), alcohols (including monohydric alcohols and polyhydric alcohols, e.g. glycols) and their derivatives, and oils (e.g. fractionated coconut oil and arachis oil). For parenteral administration, the carrier can also be an oily ester such as ethyl oleate and isopropyl myristate. Sterile liquid carriers are useful in sterile liquid form

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

140

compositions for parenteral administration. The liquid carrier for pressurised compositions can be halogenated hydrocarbon or other pharmaceutically acceptable propellant. Liquid pharmaceutical compositions which are sterile solutions or suspensions can be utilised by, for example, intramuscular, intraperitoneal or subcutaneous injection. Sterile solutions can also be administered intravenously. The compound can also be administered orally either in liquid or solid composition form.

The carrier or excipient may include time delay material well known to the art, such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate along or with a wax, ethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, methylmethacrylate and the like. When formulated for oral administration, 0.01% Tween 80 in PHOSAL PG-50 (phospholipid concentrate with 1,2-propylene glycol, A. Nattermann & Cie. GmbH) has been recognised as providing an acceptable oral formulation for other compounds, and may be adapted to formulations for various compounds of this invention.

15

Combination therapies

The targeting complex according to the present invention may be administered in combination with one or more second treatments, for example treatments which are currently used to treat cancer.

20

For example such second treatments may be selected from the group consisting of surgical treatment, chemotherapy, radiation therapy, therapy with cytokines, Hormone therapy, gene therapy, immunotherapy and treatments using laser light.

25

Chemotherapy comprise administration of a chemotherapeutical agent, such as a cytostatica. Cytostatica according to the present invention may for example be selected from the group consisting of carboplatin, cisplatin, cyclophosphamide, iphosphamide, hexamethylmelamine, doxorubicin, epirubicin, etoposide (VP-16), teniposide (VM-26), vincristine, vindesine, taxans, irinotecan, tyrosin kinase inhibitors, nimustine, lomustine, BCNU, farnesyl transferase inhibitors, anti angiogenetic compounds, anti metastatic compounds, 5-fluoruracil \pm leucovorin, topoisomerase inhibitor I and II and Temozolamide.

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

141

In addition, chemotherapy may for example comprise administration of Anti-estrogen, Anti-progesteron, anti-androgen, LH-RH antagonists or aromatase inhibitors

5 Examples

The following are examples of embodiments of the invention and should not be regarded as limiting for the present invention.

10 Example 1

Culture of small cell lung cancer (SCLC) cell lines:

The following small cell lung cancer cell lines were used for analysis

Cell line	Cell line established	Growth: A= adherent S= suspension	Growth medium
CPH 54A	University of Copenhagen, Denmark (Engelholm et al., 1986)	A	MEM (EAGLE) + 10% FCS
CPH 54B		A	MEM (EAGLE) + 10% FCS
GLC 2	Groningen Lung Cancer Centre, The Netherlands (de Leij et al., 1988; Berendsen et al., 1988, Bulte et al., 1993)	A (S)	RPMI + 10% FCS
GLC 3		S (A)	RPMI + 10% FCS
GLC 14		S	RPMI + 10% FCS
GLC 16		S	RPMI + 10% FCS
GLC 19		S	RPMI + 10% FCS
GLC 26		S	RPMI + 10% FCS
GLC 28		S	RPMI + 10% FCS
DMS 53	Dartmouth Medical School, NH, USA (Pettengill et al., 1980)	A	Waymouth + 10% FCS
DMS 79		S	RPMI + 10% FCS
DMS 92		A (S)	Waymouth + 10% FCS
DMS 114		A	Waymouth + 10% FCS
DMS 153		A	Waymouth + 10% FCS
DMS 273		A	Waymouth + 10% FCS
DMS 406		A (S)	Waymouth + 10% FCS

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

142

DMS 456		A (S)	Waymouth + 10% FCS
NCI H69	National Cancer Institute, MD, USA (Camey et al., 1985)	S	RPMI + 10% FCS
NCI N417		S	RPMI + 10% FCS
MAR H24	Philips University, Marburg, Germany (Bepler et al., 1987)	S	RPMI + 10% FCS
MAR 86 MI		S	RPMI + 10% FCS

All cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in a humidified atmosphere in medium without antibiotics and passaged twice weekly. All media and serum were obtained from Life Technologies.

5

Xenografts

0.5-1.2 x 10⁷ cells were inoculated bilaterally, subcutaneously in the flanks of 12-13 weeks old Balb/c nude mice. The mice were sacrificed and the xenografted tumors were harvested when one of the tumors had reached a maximal diameter of 1 cm. Necrotic tissue was removed. The cell line CPH 136A was only propagated in nude mice by inoculation of a 2 mm tumor block. Tumors for RNA isolation were either processed immediately or stored 24 hours in RNA *later* (Ambion) followed by storage at -70°C and processed as described below. Tumors used for lysates for Western blot analyses were processed immediately as described below.

15

RNA from normal tissues

Total RNA from normal, human tissues were obtained from either Clontech (fetal brain, brain, lung, kidney, heart, trachea, adrenal gland, prostate, salivary gland, thyroid) or from Ambion (lung, liver, brain, pancreas, spleen, small intestine, skeletal muscle, colon, stomach, testes). Only one sample was analysed in duplicate (lung RNA from Clontech and Ambion) and one in triplicate (brain RNA from 2 different batches from Clontech and one from Ambion). Fetal brain was included as a reference for embryonal, neuroendocrine tissue.

25

Isolation of RNA from cell lines

Cells from semi-confluent cultures were harvested (by trypsinisation for adherent cells) and total RNA from approx. 10⁷ cells was isolated using RNeasy Kit (Qiagen)

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

143

according to manufacturers instructions. Xenografted tumors (fresh or after storage in RNA *later*) were homogenised in TRIzol (Life Technologies) and RNA purified according to the manufacturers instruction. The TRIzol isolated RNA was further purified using RNeasy kit (Qiagen).

- 5 The concentration of the RNA was estimated by the absorption at 260nm (A_{260}). The integrity of the RNA was verified by measuring the ratio of $A_{260/280}$ to be 1.9 or more and by estimating the ratio of 28S rRNA to 18S rRNA analysed by formaldehyde (denaturing) gel analysis to being approximately 2.

10 Preparation of cDNA.

- 10 µg total RNA in 10 µl H₂O was hybridised to 100 pmol T7-(dT)₂₄ primer (HPLC purified 5'- GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGG-CGG(T)₂₄ (SEQ ID NO 401) obtained from GENSET) after denaturation at 70°C for 10 min. The following reactions were performed using reagents from Gibco BRL, Life Technologies. First strand synthesis was performed using 400 U SuperScript
- 15 RNaseH⁻ Reverse Transcriptase kit in a 20 µl reaction in first strand buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs (each) at 42°C for 1 hour. The second strand synthesis was performed in a 150 µl reaction in second strand buffer (20 mM Tris-Cl (pH 6.9), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.15 mM β-NAD⁺, 10 mM(NH₄)₂SO₄ containing 0.26 mM dNTPs, 0.07 U/µl E. coli DNA ligase, 0.27 U/µl E. coli DNA polymerase, 0.013 U/µl E. coli RNase H by incubation for 2
- 20 hours at 16°C. DNA ends were filled out by addition of 0.07 U/µl T4 DNA polymerase and incubation for 5 min at 16°C. The reactions were terminated by addition of EDTA to 33 µM final concentration. The cDNA was purified by extraction with 1 volume phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) saturated with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA followed by precipitation in 2.5 M NH₄Ac in 63% ethanol with addition of 2 µl Pellet Paint (Novagen) for visualization of pellet. After 2 consecutive rinsing of the pellet with 80% ethanol, the pellet was air dried and dissolved in 12 µl
- 30 water. An aliquot was analysed by agarose gel electrophoresis to ensure the length of the cDNA to be in the range of 0.1-10 kb.

Preparation of biotin labelled cRNA (IVT-cRNA)

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

144

In vitro transcription generating biotin labelled cRNA (complementary RNA) with T7 RNA polymerase using biotin labelled ribonucleotides was performed with the BioArray™, High Yield™ RNA transcript labelling kit from Enzo Diagnostics, NY, USA) using 6 µl cDNA (estimated to contain approx. 1µg cDNA) in a 40 µl reaction according to manufacturers specifications. The biotin labelled cRNA was purified using RNeasy spin columns kit (Qiagen) according to manufacturers specified method for RNA cleanup. An aliquot of the IVT-cRNA was analysed by denaturing agarose gel electrophoresis to ensure full length transcripts (>10 kb). The concentration of the cRNA was estimated by the absorption at 260nm and corrected for contribution of total RNA initially used for the cDNA reaction. The yield varied from 25-100 µg per reaction.

Fragmentation of IVT-cRNA

22 µg IVT-cRNA was fragmented by incubation in 0.04 M Tris-Acetate (pH 8.1), 0.03 M MgAc, 0.1 M KAc in a 20 µl reaction for 35 min at 94°C. An aliquot of the fragmented IVT-cRNA was analysed by agarose gel electrophoresis to ensure fragmentation to the size of 30-200 bases.

Hybridisation to Affymetrix GeneChip™ and analysis of data (CHIPs analysis)

A hybridisation mixture containing 20 µg of fragmented IVT-cRNA in a volume of 400 µl containing 0.1 M MES, 0.75, [Na⁺], 0.1 mg/ml herring sperm DNA, 0.1 mg/ml acetylated BSA, 0.05 nM biotinylated control oligo B2 (5'- GTCGTCAA-GATGCTACCGTTCAGGA (SEQ ID NO 402)) and control biotin labelled IVT-cRNA for spiking prepared from the plasmids pgIks-bioB (150 pM), pgIks-bioC (500 pM), pgIks-bioD (2.5 nM) and pgIks-cre (10 nM) (American Tissue Culture Collection). The control oligo and control cRNAs were obtained from Affymetrix. 100 µl was hybridised to an Affymetrix test2 CHIP followed by staining with a streptavidin-phycoerythrin conjugate and labelling with biotinylated anti-streptavidin goat antibody followed by a final staining with streptavidin-phycoerythrin conjugate (according to the manufacturers protocol Mini-euk1) or 300 µl was hybridised to an Affymetrix U95A GeneChip and stained according to the manufacturers protocol EukGE-WS2 in an Affymetrix Fluidics station and scanned at 560 nm in a confocal laser scanner (Hewlett Packard GeneArray Scanner G2500A). The digitalized image

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

145

data was first processed using Affymetrix Microarray Suite™ version 4.0 for evaluation of the quality of the RNA and hybridisation and Affymetrix Data Mining Tool (version 2.0) for selection of candidate genes. The data was re-analysed using Affymetrix Microarray Suite™ version 5 (see results) for selection of surface molecules. Data was only used from analyses where: the control oligos BioB, BioC, BioD and Cre were all detected as present; the scaled noise (Q) was below 10; the ratio of detection of the mRNA levels of the 5' ends relative to the 3' end of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin were below 2 ; at least 40% of all probe sets were identified as present. For comparison between samples, the global intensity was set at 100.

RT-PCR

Semi-quantitative RT-PCR was performed on selected genes for validation of the Chips analysis. cDNA prepared as described above was used for the RT-PCR but as an independent preparation than used for Chips analysis. The PCR reaction was performed using cDNA from 350 ng total RNA in a 25 µl reaction with 200 nM primers (DNA Technology A/S), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTPs, 0.1U/µl Platinum Taq Polymerase (Life Technologies) in the buffer provided with the enzyme with 0.008% cresol red and 12% sucrose as loading buffer. All reactions were run 94°C, 2 min, 1 cycle; 94°C, 30 sec, annealing temperature as indicated for each primer set, 30 sec, 72°C, 30 sec for 25 cycles and a final extension step of 72°C 10 min. Using only 25 cycles makes the reaction semi-quantitative.

The primer sets used were:

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

512 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. NM_002046 bp. 608-1119,
Sense: 5'-TCCATGCCATCACTGCCACCA (SEQ ID NO 403)
Antisense: 5'-TCTTGTGCTCTGCTGGGCTG (SEQ ID NO 404) Annealing temp. 56°C

One RT-PCR reaction has been performed.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

146

Pro 30 (KIAA0042)

432 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. D26361 bp. 5181-5612 ,

Sense: 5'- GTTTGAATCTGAAGAAAGCCC (SEQ ID NO 405)

Antisense: 5'-TCAAACCTCTGACCTGTGATCT (SEQ ID NO 406) Annealing

5 temp. 49°C.

2 independent RT-PCR reactions have been performed.

Pro 41 (MAD2)

525 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. AJ000186 bp. 643-1167 ,

10 Sense: 5'- GTAAATAGCATGGTGGCCTACA (SEQ ID NO 407) .

Antisense: 5'-GGTCCAAAGGAGCTATACAGCA (SEQ ID NO 408) Annealing temp.

45°C.

2 independent RT-PCR reactions were performed.

15

Pro 221 (insulinoma-associated antigen, IA-1)

532 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. M93119 bp. 1549-2080 ,

Sense: 5'- GTGTTCCCCTGCAAGTACTGCCC (SEQ ID NO 409)

Antisense: 5'-CAGAGATTGGTAGGCGAGGCGA (SEQ ID NO 410) Annealing

20 temp. 52°C

2 independent RT-PCR reactions were performed.

Pro 210 (lamin B1)

25 439 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. L37747 bp. 424-862 ,

Sense: 5'-ACTGTGTACTGTTCGGAAGGG (SEQ ID NO 411)

Antisense: 5'-TAGAGAAACCCTTCCCTCCC (SEQ ID NO 412) Annealing temp.

46°C.

Only one RT-PCR reaction has been performed. RT-PCR was not performed on

30 testis

Pro 71(p16INK4/MTS 1, CDKN2A)

437 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. U26727 bp.176-612 ,

35 Sense: 5'- TGAGGAGCCAGCGTCTAGGG (SEQ ID NO 413)

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

147

Antisense: 5'-GTGGCCCTGTAGGACCTTCG (SEQ ID NO 414) Annealing temp.
57°C

Only one RT-PCR reaction has been performed. RT-PCR was not performed on
testis

5

DR6 (TNFRS12, tumor necrosis factor receptor superfamily member 21)

559 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. AF068868 bp. 1081-1639 ,

Sense: 5'- GTGCTTGTTGGTGATTGGTGTG (SEQ ID NO 415)

Antisense: 5'-TGTTCTTGCTCTGTGGGAAGG (SEQ ID NO 416) Annealing temp.

10

56°C.

2 independent RT-PCR reactions were performed.

NCAM1 (neural cell adhesion molecule)

456 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. HSU63041 bp 2045-2500,

15

Sense: 5'- TATGAGGTCTACGTGGTGGC (SEQ ID NO 417)

Antisense: 5'- CTCCTGGCACTCTGGCTTTG (SEQ ID NO 418) Annealing temp. 53
°C.

Only one RT-PCR reaction has been performed. RT-PCR was not performed on
testis

20

NPTXR (Neuronal pentraxin receptor)

482 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. HS327J16 bp.46012-46493 ,

Sense: 5'- CACACGCACACATGTTGCAGC (SEQ ID NO 419)

Antisense: 5'- GCTCTGAGAGGCCAAAGCC (SEQ ID NO 420) Annealing temp.

25

55°C.

Only one RT-PCR reaction has been performed. RT-PCR was not performed on
testis

GLUR2 (ionotropic glutamate receptor 2; GRIA2)

30

522 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. L20814 bp. 2449-2970 ,

Sense: 5'- AGGAACCCAGTAAATCTTGCAG (SEQ ID NO 421)

Antisense: 5'- TCAGTCACACTGACATTCATCCC (SEQ ID NO 422) Annealing
temp. 51°C

Only one RT-PCR reaction has been performed. RT-PCR was not performed on
testis

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

148

ITGAV (integrin alpha V subunit)

533 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. M14648 bp. 3867-4399 ,

Sense: 5'- AATTTTAGGTCAAATCCTTCAAGCCAAC (SEQ ID NO 423)

- 5 Antisense: 5'-TGACAGCCGAGACTGATTTTACACATTA (SEQ ID NO 424) Annealing temp. 50°C.

Only one RT-PCR reaction has been performed. RT-PCR was not performed on testis

- 10 *LRP8 (apolipoprotein E receptor 2)*

459 bp PCR product spanning GenBank Acc. no. HSZ75190 bp. 2016-2474 ,

Sense: 5'- GCTCCATATAGGAGAACTGCTCAG (SEQ ID NO 425)

Antisense: 5'-CCCCAGCAACCAACATCTTCT (SEQ ID NO 426) Annealing temp. 50°C.

- 15 Only one RT-PCR reaction has been performed. RT-PCR was not performed on testis.

Western blotting

- 20 Protein samples

Whole cell lysates were extracted from cell lines and xenografted tumors for validation of protein expression of selected genes. The lysates were prepared from semi confluent cultures of cell lines by scraping with a rubber policeman (for adherent cells) and washing in ice-cold 20 mM Tris-Cl pH 7.5. The cell pellet was lysed in ice cold 20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% Triton X-100 containing Protease Inhibitor Cocktail set II and III (Calbiochem) diluted 1:100. After vortexing the lysates were cleared by centrifugation at 15,000 x g for 5 min, 4°C. Lysates from xenografted tumors was prepared immediately after harvesting of the tumors and a lysate from an adult rat brain was processed in a similar manner. The tumors were weighed and homogenised using a Heidolph DIAX 900 homogenised in 5 volumes (w/w) ice cold 20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% Triton X-100 containing Protease Inhibitor Cocktail set II and III (Calbiochem) diluted 1:100. cleared by centrifugation at 15,000 x g for 5 min, 4°C. Protein concentration of the lysates was determined using the BCA Protein Assay (Pierce) as recommended by the manufacturer.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

149

Commercial cell lysates of Jurkat (Santa Cruz) and A431 (Neomarkers) were used as positive controls in some western blots.

