

(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2005-523025

(P2005-523025A)

(43) 公表日 平成17年8月4日(2005.8.4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 5 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-586376 (P2003-586376)	(71) 出願人	504386037 コイ, ヨハネス
(86) (22) 出願日	平成15年4月12日 (2003. 4. 12)		ドイツ連邦共和国 グロソスタイム 6 3 7 6 2 イン デン シュワルツェン ゲルテン 1
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月15日 (2004. 10. 15)	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/003827	(72) 発明者	コイ, ヨハネス
(87) 国際公開番号	W02003/089667		ドイツ連邦共和国 グロソスタイム 6 3 7 6 2 イン デン シュワルツェン ゲルテン 1
(87) 国際公開日	平成15年10月30日 (2003. 10. 30)	F ターム (参考)	2G045 BB24 CB02 FB02 FB12 GC15 2G054 AA08 AB04 CA22 CA23 CE02 EA03
(31) 優先権主張番号	02008831.6		
(32) 優先日	平成14年4月19日 (2002. 4. 19)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトトランスケトラゼ様-1 遺伝子の過剰発現に関連する増殖異常性を検出および処置するための組成物および方法

## (57) 【要約】

本発明は、異常に増殖する細胞に関連する傷害の処置方法および診断方法に関する。ある局面では、本発明は、生物学的サンプル中のヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現の検出に基づく腫瘍およびその前駆段階の検出に特に有用な方法に関する。別の局面では、本発明は、ヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現に関連する傷害の処置方法に関する。処置方法は、遺伝子治療アプローチおよびトランスケトラゼ様-1ポリペプチドの活性を阻害または減少する方法を含みうる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a. 個体から得られた生物学的サンプル中のヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子の発現の存在もしくは非存在および/またはレベルを検出する工程、  
b. 該発現の存在もしくは非存在および/またはレベルから診断を評価する工程、ここで過剰発現の存在が異常細胞増殖により特徴付けられる障害の指標となる、  
を含む、個体における異常細胞増殖により特徴付けられる障害の検出のための方法。

## 【請求項 2】

異常細胞増殖により特徴付けられる障害が癌である請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

癌が大腸癌、肺癌、胃癌または膵臓癌である請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

生物学的サンプルが体液、分泌液、スミア、バイオプシー、細胞含有液、溶解細胞、細胞細片、ペプチドまたは核酸である請求項 1 ~ 3 記載いずれか記載の方法。

## 【請求項 5】

サンプルが、血清、尿、精液、糞便、胆液、バイオプシーまたは細胞もしくは組織サンプルである請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子の発現の検出が、ポリペプチドレベルで行われる請求項 1 ~ 5 いずれか記載の方法。

## 【請求項 7】

ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子の発現の検出が、核酸レベルで行われる請求項 1 ~ 5 いずれか記載の方法。

## 【請求項 8】

ポリペプチドレベルでの検出が、ヒトトランスケトラーゼ様-1ポリペプチドに対する結合因子を用いて行われる請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 9】

結合因子が抗体、抗体の断片、抗原結合エピトープまたはミニ抗体を含有するペプチド模倣体である請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

検出が免疫-細胞化学検出手順である請求項 6、8 または 9 いずれか記載の方法。

## 【請求項 11】

ヒトトランスケトラーゼ様-1核酸にハイブリダイズする少なくとも 1 つの核酸プローブが検出のために使用される請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 12】

プローブが検出可能に標識される請求項 11 記載の方法。

## 【請求項 13】

標識が、放射性同位体、生物発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート、または酵素からなる群より選ばれる請求項 12 記載の方法。

## 【請求項 14】

検出反応が核酸増幅反応を含む請求項 7 または 11 ~ 13 いずれか記載の方法。

## 【請求項 15】

増幅反応がPCR、LCRまたはNASBAである含む請求項 11 ~ 13 いずれか記載の方法。

## 【請求項 16】

インサイチュハイブリダイゼーションに使用される請求項 7 または 11 ~ 13 いずれか記載の方法。

## 【請求項 17】

インビボまたはインビトロ分子イメージング方法の過程で使用される前述の請求項いずれか記載の方法。

## 【請求項 18】

10

20

30

40

50

研究用キットまたは診断用キットである請求項 1 ~ 17 いずれか記載の方法を行うためのキット。

【請求項 19】

a. 生物学的サンプル中のヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子発現産物の検出のための少なくとも1つのプローブ；

b. 陽性対照反応を行うためのヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物サンプルを含有してなる請求項 18 記載のキット。

【請求項 20】

プローブが、ヒトトランスケトラーゼ様-1核酸に特異的にハイブリダイズする核酸プローブまたはヒトトランスケトラーゼ様-1タンパク質に特異的に結合する抗体である請求項 19 記載のキット。

10

【請求項 21】

薬学的に許容されうる形態のヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子または遺伝子産物を含有する医薬組成物の投与に基づく細胞の異常増殖により特徴付けられる障害の処置方法。

【請求項 22】

ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子または遺伝子産物が、センスもしくはアンチセンス方向の核酸またはポリペプチドである請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

医薬組成物が、ヒトトランスケトラーゼ様-1核酸もしくはその断片を含有するキメラ核酸またはヒトトランスケトラーゼ様-1ポリペプチドもしくはその断片を含有する融合ポリペプチドを含有する請求項 22 記載の方法。

20

【請求項 24】

異常細胞増殖により特徴付けられる障害が癌である請求項 21 ~ 23 いずれか記載の方法。

【請求項 25】

癌が大腸癌、肺癌、胃癌または膵臓癌である請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

処置方法が免疫治療である請求項 21 ~ 25 いずれか記載の方法。

【請求項 27】

処置方法がワクチン接種治療である請求項 21 ~ 26 いずれか記載の方法。

30

【請求項 28】

癌の処置用医薬組成物の製造のためのヒトトランスケトラーゼ様-1ポリペプチドまたはヒトトランスケトラーゼ様-1核酸の使用。

【請求項 29】

a. 本発明の方法で使用されるTKT-L1ポリペプチドまたは該ポリペプチドを発現する細胞を、トランスケトラーゼ活性または細胞増殖の調節の変化にตอบสนองして検出可能なシグナルを提供することができる成分の存在下に接触させる工程、および

b. トランスケトラーゼ活性または細胞増殖の調節の変化から生じるシグナルの存在もしくは非存在またはシグナルの増大を検出する工程、ここでシグナルの非存在または減少が推定上の薬物の指標である、

40

を含む、大腸、肺、膵臓または胃の腫瘍の治療のための薬物候補を同定し、得る方法。

【請求項 30】

請求項 29 記載の方法により同定可能な化合物、抗チアミン化合物、トランスケトラーゼ酵素活性のインヒビター、トランスケトラーゼ様-1活性のインヒビター、トランスケトラーゼ様-1ポリペプチドまたはヒトトランスケトラーゼ様-1核酸を含有してなる、大腸、肺、膵臓または胃の腫瘍の処置のための医薬組成物。

【請求項 31】

a. 生物学的サンプル中のトランスケトラーゼ様-1遺伝子の存在もしくは非存在および/または過剰発現のレベルの検出、

b. トランスケトラーゼ様-1遺伝子の存在もしくは非存在および/またはレベルによりサ

50

ブグループを構築する工程、

c. 個体または個体の細胞におけるトランスケトラゼ様-1活性の減少を含むサブグループにより適切な治療を仕立てる工程、  
を含む合理的な腫瘍管理方法。

【請求項32】

トランスケトラゼ様-1の活性の減少が、抗チアミン化合物、請求項31記載の医薬組成物、トランスケトラゼ酵素活性のインヒビター、トランスケトラゼ様-1アンチセンス構築物、トランスケトラゼ様-1に特異的なリボザイムの投与により、またはチアミンの減少した投与により達成される請求項31記載の方法。

【請求項33】

請求項31または32記載の方法において使用するための請求項30記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、異常に増殖する細胞に関連する障害の処置および診断方法に関する。ある局面では、本発明は、生物学的サンプル中のヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現の検出に基づく、腫瘍およびその前駆段階の検出のために特に有用である。別の局面では、本発明は、ヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現に関連する障害の処置方法に

20

【0002】

多大な科学および医学的研究の取り組みにも拘わらず、腫瘍性疾患は依然としてヒトの主要な死亡原因である。例えば、ドイツでは毎年340,000人以上が癌を発症し、210,000人以上がその疾患により死亡する。上皮腫瘍は癌の大多数を表し：肺癌は、男性の癌での死亡原因の第1位であり、乳癌は、女性での第1位である。癌での死亡原因の第2位は男女ともに結腸直腸癌である (Becker, N.およびWahrendorf, J., (1997) Atlas of Cancer Mortality in the Federal republic of Germany 1981-1990, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg)。

30

【0003】

この満足できない状況の主要な理由の1つは、大抵の腫瘍性疾患が比較的後期に診断され、そのときには単離された腫瘍細胞または小腫瘍細胞凝集物は原発性腫瘍からすでに放出され、宿主生物全体に分布し、ついには潜在的または明らかな転移性疾患をすでに引き起こしているかもしれないことである。初期の癌および特に前癌は、通常、何ら徴候を生じず、個々の患者に気づかれない。

【0004】

このことを解消するために、より多くの研究取り組みおよび臨床プログラムが、癌の初期検出技術を改善するために、また最初の外科的介入の前またはその間に腫瘍から放出されたかもしれない散在性単離癌細胞(DTC)の生存を防止するために規定された癌が現

40

【0005】

いくらかの癌、特に子宮頸部の癌については、有効な癌初期検出プログラムが確立され得た。その結果生じたこれらの特定の腫瘍に関連する死亡率の減少は、初期検出プログラムの高い有効性を明白に示した。

【0006】

要約すると、不運なことに、これまでに使用された診断方法は比較的感度が低く、特異性の欠失のために偽陽性の結果を生じる危険性を有する。さらに、現在の診断方法を使用することにより、悪性度の階級に関する任意の結論である腫瘍の進行およびその転移の可

50

能性は正確には予想できない。

【0007】

従って、信頼できる診断分子マーカーの使用は、上皮の腫瘍、例えば、大腸の腫瘍の分子基礎の理解のために、良性組織と悪性組織とを区別するために、および非常に悪い予後を有する転移性癌を有する患者について癌腫を階級付け、および段階付けるために非常に有益でありうる。かかるマーカーはまた、癌の処置のための新規治療手段の開発に有用であることが予想されうる。

【0008】

正常細胞から種々の階級の攻撃性の腫瘍細胞への転位の基礎となる分子事象の理解および癌関連遺伝子を選択するための適切な実験系の利用可能性は、かかる新規診断マーカーおよび治療用薬物標的の同定のための絶対的な必要条件である。 10

【0009】

腫瘍形成は、遺伝的变化および環境因子が細胞増殖および分化を調節する細胞プロセスを撤廃すると考えられる複雑な多段階プロセスを表すと一般に受け入れられている。この多段階プロセスは、例えば、典型的には10年にわたり成長し、完了のために複数の遺伝的事象を必要とすることが明らかな結腸直腸癌により良く説明される（総説については、KinzlerおよびVogelstein, 1996, Cell 87, 159-170）。さらなる体細胞変異を生じる変化した遺伝子（際立った疾患原因(predisposition)を生じる）およびゲノム不安定性（環境からの遺伝毒性因子により引き起こされる）の両方の遺伝はこのプロセスに寄与する。明らかに、腫瘍形成に原因的に関与する重要なプレイヤーのリストは完成には程遠く、明らかに腫瘍の型に応じて変化する。 20

【0010】

従って、本発明の基礎となる技術課題は、現在利用可能な診断および治療方法の不利な点を解消する、上皮腫瘍の診断および治療のために手段を提供することである。

【0011】

上記技術課題の解決法は、特許請求の範囲で特徴づけられた態様を提供することにより達成される。

【0012】

本発明は、配列番号：1（TKTL1、TKR:NM\_012253;アクセッション番号:X91817参照）に示されるヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子が、個々の正常な対照組織において見出されるレベルと比べて、大腸癌腫、膵臓癌腫、肺癌および胃癌の組織において高度に過剰発現されるといふ発明者らの知見に基づく。トランスケトラゼ酵素が腫瘍組織において比較的過剰発現されないので、これは診断目的に特に価値がある。 30

【0013】

従って、腫瘍の診断方法は、生物学的サンプル中のトランスケトラゼ様-1遺伝子産物の過剰発現の検出に基づきうる。トランスケトラゼ様-1遺伝子産物の検出される存在もしくは非存在および/またはレベルに従って、疾患過程を予測すること、診断を評価することおよび患者に適切な治療を仕立てることが可能である。