SDS-PAGE and blotting.

- 5 5-15 µg lysate was loaded per lane in LDS sample buffer with reducing agent (Nu-PAGE) and separated on 3-8% Tris Acetate SDS gels, run for 150 V 1 hr in Tris-Acetate SDS running buffer (NuPAGE) and transferred to PVDF LC 2002 (Novex) membrane in Transfer Buffer (NuPAGE). Protein size marker was ProSieve colour protein marker. For probing with anti-NCAM1 antibodies, the lysates were pre-
- 10 treated for 5 min at 37°C with 40 ng/µl recombinant EndoN-HIS (gift from E. Bock) to remove polysialylation.

- The membranes were blocked in washing buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% low fat milk for 60 min at room temperature (for antibodies against Integrin αE (CD103), For ITGAE a Tris-Cl buffer pH 10.2 was
- 15 used for all incubation and washing procedures. The blots were incubated with primary antibodies and secondary antibodies in blocking buffer as described below and bound antibodies visualised by ECL (Amersham) or alkaline phosphatase using NBT/BCIP tablets (Roche) as recommended by the manufacturers.

- 20 *NCAM1 (neural cell adhesion molecule)*

Primary antibody: Mouse monoclonal anti-NCAM1 clone 123C3 (Santa Cruz) diluted 1: 100 Incubation 16 hours at 4°C. Secondary antibody: Alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO) diluted 1: 500. Incubation 1 hour at room temperature. Development by alkaline phosphatase.

25

GluR2 (ionotropic glutamate receptor 2)

Primary antibody: Mouse monoclonal anti GluR2 and 4 (clone3A11) (Pharmingen) diluted 1:500 Incubation 16 hours at 4°C. Secondary antibody: Alkaline phosphatase rabbit anti mouse Ig (DAKO) diluted 1: 500 Incubation 1 hour at room temperature. Development by alkaline phosphatase.

30

GRM8 (GluR8 (metabotropic glutamate receptor 8))

Primary antibody: Rabbit polyclonal anti-mGluR8 (Upstate Biotechnology, TriChem) diluted 1: 500. Incubation 16 hours at 4°C. Secondary antibody: Horseradish peroxi-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

150.

dase swine anti rabbit Ig (DAKO) diluted 1: 1000 Incubation 1 hour at room temperature. Development by ECL.

NPTXR (neuronal pentraxin receptor)

- 5 Primary antibody: Goat polyclonal anti NPTXR (C-17)(Santa Cruz) diluted 1: 500 Incubation 16 hours at 4°C. Secondary antibody: Horseradish peroxidase rabbit anti goat Ig (DAKO) diluted 1: 1000 Incubation 1 hour at room temperature. Development by ECL

- 10 *ITGAE (integrin alpha E subunit)*

Primary antibody: Goat polyclonal anti Integrin α E (N-19) (Santa Cruz) diluted 1:1000. Incubation 16 hours at 4°C.
Secondary antibody: Alkaline phosphatase rabbit anti goat Ig (sc-2771) (Santa Cruz) diluted 1: 500. Incubation 1 hour at room temperature

- 15 Development by alkaline phosphatase.

Cluster analysis of obtained Chips analysis data.

- 20 To interpret the variation in expression patterns seen between the normal tissues analysed and the small cell lung cancer cell lines we took advantage of the properties of both SOMs (self-organising maps) and hierarchical clustering. These were used consecutively to group genes on the basis of similarity in the pattern of expression. Genes used for the analysis were those that had an average difference of more than 50 and were scored present in any one of the samples.

25

SOMs

- Self-Organising maps (SOMs) is a method of cluster analysis that is somewhat related to k-means clustering. The basic principle behind the SOM algorithm is that the weight vectors of neurons, which are first initialised randomly, come to represent a number of original measurement vectors during an iterative data input (Toronen et al, 1999). The following parameters were used in the calculations: **Genes:** Xdim: 1, Ydim: 10, Iterations: 100000, **Samples:** Xdim: 1, Ydim: 10, Iterations: 20000.

- 35 Hierarchical Clustering

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

151

The basic idea behind hierarchical clustering is to assemble a set of items (genes or arrays) into a tree, where items are joined by very short branches if they are very similar to each other, and by increasingly longer branches as their similarity decreases. The output file from the SOM clustering is used for the hierarchical clustering, meaning that the ordering by the SOM clustering is used to guide the flipping of nodes in the hierarchical tree (Eisen et al., 1998). The following parameters were used in the calculations: **Genes**: Cluster: Yes, Calculate weights: Yes, Similarity matrix: correlation uncentered, **Samples**: Cluster: Yes, Calculate weights: Yes, Similarity matrix: correlation uncentered. Subsequently an Average Linkage cluster analysis was performed.

Results of clustering analysis

Clustering of the X-axis (samples) (Fig 2) showed as expected that the SCLC cell lines clustered together, with Mar86MI and CPH54A being furthest apart. CPH54A and B clustered very close (B is a clonal variant of A), as did GLC14, GLC16 and GLC19 (derived from the same patient). Of the normal tissues expression from lung RNA obtained from Ambion and lung RNA obtained from CLONTECH clustered very close, as did 2 different batches of brain RNA obtained from CLONTECH with brain RNA obtained from Ambion. Expression from RNA obtained from fetal brain likewise clustered close to the mature brain and was the closest of all normal tissues to the SCLC cell lines. This confirms that SCLC lines are of neuro-endocrinal origin. Clustering of the Y-axis (genes) clearly found 4 very distinct clusters of genes with higher expression in the SCLC cell lines. The smallest contained 19 genes, the second and third 65 each, and the fourth and largest gene cluster 268.

Selection criterias for candidate promoters (first nucleic acid sequences).

The candidate promoters were chosen based on expression level of the gene, which the promoter controls. The selection was performed on all 21 SCLC cell lines, but not xenografts and on 7 normal tissues (brain, adrenal gland, lung, kidney, heart, prostate, pancreas).

Selection was based on several criteria. Only genes, which scored present (P) in the absolute call and with an Average difference >50 (level of expression) were included. These output data were further processed in Microsoft Excel 2000. Genes were selected which were scored present in at least 11 of the 21 SCLC lines and if

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

152

the gene was scored present in one or more normal tissues, the median Average difference value of the SCLC cell lines must be 4 times or more above the median Average difference value of the normal tissue. After a second screening using RNA from more normal tissues, the selected candidates are submitted to the same criteria as above and discarded if they do not fulfil the above requirements.

Validation of Chips analysis by RT-PCR

Selected genes were analysed by semi-quantitative RT-PCR for verification of expression identified by Chips analysis. The quality of the cDNA was tested using primers for GADPH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Fig. 2). All cDNA samples were very positive showing that the quality of the cDNA for further analysis was good.

RT-PCR with primers for Pro 221 (IA-1, insulinoma associated antigen 1) (Fig. 3) showed that in normal tissue adrenal gland and brain and fetal brain are weakly positive in both Chips and RT-PCR analysis. 4 SCLC lines or xenografts are negative in both analyses. All others are weak to very strongly positive. The RT-PCR and Chips analysis correlate extremely well.

RT-PCR with primers for Pro 30 (KIA0042) (Fig. 4) showed that in normal tissue testes is positive for both Chips and RT-PCR. Other normal tissues are low or negative by both analysis methods. All SCLC cells and xenografts are positive in both Chips and RT-PCR analysis. There are a few samples where the relative amounts in Chips and RT-PCR do not correlate (e.g. high in one and low in the other analysis).

RT-PCR with primers for Pro 41 (MAD2) (Fig. 5) shows low expression in most normal tissues and high expression in testes measured both by Chips analysis and RT-PCR. All SCLC cell lines and xenografts show very high expression by both Chips and RT-PCR analysis.

RT-PCR with primers for Pro 210 (lamin B1) (Fig. 6) showed very low or no expression in normal tissues (colon positive for both assays). All SCLC and xenografts have high expression by Chips analysis – all except 2 are very positive by RT-PCR. RT-PCR values are arbitrarily chosen to match Chips signal.

RT-PCR with primers for Pro 71 (CDKN2A) (Fig. 7) showed very low or no expression in normal tissues and high expression in all but 4 SCLC. Excepto for one sam-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

153

ple negative in RT-PCR and positive in Chips analysis, the RT-PCR and Chips data correlate very well.

Conclusion on validation of Chips analysis by RT-PCR.

- 5 The Chips data and RT-PCR data correlate extremely well. The low to none expression in most normal tissues observed by Chips analysis is confirmed by the semi-quantitative RT-PCR reaction. The expression of the selected genes in SCLC cell lines and xenografts are very high and in all or most cell lines. Therefore using
- 10 Chips analysis for identification of promoters with high and specific expression is an applicable method.

Selection criteria's for candidate cell surface molecules identified by Chips analysis.

- 15 The first generation of candidate cell surface molecules were selected on basis of several criteria. The selection was performed on all 21 SCLC cell lines, but not xenografts and on 7 normal tissues (brain, adrenal gland, lung, kidney, heart, prostate, pancreas). Only genes, which scored present (P) in the absolute call and with an Average difference >50 were included. These output data were further processed
- 20 in Microsoft Excel 2000. A gene was set to score one point for each cell line or tissue. The total scores for each gene were summarised for normal tissue and the SCLC cell lines, respectively. Genes were selected which were scored present in at least 5 of the 21 SCLC lines. A search was performed among these and candidate genes selected if one of the following words is included in the gene name: "receptor,
- 25 membrane, adhesion, integrin, surface, antigen, syndecan, transport, channel, hormone, binding, glycoprotein, matrix, CAM, desmosome, gap junction, delta, immunoglobulin, MHC, CD, (HSPG, CSPG, integral, notch)". The functions and cellular localisations of the proteins were unravelled based on database searches (NCBI: Nucleotide, Protein, Nucleotide, OMIM, PubMed, LocusLink). The best candidate
- 30 genes were then selected based on these informations with emphasis on the function, cellular localisation and scores on expression (i.e. higher "expression score", for SCLC than for normal tissue). Furthermore, the expression in the different normal tissue is evaluated according to the specific tissues, in order to estimate the theoretical side effects. A second selection was performed on RNA from 21 SCLC cell
- 35 lines, 8 of the cell lines grown as xenografts and 17 normal tissues (brain, lung, kidney, heart, trachea, adrenal gland, prostate, salivary gland, thyroid, liver, pancreas,

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

154

spleen, small intestine, skeletal muscle, colon, stomach, testes) using the Affymetrix Microarray Suite™ version 5. Only expressed genes, which scored present (P) in the absolute call and with a signal >20 in at least 6 SCLC cell lines or xenografts were included. Further selection was performed as described above.

5

Validation of Chips analysis by RT-PCR

Selected genes were analysed by semi-quantitative RT-PCR for verification of expression identified by Chips analysis. RT-PCR with primers for DR6 (TNFR related death receptor 6) (Fig. 8) shows medium expression in most normal tissues and medium to high in all except one SCLC line or xenograft. Chips analysis shows high expression in 2 normal tissues and high expression in 8 SCLC lines or xenografts. All positive by Chips analysis are also positive in RT-PCR.

RT-PCR with primers for LRP8 (Apolipoprotein E receptor 2) (Fig. 9) shows low expression in 6 normal tissues and high expression in all SCLC lines and xenografts are positive by RT-PCR. All positives in Chips analysis are also positive in RT-PCR. RT-PCR values are arbitrarily chosen to match Chips signal.

RT-PCR with primers for NTPXR (neuronal pentraxin receptor) (Fig. 10) showed that all positive by Chips analysis are also positive by RT-PCR. There are more tissues and SCLC with positive expression as measured by RT-PCR, but expression is averagely higher in SCLC. Two SCLC samples are negative. RT-PCR values are arbitrarily chosen to match Chips signal.

RT-PCR with primers for NCAM1 (neural cell adhesion molecule) (Fig. 11) showed all samples positive by Chips analysis were also positive by RT-PCR. Several tissues and all except one SCLC are positive by RT-PCR only. One SCLC cell line is negative in both RT-PCR and Chips analysis. RT-PCR values are arbitrarily chosen to match Chips signal.

RT-PCR with primers for GluR2 (ionotropic glutamate receptor 2)(Fig. 12A) showed all samples positive by Chips analysis were also positive by RT-PCR. Both analysis showed very high expression in brain and RT-PCR low expression in adrenal gland. 4 SCLC cell lines are negative in both RT-PCR and Chips analysis. RT-PCR values are arbitrarily chosen to match Chips signal.

RT-PCR with primers for ITGAV (integrin alpha v subunit) (Fig. 12B). 5 samples are positive in Chips analysis, but negative by RT-PCR. Otherwise good correlation

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

155

between Chips analysis and RT-PCR analysis. High expression in SCLC, but also in many tissues.

RT-PCR values are arbitrarily chosen to match Chips signal.

5 Conclusion on validation of Chips analysis of expression of surface molecules by RT-PCR.

Except for ITGAV all genes identified as expressed by Chips analysis were also found expressed when analysed by RT-PCR. More samples were positive when measured by RT-PCR. The expression of the selected genes in SCLC cell lines and xenografts are high and in many cell lines. Therefore using Chips analysis for identification of mRNA for surface molecules expressed by SCLC is an applicable method.

15 Validation of Chips analysis by western blotting

Expression of selected gene products was analysed by western blotting using specific antibodies for comparison to of expression of mRNA identified by Chips analysis. Western blot analysis was only performed on SCLC cell lines and xenografts. Western blot analysis using antibodies to mGluR8 (metabotropic glutamate receptor 8) (Fig. 13) showed expression of mGluR8 protein in all SCLC cell lines and xenografts, whereas Chips analysis only detected expression in 8 samples. The intensities of the western blot do not correlate to the Chips values, but clearly show expression of mGluR8. Rat brain homogenate was used as positive control.

25 Western blot analysis using antibodies to NPTXR (neuronal pentraxin receptor) (Fig. 14) showed protein expression in all SCLC samples identified as having expression by Chips analysis. All samples are weak to strongly positive except GLC 28. DMS 153 has a prominent high molecular weight band also present in rat brain, which may be unprocessed or dimerised receptor. The protein amounts do not directly correlate with the Chips data, but clearly show expression in most SCLC. Rat brain homogenate was used as positive control.

30 Western blot analysis using antibodies to NCAM1 (neural cell adhesion molecule) (Fig. 15) showed expression of two isoforms of NCAM1 by all SCLC cell lines and xenografts except one, whereas Chips analysis identified expression in 14 samples. 35 All samples positive by Chips analysis are positive by western blotting.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

156

There is no obvious correlation between relative amounts in Chips analysis and western blotting.

Western blot analysis using antibodies to GluR2 (ionotropic glutamate receptor 2) (Fig. 16) showed expression in 9 samples. 6 samples were positive by Chips analysis, but negative by western blotting. However, the sensitivity of the antibody was not high. The other positive samples correlate well with the Chips analysis.

Western blot analysis using antibodies to ITGAE (integrin alpha E subunit) (Fig. 17) showed expression in most SCLC samples. One sample was positive in Chips analysis and negative by Western blotting. The relative intensities of expression between Chips analysis and western blotting do not correlate for many samples. A431 cell lysate was used as positive control.

Conclusion of western blot validation of Chips analysis on surface molecules

For the selected surface molecules all genes identified as expressed by Chips analysis are also identified as expressed by western blotting showing that gene expression measured by Chips analysis is reflected in protein synthesis. For several genes western blotting identified expression in more samples than Chips analysis. Therefore the Chips analysis is an applicable method to identify surface molecules expressed by SCLC.

Example 2

Surface molecules expressed by SCLC cell lines identified by RT-PCR

Other expressed cell surface molecules were identified by the method of RT-PCR. mRNA was prepared from all 21 of the above listed cell lines using Quick-Prep®mRNA Purification Kit (Pharmacia) according to manufacturers specifications. mRNA or total RNA from 29 different tissues was obtained from CLONTECH. The RNA was obtained from the following tissues: whole brain, spinal cord, small intestine, kidney, heart, lung, testis, retina, bladder, stomach, uterus, liver, spleen, leukocyte, adipocyte, pituitary gland, ovary, mammary gland, prostate, trachea, thymus, adrenal gland, colon, pancreas, salivary gland, bone marrow, thyroid, lymph node and skeletal muscle.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

157

Single-stranded cDNA synthesis was performed using the 1st strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR (Boehringer Mannheim) according to manufacturers instructions using an oligo-(dT)₁₅ primer.

- Subsequent PCR with the cDNAs as template was performed in 10 mM Tris-Cl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 0.4 μM primers and 0.12 U/μl Thermoprime plus DNA polymerase (Advanced Biotechnologies) with amplifications of 35 or 40 cycles of 95°C for 30 sec, 62°C for 30 sec and 72°C for 1 min. A control reaction using GAPDH primers was performed on all cDNAs. The PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis. Listed below are the gene products analysed, the sequence of primers with their position in the nucleotide sequence in the GenBank database and the percent of cell lines or tissues, which were positive for mRNA from the corresponding gene.