【0014】

さらに、本発明は、トランスケトラゼ様-1遺伝子産物の過剰発現に関連する障害に治療方法を適用することができる。一方で、本発明は、障害の治療のためにトランスケトラゼ様-1核酸またはポリペプチドを使用する方法を提供する。他方で、本発明は、トランスケトラゼ様-1遺伝子ポリペプチドの酵素活性の減少に基づく方法を提供する。従って、本発明のある局面は、患者のサンプル中のトランスケトラゼ様-1遺伝子産物の検出および検出された上記遺伝子産物の過剰発現に関して治療を適応(tailor)させることに基づく合理的な腫瘍管理方法を提供することである。 40

【0015】

最後に、本発明は、診断用および研究用キットならびに本明細書中に開示される方法を行うのに有用な医薬組成物に関する。

【0016】

本発明は、癌等の異常細胞増殖により特徴づけられる障害の検出および処置のための方法を提供する。

【0017】

本発明の第1の局面は、生物学的サンプル中の配列番号：1で表されるヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子（TKTL1、TKR:NM\_012253;アクセッション番号:X91817参照）の発現の存在もしくは非存在および/またはレベルの決定に基づく癌等の異常な細胞増殖により特徴付けられる障害の検出方法を提供することである。

【0018】

本発明の第2の局面は、治療薬剤としてヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物を使用して癌等の異常な細胞増殖により特徴付けられる障害の処置方法を提供することである。

10

【0019】

本発明の第3の局面は、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子の過剰発現の存在もしくは非存在および/またはレベルの検出に関する反応を行うための研究または診断用試験キットである。

【0020】

本発明の第4の局面は、本発明により障害の処置において適用可能な医薬組成物に関する。

【0021】

本発明に関連して使用されるトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物は、トランスケトラーゼ様-1遺伝子によりコードされるポリペプチドおよび核酸を含みうる。

20

【0022】

本発明の方法を行うために使用されるポリペプチドおよびポリヌクレオチドが単離される。これは、分子が本来の環境から取り出されることを意味する。天然に存在するタンパク質は、それらが天然の環境において共存するいくらかまたは全ての物質から分離される場合、単離される。ポリヌクレオチドは、例えば、それらがベクターにクローン化された場合、単離される。

【0023】

本発明の方法を行うために使用されるヒトトランスケトラーゼ様-1核酸分子は、ポリヌクレオチドまたはその断片を含みうる。好ましいポリヌクレオチドは、少なくとも20個の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも30個の連続したヌクレオチド、さらに好ましくは少なくとも45個の連続したヌクレオチドを含み得、これは、野生型トランスケトラーゼ様-1ポリペプチドと比べて、同一であるか、配列相同性を有するか、または同一、もしくは相同なポリペプチドをコードするが、他のトランスケトラーゼ様ポリペプチドまたはトランスケトラーゼをコードしない。本発明の核酸はまた、上記ポリヌクレオチドのいずれかに相補的または逆相補的でありうる。ポリヌクレオチドは、例えば、一本鎖（センスまたはアンチセンス）または二本鎖分子を含み得、DNA（ゲノム、cDNAまたは合成）またはRNAでありうる。RNA分子は、mRNA（イントロンを含まない）に加えて、hnRNA（イントロンを含む）を含む。本発明によれば、ポリヌクレオチドはまた、支持物質または検出マーカー分子などの任意の他の分子に連結され得、さらなるコード配列または非コード配列を含んでもよいし、必ずしも含む必要もない。

30

40

【0024】

本発明により使用されるヒトトランスケトラーゼ様-1ポリヌクレオチドは、天然の配列またはそのバリエーションでありうる。バリエーションは、1つ以上の置換、付加、欠失および/または挿入を含み、その結果、コードされるポリペプチドの免疫原性は天然の腫瘍細胞と比べて減少しない。バリエーションは、例えば、ポリヌクレオチドの対立遺伝子変異でありうる。本明細書中で使用される対立遺伝子変異は、遺伝子の代替形態であり、核酸配列中の少なくとも1つの変異から生じうる。対立遺伝子は、その構造または機能が変化してもしなくてもよい改変mRNAまたはポリペプチドを生じうる。任意の所定の遺伝子は、0、1つまたは多くの対立遺伝子形態を有しうる。対立遺伝子を生じる一般的な変異的变化は、一般に、ヌクレオチドの天然の欠失、付加、または置換に帰する。これらのタイプの変化の

50

各々は、単独で起こるかまたは他のものと組み合わせられて、所定の配列中で1回以上起こりうる。本発明のバリエーションは、本明細書中に開示される天然の核酸分子に対して、好ましくは70%、より好ましくは少なくとも80%および最も好ましくは少なくとも90%の配列同一性を示す。配列類似性の決定方法は、当業者に公知である。

【0025】

配列の類似性を検出するための1つの例は、DKFZ HeidelbergのHUSARサーバーにおいてアクセス可能なFastAおよび/またはBlastNバイオインフォマティクスソフトウェアを用いて行われうる。

【0026】

本発明に関連して使用される核酸は、全てのポリヌクレオチドであり、これは、本明細書中で使用されるトランスクリプターゼ様-1配列に特異的なプローブにストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション反応に適用されるストリンジেন্টな条件は、当業者に公知であり、Sambrookら、Molecular cloning: A Laboratory Manual, 第2版、1989に記載されるように適用されうる。

【0027】

本発明はまた、遺伝子コードの縮重のために、核酸配列内では上記のような配列ホモロジーのパーセンテージを示さないが、ヒトトランスクリプターゼ様-1核酸により天然にコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。かかる核酸は、例えば、縮重コドンにより開示される配列内に存在するコドンを変化させ、合成核酸を調製することにより生じうる。かかる人工的な核酸配列の調製は、当業者に公知の方法により達成されうる。

【0028】

本発明により使用されるヒトトランスクリプターゼ様-1ヌクレオチド配列は、公知の組換えDNA技術を使用して、種々の他の核酸配列に連結されうる。配列は、例えば、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体およびコスミド等の任意の種々のクローニングベクターにクローニングされうる。さらに、発現ベクター、複製ベクター、プローブ産生ベクターおよびシーケンシングベクター等のベクターは、本明細書中に開示される配列と連結されうる。

【0029】

本発明の核酸にクローニングされうる配列は、コード配列に加えて、非コード配列ならびにプロモーター、エンハンサーおよびターミネーターを含む調節配列を含む。本明細書中に開示されるヒトトランスクリプターゼ様-1核酸配列は、例えば、他のコード配列と組み合わせられて存在しうる。これらの配列は、酵素、レセプター、抗原、免疫原性断片またはエピトープ、結合タンパク質等の種々のタンパク質をコードしうる。核酸配列は、直接連結されてもよいし、スペーサーまたはリンカー領域をコードする核酸のストレッチにより分離されてもよい。核酸配列はまた、配列の転写後に除去されうる核酸のストレッチにより分離されうる。本明細書中に開示される配列に連結されうる非コード配列は、プロモーター領域、エンハンサー、cis調節エレメント、5'非翻訳領域、ターミネーター等でありうる。

【0030】

好ましい態様では、ヒトトランスクリプターゼ様-1ポリヌクレオチドは、それらが原核生物または哺乳動物細胞等の真核生物細胞に進入し、上記細胞において発現されるように製剤化されうる。かかる製剤は、例えば治療目的に有用でありうる。標的細胞中の核酸配列の発現は、当業者に公知の任意の方法により達成されうる。核酸は、例えば、宿主細胞におけるそれらの発現を可能にするのに適切なエレメントに連結されうる。かかるエレメントは、CMV-、SV40-、RSV-、メタロチオネインI-またはポリヘドリン-プロモーター、それぞれCMV-またはSV40-エンハンサー等のプロモーターまたはエンハンサーを含みうる。考えられうる発現のための方法は、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはポックスウイルスを含むウイルスベクターへのポリヌクレオチドの取り込みである。哺乳動物宿主細胞における核酸の発現のためのウイル

10

20

30

40

50

スペクターとしては、pcDNA3、pMSX、pKCR、pEFBOS、cDM8、pCEV4等が挙げられる。これらの技術は当業者に公知である。

#### 【0031】

本明細書中で使用されるヒトトランスケトラゼ様-1配列の断片としては、ハイブリダイゼーション用の核酸プローブ、増幅反作用のプライマーまたはアンチセンス技術で使用するためのアンチセンス構築物等のオリゴヌクレオチドが挙げられうる。本発明の核酸プローブは、ヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子核酸配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドの一部に少なくとも80%同一な配列を有するか、またはかかる配列に相補的または逆相補的であるが、他のトランスケトラゼまたはトランスケトラゼ様配列にハイブリダイズしない任意の核酸プローブでありうる任意の核酸プローブでありうる。本発明の核酸プローブは、それらが本明細書中に開示される配列の核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることによりさらに特徴付けられる。プライマーは、特異的増幅反応を行うのに適切な任意のヌクレオチドでありうる。従って、本発明により使用されるプライマーは、ヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子配列と比べて少なくとも80%の配列同一性を有する少なくとも15個の連続したヌクレオチドの核酸オリゴマーでありうるか、またはかかる配列に相補的または逆相補的でありうる。本発明のプライマーは、核酸増幅反応の過程で適切に適用される条件下で本明細書中に開示される配列またはその一部に特異的にハイブリダイズするが、他のトランスケトラゼまたはトランスケトラゼ様配列にハイブリダイズしない。本明細書中で使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、開示されるコード配列の転写産物に逆相補的な核酸分子であり得、これは塩基対形成により転写産物に結合することができ、そのようにして上記コード配列の発現を阻害するかまたは減少させる。

10

20

#### 【0032】

本発明により使用される核酸はまた、化学的に前処理された核酸でありうる。かかる化学的に前処理された核酸は、本明細書中に開示される任意の核酸を含み、これは、核酸分子に修飾を生じるのに適切な化学薬剤で処理されている。上記修飾は、例えば、核酸内の特定の塩基の特異的修飾を含みうる。かかる化学的処理は、例えば、重亜硫酸ナトリウム、ヒドラジンまたは過マンガン酸カリウムでの処理を含みうる。核酸の化学的前処理を使用する実験において特に重要な配列は、例えば、配列のコード領域または非コード領域を含む。化学物質により処理されうる非コード領域の例は、プロモーター領域または5' UTR中のCpG島でありうる。

30

#### 【0033】

本発明により使用されるヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドは、全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を含み得、ここでアミノ酸残基は共有ペプチド結合により連結される。従って、上記ヒトトランスケトラゼ様-1タンパク質の内の1つの一部を含むポリペプチド(例えば、ヒトトランスケトラゼ様-1タンパク質のアミノ酸配列を含むタンパク質)は、完全にその一部からなりうるか、または一部はさらなる配列を含むより大きいポリペプチド内に存在しうる。さらなる配列は、天然のタンパク質に由来しうるか、または異種であり得、かかる配列は、免疫原性および/または抗原性でありうる(必ずしもそうである必要ではない)。以下に詳述されるように、かかるポリペプチドは、腫瘍組織から単離され得、または合成もしくは組換え手段により調製されうる。

40

#### 【0034】

本明細書中で使用されるように、ヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドの生物学的特性を示すポリペプチドは、酵素活性(トランスケトラゼ活性)、タンパク質間相互作用活性、チアミンの存在に対する酵素活性の応答性、または抗原性もしくは免疫原性特性、例えば、上記ポリペプチド(すなわち、免疫原性部分を含む)に対する上記ヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドの抗体結合能力等の少なくとも1つの活性を有するポリペプチドであると考えられる。

#### 【0035】

本明細書中で使用される免疫原性部分は、B細胞および/またはT細胞表面抗原レセプ

50

ターにより認識されるタンパク質の一部である。免疫原性部分は、本明細書中に開示されるタンパク質の少なくとも5アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも10アミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも15アミノ酸残基を含む。本発明の好ましい態様では、膜貫通ドメインまたはN末端リーダー配列等のタンパク質の特定のドメインが欠失されている。

**【0036】**

本発明の免疫原性部分は、天然の全長タンパク質と同一またはほぼ同一の強度で抗血清または特定の抗体と反応する。免疫原性部分は、一般に当該分野で周知の技術を用いて同定される。可能な技術は、例えば、抗原特異的抗体、抗血清および/またはT細胞株またはクローンと反応する能力に関するポリペプチドのスクリーニングである。

**【0037】**

本発明により使用されるヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドはまた、天然のタンパク質のバリエーションを含む。これらのバリエーションは、置換、欠失、付加および/または挿入等の1つ以上の変化により天然のタンパク質とは異なりうる。本発明のバリエーションの免疫反応性および/または生物学的活性は、天然のタンパク質と比べて実質的に減少しない。本発明の好ましい態様において、免疫反応性および/または活性は、天然のポリペプチドと比べて50%未満の減少であり、より好ましい態様では、免疫反応性および/または活性は、天然のポリペプチドと比べて20%未満の減少である。本発明の別の好ましい態様では、ポリペプチドのバリエーションは、天然のタンパク質の活性が増大、減少または失われるように変化されうる。これらのバリエーションは、例えば、ヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現に関連する障害の治療において使用されうる。好ましい態様では、バリエーションは、N末端リーダー配列、膜貫通ドメインまたは小Nおよび/またはC末端配列等の1つ以上の部分において不完全でありうる。バリエーションは、本発明により開示されるポリペプチドに対して好ましくは70%、より好ましくは少なくとも90%および最も好ましくは少なくとも95%同一性を示す。

**【0038】**

本発明により使用されるバリエーションは、好ましくは保存的置換を含み、その結果、変化されるアミノ酸は類似した特性を有するアミノ酸に置換される。関与する特性としては、アミノ酸残基の極性、荷電、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性が挙げられうる。

**【0039】**

本発明により使用されるバリエーションはまた、さらなる末端リーダー配列、リンカーまたはより容易もしくはより快適な方法でポリペプチドの合成、精製または安定性を可能にする配列を含みうる。

**【0040】**

本発明の方法で使用されるポリペプチドのバリエーションは、従来の分子生物学的プロセス（例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）によって製造されうる。例えば、本発明の核酸分子に種々の変異を導入することが可能である。結果として、あるいは修飾された生物学的特性を有するヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドが合成されうる。1つの可能性は、核酸分子が、コードDNA配列の5'または3'末端からの連続した欠失により製造され、従って短縮されたポリペプチドの合成を導く欠失変異体の製造である。別の可能性は、アミノ酸配列の修飾が、例えば酵素活性または酵素の調節に影響する位置への単一の点変異の導入である。この方法により、例えば、改変Km値を保有するか、または細胞に通常存在する調節機構、例えば、アロステリック調節または共有結合修飾についてもはや曝されないムテインが製造されうる。かかるムテインは、例えば、治療的に有用な化合物、例えば、アンタゴニストとして価値がありうる。

**【0041】**

原核生物細胞における遺伝子工学を用いた操作のために、本発明の方法に使用される核酸分子またはこれらの分子の一部がプラスミドに導入され得、DNA配列の組換えによって、配列の突然変異誘発または修飾を可能にする。従来の方法（Sambrookら、前出を参照）

10

20

30

40

50

を用いることにより、塩基は交換され得、また、天然配列または合成配列が付加され得る。DNA断片を互いに連結させるために、アダプターまたはリンカーが該断片に付加され得る。更に、適切な切断部位を提供するか、または過剰なDNAもしくは切断部位を除去する操作が行われ得る。挿入、欠失または置換が可能である場合、インピット口での突然変異誘発、プライマー修復、制限またはライゲーションが行われ得る。分析方法としては通常、配列分析、制限分析および他の生化学的または分子生物学的方法が使用され得る。

#### 【0042】

ポリペプチドは、本明細書中に開示される配列を含む融合またはキメラポリペプチドを包含し得る。融合タンパク質は、更なる本発明のポリペプチド、その一部、または本発明のポリペプチドのバリエーションもしくはその一部、および/または任意の異種ポリペプチドなど、任意の第2のおよび更なるポリペプチドと共にある、本発明のポリペプチド、その一部、または本発明のポリペプチドのバリエーションもしくはその一部を含む。異種ポリペプチドは、酵素、レセプター分子、抗原、抗原性もしくは免疫原性エピトープまたはその断片、抗体またはその断片、シグナル伝達ポリペプチドまたはシグナル変換ポリペプチドなどを含み得る。免疫原性タンパク質は、例えば再現 (recall) 応答を誘発することが可能であり得る。かかるタンパク質の例としては、破傷風、結核および肝炎タンパク質が挙げられる (例えば、Stouteら、New Engl. J. Med., 336:86-91 (1997) を参照のこと)。本発明の1つの態様において、融合ペプチドはポリペプチドの検出の増強または精製のために構築され得る。精製のために、例えばhis-タグ、myc-タグなどのタグがポリペプチドに付加され得る。抗原性部分の検出のために、酵素、色素産生性配列などがポリペプチドに融合され得る。本発明の融合タンパク質は、第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとの間にリンカーペプチドを含み得る (が必要ではない)。

10

20

#### 【0043】

第1および第2ポリペプチドをコードする離れた核酸配列を適切な発現ベクターに集めるために、公知の組換えDNA技術を使用して、本発明に使用される融合タンパク質をコードする核酸配列が構築される。この2つの核酸配列の、第1および第2ポリペプチド両方の生物学的活性を保持する単一融合タンパク質へのmRNA翻訳を許容するために配列の適切なリーディングフレームを確保するように、第1ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端が、ペプチドリinkerと共にまたはペプチドリinker無しで、第2ポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端にライゲートされる。

30

#### 【0044】

2次および3次構造への各ポリペプチドの折りたたみを確実にするのに十分な距離で第1および第2ポリペプチドを分離するために、ペプチドリinker配列が使用され得る。かかるペプチドリinker配列は当該分野で周知の標準技術を用いて融合タンパク質に組み込まれる。適切なペプチドリinker配列が以下の要因：(1)フレキシブルな拡張立体配座を採択できること；(2)第1および第2ポリペプチド上の機能的エピトープと相互作用し得る2次構造を採択できないこと；ならびに(3)ポリペプチド機能的エピトープと反応し得る疎水性残基または荷電残基が無いこと、に基づいて選択され得る。好ましいペプチドリinker配列は、Gly、AsnおよびSer残基を含む。他の近い中性アミノ酸、ThrおよびAlaなどもまた、リンカー配列において使用され得る。リンカーとして有用に使用され得るアミノ酸配列は、Marateaら、Gene 40:39-46, 1985；Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986；米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号に開示されるものを含む。リンカー配列は、1から約50のアミノ酸長であり得る。第1および第2ポリペプチドが機能的ドメインを分け、立体干渉を防ぐために使用され得る非必須N末端アミノ酸領域を有する場合、ペプチド配列は必要とされない。

40

#### 【0045】

本発明の方法に使用されるヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドおよびかかるポリペプチドをコードする核酸は、当該分野で周知の様々な方法のうち任意のものを使用して腫瘍組織から単離され得る。本発明の腫瘍ポリペプチドの1つをコードする遺伝子 (またはその一部) に対応する核酸配列は、サブトラクション技術を使用して腫瘍cDNAライブラ

50

リーから単離され得る。得られた部分的な核酸配列は、当該分野で周知の技術を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）においてヒトゲノム核酸ライブラリー由来または腫瘍cDNAライブラリー由来の全長核酸配列を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計するために使用され得る（例えば、Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263, 1987; Erlich 編、PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989を参照のこと）。このアプローチに関して、配列特異的プライマーは本明細書で提供されるヌクレオチド配列に基づいて設計することができ、また、購入または合成することができる。

#### 【0046】

本明細書中に開示される方法に使用されるヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドはまた、合成手段により生成され得る。特に約100より少ないアミノ酸、および一般に約50より少ないアミノ酸を有する合成ポリペプチドは、当業者に周知の技術を使用して生成され得る。例えばかかるポリペプチドは、Merrifield固相合成法など、拡大するアミノ酸鎖にアミノ酸が連続して付加される、任意の市販の固相技術を使用して合成され得る（例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963を参照のこと）。ポリペプチドの自動合成のための装置はPerkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, Calif.) などの供給業者から市販されており、製造者使用説明書に従って作動させることができる。

10

#### 【0047】

本明細書中に開示される方法に使用されるポリペプチドをコードするライゲートされた核酸配列は、当業者に公知の、適切な転写または翻訳調節因子に作動可能に連結される。核酸の発現の原因となる調節因子は、例えば、第1ポリペプチドをコードする核酸配列に対して5'に、コーディング配列内に、または第1のもしくは任意の更なるポリペプチドをコードする核酸配列に対して3'に配置され得る。翻訳を終了するために必要とされる停止コドンおよび転写終結シグナルが第2ポリペプチドをコードする核酸配列に対して3'に存在する。

20

#### 【0048】

本発明の方法に使用されるポリペプチドは単離され得る。これは、分子がそれらの本来の環境から取り除かれ得ることを意味する。それらが自然環境に共存するいくつかのまたは全ての物質から分離される場合、天然に存在するタンパク質が単離される。例えばそれらがベクターにクローニングされた場合、ポリヌクレオチドが単離される。

30

#### 【0049】

以下により詳細に記載される特定の好ましい態様において、本明細書中に開示される方法に使用されるポリペプチドは、単離された、実質的に純粋な形態（すなわち、ポリペプチドがアミノ酸組成および一次配列分析により決定されるのと同質である）で調製され得る。ポリペプチドは好ましくは、少なくとも約90%純粋であり、より好ましくは少なくとも約95%純粋であり、最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。実質的に純粋なポリペプチドは例えば医薬組成物に使用され得る。

#### 【0050】

更に本発明は、ヒトトランスケトラゼ様-1タンパク質に特異的に結合する結合剤を使用する。これらの結合剤は、例えば抗体および抗原結合断片、二機能性ハイブリッド抗体、最小限の抗原結合エピトープを含むペプチド模倣体などを含み得る。

40

#### 【0051】

抗体または抗原結合剤は、本明細書中で使用されるタンパク質と検出可能なレベルで反応し、他のタンパク質とは有意に反応しない場合、特異的に反応すると言われる。本発明の抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。本明細書中に使用される場合、用語、抗体またはモノクローナル抗体はタンパク質に特異的に結合することが可能な完全な分子ならびに抗体断片（例えば、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片など）を含むことが意図される。FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片は完全な抗体のFc断片を欠いており、循環からより急速に消失し、完全な抗体よりも少ない非特異的組織結合を有し得る（Wahlら、J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)）。従って、これらの断片ならびにFabまたは他の免疫グロブリン発

50

現ライブラリーの産物が好ましい。更に、本発明に使用される抗体はキメラ、単鎖、およびヒト化抗体を含む。

【0052】

本発明に従って、結合剤は単体でまたは組み合わせて使用され得る。組み合わせによって、より高度の感受性を達成することが可能である。用語、抗体は好ましくは、種々のエピトープ特異性を有するプールされたモノクローナル抗体、ならびに厳密なモノクローナル抗体調製物から実質的に構成される抗体に関する。

【0053】

モノクローナル抗体は、本発明に使用されるポリペプチドの断片を含む抗原から、当業者に公知である様々な技術のうち任意のものを使用して作製される；例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。かかる技術の1つにおいて、抗原性ポリペプチドまたはその合成部分を含む免疫原が広く様々な哺乳動物のうち任意のもの（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジおよびヤギ）にはじめに注射される。この工程において、本発明のポリペプチドが修飾無しに免疫原として役立ち得る。あるいは、特に相対的に短いポリペプチドに関して、ポリペプチドがウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンなどの担体タンパク質に接合された場合に、優勢な免疫応答が誘発される。好ましくは1以上の追加免疫を組み込んだ前もって決定されたスケジュールで、免疫原が宿主動物に注射され、該動物は定期的に採血される。次いで、ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体が、例えば、適切な固体支持体に連結したポリペプチドを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、かかる抗血清から精製され得る。

【0054】

目的の抗原性ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、例えば、KoehlerおよびMilstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, の技術およびそれに対する改良技術を使用して調製され得る。端的に言えば、これらの方法は望ましい特異性（すなわち、目的のポリペプチドとの反応性）を有する抗体を産生することが可能な不死化細胞系の調製を含む。かかる細胞系は、例えば、上記のように免疫された動物から得られた脾臓細胞より産生され得る。脾臓細胞は次いで、例えば、好ましくは免疫動物と同系の、ミエローマ細胞融合パートナーとの融合によって不死化される。様々な融合技術が使用され得る。例えば数分間、非イオン性界面活性剤と共に脾臓細胞とミエローマ細胞は結合され得、次いでハイブリッド細胞の増殖を支持するがミエローマ細胞の増殖は支持しない選択培地上で低密度でプレートされ得る。好ましい選択技術は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を使用する。十分な期間、通常約1～2週間後、ハイブリッドのコロニーが観察される。単一コロニーが選択され、ポリペプチドに対する結合活性を試験される。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマが好ましい。

【0055】

モノクローナル抗体は増殖しているハイブリドーマコロニーの上清から単離され得る。さらに、収率を増大させるために、マウスなど適切な脊椎動物宿主の腹腔へのハイブリドーマ細胞の注射など、様々な技術が使用される。次いで、モノクローナル抗体は腹水または血液から採取され得る。汚染物は、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈降および抽出などの従来技術により抗体から除去され得る。ヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドは、例えば、アフィニティークロマトグラフィー工程における精製プロセスに使用され得る。

【0056】

本発明に使用されるヒトトランスケトラゼ様-1特異的抗体は、治療剤または他のポリペプチドのいずれかに対する更なる結合部位を含み得るか、あるいは該治療剤またはポリペプチドに結合され得る。治療剤は、薬物、毒素、放射性核種およびその誘導体を含み得る。該薬剤は例えばリンカーまたは担体群によって直接的に、または間接的に結合剤に結合され得る。リンカー群は例えば結合剤と治療剤または他の薬剤との間の結合反応を可能にするために機能するか、または該リンカーは融合分子の別の部位間のスペーサーとして