Molecule	GenBank Acc. No.	Primer sequence	Position	% RT-PCR positive	
				Normal tissue	SLCL lines
Atrial natriuretic peptide clearance receptor	AF025998	5'- AGCGGAAGTCTACTTC ACC (SEQ ID 427)	629-648	95.5 %	95.5 %
		5'- TAGTCTCCACTGGTCAT GCC (SEQ ID 428)	851-832		
Gas-trin/CCK-B receptor	XM_006034	5'-GTGCGA- ATGTTGCTGGTGATCG (SEQ ID 429)	994-1015	100 % *	100 %
		5'-ACGGTGCATGAAGCAG TAGACC (SEQ ID 430)	1185-1164		
Neu-romedin B receptor	M73482	5'-AGATGGAACACGGAA ACGCCTGG (SEQ ID 431)	909-932	96.5 %	95.2 %
		5'-GGCTGTTGAA-	1151-1128		

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

158

		GGCTGTTGAA- ATGCCTCCTGAAGC (SEQ ID 432)			
Gliat cell line derived neuro- trophic factor α receptor	NM_001496	5'- TCTGCTTCTCCGACCCG CTT (SEQ ID 433)	761-780	96.5 %	95.2 %
		5'-TAGCTGCA- ATGGCCTCCGTG (SEQ ID 434)	1042-1023		
Bombesin receptor (GRPR)	XM_010317	5'- CATGCTCCACTTTGTCA CCAGC (SEQ ID 435)	1289-1310	100 % [#]	100 %
		5'- GAGGTCATGCAGGTTGT ACTCC (SEQ ID 436)	1477-1456		
Metabo- tropic glu- tamate receptor 8	U92459	5'CCAGAGCTAAGTGATA ACACCAGG (SEQ ID 437)	598-621	21.1 %	95.2 %
		5'- TTCACGTGGGATTTCT GTGACTG (SEQ ID 438)	801-825		

[#] analysed on RNA from 7 normal tissues

5 The data from the RT-PCR experiments clearly suggest, that the metabotropic glutamate receptor 8 is a candidate receptor, as it is expressed in 95.2% of the SCLC cell lines, but only in 21.1 % of normal tissues. Other receptors are also candidates, as they are expressed in more than 95% of the cell lines. A quantification of the relative levels of the RNA expression by real-time RT-PCR or northern blotting will further identify the suitable receptors.

Example 3Surface molecules expressed by SCLC cell lines identified by Western blotting

5 18 of 19 tested SCLC lines from the same panel as above were found to express the surface molecules: the neural cell adhesion molecule (NCAM1) and cadherin (Rygaard et al., 1992). The expression in the SCLC cell lines was determined by western blotting utilizing polyclonal antibodies on protein extracts from the cell lines propagated both *in vitro* and as xenografts in nude mice. NCAM1 was detected by
10 immunohistochemical methods in 20 of 20 surgically resected SCLC tumours demonstrating that SCLC cells express NCAM1 *in vivo* (Kibbelaar, et al., 1991). NCAM1 is widely expressed during embryonic development, but is highly down regulated in the adult (reviewed in Gegelashvili and Bock, 1996), and therefore expressed at low levels in normal tissues from SCLC patients. It has already been
15 demonstrated that NCAM1 expression is in part regulated by endocytosis (Minana et al., 2001) and that NCAM1 can be induced to internalise by antibody binding (Michalides et al., 1994). Cadherins has also been found to be endocytosed under normal (Kamei et al., 1999; Le et al., 1999) and pathological conditions (reviewed in
20 Parkes and Hart, 2000). Therefore, these molecules are potential candidates for surface receptors for gene transfer.

Example 4Surface molecules expressed by SCLC cell lines identified by other methods

25 Several other cell surface receptors have been shown to be expressed by many SCLC cell lines and therefore are also potential candidates for surface receptors for gene transfer.

30 The expression of high affinity transforming growth factor-beta receptors (TGF- β R) was demonstrated in several of the cell lines from the above panel by chemical crosslinking (Damstrup et al., 1993). By Northern blot analysis, the presence of the mRNA for TGF- β RI was found in 9 of 9 SCLC, TGF- β RII in 6 of 9 SCLC lines and

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

160

of TGF- β RIII (betaglycan) in 9 of 9 SCLC lines (Nørgaard et al., 1996). Binding of the ligand to these receptors induce internalisation of the receptor (Anders et al., 1997, Dore et al., 2001).

- 5 The presence of insulin-like growth factor receptors (IGF-R) mRNA has been determined by RT-PCR and was found present in 14 of 14 examined SCLC lines (Quinn et al., 1996). The presence of both IGF-R1 (Rotsch et al., 1992) and IGF-RII (Schardt et al., 1993) in 11 of 11 SCLC lines was demonstrated by Northern blotting, competitive binding assays and chemical crosslinking. Both receptors are known to
- 10 internalise after ligand binding (Dore et al., 1997)

- The epidermal growth factor receptor (EGF-R) and various homologues, variations or mutants (*v-erb-B*, *HER2/neu* (*c-erb-2*), *ErbB3* and *ErbB4* and *EGF-R vill*) have been found expressed on a large number of cancer cell lines and tumours and several forms internalise after ligand binding (reviewed in Wells, 1990; Huang and
- 15 Harari, 1999). By Northern blot analysis 11 of the 21 SCLC lines in the above panel were found to express EGF-R. The expression was verified by radioreceptor and affinity labelling analysis in 10 of the cell lines (Damstrup et al., 1992). Indeed, the EGF-R has been demonstrated to mediate targeted gene delivery in several of
- 20 these SCLC lines (Cristano and Roth, 1996, Frederiksen et al., 2000).

Example 5

- 25 Comparisons of gene expression of SCLC cell lines with gene expression of additional types of normal human tissues and other tumour cell lines.

- In order to further compare gene expression profiles between SCLC cell lines and normal tissues, total RNA from normal tissues from leukocyte will be obtained from
- 30 commercial sources (CLONTECH, Stratagene, Ambion or ResGen). Biotin labelled cRNA will be prepared as described above.

- It is of importance to determine if the genes highly expressed in SCLC cell compared to normal tissues is a phenomena general for cancer cells or is SCLC specific. Therefore total RNA will be isolated from cell lines from other types of human
- 35 cancers (e.g. commercially available cell lines derived from breast carcinoma, gli-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

161

oma, non small cell lung cancer (NCLC), colon carcinoma, neuroblastoma) and analysed as described above.

5 Comparison of gene expression of SCLC cell lines *in vitro* with gene expression from SCLC cells *in vivo*.

Analysis of gene expression of SCLC lines propagated *in vivo*

Selected cell lines are propagated *in vivo* as xenografts in both flanks of BALB/c nude mice according to Rygaard et al., 1992. When one of the tumours has reached the size of approximately 1 cm x 1 cm the mice will be sacrificed and tumours removed. For total RNA isolation from the tumour, the tumour will be stored for 24-48 hours in RNAlater™ (Ambion) and subsequently removed from the storage solution and stored at -70°C until RNA preparation. Total RNA will be prepared from the tumours by extraction with Trizol (Life Technologies) according to manufacturers specifications. The total RNA will be further purified on RNeasy columns (Qiagen) according to the manufacturers method for RNA cleanup. Analysis of isolated total RNA and preparation of cDNA and biotin labelled cRNA and analysis of gene expression by Affymetrix Chips will be performed as described above. Protein extracts for Western blot analysis are prepared from freshly removed tumours by homogenisation on ice with a teflon pestle in 5 volumes (w/v) of 20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 2 % Triton X-100 with addition of protease and phosphatase inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail Set III and Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II from Calbiochem) and subsequent clearing by high speed centrifugation (13.000 x g).

25 ***Analysis of gene expression of biopsies from patients with small cell lung cancer***

Biopsies from patients with diagnosed small cell lung cancer (obtained from Herlev Hospital) will be stored for 24-72 hours in RNAlater™ (Ambion) and subsequently removed from the storage solution and stored at -70°C. The tumours will be micro dissected by an experienced pathologist and RNA isolated from the tumours as above. RNA from several tumours will be pooled. Should the total RNA amount obtained not be sufficient for direct preparation of biotin labelled cDNA, the labelling procedure will be modified to include 2 further amplification steps as described in Ohyama et al., 2000.

35

Example 6Experimental procedures for identification of cell surface molecules

- 5 Candidate cell surface molecules (receptors) expressed by SCLC cells are identified by Gene Chip analysis, Northern blotting, RT-PCR or by Western blotting. The specific splice form(s) expressed by the SCLC cells will be determined by RT-PCR and/or by sequencing (performed at GATC Biotech AG, Germany). The protein expression and subcellular localization of molecules, which are identified only on
- 10 mRNA level, must be verified by other methods. If commercially antibodies are available, identification by western blotting (using protein extracts prepared from SCLC cell lines from the above panel propagated *in vitro* and *in vivo* as described above) and immunostaining of SCLC cell lines will be performed using the manufacturers recommendations.
- 15 For molecules with known ligands, which are commercially available or can be produced recombinantly (see below), this can additionally or alternatively be accomplished by binding or crosslinking studies. The labelled ligands (e.g. radio-, biotin- or fluorescent labelled ligands) will also be used to determine the affinity of the receptor, number of receptor molecules per cell and their ability for internalisation of the
- 20 ligand.

- For cell surface molecules without known ligands, both the expression of the surface molecule and identification of ligands must be determined. As the mRNA encoding the cell surface molecule is readily available from the SCLC lines, the cDNA encoding the extracellular part can be cloned by standard RT-PCR methods into an expression vector to allow expression of a recombinant protein to be used for immunization. Preferably expression in a bacterial system (e.g. Qiagen pQE vectors) as a fusion with a suitable tag (e.g. 6 x HIS) for easy purification of the recombinant protein will be used. Immunization for generation of polyclonal antibodies in rabbits will
- 25 be performed at the Department of Experimental Medicine, The Panum Institute, University of Copenhagen. Generation of mouse monoclonal hybridomas will be performed at the Serum Institute, Copenhagen. Sera from immunized animals and conditioned medium from hybridomas will be screened for antigen binding using the recombinantly produced protein as immobilized antigen (in microtiter wells or on
- 30 membranes). In addition, the specificity of the antibodies on the surface molecule,
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

163

when expressed by mammalian cells, must be performed. This will be achieved by cloning the cDNA encoding the full length molecule into an eukaryotic expression vector (e.g. pcDNA 3.1 from Invitrogen or pCMV-Tag from CLONETECH) using RT-PCR. After transient transfection of a cell line, which does not endogenously express the molecule, the specificity of the antibodies will be determined using indirect immunofluorescence staining.

When a suitable antibody or serum has been identified, the protein expression will be analysed by immunostaining on the SCLC cell lines grown *in vitro* and *in vivo* and additionally on SCLC biopsies to verify of expression both *in vitro* and *in vivo*. The expression in normal tissues will be evaluated using a human tissue array containing 200 distinct tissue samples spotted on glass microscope slides (VastArray™ from GenRes).

Alternatively, human single chain antibodies isolated from a phage display library can be utilized (see below).

15

Example 7

Experimental procedures for identification of ligands to a cell surface molecule and determination of their capacity for internalisation

20

Known ligands, which are commercially available, will, when possible, be obtained in either a radio-, biotin- or fluorescent labelled form. For analyses of integrins as candidate surface molecules, the specific integrin alpha and beta subunit combination found in the cell lines must first be determined to identify the extracellular matrix ligand. This can be performed by immunostaining, as many antibodies against specific integrin combinations are commercially available.

If the ligand is commercially available, but not in a labelled form, the ligand can be labelled with ¹²⁵I (e.g. using the chloramine-T method) or with a fluorescent dye or biotin (e.g. using FluoReporter Kits from Molecular Probes). Binding assays will be performed to determine the specificity and capacity of ligand binding to the surface molecule. Using the labelled ligand, the ability of the surface molecule to internalise at 37°C (with incubation at 0-4°C as control) can be monitored after stripping of externally bound ligand (e.g. by acid or protease treatment) and measurement of internalised radioactivity for radio-labelled ligand; staining with enzyme or fluorescent

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

164

labelled streptavidine for biotin labelled ligand or direct evaluation for fluorescent labelled ligand by microscopy.

- 5 If the ligand is known, but not commercially available, the gene encoding the ligand will be cloned into an expression vector using RT-PCR or obtaining a cDNA library from a suitable tissue or cell line or (when available) obtain the clone from commercial sources (GeneStorm® clones from Invitrogen or GeneConnection™ from CLONTECH). A suitable tag (e.g. 6 x HIS) should be included in the recombinant ligand for easy purification. A bacterial expression system will be preferred. Recombinant expression will also enable the possibility to express the ligand as a fusion with EGFP for facilitating the analysis of binding and internalisation. Alternatively, antibodies against the tag can be used for analysis of binding and internalisation. However, should posttranslational modifications such as glycosylation or sulfation be essential for binding of the ligand to its receptor, expression as a secreted protein can be achieved in a yeast system (*Pichia pastoris*), in an insect system (*Baculovirus*) or in mammalian cells (e.g. HEK293, COS-7 or CHO cells).
- 10 If the ligand of a cell surface molecule is unknown, homology studies based on the genomic sequence or amino acid sequence of the receptor may result in identification of a superfamily of receptors to which the particular receptor belongs. A panel of ligands specific for this superfamily can then be tested using the methods described above. Alternatively, screening with a bacterial peptide expression library (e.g. FliTrx Random Peptide Display Library from Invitrogen) may identify one or more peptide ligands. These peptide ligands can subsequently either be cloned for recombinant expression or obtained commercially. For this screening it would be optimal to use a cell line, which does not express the candidate surface molecule as screening for non-specific binding and the same cell line transfected with an expression plasmid for the surface molecule for identification of specific peptide ligands.
- 20 If mouse monoclonal antibodies towards the cell surface molecule have been generated, an alternative is to screen these antibodies for the capacity of internalising by detection of endocytosed antibodies by fluorescent labelled anti-mouse antibodies. Recombinantly expressed single chain antibodies cloned from the antibody producing hybridoma will also be tested. For clinical trials, these antibodies must be humanized for example by the method described in Losman et al., 1999. If no internalising monoclonal antibodies are available, a phage library expressing human single chain antibody fragments can be used for isolation of internalising antibodies.
- 35 By removing unspecific binding of phage displayed antibodies by incubation with a

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

165

cell line negative for the cell surface molecule in question and selection with a transfected cell line expressing the molecule (as described above) specific and internalising antibodies can be identified and subsequently cloned from the phagemid DNA taken up by the cell after endocytosis (Nielsen and Marks, 2000; Heitner et al., 2001) (collaboration with Prof. J. Engberg, Royal Danish School of Pharmacy).

Example 8Identification of a promoter for expression of a therapeutic gene.

The promoter region from genes, whose expression by GeneChips analysis has been found to be high in SCLC cell lines and xenografts and low or negative in normal tissues, are potential candidates to control and mediate expression of a therapeutic gene in targeted gene therapy. The expression by candidate promoters determined by GeneChips analysis will first be verified by RT-PCR or Northern blotting using several different primer sets or probes covering the entire molecule on the same RNAs used for GeneChips analysis (from SCLC cells and normal tissues) to ensure the cancer cell specificity of the promoter (as alternatively spliced variants expressed by the same promoter in normal tissues may not be recognized by the Affymetrix Chip). As the activity and specificity of a promoter can be encoded in a very large portion of DNA, it is essential to define the region(s) of the promoter, which are sufficient for specific and high expression in SCLC cells in order to limit the size of the DNA encoding the therapeutic gene to enhance delivery by a surface molecule. We set this limit to 15 kb, which is within the feasible size for cloning by PCR. Initially, a region of approx 15 kb upstream from the coding region of the candidate gene, including the region coding for the 5' untranslated part of the mRNA, will be cloned by PCR using a thermostable polymerase, which is capable of extending large PCR products with genomic DNA as template (e.g. Herculase from Stratagene). The primers used for PCR will be designed from the genomic sequence in the HUGO database and will be designed to contain either rare restriction sites for cloning by restriction cleavage or to contain loxP sites for direct cloning without restriction cleavage by addition of Cre recombinase. The vector to be used for testing the promoter regions will be constructed to contain a promoterless gene encoding the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) from CLONTECH preceded by rare restriction sites in the multiple cloning sites (e.g. pd2EGFP-1 from

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

166

CLONTECH) and/or a loxP site. The activity of the promoter will be estimated visually in a semi quantitative manner after transfection into the SCLC lines (e.g. using Lipfectamine Plus™ from Life Technologies) using fluorescence microscopy or quantitatively using a fluorometer (e.g. Victor 1420 from Wallac). As control for transfection efficiency, a low amount of plasmid encoding a red fluorescent protein under the control of a CMV promoter (pDsRed2-N1 from CLONTECH) will be used.

Promoters, which are active in the above assay, will be subcloned into smaller fragments (by PCR as described above or by standard restriction enzyme digestion) and tested for promoter activity as above. The relative activities of the promoters and subclones thereof can be determined quantitatively by recloning into a promoterless vector encoding a firefly luciferase and as transfection control, co-transfection with a plasmid encoding a *renilla* luciferase expressed from a SV40 promoter. Using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System from Promega, the transcription from both plasmids in an extract of transiently transfected cells will be quantified using a luminometer (Lumat LB9507 from EG&G). In a similar manner, chimerics of the active parts of different, strong SCLC specific promoters can be tested for optimal expression and regulation. Alternatively, addition of enhancer sequences from other genes (e.g. viral enhancers) can be inserted. To ensure that the specificity of the selected promoter regions for SCLC cells compared to normal tissues is not lost in the various constructions, these will additionally be tested by transfection into commercially available cell lines of various origin derived from normal tissues. If higher specificity is needed, an additional specificity for cancer cells with mutations in p53 gene will be incorporated in the system. By inserting loxP sites adjacent to the promoter for the therapeutic gene and inserting the gene encoding Cre recombinase under the control of a p53 activated promoter, normal cells expressing wt p53 will express Cre recombinase which excises the promoter for the therapeutic gene, which therefore is not expressed.

If the transcriptional activity of the tumour specific promoter is not sufficient to achieve high enough levels of transcript encoding the therapeutic gene, it will be possible to utilize the specific promoter for activation of a second tissue-unspecific, but highly active promoter e.g. CMV. An example of this system is the encoding of Cre recombinase by the specific promoter, which after expression in the tumour tis-

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

167

sue activates a CMV promoter by recombinational removal of a silencing element flanked by loxP sequences (Kijama et al., 1999).