作用し得る。該リンカーはまた、特定の環境下で分離可能であり得るため、該条件下で結合剤を放出する。治療剤は、担体群に直接に、またはリンカー群を介して共有的に結合され得る。該薬剤はまた、担体に非共有結合的に結合され得る。本発明に使用され得る担体は、例えば、アルブミン、ポリペプチド、多糖類またはリポソームである。

【0057】

本発明に使用されるヒトトランスケトラゼ様-1特異抗体は、1以上の薬剤に結合され得る。1つの抗体に結合された複数の薬剤は、全て同じ種であり得るか、または1つの抗体に結合した数種の異なる薬剤であり得る。

【0058】

本明細書中に開示される方法は、トランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現に関連した障害にかかる傾向のある全ての真核生物に適用可能である。本発明に関連して使用される個体としては、例えば、農業目的の動物（ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタなど）、コンパニオンアニマル（ネコ、イヌなど）、研究使用のために一般に使用される動物（ラット、マウス、ハムスターなど）またはヒトなどの哺乳動物が挙げられる。

【0059】

本発明に関連して使用される診断は、試料中のヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子産物のレベルを測定する工程を含み得る。試料において測定されたヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子産物のレベルに基づいて、個体はサブグループに細分され得る。サブグループは、試料において測定されたトランスケトラゼ様-1遺伝子産物の個々のレベルに関連して、例えば、生存、疾患の再発、転移の頻度など、臨床データに従って作られ得る。

【0060】

これらのサブグループに基づいて、予後の査定が行われ得る。サブグループに従って、腫瘍に冒された個体の治療が仕立てられ得る。

【0061】

例えば、トランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現、ならびに結腸、胃、膵臓および肺の腫瘍の部分集合におけるペントース-ホスフェートサイクルの増大した活性は、チアミン（ビタミンB1）が核酸リボース合成および非酸化的トランスケトラゼ経路を介した腫瘍細胞増殖を促進させる機構を示唆する。その上、癌患者のチアミン取込みはトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現で腫瘍の増殖率に対する直接的な結果を有する。これはまた、予備情報を提供し、臨床設定において抗チアミントランスケトラゼインヒビターでの代替処置に関するガイドラインを創る助けとなる。臨床データおよび実験データはヒト腫瘍のチアミン利用の増加を示し、実験的化学療法での干渉を示す。RNAリボースの分析は、グルコース炭素が、培養した頸部および膵臓癌細胞におけるリボース合成に90%を超えて寄与することを示し、リボースがチアミン依存性トランスケトラゼ経路を介して1次的に合成される（>70%）ことを示す。抗チアミン化合物は、様々な腫瘍モデルにおいて、インビトロおよびインビボでの核酸合成および腫瘍細胞増殖を有意に阻害する。医学文献により、新規の核酸合成およびプリンサルベージ経路における主要プロセスである、腫瘍細胞リボース産生におけるチアミン依存性トランスケトラゼ反応の役割に関する情報がほとんどないことが明らかである。

【0062】

チアミン依存性トランスケトラゼ経路は、腫瘍において核酸にリボースホスフェートを供給する主要な達成手段であるため、過剰なチアミン補充は、癌細胞増殖を終結するための治療的試みの失敗の原因となり得る。トランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現を有する結腸および肺の腫瘍の部分集合の検出は、個々の癌治療に重要な工程を提供し、また、チアミンの制限投与およびトランスケトラゼインヒビターを付随した処置は癌処置のためのより合理的なアプローチである。

【0063】

従って、TKTL1の過剰発現の検出に基づいて、グルコース代謝に関連したホルモンによりペントース-ホスフェートサイクルの特異的な生化学反応をターゲティングし、チアミン取込み、非酸化的トランスケトラゼペントース-ホスフェートサイクル反応の共因子

10

20

30

40

50

を調整するか、または抗チアミンアナログで癌患者を処置する新たな処置ストラテジーが組み立てられる。

【0064】

従って、本発明の1つの態様において、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子の過剰発現を特徴とする障害は、トランスケトラーゼ様-1遺伝子の過剰発現のレベルに従って処置され得る。核酸産生のために選択的に経路を利用して、グルコースを阻害するために非酸化的ペントース-ホスフェートサイクル反応を使用することは、細胞サイクルに強い制御効果を有する癌処置のための新しい標的部位を提供する。

【0065】

1つの態様において、トランスケトラーゼ様-1遺伝子の過剰発現に関連した障害の処置は、冒された個体に対するチアミンの制限投与を含み得る。別の態様において、処置は、例えば抗チアミン化合物などのトランスケトラーゼインヒビターの投与を含み得る。

【0066】

モニタリングは、試料中のヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物の異なる時点で採取したレベルを検出する工程、および該レベルの変化を測定する工程を含み得る。該変化に従い、疾患の進行が続き得る。疾患の進行は個々の個体に対する治療ストラテジーを選択するために使用され得る。

【0067】

本発明の疾患進行の診断およびモニタリングの別の局面は、微小残存病変の検出を含み得る。これは例えば、一回または数回の時点での、個体の初期治療に続く1以上の身体試料におけるヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物レベルの検出を含み得る。試料において検出されたヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物のレベルに従って、個々の個体のための適切な治療を選択し得る。

【0068】

別の好ましい態様において、微小残存病変(MRD)の診断として、生物学的試料において転移した腫瘍細胞を検出するために診断方法が実施される。

【0069】

異常細胞増殖を特徴とする障害は、本発明に関連して使用される場合、例えば、良性および悪性腫瘍などの腫瘍、癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫または形成異常症を含み得る。腫瘍は頭部および頸部の腫瘍、気管の腫瘍、胃腸管の腫瘍、泌尿器系の腫瘍、生殖器系の腫瘍、内分泌系の腫瘍、中枢および末梢神経系の腫瘍、皮膚およびその付属体の腫瘍、軟組織および骨の腫瘍、リンパ球新生および造血系の腫瘍などを含み得る。

【0070】

好ましい態様において、腫瘍は例えば、頭部および頸部の癌、気管の癌、胃腸管の癌、皮膚およびその付属体の癌、中枢および末梢神経系の癌、泌尿器系の癌、生殖器系の癌、内分泌系の癌、軟組織および骨の癌、造血系およびリンパ球新生系の癌である。本発明の最も好ましい態様において癌腫は頸部癌、結腸癌、胃癌、乳癌、膀胱癌などである。

【0071】

本発明の腫瘍は、検出可能なリンパ節関連を示す腫瘍(節陽性腫瘍)ならびに検出可能なリンパ節への広がり無し腫瘍(節ネガティブ腫瘍)を含み得る。本発明の1つの態様において、胃腸管腫瘍は検出可能なリンパ節への広がり無し腫瘍である。

【0072】

本発明の方法の試料は、細胞または細胞残屑を含む任意の試料を含み得る。試料は、例えば、分泌液(胃液、胆汁または唾液など)、スミア、体液(血清、血液、血漿、尿、精液、便など)、生検試料または細胞および組織試料などの臨床関連の試料を含み得る。本発明に関連して使用される場合、生検試料は、例えば器官の内視鏡的手段または針生検により調製される腫瘍の切除試料、組織試料を含み得る。更に、検出されるマーカー分子を潜在的に含む任意の試料が本発明の試料であり得る。

【0073】

かかる試料は例えば、完全な細胞、溶解した細胞、またはタンパク質、ペプチドもしくは

は核酸を含む任意の液体を含み得る。細胞、細胞断片またはヒトトランスクリプターゼ様-1核酸もしくはヒトトランスクリプターゼ様-1タンパク質などのマーカー分子が付着し得る固体も、本発明の試料であり得る。かかる固体は、例えばメンブレン、スライドガラス、ビーズなどを含み得る。

【0074】

試料の調製は、例えば患者からの組織、体液、細胞、細胞残屑の試料を得ることを含み得る。本発明に従って、試料の調製はまた、試料の更なる調製のいくつかの工程（解剖体の調製、溶解細胞の調製、組織アレイの調製、ポリペプチドまたは核酸の単離、ペプチドまたは核酸が固定された固体相の調製または測定された分子が共有結合的にまたは非共有結合的に結合するビーズ、メンブレン、スライドの調製など）を含み得る。

10

【0075】

本発明のヒトトランスクリプターゼ様-1遺伝子産物のレベルの検出方法は、生物学的試料において非常に少量の特異的な生物学的活性分子を検出するために適切な任意の方法である。本発明の検出反応は、核酸レベルまたはポリペプチドレベルいずれかでの検出である。

【0076】

検出は、溶液中で、または固体相に固定された試薬を用いて行われ得る。ポリペプチドまたは核酸などの1以上の分子マーカーの検出が、単一の反応混合物中または2つのもしくは分けられた反応混合物中で行われ得る。あるいは、いくつかのマーカー分子の検出反応が、例えば複数ウェル反応容器中で同時に行われ得る。ヒトトランスクリプターゼ様-1遺伝子産物に特徴的なマーカーは、これらの分子を特異的に認識する試薬を使用して検出され得る。マーカー分子の検出反応は、初期のマーカー分子を認識するか、または他の分子を認識するために使用される先の分子を認識する、いずれかの薬剤を検出する1以上の反応を含み得る。

20

【0077】

検出反応は更に、存在または非存在を示すレポーター反応および/またはヒトトランスクリプターゼ様-1遺伝子マーカーのレベルを含み得る。レポーター反応は、例えば、彩色された化合物を産生する反応、生物発光反応、蛍光反応、一般に放射線放射反応などであり得る。好ましい態様において、異なるマーカー分子が異なるレポーターシグナルを産生する薬剤により認識され得、それによりマーカー分子に対応するシグナルが分類され得る。

30

【0078】

本発明の検出反応のための適切なフォーマットは、ウェスタンブロット、サザンブロット、ノーザンブロットなどのプロッティング技術であり得る。プロッティング技術は、当業者に公知であり、例えば、エレクトロブロット、セミドライブロット、バキュームブロットまたはドットブロットとして行われ得る。増幅反応もまた、例えば核酸分子の検出のためにも適切であり得る。更に、分子の検出のための免疫学的方法、例えば免疫沈降または免疫学的アッセイ（ELISA、RIA、側流（lateral flow）アッセイ、免疫細胞化学方法など）などが適用され得る。

【0079】

本発明の1つの好ましい態様において、試料中に存在するヒトトランスクリプターゼ様-1遺伝子産物またはその断片をコードする核酸のレベルの検出により、ヒトトランスクリプターゼ様-1遺伝子産物のレベルの検出が行われる。核酸分子の検出のための手段は、当業者に公知である。核酸の検出のための手順は、例えば、検出される分子の、相補的な核酸プローブ、該核酸に対して結合特異性を有するタンパク質または該核酸を特異的に認識して結合する任意の他の実体への結合反応によって行われ得る。本方法は、例えば染色反応検出の進行中にインビトロで、ならびにインサイチュで直接行われ得る。本発明の方法で実施される、試料中のヒトトランスクリプターゼ様-1遺伝子産物を核酸のレベルで検出する別の方法は、例えばポリメラーゼ連鎖反応などの定量方法によって行われ得る核酸の増幅反応である。本発明の好ましい態様において、リアルタイムRT PCRが腫瘍の試料中のトランスクリプターゼ様-1RNAのレベルを定量するために使用され得る。

40

50

## 【0080】

本発明の別の好ましい態様において、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物のレベルの検出がタンパク質の発現のレベルを測定することにより行われ得る。タンパク質レベルでのヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物の測定は、例えば、ヒトトランスケトラーゼ様-1タンパク質の検出に特異的な抗体を含む反応において行われ得る。抗体は例えばウエスタンブロット、ELISAまたは免疫沈降といった多くの異なる検出技術において使用され得る。一般に、抗体ベースの検出は、例えば免疫組織学的染色反応の進行において、インビトロで、ならびにインサイチュで直接行われ得る。生物学的試料における個々のポリペプチドの量の測定は、本発明に従って使用され得る。

## 【0081】

本発明の1つの好ましい態様において、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物のレベルは対照試験試料と比較して有意に上昇される。この場合、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子は試料中で過剰発現される。

10

## 【0082】

ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子の発現に関連した障害の診断の一例は、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子によりコードされるポリペプチドに対する自動抗体の検出を含み得る。本発明の方法に使用されるポリペプチドは当業者に公知の方法により、体液中のかかる抗体の存在または非存在を検出するために使用され得る。

## 【0083】

1つの好ましい態様において、トランスケトラーゼ様-1遺伝子産物を発現する組織の検出が、分子イメージング手法の形式で行われる。それぞれの手法は当業者に公知である。本発明に関連して使用されるイメージング方法は、例えば、MRI、SPECT、PETおよびインビボイメージングに適切な他の方法を含み得る。