5 In addition, the presence of endogenous transcriptional enhancers (e.g. steroid hormone receptor binding regions and receptors) will be determined. This will be analysed by transfection with the promoter controlling expression of EGFP or luciferase as described above, after addition of steroid hormones (e.g. retinoic acid, estrogen, progesterone or glucocorticoids). If present, these will give the opportunity to enhance the expression of the therapeutic gene by adjuvant administration of the hormone. Alternatively, these sequences can be inserted into the promoter for enhancement of transcriptional activity if the corresponding receptor is expressed by the SCLC cells.

Example 9

15

Optimisation methods for complexing DNA with a ligand

A complex formation between the DNA encoding the tissue specific promoter controlling expression of a therapeutic gene and the ligand must be achieved for specific internalisation. Several different possibilities will be tested. Biotin labelled ligand bound via streptavidine to biotin labelled poly-cationic poly-L-lysine (PLL) will complex with negatively charged DNA, thus forming a compacted ligand/DNA polyplex, which can be internalised via the ligand (Frederiksen et al., 2000). Biotinylation of ligand and poly-L-lysine of different sizes can be performed as described by Cristiano et al., 1996 or Wagner et al., 1990.

Alternatively, the commercially available branched cationic polymer polyethylenimine (PEI) can be used for forming the ligand/DNA complex. PEI/DNA complexes in themselves have a low activity of gene transfer. However, the activity and specificity can be substantially increased by covalent crosslinking of a ligand to PEI (Kirchheis et al., 1997). Another possibility will be to test biotin labelled PEI combined with biotin labelled ligand and streptavidine, as described for PLL above.

A further advantage of this system over using PLL is that inclusion of an endosomal lysis agent in the complex is unnecessary (see below).

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

168

If the ligand is produced recombinantly, a different approach will also be tested. By including peptide sequences in the recombinant ligand, which can bind strongly to specific DNA sequences encoded in the DNA containing a therapeutic gene, it is possible to achieve a DNA/ligand complex, which then can be neutralized and compacted by PLL. The DNA binding domain from the yeast transcriptional activator GAL4 produced as a recombinant fusion with the ligand will be tested in this manner using DNA, where tandem repeats of the GAL4 recognition sequences have been incorporated into the DNA.

The above described complexes will initially be tested using DNA encoding EGFP controlled by a CMV promoter with a ligand known to bind a cell surface receptor capable of internalisation. The efficacy and specificity of will be determined by visual evaluation by fluorescence microscopy and/or by fluorometric quantification after administering to cells with and without expression of the receptor for the ligand.

Example 10

Optimisation of endosomal lysis of complex.

To avoid lysosomal degradation of the endocytosed complex, it is essential to include an endosomal lysis agent in the complex for release of the DNA into the cytoplasm or an agent such as Chloroquine, which raises the endosomal pH and thereby inhibits degradation by lysosomal enzymes (reviewed in Guy et al., 1995). Replication deficient adenovirus has been demonstrated as a potent endosmolytic agent, when directly coupled to the ligand/DNA polyplex (Yoshimura et al., 1993). However, the drawbacks of using deficient adenovirus or viral capsids is unwanted immunological response, unspecific uptake of the complex via viral receptors, safety precautions and difficulty in preparation and stability. Therefore, to avoid these disadvantages and in order to reduce the size of the complex, smaller, preferably non viral endosmolytic agents will be tested. The influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides (Wagner et al., 1992), N-terminal rhino virus peptides, the pseudomonas exotoxin A translocation domain (Fominaya and Wels, 1996) and synthetic peptides (Gottschalk et al., 1996) have been found to mediate endosomal lysis or endosomal escape. Biotin labelled endosmolytic peptides can be included

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

169

in the ligand/DNA complex, when generated by biotin labelled poly-L-lysine (PLL) coupled to streptavidin. Alternatively, when the ligand is produced recombinantly, the peptide sequences can be included in the N- or C-terminal part of the ligand. The efficiency of these peptides (added either separately or incorporated into a recombinant ligand) will be tested using DNA encoding a reporter gene (EGFP or luciferase) controlled by a CMV promoter complexed to a ligand known to internalise and the endosomal lysis monitored by evaluation of expression of the reporter gene. If the ligand/DNA complex is assembled by PEI, this agent can alone mediate endosomal swelling and subsequent lysis and release of the complex (Boussif et al., 1995).

Example 11

Optimisation of methods for protection and nuclear targeting of the therapeutic gene.

To enhance the transport of endosomally released DNA encoding the therapeutic gene to the nucleus, the DNA will be covalently linked to a peptide encoding a nuclear targeting sequence (NLS – nuclear localization sequence). By excision of the therapeutic gene together with the promoter with restriction enzymes, protection of the DNA ends from digestion by exonucleases can be achieved by hybridisation to and ligation of oligonucleotides, which generate a protective stem-loop cap at the double stranded DNA ends. By including an amino-modified nucleotide in the oligonucleotide, this residue can be used for covalent crosslinking to a C-terminal amidated peptide encoding a nuclear localization signal (Zanta et al., 1999) (the peptides can be commercially obtained from e.g. Genosys, TX, USA). A number of potential sequences are mentioned herein above. Initially, the enhancement of expression by coupling of a NLS peptide of simian virus 40 large tumour antigen to the DNA will be tested using a DNA fragment encoding EGFP with a CMV promoter and expression analysed by transient transfection of SCLC cell lines. Other peptides encoding NLS from other proteins (see herein above) will be tested for determination of the most efficient nuclear transport.

Example 12Experimental procedures for selection of therapeutic gene.

5 Potential therapeutic genes will be selected from the group of: apoptosis inducing gene products, toxic gene products, gene products which introduce sensitivity to-
towards harmless drugs, antisense RNA for oncogenes, Ribozymes targeted against
oncogenes or genes encoding antibodies against oncogenes. The cDNA encoding
10 the gene products for expression of protein or antisense RNA will either be obtained
by cloning via RT-PCR, PCR on a cDNA library or obtained from commercial
sources. To evaluate the efficacy of therapeutic genes for promoting cell death,
these will be inserted into a vector under the control of a CMV promoter and the effect
of expression tested after transient transfection (e.g. using LipofectaminePlus, Life
15 Technologies) into SCLC cell lines from the above panel, using a plasmid express-
ing EGFP for co-transfection for identification of transfected cells. For apoptosis in-
ducing genes the effect of expression on transfected cells will be monitored by spe-
cific staining (e.g. by use of Vybrant Apoptosis Assay Kit from Molecular Probes). In
addition, cell death of transfected cells will be monitored by the use of fluorescent
20 "live stains" (e.g. LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit from Molecular Probes).
Therapeutic genes selected from the experiments above will subsequently be re-
cloned to be expressed under the control of one or more SCLC specific promoters
and the efficiency of the expression analysed by transfection as described above.

25 Example 13Transduction experiments *in vivo*.

Once potential surface molecules and their ligands have been selected, a
30 DNA/ligand complexing method including an endosomal lysis agent and nuclear
targeting of a gene has been developed, the specificity and efficiency of the delivery
system will be tested *in vivo* by administration of the complex to SCLC tumour
xenografts of selected cell lines from the list above propagated in nude mice. A
complex containing a reporter gene (e.g. β -galactosidase or EGFP) with a CMV

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

171

- promoter in an appropriate pharmaceutical formulation will be administered to the tumour xenografted mice by intravenous injection in the tail vein. After 24, 48 or 72 hours, the mice will be sacrificed and the tumours and tissues from lung, liver, heart, brain, spleen, kidney and skeletal muscle will be excised and stained or analysed for the product of the reporter gene (e.g. β -galactosidase).

Transduction experiments using therapeutic genes *in vivo*.

- To test the ability of the DNA/ligand to deliver a therapeutic gene *in vivo*, transduction experiments using therapeutic genes selected by *in vitro* experiments and DNA/ligand complexes selected from *in vivo* experiments will be performed as described above. If the therapeutic gene encodes a thymidine kinase, it will be accompanied by administration of a nucleotide analogue (e.g. gancyclovir). Tumour development will be monitored by size determination, flow cytometry of cells from biopsies and after sacrifice of the mice, the tumours will be analysed for apoptosis and necrosis.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

172

References

- Anders RA, Arline SL, Dore JJ, Leof EB.
Distinct endocytic responses of heteromeric and homomeric transforming growth factor beta receptors.
5 Mol Biol Cell. 1997 Nov;8(11):2133-43
- Batt DG, Petraitis J J, Houghton G C, Modi D P, Cain G A, Corjay M H, Mousa S A, Bouchard P J, Forsythe M S, Harlow P P, Barbera F A, Spitz S M, Wexler R R and Jadhav P K
(2000) Disubstituted Indazoles As Potent Antagonists of the Integrin Alpha(v)Beta(3). *J Med Chem* 43: pp 41-58.
10
- Bepler G, Jaques G, Neumann K, Aumuller G, Gropp C, Havemann K.
Establishment, growth properties, and morphological characteristics of permanent human small cell lung cancer cell lines.
J Cancer Res Clin Oncol. 1987;113(1):31-40.
15
- Berendsen HH, de Leij L, de Vries EG, Mesander G, Mulder NH, de Jong B, Buys CH, Postmus PE, Poppema S, Sluiter HJ, et al.
Characterization of three small cell lung cancer cell lines established from one patient during longitudinal follow-up.
20 Cancer Res. 1988 Dec 1;48(23):6891-9.
- Boger DL, Goldberg J, Silletti S, Kessler T and Cheresh D A (2001) Identification of a Novel Class of Small-Molecule Antiangiogenic Agents Through the Screening of Combinatorial Libraries Which Function by Inhibiting the Binding and Localization of Proteinase MMP2 to Integrin Alpha(V)Beta(3). *J Am Chem Soc* 123: pp 1280-1288.
25
- Brenner, M. B. and Cepek, K. L. Methods and compositions for modulating heterotypic E-cadherin interactions with T lymphocytes. [Patent Number: US6300080]. 2001.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

173

- Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor P J and Nicoletti F (2001) Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes As Targets for Neuro-protective Drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: pp 1013-1033.
- 5 Bräuner-Osborne H, Egebjerg J, Nielsen E O, Madsen U and Krosgaard-Larsen P (2000) Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. *J Med Chem* 43: pp 2609-2645.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP.
A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1;92(16):7297-301
- 10 Brenner, M. B. and Cepek, K. L. Methods and compositions for modulating heterotypic E-cadherin interactions with T lymphocytes. [Patent Number: US6300080]. 2001.
- 15 Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor P J and Nicoletti F (2001) Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes As Targets for Neuro-protective Drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: pp 1013-1033.
- Bräuner-Osborne H, Egebjerg J, Nielsen E O, Madsen U and Krosgaard-Larsen P (2000) Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. *J Med Chem* 43: pp 2609-2645.
- 20 : Bulte JW, Go KG, Zuiderveen F, The TH, de Leij L.
Intracerebral and subcutaneous xenografts of human SCLC in the nude rat: comparison of monoclonal antibody localization and tumor infiltrating lymphocytes.
J Neurooncol. 1993 Apr;16(1):11-8.
- : Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD.
25 Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features.
Cancer Res. 1985 Jun;45(6):2913-23.
- 30 Cavalheiro EA and Olney J W (2001) Glutamate Antagonists: Deadly Liaisons With Cancer.
Proc Natl Acad Sci U S A 98: pp 5947-5948.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

174

Chen CY, Chang YN, Ryan P, Linscott M, McGarrity GJ, Chiang YL.

Effect of herpes simplex virus thymidine kinase expression levels on ganciclovir-mediated cytotoxicity and the "bystander effect".
Hum Gene Ther. 1995 Nov;6(11):1467-76

5

: Chomczynski P, Sacchi N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.

Cristiano RJ, Roth JA.

Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor.
Cancer Gene Ther. 1996 Jan-Feb;3(1):4-10

10

: Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Poulsen HS.

Expression of the epidermal growth factor receptor in human small cell lung cancer cell lines.
Cancer Res. 1992 Jun 1;52(11):3089-93.

15

: Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Skovgaard Poulsen H.

Expression of transforming growth factor beta (TGF beta) receptors and expression of TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3 in human small cell lung cancer cell lines.
Br J Cancer. 1993 May;67(5):1015-21.

20

: de Leij L, Postmus PE, Buys CH, Elema JD, Ramaekers F, Poppema S, Brouwer M, van der Veen AY, Mesander G, The TH.

Characterization of three new variant type cell lines derived from small cell carcinoma of the lung.
Cancer Res. 1985 Dec;45(12 Pt 1):6024-33.

25

Dodds DC, Omels I A, Cushman S J, Helms J A and Perin M S (1997) Neuronal Pentraxin Receptor, a Novel Putative Integral Membrane Pentraxin That Interacts With Neuronal Pentraxin 1 and 2 and Taipoxin- Associated Calcium-Binding Protein 49. *J Biol Chem* **272**: pp 21488-21494.

30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

175

- Dore S, Kar S, Quirion R.
Presence and differential internalization of two distinct insulin-like growth factor receptors in rat hippocampal neurons.
Neuroscience. 1997 May;78(2):373-83
- 5 : Dore JJ Jr, Yao D, Edens M, Garamszegi N, Sholl EL, Leof EB.
Mechanisms of Transforming Growth Factor-beta Receptor Endocytosis and Intracellular Sorting Differ between Fibroblasts and Epithelial Cells.
Mol Biol Cell. 2001 Mar;12(3):675-84.
- : Engelholm SA, Spang-Thomsen M, Vindelov LL, Brunner N, Nielsen MH, Hirsch F, Nielsen A, Hansen HH.
- 10 : Comparison of characteristics of human small cell carcinoma of the lung in patients, in vitro and transplanted into nude mice.
Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]. 1986 Sep;94(5):325-36.
- 15 : Evans JP (2001) Fertilin Beta and Other ADAMs As Integrin Ligands: Insights into Cell Adhesion and Fertilization. *Bioessays* 23: pp 628-639.
- Foley AG, Hartz B P, Gallagher H C, Ronn L C, Berezin V, Bock E and Regan C M (2000) A Synthetic Peptide Ligand of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Ig1 Domain Prevents NCAM Internalization and Disrupts Passive Avoidance Learning. *J Neurochem* 74: pp 2607-2613.
- 20 : Fominaya J, Wels W.
Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system.
J Biol Chem. 1996 May 3;271(18):10560-8.
- Frederiksen KS, Petri A, Abrahamsen N, Poulsen HS.
Gene therapy for lung cancer.
25 Lung Cancer. 1999 Mar;23(3):191-207. Review
- Frederiksen KS, Abrahamsen N, Cristiano RJ, Damstrup L, Poulsen HS.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

176

Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor.
Cancer Gene Ther. 2000 Feb;7(2):262-8

5

Gegelashvili, G. and Bock, E. (1996),
Cell recognition molecules of the immunoglobulin superfamily in the nervous system.,
Biomembranes, vol 3, 33-75

Gottschalk S, Cristiano RJ, Smith LC, Woo SL

10 Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells: potosomal disruption results in enhanced gene expression.
Gene Ther. 1994 May;1(3):185-91.

Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SL, Smith LC

15 A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells.
Gene Ther. 1996 May;3(5):48-57.

Goula D, Benoist C, Mantero S, Merlo G, Levi G, Demeneix BA

Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung.
Gene Ther. 1998 Sep;5(9):1291-5.

20

Gunji Y, Ochiai T, Shimada H, Matsubara H

Gene therapy for cancer.
Surg Today. 2000;30(11):967-73. Review.

Guv J, Drabek D, Antoniou M

25 Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy.
Mol Biotechnol. 1995 Jun;3(3):237-48. Review.

Hartman GD and Duggan M E (2000) Alpha(v)Beta(3) Integrin Antagonists As Inhibitors of Bone Resorption. *Expert Opin Investig Drugs* 9: pp 1281-1291.

30

Heitner T, Moor A, Garrison JL, Marks C, Hasan T, Marks JD

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

177

- Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library.
J Immunol Methods. 2001 Feb 1;248(1-2):17-30.
- Huang SM, Harari PM.
- 5 Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results.
Invest New Drugs. 1999;17(3):259-69. Review
- Huang TF (1998) What Have Snakes Taught Us About Integrins? *Cell Mol Life Sci* 54: pp 527-540.
- 10 Jane DE, Hoo K, Kamboj R, Deverill M, Bleakman D and Mandelzys A (1997) Synthesis of Willardiine and 6-Azawillardiine Analogs: Pharmacological Characterization on Cloned Homomeric Human AMPA and Kainate Receptor Subtypes. *J Med Chem* 40: pp 3645-3650.
- Jane D. AMPA/Kainate receptors. WWW . 2001.
- 15 <http://www.bris.ac.uk/synaptic/info/pharmacology/AMPA.html>
- : Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Peng YF, Nakano K, Takaishi K, Takai Y.
- Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins.
Oncogene. 1999 Nov 18;18(48):6776-84.
- 20 Kang IC, Lee Y D and Kim D S (1999) A Novel Disintegrin Salmosin Inhibits Tumor Angiogenesis. *Cancer Res* 59: pp 3754-3760.
- Karecla PI, Green S J, Bowden S J, Coadwell J and Kilshaw P J (1996) Identification of a Binding Site for Integrin AlphaEbeta7 in the N- Terminal Domain of E-Cadherin. *J Biol Chem* 271: pp 30909-30915.
- 25 Kaufmann, O., Georgi, T., and Dietel, M. Utility of 123C3 monoclonal antibody against CD56 (NCAM) for the diagnosis of small cell carcinomas on paraffin sections. *Hum.Pathol.* 28[12], 1373-1378. 1997.
- Kerr JS, Slee A M and Mousa S A (2000) Small Molecule Alpha(v) Integrin Antagonists: Novel Anticancer Agents. *Expert Opin Investig Drugs* 9: pp 1271-1279.
- 30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

178

- Kibbelaar, R. E., Moolenaar, K. E., Michalides, R. J., Van Bodegom, P. C., Vanderschueren, R. G., Wagenaar, S. S., Dingemans, K. P., Bitter-Suermann, D., Dalesio, O., van Zandwijk, N., and . Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differentiation and prognosis in lung carcinoma. *Eur.J.Cancer* 27[4], 431-435. 1991.
- 5 Kijima T, Osaki T, Nishino K, Kumagai T, Funakoshi T, Goto H, Tachibana I, Tanio Y, Kishimoto T.
Application of the Cre recombinase/loxP system further enhances antitumour effects in cell type-specific gene therapy against carcinoembryonic antigen-producing cancer. *Cancer Res.* 1999 Oct 1;59(19):4906-11
- 10 Kirchels R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Feilzmann T, Buchberger M, Wagner E.
Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 1997 May;4(5):409-18
- 15 Kirkpatrick LL, Matzuk M M, Dodds D C and Perin M S (2000) Biochemical Interactions of the Neuronal Pentraxins. Neuronal Pentraxin (NP) Receptor Binds to Taipoxin and Taipoxin-Associated Calcium-Binding Protein 49 Via NP1 and NP2. *J Biol Chem* 275: pp 17786-17792.
- 20 Kiselyov VV, Berezin V, Maar T E, Soroka V, Edvardsen K, Schousboe A and Bock E (1997)
The First Immunoglobulin-Like Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Domain Is Involved in Double-Reciprocal Interaction With the Second Immunoglobulin-Like NCAM Domain and in Heparin Binding. *J Biol Chem* 272: pp 10125-10134.
- Krogsgaard-Larsen, P., Brehm, L., Johansen, J. S., Vinzents, P., Lauridsen, J., and Curtis, D. R. Synthesis and structure-activity studies on excitatory amino acids structurally related to ibotenic acid. *J Med Chem.* 28[5], 673-679. 1985.
- 25 Le TL, Yap AS, Stow JL.
Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol.* 1999 Jul 12;146(1):219-32
- Losman MJ, Qu Z, Krishnan IS, Wang J, Hansen HJ, Goldenberg DM, Leung SO.
Generation and monitoring of cell lines producing humanized antibodies. *Clin Cancer Res.* 1999 Oct;5(10 Suppl):3101s-3105s.
- 30

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

179

- Madsen U, Stensbol T B and Krosgaard-Larsen P (2001) Inhibitors of AMPA and Kainate Receptors. *Curr Med Chem* 8: pp 1291-1301.
- Mercer B, Markland F and Minkin C (1998) Contortrostatin, a Homodimeric Snake Venom Disintegrin, Is a Potent Inhibitor of Osteoclast Attachment. *J Bone Miner Res* 13: pp 409-414.
- Michalides R, Kwa B, Springall D, van Zandwijk N, Koopman J, Hilkens J and Mooi W (1994) NCAM and Lung Cancer. *Int J Cancer Suppl* 8: pp 34-37.
- Minana R, Duran J M, Tomas M, Renau-Piqueras J and Guerri C (2001) Neural Cell Adhesion Molecule Is Endocytosed Via a Clathrin-Dependent Pathway. *Eur J Neurosci* 13: pp 749-756.
- Montgomery AM, Becker J C, Siu C H, Lemmon V P, Cheres D A, Pancook J D, Zhao X and Reisfeld R A (1996) Human Neural Cell Adhesion Molecule L1 and Rat Homologue NILE Are Ligands for Integrin Alpha v Beta 3. *J Cell Biol* 132: pp 475-485.
- Mountain A.
Gene therapy: the first decade.
Trends Biotechnol. 2000 Mar;18(3):119-28. Review.
- Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R.
Gene therapy: designer promoters for tumour targeting.
Trends Genet. 2000 Apr;16(4):174-81. Review
- Nielsen LL, Maneval DC.
P53 tumor suppressor gene therapy for cancer.
Cancer Gene Ther. 1998 Jan-Feb;5(1):52-63. Review
- Nielsen UB, Marks JD.
Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage display libraries.
Pharm. Sci. Technol. Today. 2000 Aug;3(8):282-291.
- : Norqaard P, Spang-Thomsen M, Poulsen HS.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

180

- Expression and autoregulation of transforming growth factor beta receptor mRNA in small-cell lung cancer cell lines.
Br J Cancer. 1996 May;73(9):1037-43.
- :Ohyama H, Zhang X, Kohno Y, Alevizos I, Posner M, Wong DT, Todd R.
5 Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization.
Biotechniques. 2000 Sep;29(3):530-6.
- :Parkes RJ, Hart SL.
10 Adhesion molecules and gene transfer.
Adv Drug Deliv Rev. 2000 Nov 15;44(2-3):135-52. Review
- :Pettengill OS, Sorenson GD, Wurster-Hill DH, Culphey TJ, Noll WW,
Cate CC, Maurer LH.
Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small-cell carcinoma of the lung.
15 Cancer. 1980 Mar 1;45(5):906-18.
- :Quinn KA, Treston AM, Unsworth EJ, Miller MJ, Vos M, Grimley C, Batley J, Mulshine JL,
Cuttitta F.
Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines.
J Biol Chem. 1996 May 10;271(19):11477-83.
- 20 Riddell DR, Vinogradov D V, Stannard A K, Chadwick N and Owen J S (1999) Identification and Characterization of LRP8 (ApoER2) in Human Blood Platelets. *J Lipid Res* 40: pp 1925-1930.
- Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK,
Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh
GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ,
Mukhopadhyay T, Cai D.
25 Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer.
Nat Med. 1996 Sep;2(9):985-91.
- :Rotsch M, Maasberg M, Erbil C, Jaques G, Worsch U, Havemann K.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

181

Characterization of insulin-like growth factor I receptors and growth effects in human lung cancer cell lines.

J Cancer Res Clin Oncol. 1992;118(7):502-8.

5

: Rygaard K, Møller C, Bock E, Spang-Thomsen M.

Expression of cadherin and NCAM in human small cell lung cancer cell lines and xenografts. Br J Cancer. 1992 Apr;65(4):573-7.

- 10 Rønn LC, Olsen M, Ostergaard S, Kiselyov V, Berezin V, Mortensen M T, Lerche M H, Jensen P H, Soroka V, Saffell J L, Doherty P, Poulsen F M, Bock E, Holm A and Saffells J L (1999) Identification of a Neuritic Ligand of the Neural Cell Adhesion Molecule Using a Combinatorial Library of Synthetic Peptides. *Nat Biotechnol* 17: pp 1000-1005.

: Schardt C, Rotsch M, Erbil C, Goke R, Richter G, Havemann K.

- 15 Characterization of insulin-like growth factor II receptors in human small cell lung cancer cell lines.

Exp Cell Res. 1993 Jan;204(1):22-9.

- 20 Taraszka KS, Higgins J M, Tan K, Mandelbrot D A, Wang J H and Brenner M B (2000) Molecular Basis for Leukocyte Integrin Alpha(E)Beta(7) Adhesion to Epithelial (E)-Cadherin. *J Exp Med* 191: pp 1555-1567.

Thomas NK, Wright R A, Howson P A, Kingston A E, Schoepp D D and Jane D E (2001) (S)-3,4-DCPG, a Potent and Selective mGlu8a Receptor Agonist, Activates Metabotropic Glutamate Receptors on Primary Afferent Terminals in the Neonatal Rat Spinal Cord. *Neuropharmacology* 40: pp 311-318.

- 25 Turner JP and Salt T E (1999) Group III Metabotropic Glutamate Receptors Control Corticothalamic Synaptic Transmission in the Rat Thalamus in Vitro. *J Physiol* 519 Pt 2: pp 481-491.

Yoshimura K, Rosenfeld MA, Seth P, Crystal RG.

- 30 Adenovirus-mediated augmentation of cell transfection with unmodified plasmid vectors.

J Biol Chem. 1993 Feb 5;268(4):2300-3

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

182

Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML.

Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 May;87(9):3410-4

Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML.

Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 1;89(17):7934-8

Wells A.

EGF receptor.

10 Int J Biochem Cell Biol. 1999 Jun;31(6):637-43. Review

Yoneda Y, Kawajiri S, Sugimura M, Osanai K, Kito F, Ota E and Mimura T (2001) Synthesis of Diaminobutane Derivatives As Potent Ca(2+)-Permeable AMPA Receptor Antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 11: pp 2663-2666.15 Yu A, Choi J, Ohno K, Levin B, Rom W N and Meruelo D (2000) Specific Cell Targeting for Delivery of Toxins into Small-Cell Lung Cancer Using a Streptavidin Fusion Protein Complex. *DNA Cell Biol* 19: pp 383-388.Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP.

Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus.

20 Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):91-6

25

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

183

Claims

1. A method for identifying a plurality of cell surface molecules, which are expressed at a different level in malignant cells compared with normal cells, comprising the steps of:
 - 5 i) providing at least 3 malignant cell lines selected from the group consisting of CPH 54 A, CPH 54 B, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86 MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H2111, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446, SW 1271; and
 - 10 ii) providing at least 3 total RNA samples derived from normal tissue selected from the group consisting of liver, heart, kidney, lung, adrenal gland, colon, pancreas, small intestine, spleen, skeletal muscle, trachea, prostate, placenta, salivary gland, testes, leucocytes, brain, adipose tissue, bladder, breast, cervix, esophagus, larynx, ovary, rectum, skin, spinal cord, stomach, thymus, thyroid and uterus; and
 - 15 iii) comparing the expression of mRNA in the cell lines according to i) and tissue samples according to ii); and
 - 20 iv) identifying nucleic acid sequences, wherein
 - a) there is a difference between the amount of mRNA expressed in one or more cell lines according to i) and the amount of mRNA

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

184

expressed in one or more tissues according to ii);
and/or

b) there is essentially no difference in the amount of
mRNA expressed in at least two cell lines

5 according to i); and/or

c) there is essentially no difference in the amount of
mRNA expressed in at least two tissue samples
according to ii); and

10 v) selecting among the nucleic acid sequences according to iv), nucleic
acid sequences encoding for potential cell surface molecules.

2. The method according to claim 1, wherein step i) involves providing at least 5
malignant cell lines.

15 3. The method according to claim 1, wherein step ii) involves tissue samples
derived from lung, liver, heart, and kidney.

4. The method according to claim 1, wherein step ii) involves providing at least 5
total RNA samples.

20 5. The method according to claim 1, wherein step iii) comprises the steps of:

i) isolating RNA comprising mRNA from the malignant cell lines; and

25 ii) preparing cDNA populations from said RNA, wherein one cDNA
population is prepared from RNA isolated from one cell line or one tissue
sample; and

iii) labelling each cDNA population with a detectable label; and

iv) providing solid supports on which an array of known nucleic acid
sequences has been immobilised; and

30 v) incubating each cDNA population with a solid support under conditions
which allows for hybridisation; and

vi) detecting said detectable label on the solid supports

35 6. The method according to claim 5, wherein said detectable label is a
fluorescent label.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

185

7. The method according to claim 5, wherein the solid support is a glass plate.
8. The method according to claim 5, wherein at least 1000 known nucleic acid sequences are immobilised on the solid support.
9. The method according to claim 1, wherein the difference in step iv), a) is at least 2-fold in mRNA expression.
10. The method according to claim 1, wherein the difference in step iv), a) is an in principle unlimited number of fold.
11. The method according to claim 1, wherein step iv), b) involves at least 3 malignant cell lines.
12. The method according to claim 1, wherein step iv), c) involves at least 3 RNA samples.
13. The method according to claim 1, wherein nucleic acid sequences encoding for potential cell surface molecules according to step v) are selected according to information available in commonly accessible databases selected from the group consisting of PubMed (NCBI), Nucleotide (NCBI), Protein (NCBI), Structure (NCBI), OMIM (NCBI) and LocusLink (NCBI).
14. The method according to claim 1, wherein nucleic acid sequences encoding for potential cell surface molecules according to step v) are selected according to sequence homology with known cell surface molecules, there is at least 20% sequence identity.
15. The method according to claim 1, wherein nucleic acid sequences encoding for potential cell surface molecules according to step v) are selected according to sequence homology with domains comprised within known cell surface molecules.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

186

16. The method according to claim 1, wherein nucleic acid sequences encoding potential cell surface molecules according to step v) are selected such as the potential cell surface molecules comprise a domain selected from the group consisting of hydrophobic regions and potential glycosylation sites.
17. A method of identifying first nucleic acid sequences, which are capable of directing expression of second nucleic acid sequences operably linked thereto, wherein the level of said expression is different in malignant cells compared with normal cells comprising the steps of:
- i) providing at least 3 malignant cell lines selected from the group consisting of CPH 54 A, CPH 54 B, GLC 2, GLC 3, GLC 14, GLC 16, GLC 19, GLC 26, GLC 28, DMS 53, DMS 79, DMS 92, DMS 114, DMS 153, DMS 273, DMS 406, DMS 456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86 MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446 and SW 1271, and
 - ii) providing at least 3 RNA samples derived from normal tissue samples derived from the group consisting of liver, heart, kidney, lung, adrenal gland, colon, pancreas, small intestine, spleen, skeletal muscle, trachea, prostate, placenta, salivary gland, testes, leucocytes, brain, adipose tissue, bladder, breast, cervix, esophagus, larynx, ovary, rectum, skin, spinal cord, stomach, thymus, thyroid and uterus; and
 - iii) comparing the expression of mRNA in the cell lines according to i) and tissue samples according to ii); and

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

187

- iv) identifying second nucleic acid sequences, wherein
 - a) there is a difference between the amount of mRNA expressed in one or more cell lines according to i) and the amount of mRNA expressed in one or more tissues according to ii); and/or
 - 5 b) there is essentially no difference in the amount of mRNA expressed in at least two cell lines according to i); and/or
 - c) there is essentially no difference in the amount of mRNA expressed in at least two tissue samples according to ii); and
 - 10 v) identifying first nucleic acid sequences operably linked to the second nucleotide sequences identified in step iv)
- 18. The method according to claim 17, wherein step i) involves providing at least 5 malignant cell lines.
- 15 19. The method according to claim 17, wherein step ii) involves tissue samples derived from the group consisting of lung, liver, heart and kidney.
- 20. The method according to claim 17, wherein step ii) involves providing at least 5 RNA samples.
- 20 21. The method according to claim 17, wherein step iii) comprises the steps of:
 - i) isolating RNA from the malignant cell lines; and
 - 25 ii) preparing cDNA populations from said RNA, wherein one cDNA population is prepared from RNA isolated from one cell line or one tissue sample; and
 - iii) labelling each cDNA population with a detectable label; and
 - iv) providing solid supports on which an array of known nucleic acid sequences has been immobilised; and
 - 30 v) incubating each cDNA population with a solid support under conditions which allows for hybridisation; and
 - vi) detecting said detectable label on the solid supports
- 22. The method according to claim 21, wherein said detectable label is a fluorescent label.
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

188

23. The method according to claim 21, wherein the solid support is a glass plate.
24. The method according to claim 21, wherein at least 1000 different known
5 nucleic acid sequences are immobilised on the solid support.
25. The method according to claim 17, wherein the difference in step iv), a) is at least 2-fold difference in mRNA expression.
- 10 26. The method according to claim 17, wherein the difference in step iv), a) is an in principle unlimited number of fold.
27. The method according to claim 17, wherein step iv), b) involves at least 3 malignant cell lines.
- 15 28. The method according to claim 17, wherein step iv), c) involves at least 3 tissue samples.
29. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise at least 15,000
20 base pairs upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.
30. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise at least 5,000
25 base pairs upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.
31. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprises up to up to 5000
30 base pairs upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.
32. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise intron sequences
35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

189

found upstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.