20

## 【0084】

1つの態様において、本方法は、トランスケトラーゼ様-1分子による分子イメージング方法の経過における、不活性な化合物または標識化合物の、検出可能な分子への酵素的変換に基づき得る。別の態様において、分子イメージング方法は、インビボでトランスケトラーゼ様-1分子に特異的に結合する、インビボ分子イメージングのための適切なラベル（放射線同位体、金属イオンなど）を有する化合物の使用に基づき得る。

## 【0085】

本発明の好ましい態様において、これらの化合物は非毒性化合物であって、時間が経つと、生物（ヒトなど）の循環から排除され得、トランスケトラーゼ様-1遺伝子を過剰発現する腫瘍組織において蓄積された標識の検出を行うことを可能にする。本発明の別の好ましい態様において、化合物は、循環からの除去が分子イメージング反応の実行に関連性の無い、分子イメージングに使用される。これは例えば、循環分子などにより産生される低いバックグラウンドによる。分子イメージング方法での使用のための化合物は、任意の他の適切な物質（例えば他の診断的に有用な物質、治療的に有用な物質、担体物質など）を更に含み得る組成物において薬学的に許容され得る形式で投与される。

30

## 【0086】

本発明の別の局面は、本発明の方法を行う試験キットである。該キットは例えば、診断キットまたは研究キットであり得る。

40

## 【0087】

本発明のキットは、少なくとも本明細書に開示される分子の検出に適切な薬剤を含む。更に、本発明のキットは：

- a) ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物の検出用試薬
  - b) バッファー、検出マーカ、担体物質などの、検出反応の実施に通常使用される試薬およびバッファー
  - c) 陽性対照反応を実施するためのヒトトランスケトラーゼ様-1試料
- を含み得る。

## 【0088】

50

ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子の検出用試薬は、ヒトトランスケトラーゼ様-1分子に結合することが可能な任意の薬剤を含み得る。かかる試薬は、タンパク質、ポリペプチド、核酸、ペプチド核酸、糖タンパク、プロテオグリカン、多糖類、または脂肪を含み得る。

【0089】

陽性対照を実施するためのヒトトランスケトラーゼ様-1試料は、例えば、溶液または塩など適切な形式でのヒトトランスケトラーゼ様-1核酸またはポリペプチドもしくはその断片、適切な形式でのペプチド、組織切片試料または陽性細胞を含み得る。

【0090】

本発明の好ましい態様において、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物の検出がポリペプチドのレベルで実施される。この態様において、結合薬剤は、例えばヒトトランスケトラーゼ様-1またはその断片に特異的な抗体であり得る。

【0091】

試験キットの他の態様において、ヒトトランスケトラーゼ様-1遺伝子産物の検出が核酸レベルで実施される。本発明の態様において、検出用試薬は、例えば核酸プローブまたは前記ヒトトランスケトラーゼ様-1核酸に逆相補的なプライマーであり得る。

【0092】

更なる局面において、本発明は、本発明の方法に有用な、癌（好ましくは結腸癌、膵臓癌、胃癌、肺癌）の処置用の医薬組成物の調製のための、1以上の化合物（核酸分子、置換ベクター、ポリペプチド、アンチセンスRNA配列、リボザイムまたは抗体など）の使用に関する。

【0093】

本発明の方法において有用なポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび結合剤は、医薬組成物または免疫原性組成物に組み込まれ得る。医薬組成物は前記化合物および生理学的に許容され得る担体を含む。

【0094】

医薬組成物またはワクチンは、例えば本発明の1以上のポリペプチドをコードするDNAを含む。DNAはポリペプチドがインサイチュで生成されることを可能にする方法で投与され得る。適切な発現系は当業者に公知である。ポリペプチドの発現は、例えば持続性または一過性であり得る。ポリペプチドのインサイチュ発現のために提供される医薬組成物および/またはワクチンにおいて、核酸発現系、細菌およびウイルス発現系を含む、当業者に公知の任意の適切な送達系内で該核酸が存在し得る。適切な核酸発現系は患者における発現のための必要な調整核酸配列（適切なプロモーター、ターミネーターなど）を含む。細菌送達系は、例えば細胞表面における細胞抗原のエピトープを発現する細菌の投与を使用する。好ましい態様において、核酸は、非病原性の複製能力を有するウイルスの使用に関連し得る、ウイルス発現系（例えば、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルスなど）を使用して導入され得る。適切な系は、例えば、Fisher-Hochら、PNAS 86:317-321, 1989; Flexnerら、Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexnerら、Vaccine 8:17-21, 1990; 米国特許第4,603,112号、第4,769,330号、および第5,017,487号; 国際公開第89/01973号; 米国特許第4,777,127号; GB 2,200,651; EP 0,345,242; 国際公開第91/02805号; Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Rosenfeldら、Science 252:431-434, 1991; Kollisら、PNAS 91:215-219, 1994; Kass-Eislerら、PNAS 90: 11498-11502, 1993; Guzmanら、Circulation 88:2838-2848, 1993; およびGuzmanら、Cir. Res. 73:1202-1207, 1993に開示されている。別の態様において、トランスジェニック哺乳動物細胞が核酸の送達および/または発現に使用され得る。ポリペプチドのインサイチュ発現に適切な核酸構築物を産生する方法は、当業者に公知である。

【0095】

本発明の別の態様において、核酸は、たとえば、アンチセンス構築物であり得る。

【0096】

核酸は、また、裸の核酸として投与され得る。この場合、細胞内に効率的に輸送される

10

20

30

40

50

生物分解性ビーズ上に核酸を被覆するなどの、核酸の取り込みを増強する適切な物理的送達システムが使用され得る。裸の核酸の投与は、たとえば、宿主または宿主細胞内での一過性の発現の目的のために有用である。

【0097】

かわりに、医薬組成物は、1つ以上のポリペプチドを含有してもよい。医薬組成物に組み込まれるポリペプチドは、1つ以上の他の公知のポリペプチド（たとえば、酵素、抗体、調節因子（サイクリン、サイクリン依存性キナーゼまたはCKIなど）、またはトキシン）と組み合わせたヒトトランスケトラゼ様-1ポリペプチドであってもよい。

【0098】

医薬組成物は、当業者に公知の任意の適当な方法により投与され得る。投与は、たとえば、皮内、筋肉内、静脈内または皮下注射などの注射、たとえば、呼吸による鼻腔内投与あるいは口腔内投与を含みうる。治療の薬学的な利益を確実にするのに適当な用量は、患者の年齢、性別、体重などの当業者にとって公知のパラメータにしたがって選択される。

【0099】

本発明の医薬組成物に使用される担体のタイプは、投与形態に依存して変化する。皮下注射などの非経口投与について、担体は、好ましくは水、生理食塩水、アルコール、脂質、ワックスおよび/またはバッファーを含む。経口投与について、任意の上記担体または固形状担体（マンニトール、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、滑石粉、セルロース、グルコース、スクロース、および/または炭酸マグネシウムなど）が使用され得る。生物分解性マイクロスフェア（たとえば、ポリ乳酸グリコリド）もまた本発明の医薬組成物用担体として使用され得る。適当な生物分解性マイクロスフェアは、たとえば、米国特許第4,897,268号明細書および第5,075,109号明細書に開示されている。

【0100】

本発明の化合物は、さらに、免疫原性組成物に組み込まれ得る。

【0101】

免疫原性組成物の成分は、ワクチン、抗原、抗原性断片またはインサイチュで発現される抗原もしくは抗原性断片をコードする核酸を含みうる。この組成物は、ポリペプチドとして、または核酸として存在し得、これはポリペプチドがインサイチュで発現されることを可能にしている。免疫原性組成物は、かかる化合物および加えて免疫刺激剤または免疫原性アジュバントを含有する。

【0102】

ヒトトランスケトラゼ様-1タンパク質の免疫原性部分を含む本発明のポリペプチドまたはその断片は、免疫原性組成物に使用され得、ここでポリペプチドは、たとえば、腫瘍細胞に対する患者自身の免疫応答を刺激する。患者は、疾患にひどく悩まされるか、検出できる疾患についてフリーな状態である。したがって、ここで開示される化合物は、癌を治療するためまたは癌の発達を阻害するために使用され得る。この化合物は、初期の腫瘍の外科的摘出、放射線療法の適用による治療、通常の化学療法的方法または関連する癌またはその前駆体の任意の他の形態の治療などの通常の治療の前または後のいずれかに投与され得る。

【0103】

ワクチンなどの免疫原性組成物は、1つ以上のポリペプチドおよび非特異的免疫応答エンハンサーを含有し得、ここで非特異的免疫応答エンハンサーは、外因性抗原に対する免疫応答を引き出すまたは増強することができる。非特異的免疫応答エンハンサーには、アジュバント、生物分解性マイクロスフェア（たとえば、ポリ乳酸ガラクトシド）、たとえばポリペプチドが組み込まれたリポソームが含まれる。医薬組成物およびワクチンは、また、上記のような融合タンパク質（すなわち、複数のエピトープを含む単独のポリペプチド）に組み込まれるか別のポリペプチド内に存在するかのいずれかの腫瘍抗原の他のエピトープを含みうる。

【0104】

10

20

30

40

50

任意の適当な免疫応答エンハンサーは、本発明のワクチンに使用され得る。たとえば、アジュバントが含まれ得る。大部分のアジュバントは、水酸化アルミニウムまたはミネラルオイルなどの急性の異化作用から抗原を保護するために設計された物質、およびリピッドA、ボーデテラ・ペルツシス (*Bordetella pertussis*) またはマイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) などの免疫応答の非特異的刺激剤を含む。かかるアジュバントは、たとえば、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) およびメルク (Merck) アジュバント (Merck and Company, Inc. Rahway, N.J.) として市販されている。

**【0105】**

治療目的のために、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは結合剤は、種々の方法で投与され得る。可能性のある方法は、たとえば、皮内、筋肉内、静脈内または皮下注射、たとえば呼吸による鼻腔内投与、または経口投与を含み得る。

**【0106】**

本発明の別の局面は、治療および/またはワクチン接種の方法を提供することである。本発明によれば、細胞増殖疾患の治療は、ヒトトランスケトラーゼ様-1ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドを用いて行うことができる。治療は、たとえば、免疫療法または体細胞遺伝子治療であってもよい。

**【0107】**

ヒトトランスケトラーゼ様-1ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドは、本発明にしたがって、細胞増殖疾患に対するワクチン接種のために使用され得る。本発明のワクチン接種は、免疫原性化合物に対する免疫応答を刺激することを目的として免疫原性化合物を個体に投与し、したがって免疫原性化合物に対して個体を免疫することを含む。免疫応答を刺激することは、かかる化合物に対する抗体の産生を誘導し、ならびに細胞毒性T細胞を刺激することを含み得る。ワクチン接種のために、本発明のポリペプチド、核酸および結合剤は、生理学的に許容され得る形態で投与され得る。個体へ投与される組成物は、1つ以上の抗原成分、生理学的に許容され得る担体物質またはバッファー溶液、免疫刺激剤および/またはアジュバントを含有し得る。アジュバントは、たとえば、フロイント不完全アジュバントまたはフロイント完全アジュバントまたは当業者に公知の他のアジュバントを含み得る。

**【0108】**

前記組成物は、たとえば、静脈内、皮下、筋肉内などの任意の適用可能な方法で投与され得る。この組成物の用量は、特定の場合およびワクチン接種の目的に依存する。これは、年齢、体重、性別などの、試験された個体によるパラメータに適合させなければならない。さらに、誘導された免疫応答のタイプに気を配らねばならない。一般に、個体が100  $\mu\text{g}$  ~ 1 gの本発明のポリペプチドまたはインサイチュで発現し得る形態で本発明の核酸を含有する $10^6 \sim 10^{12}$  molの組み換え核酸を受けることが好ましいだろう。

**【0109】**

ワクチン接種のための個体は、トランスケトラーゼ様-1タンパク質を含み、且つ細胞増殖疾患により影響を受け得る任意の生物であり得る。

**【0110】**

個体のワクチン接種は、たとえば、改変された、非野生型配列または細胞増殖疾患に関連したマーカー分子の構造の場合に好ましいだろう。

**【0111】**

本明細書で開示されるポリペプチドは、癌治療用の養子免疫療法にも使用され得る。養子免疫療法は、能動的または受動的のいずれかの免疫療法に大雑把に分類され得る。能動的な免疫療法において、治療は、免疫応答改変剤 (たとえば、腫瘍ワクチン、細菌性アジュバント、および/またはサイトカイン) の投与による腫瘍に対して反応する内因性の宿主免疫系のインビボ刺激に依存している。

**【0112】**

受動的な免疫療法において、治療には、抗腫瘍作用を直接的または間接的に媒介でき、

かつ無傷の宿主免疫系に必ずしも依存していない、確立された腫瘍 - 免疫反応性を有する生物学的薬剤（エフェクター細胞または抗体など）の送達が含まれる。エフェクター細胞の例には、開示される抗原を発現するTリンパ球（たとえば、CD8+細胞障害性Tリンパ球、CD4+ Tヘルパー、腫瘍浸潤リンパ球）、キラー細胞（ナチュラルキラー細胞、リンホカイン活性化キラー細胞など）、B細胞、または抗原提示細胞（樹状細胞およびマクロファージなど）が含まれる。本明細書で開示されるポリペプチドは、消極的な免疫療法についての抗体または抗イディオタイプ抗体を産生するのにも使用され得る（米国特許第4,918,164号明細書）。

#### 【0113】

養子免疫療法のための適当な数のT細胞を得る優れた方法は、インビトロで免疫T細胞を成長させることである。単独の抗原特異的T細胞をインビボにおける抗原認識の保持に関して数の上で数十億に増幅するための培養条件は、当該分野で周知である。これらのインビトロ培養条件は、典型的に、抗原を伴う断続的な刺激を、しばしばIL-2などのサイトカインおよび非分裂支持細胞の存在下で利用している。上記に示されたように、本明細書に記載の免疫応答ポリペプチドは、十分な数の免疫療法用細胞を産生するために抗原特異的T細胞培養物を急速に拡大するのに使用され得る。特に、樹状、マクロファージまたはB細胞などの抗原提示細胞は、当該分野で周知の標準的な技術を用いて、免疫応答ポリペプチドを適用されるか、または核酸配列でトランスフェクトされ得る。たとえば、抗原提示細胞は、発現増強に適切なプロモーター領域を含み、組み換えウイルスまたは他の発現系の一部として発現され得る核酸配列でトランスフェクトされ得る。治療に有効とされる培養されたT細胞に関して、この培養されたT細胞は、広範囲に成長および分布することができ、インビボで長期間生存することができる。研究により、IL-2を補足した抗原で繰り返し刺激することで、培養されたT細胞がインビボで成長し、かなりの数が長期間生存するように誘導することができることが示されている（たとえば、Cheever, M,ら、"Therapy With Cultured T Cells: Principles Revisited," Immunological Reviews, 157:177,1997を参照）。

#### 【0114】

本明細書に開示されるポリペプチドは、また、腫瘍活性化T細胞を産生および/または単離するのに使用され得、これは次いで患者に投与され得る。一つの技術において、抗原特異的T細胞株は、開示されたポリペプチドの免疫原性部分に対応する短いペプチドを用いるインビボ免疫により産生され得る。得られる抗原特異的CD8+ CTLクローンは、患者から単離され、標準的な組織培養技術を用いて増幅され、患者に戻され得る。

#### 【0115】

あるいは、本発明のポリペプチドの免疫原性部分に対応するペプチドは、自系T細胞の選択的なインビトロでの刺激および拡大により腫瘍反応性T細胞サブセットを産生するのに使用され得、これは、次いで、たとえばChangらに記載されたように患者に移され得る（Crit. Rev. Oncol. Hematol., 22(3), 213, 1996）。T細胞などの免疫系の細胞は、セルプロ（CellPro）インコーポレイテッド製（Bothell, Wash.）CEPRATE<sup>TM</sup>などの市販の細胞分離システムを用いて患者の末梢血から単離され得る（米国特許第5,240,856号明細書、米国特許第5,215,926号明細書、W089/06280号、W091/16116号およびW092/07243号参照）。分離された細胞は、マイクロスフェアなどの、送達ビヒクル内に含有された1つ以上の免疫応答ポリペプチドで刺激され、抗原特異的T細胞を提供する。腫瘍抗原特異的T細胞群は、次いで、標準的な技術を用いて拡大され、この細胞は、患者に投与して戻される。

#### 【0116】

別の態様において、ポリペプチドに特異的なT細胞レセプターおよび/または抗体レセプターは、クローン化され、拡大され、そして養子免疫療法で使用するための他のベクターまたはエフェクター細胞に移される。

#### 【0117】

さらなる態様において、同系のまたは自系の樹状細胞は、少なくとも本明細書に記載さ

れるポリペプチドの免疫部分に相当するペプチドを適用され得る。得られた抗原特異的樹状細胞は、患者に移され、またはT細胞を刺激するのに使用されて、抗原特異的T細胞を得てもよく、これは順に患者に投与され得る。抗原特異的T細胞を産生するためのペプチド適用樹状細胞の使用およびマウスモデル中の腫瘍を全滅するためのかかる抗原特異的T細胞の使用は、Cheeverら、Immunological Reviews, 157:177,1997により示されている。

【0118】

さらに、開示された核酸を発現するベクターは、患者から取り出した幹細胞に導入され、同じ患者に自系移植片を戻すためにインビトロでクローニング的に増殖させ得る。

【0119】

本発明のモノクローナル抗体は、また、腫瘍を減少させるまたは取り除くために治療化合物として使用され得る。抗体は、それ自体（たとえば、転移を阻害するために）使用され、または1つ以上の治療剤と連結され得る。この点で適当な薬剤には、放射核種、分化インデューサー、ドラッグ、トキシン、およびそれらの誘導体が含まれる。好ましい放射核種には90Y、123I、125I、131I、186Re、188Re、211At、および212Biが含まれる。好ましいドラッグには、メトトレキサート、ならびにピリミジンおよびプリンアナログが含まれる。好ましい分化インデューサーには、ホルボールエステルおよびブチル酸が含まれる。好ましいトキシンには、リシン、アブリン、ジフテリア(diphtheria)トキシン、コレラトキシン、ゲロニン(gelonin)、シュードモナスエキソトキシン、シゲラトキシン、およびヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が含まれる。

10

【0120】

トランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現に関連する疾患のさらなる治療方法は、個体または個体の細胞におけるトランスケトラゼ様1ポリペプチドの活性の低減に適当な任意の方法を含み得る。これらの方法は、遺伝子発現の低減によるまたは酵素活性の低減による、トランスケトラゼ様-1ポリペプチドの活性の低減を含み得る。例として、アンチセンス構築物の投与、リボザイムの投与、酵素インヒビターの投与、トランスケトラゼ様-1ポリペプチドの補因子のアンタゴニスト（たとえばチアミン化合物）の投与または酵素活性用の本質的な補因子（たとえばチアミン）の低減された投与を含む。

20

【0121】

リボザイムまたはアンチセンス構築物の投与方法は、当業者に公知である。投与は、裸の核酸の投与または関連した活性産物のインサイチュでの発現に適した核酸の投与として

30

【0122】

一つの好ましい態様において、トランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現に関連した疾患の治療は、抗チアミン化合物の投与、またはトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現で特徴付けられる疾患を示す個体についてのチアミンの取り込みの低減を含む。

【0123】

さらなる態様において、本発明は、本発明の方法を用いられた場合にTKTL1ポリペプチドまたはかかるポリペプチドを発現している細胞を、細胞増殖の変更された調節についてトランスケトラゼ活性に応答して検出できるシグナルを提供することができる成分の存在下で接触させて、トランスケトラゼ活性または細胞増殖の変更された調節から生じるシグナルの有無またはシグナルの増大を検出する工程を含む、結腸、胃、脾臓または肺の腫瘍の治療用の薬物候補を同定し獲得する方法に関する。ここで、シグナルの有無は、推定される薬剤を示す。

40

【0124】

薬物候補は、単独の化合物または複数の化合物であり得る。本発明の方法における用語「複数の化合物」は、同一であってもなくてもよい複数の物質として理解されるべきである。

【0125】

かかる化合物または複数の化合物は、化学的に合成または微生物学的に産生されおよび/またはたとえば、試料（たとえば、植物、動物または微生物からの細胞抽出物など）に

50

において構成され得る。さらに、該化合物は、当該分野で公知であり得るが、TKTL1ポリペプチドを抑制するまたは活性化することができることはこれまでは知られていない。反応混合物は、無細胞抽出物でもよく、あるいは細胞または組織細胞を含んでもよい。本発明の方法の適切なセットアップは、当業者に公知であり、たとえば、Albertsら、Molecular Biology of the Cell, 第三版(1994)および添付の実施例に一般的に記載されている。複数の化合物は、たとえば、反応混合物、培養培地に添加され、細胞内に注入され、またはそうでなければトランスジェニック動物に適用され得る。本発明の方法において使用される細胞または組織は、好ましくは、上記の実施態様に記載される本発明の宿主細胞、哺乳動物細胞または非ヒトトランスジェニック動物である。

【0126】

化合物または複数の化合物を含有する試料が本発明の方法で同定される場合、TKTL1を抑制または活性化することができる化合物を含有すると同定された元の試料から化合物を単離することができ、あるいは複数の異なる化合物からなる場合、試料あたりの異なる物質の数を低減するために、元の試料をさらに再分し、元の試料の再分を用いて上記方法を繰り返すことができる。試料の複雑さに応じて、上記の工程は、数回、好ましくは本発明の方法にしたがって同定した試料が限定された数のまたは唯一の物質を含むだけになるまで、行うことができる。好ましくは、前記試料は、類似の化学的および/または物理的特性の物質を含み、最も好ましくは、該物質は同一である。

【0127】

本発明の方法にしたがって試験され、同定され得る化合物は、ペプチド、タンパク質、核酸、抗体、低有機化合物、ホルモン、ペプチド模倣物、PNAなどであり得る。

【0128】

上記の方法により単離された化合物は、アナログ化合物の開発用の模範化合物としても役立つ。アナログは、模範化合物と実質的に同じ方法で重要な官能基をTKTL1に存在させることができる安定化された電気の配置および分子の立体配座を有する。特に、アナログ化合物は、結合領域に類似の空間的電気特性を有するが、模範化合物よりも低分子であり得、しばしば分子量約2kD未満、好ましくは約1kD未満の分子量を有する。アナログ化合物の同定は、首尾一貫した領域(self-consistent field)(SCF)の分析、立体配置相互作用(CI)の分析、および正常な形態の動力学分析などの技術を使用して行うことができる。これらの技術を実施するためのコンピュータプログラムは、たとえば、レセプター-リガンド相互作用のレイン(Rein)コンピュータ補助モデリングを利用できる(Alan Liss, New York, 1989)。化学的誘導体およびアナログの調製方法は、当業者に周知であり、たとえば、Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer編, New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 U.S.A.およびOrganic Synthesis, Wiley, New York, USAに開示されている。さらに、この誘導体およびアナログは、当該分野で公知の方法にしたがってそれらの効果を試験することができる;上記も参照。さらに、適当な誘導体やアナログの設計を支援するペプチド模倣物および/またはコンピュータは、たとえば、上記方法にしたがって使用することができる。

【0129】

前記化合物が同定され得られていれば、治療許容形態で提供されるのが好ましい。

【0130】

本発明は、たとえば癌などの異常な細胞増殖により特徴付けられる疾患の検出および治療方法を提供する。ある局面では、本発明は、生物学的試料におけるヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子発現の有無および/またはその発現レベルの決定に基づく、たとえば癌などの異常な細胞増殖により特徴付けられる疾患の検出方法を提供する。第2の局面において、本発明は、治療活性剤としてヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子産物を用いる、たとえば癌などの異常な細胞増殖により特徴付けられる疾患の治療方法を提供する。本発明は、また、トランスケトラゼ様-1遺伝子ポリペプチドの酵素活性の低減に基づく、治療方法を提供する。本発明の一つの局面では、患者試料中のトランスケトラゼ様-1遺伝子産物の検出および該遺伝子産物の検出された過剰発現に関連した治療の適応に基づく、合理

10

20

30

40

50

的な腫瘍管理方法を提供する。さらに、本発明は、ヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子の過剰発現の有無および/またはそのレベルの検出に関する反応を行うための研究または診断試験キットを提供する。最後に、本発明は、本発明にしたがう疾患治療に適用できる医薬組成物に関する。

【0131】

以下の実施例は、単に説明の目的で提供されたものであり、本明細書に開示する発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0132】

実施例1：結腸癌種組織におけるヒトトランスケトラゼ様-1mRNAレベルの決定

腫瘍生検の解剖体は、インサイチュ染色反応におけるヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子のmRNAレベルについて半定量的に分析され得る。染色反応は、以下のように行う：

【0133】

組織の解剖体を、100%エタノールまでエタノール濃度を上げてインキュベートする。アルコールのエバポレート後、解剖体を組織の前処理として10mMクエン酸塩バッファー(pH6.0)中で煮沸する。50 $\mu$ lの既製品のハイブリダイゼーションバッファー(DAKO A/S, Glostrup, Danmark)を約5~10pmolのプロープと混合することにより、ハイブリダイゼーション混合物を調製する。このプロープは、以下の配列の蛍光標識されたオリゴヌクレオチドである：