- 5 33. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise intron sequences found downstream of the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.
- 10 34. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise an enhancer sequence located more than 10,000 base pairs upstream or downstream from the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome.
- 15 35. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise up to 5000 base pairs upstream from the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome, from which at least 10 internal bp have been deleted.
- 20 36. The method according to claim 17, wherein any first nucleic acid sequence operably linked to a second nucleic acid sequence comprise up to 5000 base pairs upstream from the translation start codon of said second nucleic acid sequence on the chromosome, from which at least one silencer has been deleted.
- 25 37. A targeting complex comprising:
 - i) a binding partner capable of binding a cell surface molecule identified by the method according to any of the claims 1 to 16, wherein said cell surface molecule is selected from the group consisting of *GRIA2*, *GRM8*, *ITGAV*, *ITGAE*, *NCAM1*, *NPTXR*, *LRP8* and *CHRNA5*; and
 - 30 ii) a bioreactive species
38. The targeting complex according to claim 37, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of *GRIA2*.
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

190

39. The targeting complex according to claim 37, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of GRM8.
- 5 40. The targeting complex according to claim 37, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of ITGAV.
41. The targeting complex according to claim 37, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of ITGAE.
- 10 42. The targeting complex according to claim 37, wherein the binding partner is selected from the group consisting of L-glutamate, kainate, 5-(bromomethyl)-4-isoxazolepropionic acid, analogues of glutamate, substituted quinoxaline 2,3-diones, GYKI52466, 5-I-Willardine, 5-F-Willardine, agonist and antagonist ligands to the AMPA ((RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, NBQX, CNQX, DNQX, GYKI 52466, 6-Chlorokynurenic acid, JSTX, L-APA, L-SOP, ACPT, (R,S)-PPG, CPPG, MAP4, (S)-3,4-DCPG, vitronectin, cytoactin, fibronectin, fibrinogen, laminin, MMP-2, osteopontin, prothrombin, thrombospondin, von Willebrandts Factor, recombinant fragments of L1CAM, 20 salmosin, E-cadherin and peptides thereof, including the peptide: NRDKETKV, NCAM1 domain Ig I+II, NCAM1 domain IgIII and peptides thereof, peptides C3: ASKKPKRNIKA, D3: AKKERQRKDTU, D4: ARALNKGAKP, monoclonal antibody 123C3, NPTX1, NPTX2, taipoxin, TCBP49, Oxyntor, ApoE2, ApoE3, ApoE4, peptides from ApoE (E₁₄₁₋₁₅₅); LRKLRKRLRDADDL and its tandem 25 E₍₁₄₁₋₁₅₅₎₂; LRKLRKRLRDADDL-LRKLRKRL RDADDL) reelin, nicotine, acetylcholine, α -bungarotoxin, carbachol and specific antibodies against any of said surface molecules.
43. The targeting complex according to claim 37, wherein said cell surface molecule is capable of internalising the targeting complex.
- 30 44. The targeting complex according to claim 37, wherein said bioreactive species comprises a nucleic acid.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

191

45. The targeting complex according to claim 44, wherein the nucleic acid comprises a second nucleic acid operably linked to a first nucleic acid sequence comprising an expression signal.
- 5 46. A targeting complex comprising
- 10 i) a binding partner capable of binding a cell surface molecule identified by the method according to any of the claims 1 to 16, wherein said cell surface molecule is capable of internalising the targeting complex; and
- 15 ii) a bioreactive species comprising a nucleic acid sequence comprising a second nucleic acid operably linked to a first nucleic acid sequence comprising an expression signal, wherein said first nucleic acid sequence has been identified by the method according to any of claims 17 to 36.
- 15 47. The targeting complex according to claim 46, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of a cell surface molecule selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8 and CHRNA5.
- 20 48. The targeting complex according to claim 46, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of NCAM1.
49. The targeting complex according to claim 46, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of NPTXR.
- 25 50. The targeting complex according to claim 46, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of LRP8.
51. The targeting complex according to claim 46, wherein the cell surface molecule comprises or essentially consists of CHRNA5.
- 30 52. The targeting complex according to claim 46, wherein the binding partner is selected from the group consisting of NCAM1 domain Ig I+II, NCAM1 domain IgIII and peptides thereof, peptides C3: ASKKPKRNIKA, D3: AK-KERQRKDTU, D4: ARALNWGAKP, monoclonal antibody 123C3, NPTX1, NPTX2, taipoxin, TCBP49, Oxyrin, ApoE2, ApoE3, ApoE4, peptides from
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

192

ApoE (E₍₁₄₁₋₁₅₅₎; LRKLRKRLRDADDL and its tandem E₍₁₄₁₋₁₅₅₎₂; LRKLRKRLRDADDL-LRKLRKRL RDADDL) reelin, nicotine, acetylcholine, α -bungarotoxin, carbachol and specific antibodies to said surface molecules.

5

53. The targeting complex according to claim 46, wherein said first nucleic acid sequence comprises an expression signal which direct a higher level of expression of said second nucleic acid sequence in malignant cells compared with non-malignant cells.

10

54. The targeting complex according to claim 46, wherein said first nucleic acid sequence comprise an expression signal which directs a lower level of expression of said second nucleic acid sequence in malignant cells compared with non-malignant cells.

15

55. The targeting complex according to any of claims 46 to 47, wherein said first nucleic acid sequence is selected from the group consisting of pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273 and pro362.

20

56. The targeting complex according to any of claims 46 to 47, wherein said first nucleic acid sequence comprises fragments of nucleotide sequences selected from the group consisting of pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273 and pro362.

25

57. The targeting complex according to any of claims 46 to 47, wherein said first nucleic acid sequence comprises more than one fragment of nucleotide sequences selected from the group consisting of pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273 and pro362.

30

58. The targeting complex according to any of claims 46 to 47, wherein said first nucleic acid sequence comprises pro221 or one or more fragments thereof.

35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

193

59. The targeting complex according to any of claims 46 to 47, wherein said first nucleic acid sequence comprises pro210 or one or more fragments thereof
- 5 60. The targeting complex according to any of claims 46 to 47, wherein said first nucleic acid sequence comprises pro71 or one or more fragments thereof
61. The targeting complex according to claim 46, wherein said first nucleic acid sequence further comprises nucleic acid sequences not natively associated therewith.
- 10 62. The targeting complex according to claim 61, wherein said nucleic acid sequences not natively associated therewith is a steroid hormone receptor binding site.
- 15 63. The targeting complex according to any of claims 44 and 46, wherein said second nucleic acid sequence encodes a therapeutic protein.
64. The targeting complex according to any of claims 44 and 46, wherein said second nucleic acid sequence encodes or comprises an antisense RNA or part of an antisense RNA.
- 20 65. The targeting complex according to any of claims 44 and 46, wherein said second nucleic acid sequence encodes or comprises a ribozyme.
- 25 66. The targeting complex according to any of claims 44 and 46, wherein said antisense RNA or said ribozyme is targeted against RNA of an oncogene or proto-oncogene.
- 30 67. The targeting complex according to claim 66, wherein said oncogene or proto-oncogene is selected from the group consisting of Ras, Raf, Myc, Syn, Pim, BMI-1, FOP, Sis, KGF, Fms, Flg, Neu, Trk, Kit, Met, Src, Fyn, Mas, Fes/Fps, Tre, Mer, ABL, BCL3, int-2, Cym, Ets, Elk, RhoA, Ski, Wnt-5a, Spi-1, Rap2, p55 and c-tyr.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

194

68. The targeting complex according to any of claims 37 and 46, wherein the complex further comprises a protective capping, wherein said protective capping consists of nucleic acid sequences attached to the first and/or second nucleic acid sequences.
- 5 69. The targeting complex according to claim 68, wherein the protective capping comprises a modified nucleotide.
- 10 70. The targeting complex according to claim 37, wherein said bioreactive species is a toxin.
71. The targeting complex according to claim 70, wherein said toxin is selected from the group consisting of ricin, diphtheria toxin, pseudomonas exotoxin, streptozotocin or cholera toxin.
- 15 72. The targeting complex according to claim 37, wherein said bioreactive species is an inducer of apoptosis.
- 20 73. The targeting complex according to claim 72, wherein said inducer of apoptosis is selected from the group consisting of retinoic acid, A23187, Okadaic Acid, Puromycin, Staurosporine, Thapsigargin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximide, Dexamethasone, Etoposide and Glucocorticoid.
- 25 74. The targeting complex according to claim 37, wherein said bioreactive species comprises a radioisotope.
75. The targeting complex according to claim 37, wherein said bioreactive species comprises a cytostatica.
- 30 76. The targeting complex according to claim 37, wherein said bioreactive species comprises or essentially consists of a polypeptide.
- 35 77. The targeting complex according to claim 76, wherein said polypeptide is a therapeutic protein.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

195

78. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, wherein said therapeutic protein is a tumour suppressor.
- 5 79. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, wherein said therapeutic protein is an inducer of apoptosis.
80. The targeting complex according to claim 63 and 77, wherein said therapeutic protein is a protein, which can contribute to a cell cycle arrest.
- 10 81. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, wherein said therapeutic protein is a protein capable of protecting the cell against a toxic agent.
- 15 82. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, wherein said therapeutic protein is protein capable of catalysing the synthesis of a toxic substance.
- 20 83. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, wherein said therapeutic protein is p53.
84. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, wherein said therapeutic protein is a tumor suppressor selected from the group consisting of p73, p16, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-1, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, MSH2, PTCH, DPCH, TSC2, CDKN2A and ARF.
- 25 85. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, wherein said therapeutic protein is an inducer of apoptosis selected from the group consisting of Fas/Apo1, TNF, TRAIL, TGF- β , caspases, Bak, Bax, Bid, Bik and GZMB.
- 30 86. The targeting complex according to any of claims 63 and 77, which comprises more than one first nucleotide sequence encoding a therapeutic protein or more than one therapeutic protein, for example 2, such as 3, for example 4 therapeutic protein.
- 35

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

196

87. The targeting complex according to any of claims 37 to 86, wherein the complex further comprises a nuclear targeting signal.
- 5 88. The targeting complex according to claim 87, wherein the nuclear targeting signal is an oligopeptide.
89. The targeting complex according to claim 87, wherein the nuclear targeting signal is the nuclear localisation signal of simian virus 40 large tumour antigen.
- 10 90. The targeting complex according to any of claim 37 to 89, wherein the complex further comprises an endosomal lytic agent.
- 15 91. The targeting complex according to claim 90, wherein the endosomal lytic agent is selected from the group consisting of polyethylenimine (PEI), a replication defective virus and a viral protein capsid.
92. The targeting complex according to any of claims 37 to 89, wherein the targeting complex further comprises chloroquine.
- 20 93. The targeting complex according to claim 90, wherein both the endosomal lytic agent comprises a membrane destabilising polypeptide.
- 25 94. The targeting complex according to any of claims 37 to 93, wherein the binding partner associates with the bioreactive species via a nucleic acid binding agent covalently attached to said binding partner.
95. The targeting complex according to claim 94, wherein the nucleic acid binding agent is selected from the group consisting of poly-L-lysine (PLL), spermine, spermidine and histone proteins.
- 30 96. The targeting complex according to claim 94, wherein the nucleic acid binding agent is PLL comprising from 15 to 1000 residues.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

197

97. The targeting complex according to any of claims 37 to 93, wherein the binding partner associates with the bioreactive species indirectly via a pair of specific interacting components wherein one component is covalently attached to the bioreactive species and the second component is covalently attached to the binding partner.
98. The targeting complex according to claim 97, wherein said interacting components are biotin and streptavidin.
99. Use of a cell surface molecule identified according to any of claims 1 to 16 as a drug target, wherein said drug target is capable of binding a binding partner and internalising said binding partner into cells expressing said cell surface molecule.
100. The use according to claim wherein the cell surface molecule is selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, *GRIA2*, *GRM8*, *ITGAV*, *ITGAE*, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and *TMEFF1*.
101. A method of identifying and/or preparing specific binding partners comprising the steps of
- i) Providing a cell surface molecule identified by the method according to any of the claims 1 to 16, wherein the cell surface molecule is selected from the group consisting of TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and *TMEFF1*; and
 - ii) Identifying and/or preparing binding partners capable of associating with said cell surface molecules
102. The method according to claim 101, wherein said binding partners can be used in pharmaceutical compositions for the treatment of a premalignant and/or malignant conditions.
103. The method according to claim 101, wherein said binding partner is prepared by the following steps

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

198

- i) immunising an animal with said cell surface molecule or part of said cell surface molecule; and
- ii) obtaining antibodies from said animal; or
- 5 iii) obtaining cells producing antibodies from said animal and obtaining antibodies from said cells
104. The method according to claim 101, wherein said binding partners are selected from an expression library expressing polypeptides and/or oligopeptides.
- 10 105. The method according to claim 101, wherein said binding partners are selected from a synthetic combinatorial library expressing polypeptides and/or oligopeptides.
- 15 106. The method according to claim 101, wherein said binding partner is identified by screening a phage display library of antibodies.
107. The method according to claim 101, wherein said binding partner is identified by screening a phage display library of human antibodies.
- 20 108. The method according to claim 101, wherein said binding partners are selected from a library of small chemical compounds
109. An isolated and/or purified specific binding partner capable of associating with a cell surface molecule, which is expressed at a different level in malignant cells compared with normal cells, identified by the method according to any of the claims 101 to 108.
- 25 110. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner comprises or essentially consists of a polypeptide.
- 30 111. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is an antibody or a fragment of an antibody.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

199

112. The binding partner according claim 109, wherein said binding partner is a polyclonal antibody or a fragment thereof.
113. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a monoclonal antibody or a binding fragment thereof.
114. The binding partner according claim 109, wherein said binding partner is a murine monoclonal antibody.
115. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a humanised antibody.
116. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a human antibody identified from a phage display library.
117. The binding partner according to any of claims 111 to 116, wherein said antibody can interact with the extracellular part of the cell surface molecule.
118. The binding partner according to any of claims 111 to 116, wherein said antibody can interact with a posttranslational modification of the extracellular part of the cell surface molecule.
119. The binding partner according to any of claims 111 to 118, wherein said antibody is capable of being internalised upon association with said cell surface molecule.
120. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a naturally occurring ligand for said cell surface molecule.
121. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a recombinantly produced ligand for said cell surface molecule.
122. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a viral protein.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

200

123. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a viral capsid protein.
124. The binding partner according claim 109, wherein said binding partner is a recombinantly produced and comprise viral capsid protein sequences.
125. The binding partner according to claim 109, wherein said binding partner is a small chemical compound.
126. The targeting complex according to any of claims 37 to 98, wherein the binding partner is a binding partner according to any of claims 109 to 125.
127. A method of identifying novel drug targets, comprising the steps of
- i) Providing a binding partner according to any of claims 109 to 125
 - ii) Identifying potential drug targets capable of associating with said binding partner
128. The method according to claim 127, wherein said drug target comprise a polypeptide, which is a cell surface molecule expressed at a different level in malignant cells compared with normal cells.
129. A drug target identified by the method according to any of the claim 127 to 128.
130. A complex comprising a cell surface molecule identified according to any of the claims 1 to 16 and a targeting complex according to any of the claims 37 to 98.
131. The complex according to claim 130, wherein the cell surface molecule is selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, *GRIA2*, *GRM8*, *ITGAV*, *ITGAE*, TNFRSF12, L1CAM, GPR49, *TMEFF*.
132. A use of the binding partner according to any of claims 109 to 125 for the preparation of a targeting complex according to any of claims 37 to 98.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

201

133. A pharmaceutical composition comprising of the targeting complex according to any of the claims 37 to 98 together with a pharmaceutically acceptable carrier.
- 5 134. A method of treatment of a premalignant and/or malignant conditions in an individual in need thereof, comprising administering to said individual a pharmaceutically effective amount of the targeting complex according to any of the claims 37 to 98.
- 10 135. The method according to claim 134, wherein said treatment is ameliorating treatment.
- 15 136. The method according to claim 134, wherein said treatment is curative treatment.
137. The method according to claim 134, wherein said treatment is prophylactic treatment.
- 20 138. The method according to claim 134, wherein said condition is a cancer selected from the group consisting of melanoma, brain tumour, neuroblastoma, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, cervix cancer, uterine cancer, ovarian cancer, leukaemia, colon cancer, rectum cancer and bladder cancer.
- 25 139. The method according to claim 134, wherein said condition is lung cancer selected from the group comprising small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC).
- 30 140. The method according to claim 134, wherein said condition is small cell lung cancer.
141. The method according to claim 134, wherein said condition is breast cancer.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

202

142. The method according to claim 134, wherein said clinical condition is a brain tumour selected from the group comprising glioblastomas, neuroblastomas, astrocytomas, oligodendrogliomas, meningiomas, medulloblastomas, neuronomas, ependymomas, craniopharyngiomas, pineal tumours, germ cell tumours and schwannomas.
143. The method according to claim 134, wherein said targeting complex is administrated parenterally.
144. The method according to claim 134, wherein said targeting complex is administrated by intravenous injection.
145. The method according to claim 134, wherein said targeting complex is administrated by subcutaneous injection.
146. The method according to claim 134, wherein said method further comprises one or more second treatments.
147. The method according to claim 146, wherein said second treatments are selected from the group consisting of surgical treatment, chemotherapy, radiation therapy, therapy with cytokines, Hormone therapy, gene therapy, immunotherapy and treatments using laser light.
148. A use of the targeting complex according to any of the claims 37 to 98 for the preparation of a medicament for the treatment of a premalignant and/or malignant conditions in an individual in need thereof.
149. The use according to claim 148, wherein said treatment is ameliorating treatment.
150. The use according to claim 148, wherein said treatment is curative treatment.
151. The use according to claim 148, wherein said treatment is prophylactic treatment.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

203

152. The use according to claim 148, wherein said condition is a cancer selected from the group consisting of melanoma, brain tumour, neuroblastoma, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, cervix cancer, uterine cancer, ovarian cancer, leukaemia, colon cancer, rectum cancer and bladder cancer.
- 5 153. The use according to claim 148, wherein said condition is lung cancer selected from the group comprising small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC).
- 10 154. The use according to claim 148, wherein said condition is small cell lung cancer.
155. The use according to claim 148, wherein said condition is breast cancer.
- 15 156. The use according to claim 148, wherein said condition is a brain tumour selected from the group comprising glioblastomas, neuroblastomas, astrocytomas, oligodendrogliomas, meningiomas, medulloblastomas, neuronomas, ependymomas, craniopharyngiomas, pineal tumours, germ cell tumours and schwannomas.
- 20 157. The use according to claim 148, wherein said medicament is suitable for parenteral administration.
- 25 158. The use according to claim 148, wherein said medicament is suitable for intravenous injection.
159. The use according to claim 148, wherein said medicament is suitable for subcutaneous injection.
- 30 160. A use of a pharmaceutically effective amount of cell surface molecule identified according to any of claims 1 to 16 for the preparation of a vaccine.
- 35 161. A use of a pharmaceutically effective amount of a nucleic acid sequence encoding a cell surface molecule identified according to any of claims 1 to 16 for the preparation of a vaccine.