TCTCATCACAAGCAGCACAGGAC

【0134】

ハイブリダイゼーション混合物を95 $^{\circ}$ Cに加熱し、その後37 $^{\circ}$ Cに釣り合わせる。煮沸処置後、解剖体を各50 $\mu$ lのハイブリダイゼーション混合物とともに37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートする。解剖体を過剰容量の洗浄バッファー中において、2 $\times$ SSC中室温、15分間で2回、1 $\times$ SSC中50 $^{\circ}$ C、15分間で1回洗浄する。次いで、解剖体を2 $\times$ SSC中室温で2回リンスする。この洗浄処理後、解剖体を30分間ブロックバッファー(NEN, Blockingpuffer)を用いて室温でインキュベートする。次いで、1時間、1:100希釈した(ブロッキングバッファー中、上記参照)抗フルオレセインAP(DAKO A/S)とインキュベートする。解剖体を次いで2回、1 $\times$ PBS/0.1%トリトン $\times$ 100中において、10分間室温で洗浄し、続いて1回、1 $\times$ PBS、50mM MgCl<sub>2</sub>(pH9.2)を用いる洗浄工程を10分間、室温で行う。

【0135】

次いで、染色反応をNBT/BCIP(Sigma)を用いて約30分間室温で行う。染色反応はPBS中の1mM EDTAを用いた短時間のインキュベーションにより停止される。最後に解剖体をH<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>中にさっと浸け、アクアテックス(Aqua Tex)(Merck)で固定する。次いで、染色した解剖体を顕微鏡によって分析することができる。

【0136】

結果は、ヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子が正常な結腸組織に比べて、結腸癌組織において過剰発現されていることを示す。

【0137】

実施例2：半定量的RT-PCRを用いる癌種の組織および対照組織におけるヒトトランスケトラゼ様-1遺伝子およびトランスケトラゼレベルの決定

結腸癌、肺の腺腫、および胃癌の試料を、半定量RT-PCRを用いてヒトトランスケトラゼ様-1mRNAのレベルおよびヒトトランスケトラゼmRNAのレベルを決定するのに使用する。腫瘍生検をこの実験に使用する。

【0138】

腫瘍を回収し、簡易に凍結して、-80 $^{\circ}$ Cで保存する。それらは組織病理学分析により新生細胞の大部分を構成していることが確認されている。クイアゲン(Qiagen)試薬(Quiagen, Hilden, Germany)を用いて、腫瘍および患者に適合する正常な組織からmRNAを単離し、1本鎖cDNAを、スーパースク립ト(Superscript)II(Life Technologies, Inc.)を用いて合成する。製造業者のマニュアルに記載されるように、7700シーケンスディ

10

20

30

40

50

テクター (Taqman TM) および SYBR グリーン PCR マスター - ミックスを用いて定量的 PCR を行う (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

【0139】

PCR 反応は、25  $\mu$  l 容量で、各プライマーについて終濃度 300 nmol で、95 15 秒間、60 60 秒間を 40 サイクル行う。以下のプライマーを定量的 PCR に使用する：

トランスケトラゼ様 -1： プライマー A：CACCTTGGGATTCTGTGTGC

プライマー B：TCTCATCACAAGCAGCACAG

トランスケトラゼ： プライマー A：TGTGTCCAGTGCAGTAGTGG

プライマー B：ACACTTCATACCCGCCCTAG

【0140】

PCR 産物の特異性をゲル電気泳動により確認する (データ示さず)

【0141】

結果は、ヒトトランスケトラゼ様 -1 遺伝子が正常な対照組織に比べて、10 つのうちの 1 つの結腸癌、5 つのうちの 2 つの肺腺腫、および 5 つのうち 3 つの胃癌において高く過剰発現されることを示す。

【0142】

特に、試料中におけるトランスケトラゼ様 -1 遺伝子の過剰発現の程度は、顕著である。全部で 20 つのうち 6 つの癌種では、TKTL1 遺伝子の 8 倍を超える過剰発現を示している。対照的に、トランスケトラゼ遺伝子は、有意に過剰発現される場合はない。

【0143】

結果は、異なる起源の癌の部分集合においてトランスケトラゼ様 -1 遺伝子が過剰発現されることを示す。トランスケトラゼ遺伝子は、反対に試験された腫瘍組織で区別して発現されない。

【0144】

実施例 3：癌の組織試料における tktl1 の過剰発現の免疫化学的検出

ホルマリン固定した、パラフィン包埋胃組織試料の切片を tktl1 に対する抗体を用いて免疫化学的に染色した。

【0145】

キシレンおよび段階的にしたエタノール中でのインキュベーションを経て切片を再水化し、アクア・ビDEST (Aqua bidest) に移した。抗原検索を、10 mM クエン酸塩バッファー (pH 6.0) を用いて行った。したがって、スライドを水浴中で、40 分間、95 で加熱した。スライドを 20 分間で室温まで冷却し、洗浄バッファー (PBS / 0.1% Tween20) に移した。

【0146】

内因性ペルオキシダーゼの不活性化のために、試料を 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と 10 分間室温でインキュベートし、その後、PBS / 0.1% Tween20 中で 10 分間洗浄する。

【0147】

スライドを次いで一次抗体、マウス抗 tktl1 (1:300) とともに 1 時間室温でインキュベートし、スライドを次いで洗浄バッファーでリンスし、新しいバッファー浴中に 5 分間置いた。使用した抗体は、ヒト tktl1 の図 7 中の太字で示されたタンパク質配列に対して指向される。

【0148】

その後、スライドを二次抗体 (ヤギ抗マウス (1:500)) とともに 1 時間室温でインキュベートした。洗浄は、3 回 5 分間行った。スライドを 200  $\mu$  l 基質 - 色原体溶液 (DAB) で 10 分間覆った。次いで、スライドを既に述べたように洗浄し、ヘマトキシリンの浴中で 2 分間対比染色した。残存するヘマトキシリンを蒸留水でリンスし、試験片を標本にして、水溶性マウンティング溶剤でカバーガラスをつけた。

【0149】

スライドの顕微鏡検査は、胃癌のサンプルとして顕微鏡的に同定され得る、tktl1 に免疫応答する細胞が試料中に見られ得ることを示す。癌種において、tktl1 特異的染色は、

10

20

30

40

50

核および細胞質において目視できる。また、顆粒の染色パターンが、腫瘍細胞において観察された。

【0150】

前記免疫組織化学的染色手法は、さらに、乳癌、肺癌、子宮頸癌(CINIII)、胃癌、咽頭癌、子宮内膜癌、卵巣癌由来の組織に適用された。これらすべての場合において、tktl1について核および細胞染色は、癌細胞で観察することができた。

【0151】

さらに肝臓に局在する結腸直腸癌からの転移は、前記のように免疫化学的手法により解析した。結果は、tktl1タンパク質の強い過剰発現を示した。

【図面の簡単な説明】

10

【0152】

【図1】図1：大腸癌腫におけるRT-PCRによるトランスケトラーゼ様-1遺伝子の過剰発現の検出；図は、対照組織と比べた大腸癌腫の組織におけるトランスケトラーゼ様-1遺伝子の発現の誘導を示す。

【図2】図2：肺腺腫におけるRT-PCRによるトランスケトラーゼ様-1遺伝子の過剰発現の検出；図は、対照組織と比べた、肺腺腫の組織におけるトランスケトラーゼ様-1遺伝子の発現の誘導を示す。

【図3】図3：胃癌腫におけるRT-PCRによるトランスケトラーゼ様-1遺伝子の過剰発現の検出；図は、対照組織と比べた胃癌腫の組織におけるトランスケトラーゼ様-1遺伝子の発現の誘導を示す。

20

【図4】図4：大腸癌腫におけるRT-PCRによるトランスケトラーゼの過剰発現の検出；図は、対照組織と比べた大腸癌腫の組織におけるトランスケトラーゼの発現の誘導を示す。

【図5】図5：肺腺腫におけるRT-PCRによるトランスケトラーゼの過剰発現の検出；図は、対照組織と比べた肺腺腫の組織におけるトランスケトラーゼの発現の誘導を示す。

【図6】図6：胃癌腫におけるRT-PCRによるトランスケトラーゼの過剰発現の検出；図は、対照組織と比べた胃癌腫の組織におけるトランスケトラーゼの発現の誘導を示す。

【図7】図7：tktl1のDNAおよびアミノ酸配列；抗体産生のための免疫化に使用されるタンパク質の部分は太字で示される；さらに、抗体産生のためのペプチド免疫化に使用されたペプチドに下線を付す。

【図8】図8：tktl1に対する一次抗体を使用する胃癌腫(B)および対応する正常組織(A)の免疫組織化学的解析。患者1666の癌腫において、tktl1タンパク質の強力な過剰発現が検出されうる。

30

【図9】図9：tktl1に対する一次抗体を使用する胃癌腫患者1682(A)および1697(B)の免疫組織化学的解析。患者1682の癌腫において、tktl1タンパク質の強い過剰発現が核および細胞質において検出されうる。患者1697の癌腫において、tktl1タンパク質の非常に強い過剰発現が核および細胞質において検出されうる。

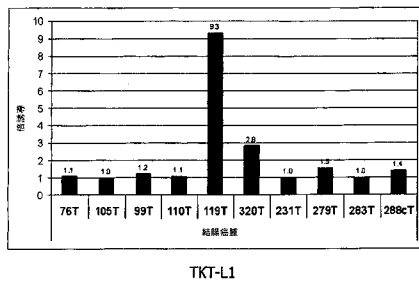
【図10】図10：tktl1に対する一次抗体を使用する胃癌腫患者1699の免疫組織化学的解析。図Aは正常組織の領域を有する癌腫を示す。正常組織においてtktl1の低い発現が検出される一方で、tktl1の強い過剰発現が癌腫の腫瘍細胞に存在する。正常組織と腫瘍組織との境界の拡大図はBに示される。腫瘍特異的顆粒染色パターンが検出されうる。

40

【図11】図11：tktl1に対する一次抗体を使用する胃癌腫患者1698の免疫組織化学的解析。図Aにおいて、tktl1タンパク質の強い過剰発現が、胃腫瘍細胞の核および細胞質において検出されうる。周囲の繊維芽細胞では、低い発現が検出されうるか、または発現は存在しない。周囲の連結組織を有する癌腫細胞の領域の拡大図はBに示される。腫瘍特異的顆粒染色パターンが検出されうる。

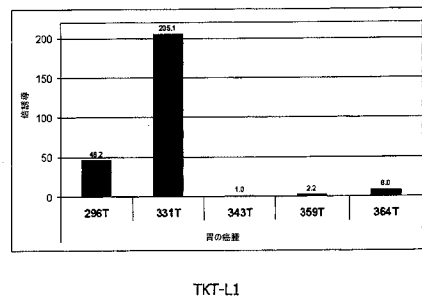
【 図 1 】

Figure 1:



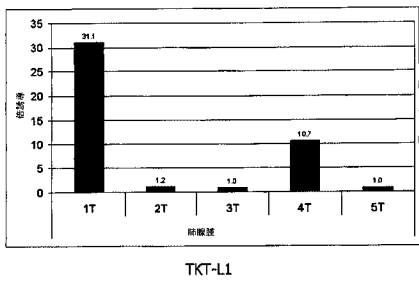
【 図 3 】

Figure 3:



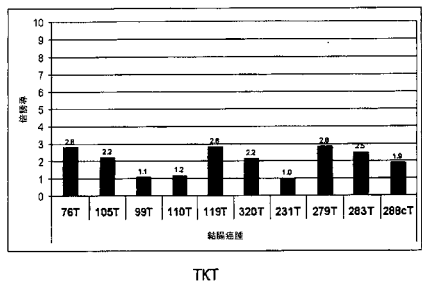
【 図 2 】

Figure 2:



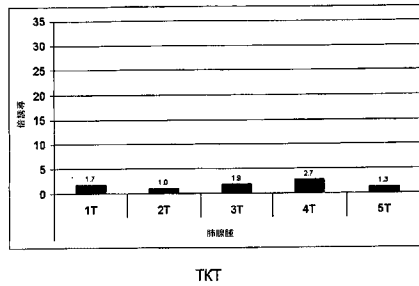
【 図 4 】

Figure 4:



【 図 5 】

Figure 5:



【 図 7 - 1 】

Fig. 7: TKT-L1 のDNAおよびアミノ酸配列

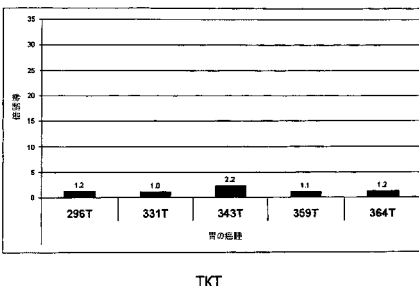
```

1  GCCATTGCGCTCTTCAGAGCCCGGAGAGCTAGAGATGGTCTTCAGACTCCAAGGGGTTG
61  GACTAATGGGGATGTCGAGGCGAGGGCTGAGTTCGGGAGGCGCAGACTGCAGGG
   M A D A E A R A B F P E E A R P D R G
121  GCACCTTCGAGGTGTCCAGATATGGCCAGCCCTTGGCAATCCATCCATCGGGCCA
   T L Q V L Q D M A S R L R I H S I R A T
181  CATGCTCCAGAGCTCCGGCCACCCCTACATCATGTAGCAGTCTCTCGAGATCATGCTG
   C S T S S G H P T S C S S S S E I M S V
241  TCGTGTCTTCTACATCATGAGGTACAGCAGTCCAGATCCAGAGATCCGGACAAAGCC
   L F F Y I M R Y K Q S D P E N P D N D R
301  GATTTGTCCTCCGAAAGAGACTGTGCTTGTGGATGTGGCAAGAGATGCTCCGACAAAG
   F V L A K R L S F V D V A T G W L G Q G
361  GACTGGAGTTCGATGGAAATGGCATATCTGGCAAGTACTCCGACGGCCAGCTACC
   L G V A C G M A Y T G K Y F D R A S Y R
421  GGGTGTCTGCTCATGAGTGAAGCCAGTCTCCGAAAGGCTTGTCTGGAGGCAATGG
   V P S L W S D Q E S S E G C V W E A H A
481  CCTTGTCTCCAGTACAGCTGCGACAACTTGTGGCAAGCTTGGATGACAGCCGCTGG
   F A S L Y S L E D N L V A I F D V N R L G
541  GGCAGATGGTGCATTCGCGGAGAGACTCCATAGCATCTACAGAGGCTCCGAAAG
   H B G A L P A E H C I N I Y Q R R C E A
601  CCTTGGTGGAGCACTATGTTGGTGGAGCCCGGAGCTGGAGGCTGTGGCAGATAT
   F G M N T Y V V D G R D V H A L C Q V F
661  TCTGGAGGCTTCTGAGTGAAGCAGAGCCACTCTCTGTGGTGGCAAGCTTCAAGG
   W Q A B Q V K H K P T A V V A K T F K G
721  GCGGGGACCCCAAGTATTCAGAGTCCAGAAATGGCATGCAAGCCATCCCGAGAG
   R G T P S I E D A E S W H A K P M F R E
781  AAAGACAGATGCCATTAACAATTAATGAGAGCCAGATACAGACGAGGAACTTGG
   R A D A I I K L I E S Q I Q T S E R N E D
841  ACCCAGAGCCCGCAATGGAGACTCCCTGAGTCAACATCAGATGTAAGATGACCT
   P Q P P Y E D R E V N I T D V R N T S
901  CTCACCTGATTCAGAGTTCGTAAGATGCTACTGCGAAGCATCGGCTCGGCTC
   P P D Y R V G D K I A T R K A C G L A L
961  TGGTAAAGCTGGGCTACCGAAGCAGAGTCTGCTGCTGATGATGACACAGTACT
   A K L G Y A N N R V Y V L D G D T R Y S
1021  CTACTTCTTCAGATATTCAGAGAGAGTACCTGAGGCTTATGAGGCTTATG
   T P S R E L F N K E Y D E R F I E C T M A
1081  CTGAACAAAGTGGTGGAGCCGCTTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAG
   R Q S H V S V A L L G C A S R G R T T A F
1141  TGTAGAGCTTTCGCTTCTGAGTCCAGCACTGAGCACTTACACATCCGAGTGGGGCC
   R S T P A A F L T R A P D H I R I G G L

```

【 図 6 】

Figure 6:



【 図 7 - 2 】

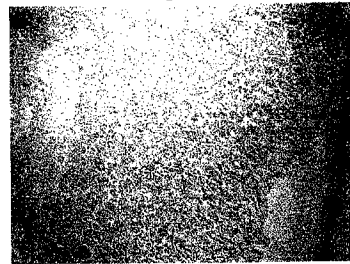
```

1261 TCGCTGAGGACACATACACATTATGGTCCCACTGTGGGATCTGTGTGTAAGATG
    A P S N I M I T G S H C G V S V S D D G
1261 GTCCTCCGAGATGGCCCTGAGGATATAGCCATGTTCCGAAACCTCCGAGTGACGA
    A S Q M A L B D I A M F E T T F R C T I
1321 TCTTACCCCACTGATGCTGCTCCGAGAGCAGCTGTCTCTGCGAGCCAAAGGCA
    F Y P T D A V S T E H A V A L A A N A K
1381 AGGGATGTGCTTCATTCGAGACCCGACAGAACTATGGTATTACACCCACAG
    G M C P I R T T R P E T M V I Y T P Q E
1441 AACCCITTAGATCGAGAGGCGAGGCTCCCGCACTGTGCACTGACAGGTACAG
    R F E I G Q A K V L R H C V S D K V T V
1501 TTATTGAGCTGGAATTACTGTATGAGCCCTTAGCAGCTGCTGATGAGCTTCCGAA
    I G A G I T V Y E A L A A A D E L S K Q
1561 AAGATATTTTATCCGCTGATCGACCTGTTACCATTAACCTCTGATGTCGCCCA
    D I F I R V I D L F T I K P L D D V A T I
1621 TCGTCTCCAGTCAAAAAGCCACAGAGGCGGATCATTACAGTGGAGGATCACTACCG
    V S S A K A T E G R I I T V E D H Y P Q
1681 AAGTGGATCGGGAGCTGTCTGGCAGCCGCTCCCATGATCCTGACATTCAGGTC
    G G I G E A V C A A V S M D P D I Q V H
1741 ATTGCTGGCAGTCCGGAGTCCCGAGAGTGGGAGTCCGAGAAATCTCGATATGT
    S L A V S G V P Q S G K S E E L L D M Y
1801 ATGGAAATATCCGACACATATCATNGCCCGTAAATGATGCTGCACTAAATA
    G I S A R H I I V A V K C M L L N *
1861 GCTGTAGCTTGGTCTTTGGCTCTTACCCCTGTTATGTTGTTCCAAAACATC
1921 ATTTAATCTCCTGTCACATTTGTTCTTAAAGCAAGCCAGTACACCTTCAT
1981 CATUCCGTAGTGGGAATTCAGCTAACTACTTACCCCTTAACTGTCACTCATATGA
2041 AGTACCGCTTAATTTTGGATCATTAAGGGAGTTCACAACTTTAAGTGAARAAAT
2101 AAGTACAAACAACCACTGATAGTAAAGTTTGTGATAAGCTATAGATAAGTGTAGA
2161 GGTAAATCAATCTTCCGAGTGTTCCTTCTGGATTAAGTGGTGGTAAAGTATTTT
2221 CATGTATTTCCCTCATGTAAGAAATGTGGATTAAGTATAGATCCAGTAGCTTA
2281 GTTCCACAGCACATACACATGAGCCCTACTGCTGTTCCACCTGGGATTTGCTE
2341 GCTCCATCCACCTGGAGTCCCTGAAATCCCTTCCCTTTCCTTTCATCTCCCTG
2401 CACGTTTGGAGGCTGTGAGGAGGAGGAGGCTGTGAGGAGTCCCTGCTGCTGCT
2461 GATGAGGCTCCACACTGTACTGTTCAAGTCAATGTTAATAAGCATTTCAAAACDAA
2521 AAAAAAAAAA

```

【 図 8 】

Fig 8



A 1666



B 1666

【 図 9 】

Fig 9



A 1682



B 1697

【 図 10 】

Fig 10



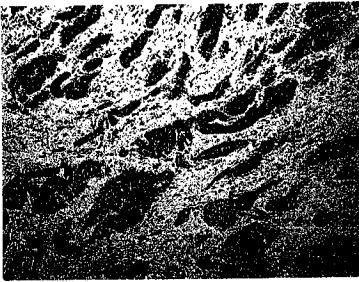
A 1699



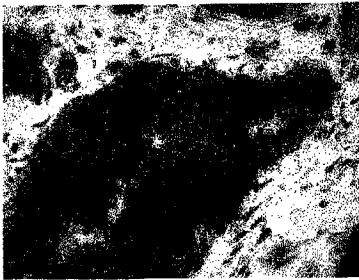
B 1699

【 図 1 1 】

Fig.11



A 1698



B 1698

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intl. Patent Application No. PCT/EP 03/03827
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COY J F ET AL: "MOLECULAR CLONING OF TISSUE-SPECIFIC TRANSCRIPTS OF A TRANSKETOLASE-RELATED GENE: IMPLICATIONS FOR THE EVOLUTION OF NEW VERTEBRATE GENES" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 32, no. 3, 15 March 1996 (1996-03-15), pages 309-316, XP000616489 ISSN: 0888-7543	18-20
Y	the whole document	1-29
X	WO 97 05253 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;POUSTKA ANNEMARIE (DE); COY JOHANNES (DE)) 13 February 1997 (1997-02-13)	18-20
Y	the whole document	1-29
	--- -/--	
<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 citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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  8 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. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bort, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 03/03827
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CASCANTE ET AL.: "Role of thiamin (vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation" NUTRITION AND CANCER, vol. 36, no. 2, 2000, pages 150-154, XP008012308 the whole document	30,33
X	SPENTZOS ET AL.: "Transketolase gene expression may be a marker of sensitivity to platinum/paclitaxel chemotherapy in ovarian cancer" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 43, March 2002 (2002-03), pages 1105-1106, XP008012309	31,32
Y	the whole document	1-29
A	LYNCH ET AL.: "Hereditary cancer: family history, diagnosis, molecular genetics, ecogenetics, and management strategies" BIOCHIMIE, vol. 84, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 3-17, XP001148125 the whole document	1-17
A	WO 98 53319 A (KINZLER KENNETH W ;VOGELSTEIN BERT (US); UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 26 November 1998 (1998-11-26) abstract; claims 2,29,52	1-17
A	WO 00 52204 A (ORNTOFT TORBEN F) 8 September 2000 (2000-09-08) abstract; claims 8,12,22	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/03827

**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.  Claims Nos.: 21-27, 30-33 (all partially)  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.: 30, 33 (all partially)  
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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  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.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  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.  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**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03 03827

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

Continuation of Box I.1

Although claims 21-27, 31 and 32 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effect.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 21-27, 30-33 (all partially)

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 30, 33 (all partially)

Independent claim 30 refers to a pharmaceutical compositions for the treatment of certain types of cancer, defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the method fo claim 29. The claim covers all compositions having this characteristic although the application does not provide support therefor within the meaning of Article 6 PCT. The lack of support/disclosure in the present case is such that any compound used to treat cancer will fall under the scope of protection. Consequently, the search of claim 30 has been limited to any antihiamine compound, inhibitor or transketolase anzyme activity, transketolase like-1 polypeptide or human transketolase like-1 nucleic acid

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03827

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705253	A	13-02-1997	DE 19527552 A1	30-01-1997
			WO 9705253 A2	13-02-1997
			EP 0840789 A2	13-05-1998
			JP 11510382 T	14-09-1999
			US 6133005 A	17-10-2000
WO 9853319	A	26-11-1998	AU 7499198 A	11-12-1998
			WO 9853319 A2	26-11-1998
WO 0052204	A	08-09-2000	AU 3316600 A	21-09-2000
			WO 0052204 A2	08-09-2000
			US 6335170 B1	01-01-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00	C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 21/78	C
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/58	A
G 0 1 N 33/58	C 1 2 N 15/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA10 CA02 DA03 HA12  
 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ26 QQ44 QR55 QR62 QS24 QS33 QS34  
 QX01  
 4C084 AA02 AA13 AA17 DC50 NA14 ZB261  
 4C085 AA03 BB11 CC21  
 4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

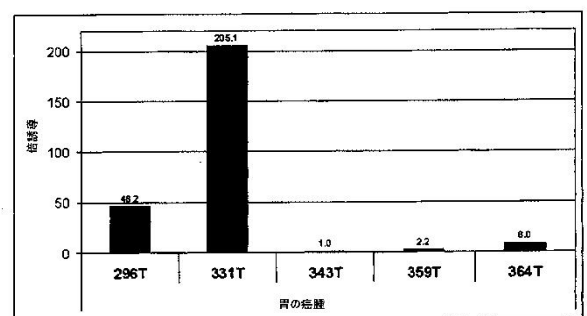
专利名称(译)	用于检测和治疗与人转酮酶样-1基因过表达相关的增殖异常的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005523025A</a>	公开(公告)日	2005-08-04
申请号	JP2003586376	申请日	2003-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	青年事务委员会JOHANNES DR		
申请(专利权)人(译)	鲤鱼, 约翰内斯		
[标]发明人	コイヨハネス		
发明人	コイ,ヨハネス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61K31/7088 A61K39/00.H A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA10 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ44 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC21 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26		
优先权	2002008831 2002-04-19 EP		
其他公开文献	JP4239824B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及治疗和诊断与异常增殖细胞相关的病症的方法。在一个方面，本发明涉及基于检测生物样品中人转酮酶样-1基因的过表达，特别用于检测肿瘤及其前体阶段的方法。另一方面，本发明涉及治疗与人转酮酶样-1基因过表达相关的病症的方法。治疗方法可包括基因治疗方法以及抑制或降低转酮酶样-1多肽活性的方法。

】

Figure 3:



TKT-L1