WO 03/00928

PCT/IB02/03534

204

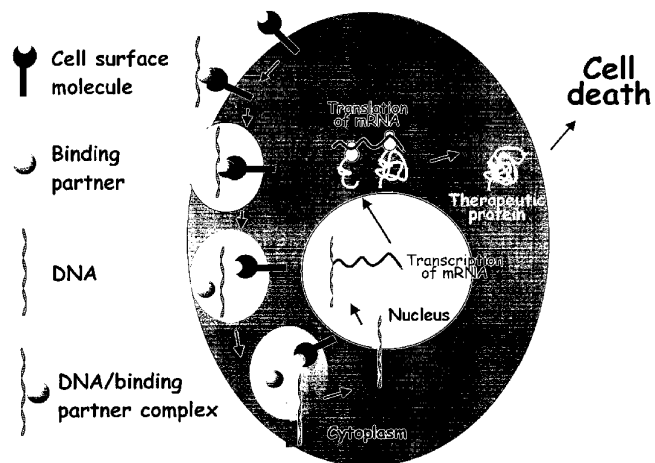
162. The use according to any of claims 160 and 161, wherein the cell surface molecule is selected from the group consisting of NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, *GRIA2*, *GRM8*, *ITGAV*, *ITGAE*, TNFRSF12, L1CAM, GPR49 and *TMEFF1*.
163. The use according to any of 160 and 161, wherein said vaccine furthermore comprise a non-self antigen covalently linked to said cell surface molecule.
164. The use according to any of 160 and 161, wherein said vaccine furthermore comprises second nucleic acid sequences encoding a non-self antigen linked to the nucleic acid sequences.
165. The use according to any of 160 and 161, wherein said vaccine furthermore comprise more than one antigen.
166. The use according to any of claims 160 and 161, wherein said vaccine furthermore comprise an adjuvant.
167. The use according to any of claims 160 and 161, wherein said vaccine is suitable for ameliorating and/or curative and/or prophylactic treatment of a premalignant and/or malignant conditions.

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

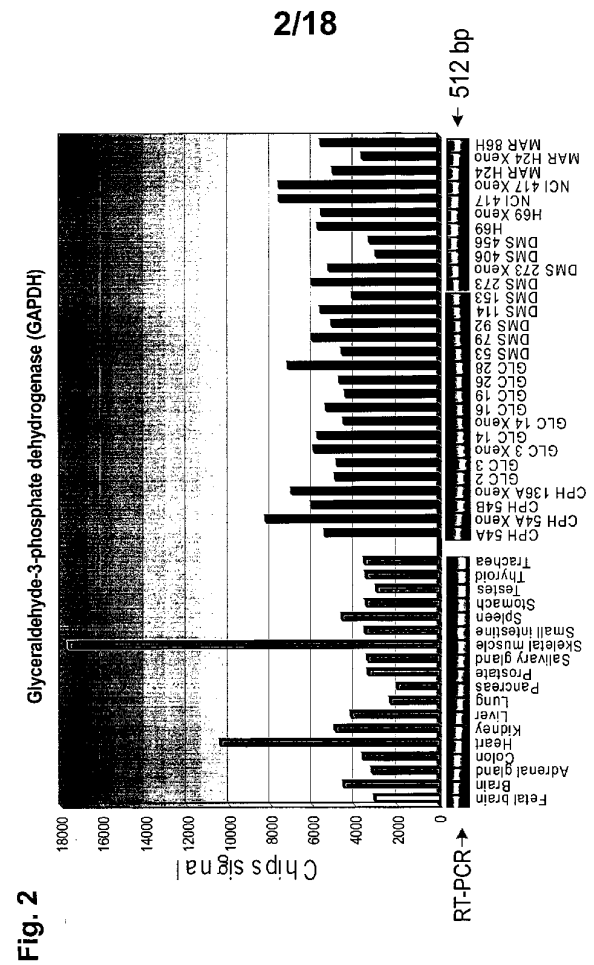
1/18

Fig. 1



WO 03/000928

PCT/IB02/03534



WO 03/000928

PCT/IB02/03534

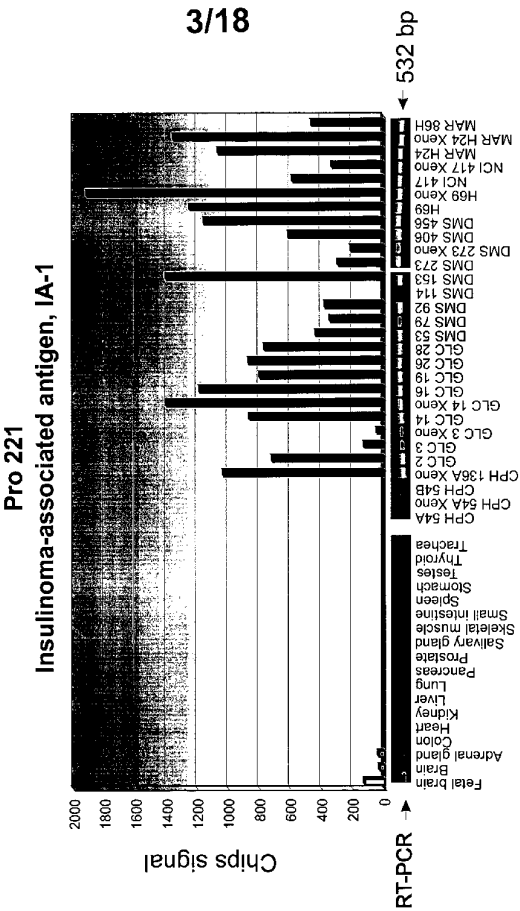


Fig. 3

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

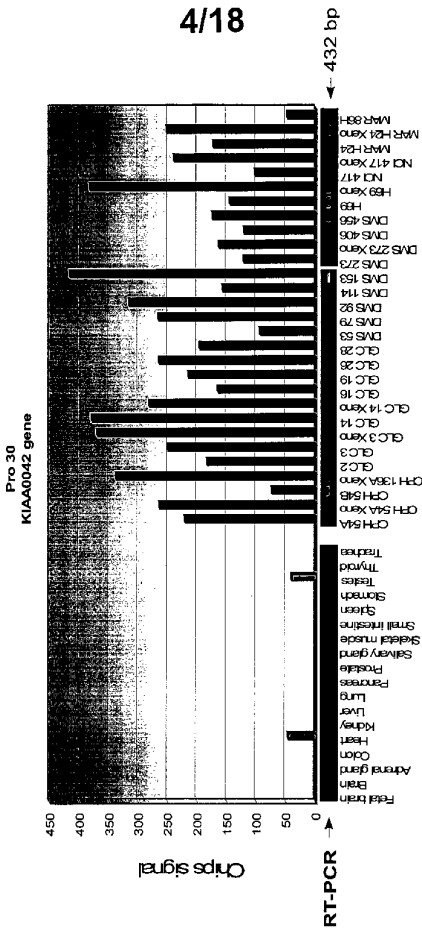


Fig. 4

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

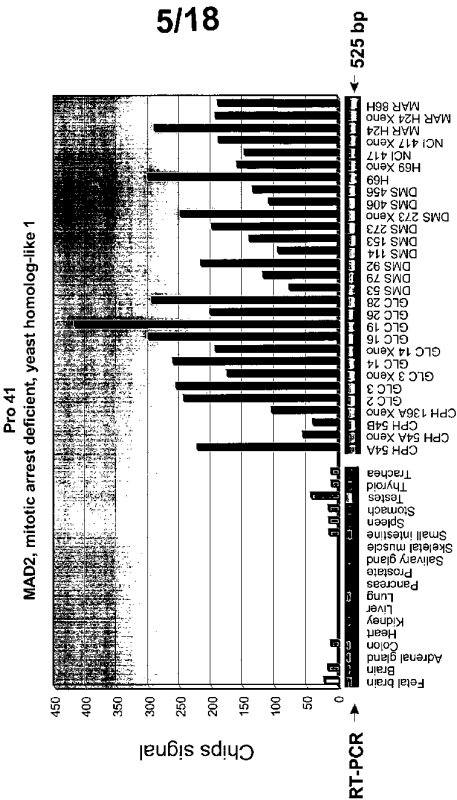


Fig. 5

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

6/18

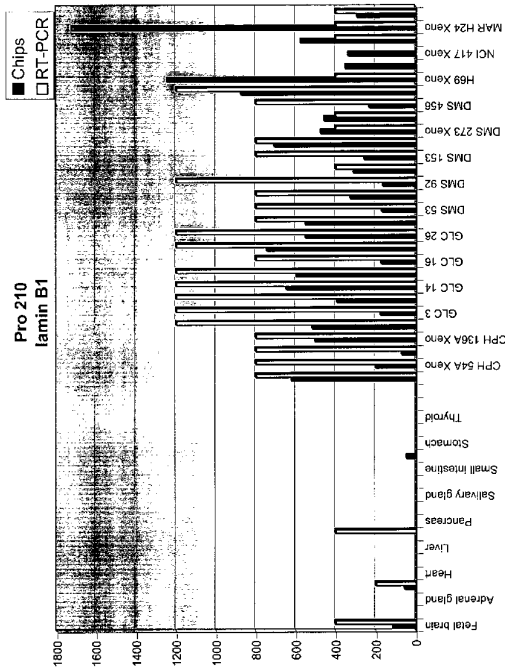


Fig. 6

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

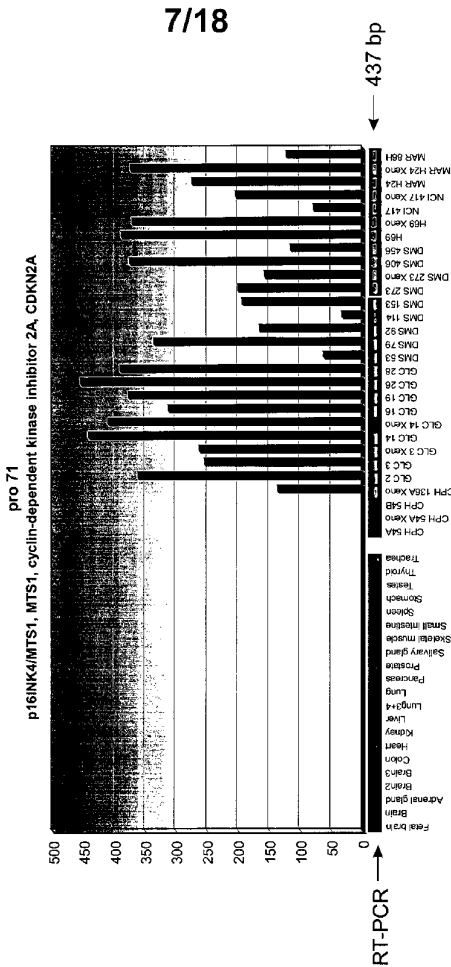


Fig. 7

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

8/18

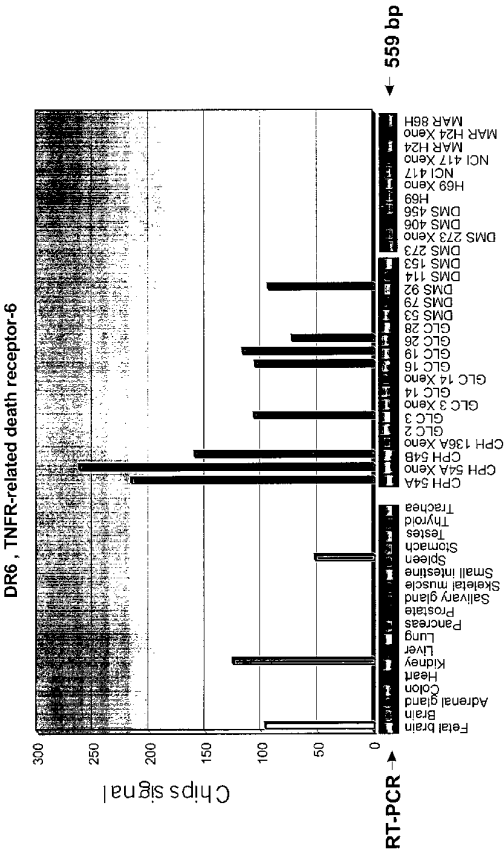
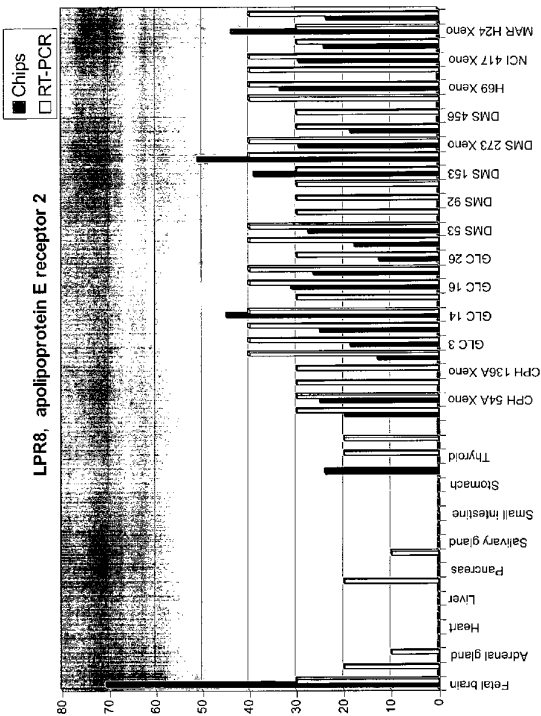


Fig. 8

9/18

Fig. 9

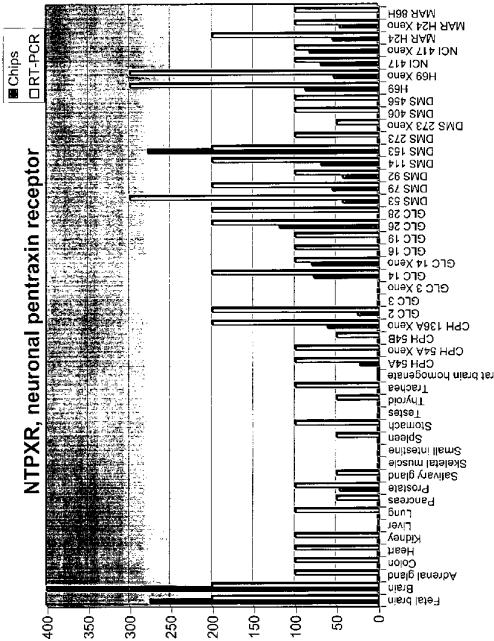


WO 03/000928

PCT/IB02/03534

10/18

Fig. 10

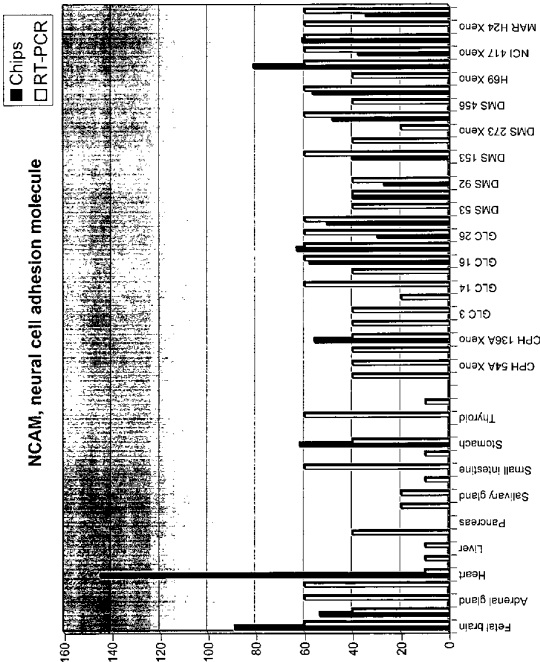


WO 03/000928

PCT/IB02/03534

11/18

Fig. 11



WO 03/000928

PCT/IB02/03534

12/18

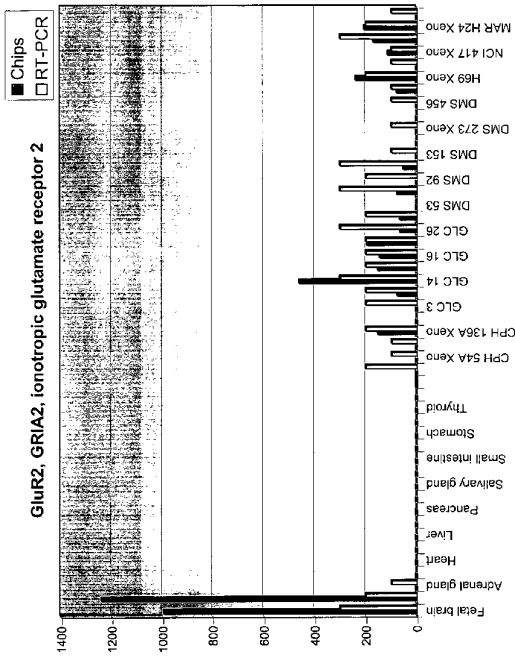


Fig. 12A

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

13/18

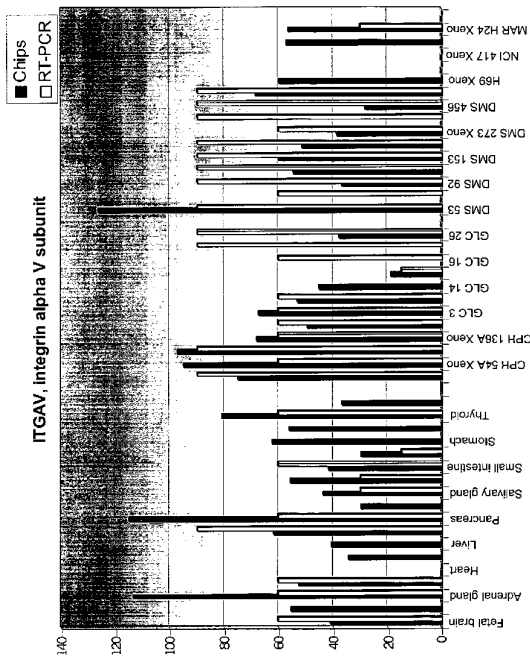


Fig. 12B

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

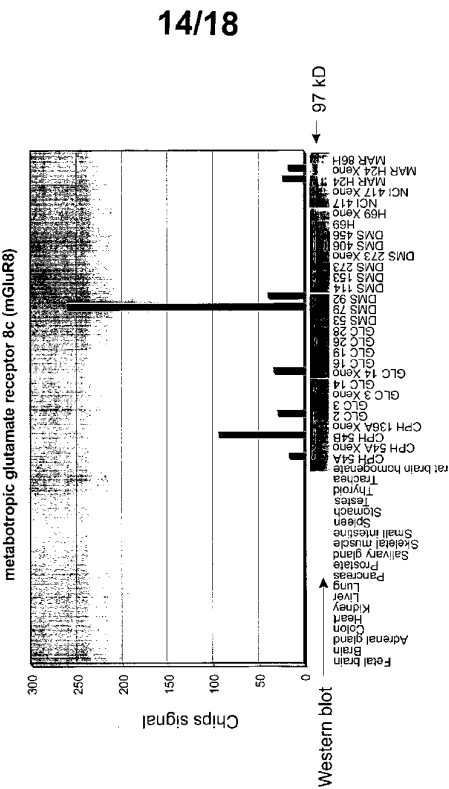


Fig. 13

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

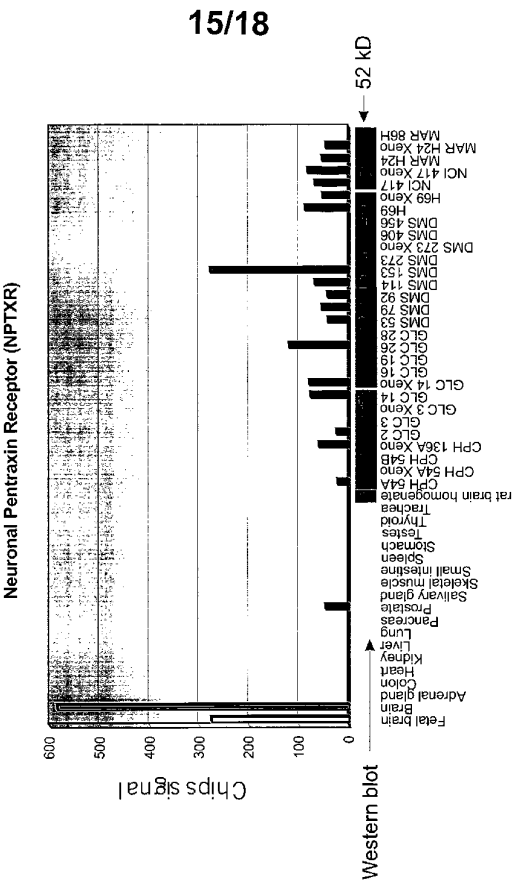


Fig. 14

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

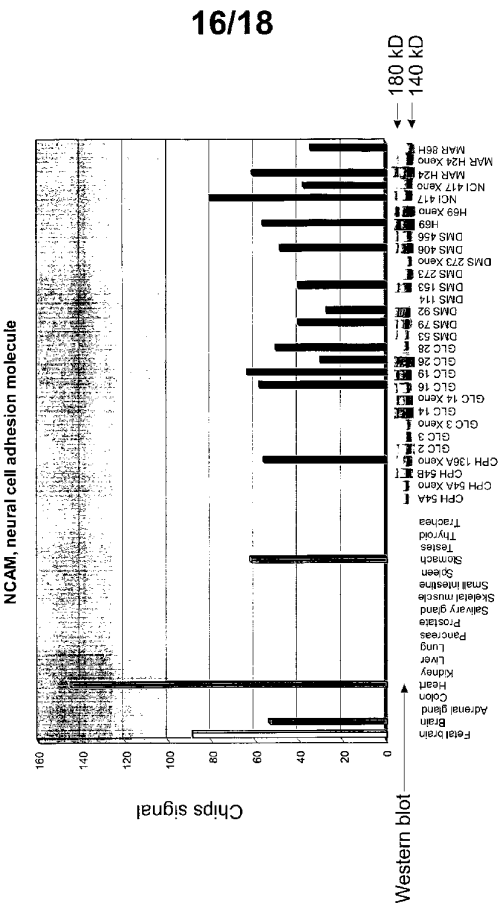


Fig. 15

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

17/18

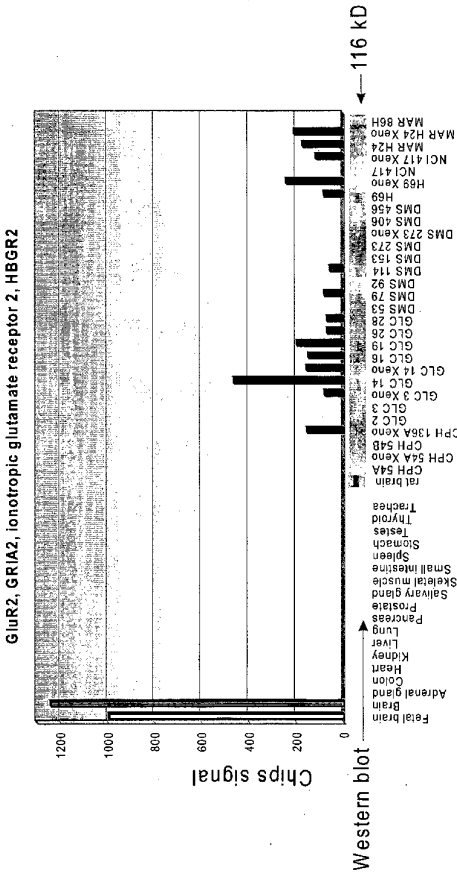
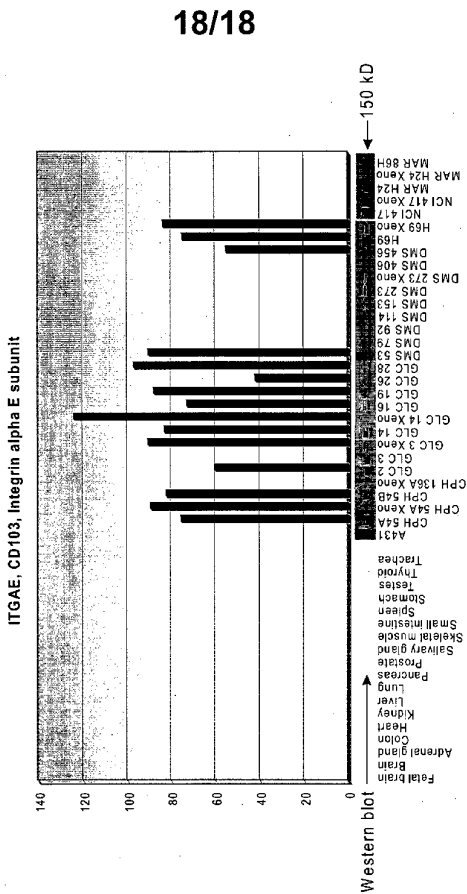


Fig. 16

WO 03/000928

PCT/IB02/03534

Fig. 17



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/000928 A3

(51) International Patent Classification⁷: **C12Q 1/68**,
G01N 33/574, A61K 38/00, G01N 33/50, C07K 16/18,
14/47

GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:
PCT/IB2002/003534

(22) International Filing Date: 19 June 2002 (19.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PA 2001 00992 25 June 2001 (25.06.2001) DK
60/301,818 2 July 2001 (02.07.2001) US

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

— with international search report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
3 June 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(71) Applicant (for all designated States except US): **BUADBO APS** [DK/DK]; c/o Mercodan A/S, Baadshavnsgade 12, DK-2450 Copenhagen SV, (DK).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **POULSEN, Hans, Skovgaard** [DK/DK]; Tuborg Boulevard 24 st. th, DK-2900 Hellerup (DK). **PEDERSEN, Nina** [DK/DK]; Lundtoftegade 46, st.tv., DK-2200 Copenhagen N. (DK). **MORTENSEN, Shila** [DK/DK]; Middelvej 29, DK-2820 Gentofte (DK). **SØrensen, Susanne, Berg** [DK/DK]; Lille Strandvej 26, 1.mf., DK-2900 Hellerup (DK). **PETERSEN, Mikkel, Wandahl** [DK/DK]; Østerbrogade 139, 3.tv., DK-2100 Copenhagen Ø (DK). **ELSEN, Henrik, Irgang** [DK/DK]; Svend Gørges Vej 36, DK-2700 Brønshøj (DK).

(74) Agent: **HOIBERG A/S**; Store Kongensgade 59 B, DK-1264 Copenhagen K. (DK).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE,

(54) Title: METHODS FOR IDENTIFICATION OF CANCER CELL SURFACE MOLECULES AND CANCER SPECIFIC PROMOTERS, AND THERAPEUTIC USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention describes methods for identification of molecules expressed at a different level on the cell surface of cancer cells compared to non-malignant cells and methods of identification of cancer specific promoters to be used singly or in combination for delivery and expression of therapeutic genes for treatment of cancer. The invention furthermore describes targeting complexes targeted to cell surface molecules identified by the methods of the invention. In embodiments of the invention said targeting complexes comprise the promoters identified by the methods of the invention. In addition the invention describes methods of identifying binding partners for the cell surface molecules and the binding partners per se. Methods of treatment using the targeting complexes and uses of the targeting complexes for the preparation of a medicament are also disclosed by the invention. Furthermore, the invention describes uses of the cell surface molecules or fragments thereof for preparation of vaccines.

WO 2003/000928 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 02/03534
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/574 A61K38/00 G01N33/50 C07K16/18 C07K14/47		
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 G01N C07K A61K		
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, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NORGAARD P ET AL: "EXPRESSION AND AUTOREGULATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA RECEPTOR MRNA IN SMALL-CELL LUNG CANCER CELL LINES" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 9, May 1996 (1996-05), pages 1037-1043, XP001041824 ISSN: 0007-0920 the whole document	1
Y	NORGAARD P ET AL: "Acquired TGFb1 sensitivity and TGFb1 expression in cell lines established from a single small cell cancer patient during clinical progression" LUNG CANCER, vol. 14, 1996, pages 63-73, XP002246276 the whole document	1
-/-		
<input checked="" 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 claim 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 *T* 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 July 2003		Date of mailing of the international search report 15/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Osborne, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 02/03534
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FREDERIKSEN K S ET AL: "GENE DELIVERY BY AN EPIDERMAL GROWTH FACTOR/DNA POLYPLEX TO SMALL CELL LUNG CANCER CELL LINES EXPRESSING LOW LEVELS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR" CANCER GENE THERAPY, NORWALK, CT, US, vol. 7, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 262-268, XP001041826 ISSN: 0929-1903 the whole document	1
Y	FREDERIKSEN K ET AL: "Gene therapy for lung cancer" LUNG CANCER, vol. 23, 1999, pages 191-207, XP002246277 the whole document	1
Y	MANDA R ET AL: "Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display" GENOMICS, vol. 61, 1999, pages 5-14, XP002246278 the whole document	1
Y	RETTIG W J ET AL: "CELL-SURFACE GLYCOPROTEINS OF HUMAN SARCOMAS: DIFFERENTIAL EXPRESSION IN NORMAL AND MALIGNANT TISSUES AND CULTURED CELLS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 85, May 1988 (1988-05), pages 3110-3114, XP000882805 ISSN: 0027-8424 the whole document	1
Y	TANIMOTO H ET AL: "HEPSIN, A CELL SURFACE SERINE PROTEASE IDENTIFIED IN HEPATOMA CELLS, IS OVEREXPRESSED IN OVARIAN CANCER" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 57, no. 14, 15 July 1997 (1997-07-15), pages 2884-2887, XP000867297 ISSN: 0008-5472 the whole document	1

	--- --	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		II International Application No PCT/IB 02/03534
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROSS DT ET AL: "Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines" NATURE GENETICS, vol. 23, no. 4, March 2000 (2000-03), pages 227-36, XP002246279 the whole document	1
Y	WANG K ET AL: "Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 229, no. 1-2, 18 March 1999 (1999-03-18), pages 101-108, XP004161163 ISSN: 0378-1119 the whole document	1
Y	WO 98 53319 A (KINZLER KENNETH W ;VOGELSTEIN BERT (US); UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 26 November 1998 (1998-11-26) the whole document	1
Y	WO 00 28032 A (INCYTE PHARMA INC ;AZIMZAI YALDA (US); CORLEY NEIL C (US); YUE HEN) 18 May 2000 (2000-05-18) page 1 -page 6, line 11	1
Y	FUNG L F ET AL: "DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CELLS" LIFE SCIENCES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 67, no. 8, 2000, pages 923-936, XP001041803 ISSN: 0024-3205 the whole document	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		ational application No. PCT/IB 02/03534
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 2-167 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/IB 02 03534

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 2-167

In view of the large number of claims (167) and also the wording of the claims presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and/or conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible.

Moreover, all present claims relate to an extremely large number of possible methods, products and use of products. In fact, the claims contain so many options, variables, possible permutations that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible.

Independent of the above reasoning, present claims 134-147 relate to methods of treatment of the human body. normally a search would be made on the alleged effects of the compounds. However, considering the shortcomings with respect to conciseness and clarity already referred to above, no meaningful search could be performed.

Consequently, based on the objections outlined above, a meaningful search of the complete claimed subject matter was not possible. However, a search limited to an understanding of the general principal underlying the first independent claim (claim 1), i. e. a method for identifying cell surface molecules expressed at a different level in malignant and normal cells using the first mentioned 3 malignant cell lines of claim 1, was performed.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				In - _ _ _ _ _ Application No PCT/IB 02/03534	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9853319	A	26-11-1998	AU WO	7499198 A 9853319 A2	11-12-1998 26-11-1998
WO 0028032	A	18-05-2000	AU CA EP WO	1618500 A 2349815 A1 1129189 A2 0028032 A2	29-05-2000 18-05-2000 05-09-2001 18-05-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
// C 0 7 K 14/705	G 0 1 N 33/566	
	C 0 7 K 14/705	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

- (72)発明者 ハンス・スコヴゴー・ポールセン
デンマーク、デーコー - 2 9 0 0 ヘレルupp、トゥボー・ブルヴァーズ 2 4 番、スチューエン・チル・ヘイア
- (72)発明者 ニーナ・ペダーセン
デンマーク、デーコー - 2 2 0 0 コペンハーゲン・エヌ、ルントフテギヤーゼ 4 6 番、スチューエン・チル・ヴェンストレ
- (72)発明者 シラ・モーテンセン
デンマーク、デーコー - 2 8 2 0 ゲントフテ、ミッデルヴァイ 2 9 番
- (72)発明者 スザンネ・ベアウ・セレンセン
デンマーク、デーコー - 2 9 0 0 ヘレルupp、1 エムエフ、リレ・ストランズヴァイ 2 6 番
- (72)発明者 ミッケル・ヴァンダー・ペダーセン
デンマーク、デーコー - 2 1 0 0 コペンハーゲン・エ、3 チル・ヴェンストレ、オスタープロギヤーゼ 1 3 9 番
- (72)発明者 ヘンリク・イルガング・エルスナー
デンマーク、デーコー - 2 7 0 0 ブレンシェイ、スヴェンズ・イエンゲス・ヴァイ 3 6 番

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA12 AA15 CA04 CA12 HA12 HA14 HA20
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ43 QQ49 QQ53 QQ79 QR32 QR55 QR62
QS25 QS34 QS39
4C076 AA11 AA16 AA95 BB11 EE59M FF31 FF34 FF68
4C084 AA13 BA35 MA17 MA24 MA66 NA10 NA12 ZB261 ZB271 ZC711
ZC781
4C085 AA03 AA26 AA27 AA32 AA38 BA01 BB11 DD86 EE01 FF24
GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 AA50 BA10 CA41 DA50 DA75 EA20
EA31 EA54 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005500833A5	公开(公告)日	2005-11-17
申请号	JP2003507309	申请日	2002-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	BUADBO		
申请(专利权)人(译)	Buazubo安公寓酒店细胞Sukabu		
[标]发明人	ハンススコヴゴーポールセン ニーナペダーセン シラモーテンセン スザンネベアウセレンセン ミッケルヴァンダールペダーセン ヘンリクイルガングエルスナー		
发明人	ハンス・スコヴゴー・ポールセン ニーナ・ペダーセン シラ・モーテンセン スザンネ・ベアウ・セレンセン ミッケル・ヴァンダール・ペダーセン ヘンリク・イルガング・エルスナー		
IPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/705 C12N15/09 C12N15/10 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P35/00 A61P35/02 C12N15/1034 C12Q1/6809 C12Q1/6886 C12Q1/6897 G01N33/5011 G01N33/57492 G01N2500/20 C12Q2527/125		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.G A61K39/39 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C07K14/705		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA15 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ49 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4C076/AA11 4C076/AA16 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/EE59M 4C076/FF31 4C076/FF34 4C076/FF68 4C084/AA13 4C084/BA35 4C084/MA17 4C084/MA24 4C084/MA66 4C084/NA10 4C084/NA12 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC711 4C084/ZC781 4C085/AA03 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/AA32 4C085/AA38 4C085/BA01 4C085/BB11 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/FF24 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA50 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	上田俊夫 品川EiSatoshi		
优先权	200100992 2001-06-25 DK 60/301818 2001-07-02 US		
其他公开文献	JP2005500833A		

摘要(译)

本发明提供了鉴定与非恶性细胞相比在癌细胞的细胞表面上以不同水平表达的分子的方法，以及单独的或用于癌症治疗的治疗基因的递送和表达的方法。本发明涉及鉴定组合使用的癌症特异性启动子的方法。本发明进一步涉及靶向复合物，其靶向通过本发明方

法鉴定的细胞表面分子。在本发明的方面，靶向复合物包含通过本发明的方法鉴定的启动子。此外，本发明涉及鉴定细胞表面分子的结合配偶体的方法，以及结合配偶体本身。本发明还公开了使用靶向复合物的治疗方法，以及靶向复合物在药物生产中的用途。此外，本发明涉及所述细胞表面分子或其片段用于疫苗生产的用途。