

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-263988
(P2008-263988A)

(43) 公開日 平成20年11月6日(2008.11.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 H O 4 5
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	

審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 124 頁)

(21) 出願番号	特願2008-131832 (P2008-131832)	(71) 出願人	500039463
(22) 出願日	平成20年5月20日 (2008. 5. 20)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
(62) 分割の表示	特願2000-507843 (P2000-507843) の分割		アメリカ合衆国、テキサス・78701、オースティン、ウエスト・セブンス・ストリート・201
原出願日	平成10年8月26日 (1998. 8. 26)	(71) 出願人	500086515
(31) 優先権主張番号	60/057, 750		ミリアド・ジェネティックス・インコーポレイテッド
(32) 優先日	平成9年8月26日 (1997. 8. 26)		アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・レイク・シティ、ワカラ・ウェイ320番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/083, 563		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成10年4月30日 (1998. 4. 30)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T S 1 0 Q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌の診断および治療に役立つ腫瘍抑制因子遺伝子を提供する。

【解決手段】 第10染色体の特定の領域(10q23.3)が腫瘍抑制遺伝子を含むことを同定され、該遺伝子の対応コード領域は新規な47kDタンパク質を表している。この生成物のドメインはプロテインチロシンホスファターゼの保存された触媒ドメインと正確に一致しており、リン酸化事象での機能的役割の可能性が示唆された。配列分析は、10q23.3領域を定めるのに用いた腫瘍細胞株で該遺伝子の多数のエクソンが欠失していることが示され、該遺伝子が腫瘍抑制遺伝子として分類される。さらに、神経膠腫細胞および前立腺癌細胞の両者で該遺伝子中の多数の欠失の存在が示された。この腫瘍抑制因子(TS10q23.3と称する)に関連する癌の診断および治療方法もまた開示される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TS10q23.3 と称する腫瘍抑制因子の突然変異体をコードする DNA、RNA を含む単離核酸またはその相補体であって、該突然変異体は、以下の突然変異からなる群から選ばれる：

- (a) イントロン 2 の 1 位が G から T に変化するミスセンス突然変異；
- (b) エクソン 2 の 112 および 113 位が CC から TT に変化するミスセンス突然変異；
- (c) エクソン 5 の 323 位が T から G に変化するミスセンス突然変異；
- (d) エクソン 5 の 331 位が T から G に変化するミスセンス突然変異；
- (e) エクソン 5 の 335 位が T から G に変化するミスセンス突然変異；
- (f) エクソン 5 の 407 位が G から A に変化するミスセンス突然変異；
- (g) エクソン 5 の 455 位が T から C に変化するミスセンス突然変異；
- (h) エクソン 6 の 517 位が C から T に変化するミスセンス突然変異；
- (i) エクソン 6 の 518 位が G から C に変化するミスセンス突然変異；
- (j) エクソン 5 の 388 位が C から T に変化するミスセンス突然変異；
- (k) エクソン 7 の 697 位が C から T に変化するミスセンス突然変異；
- (l) エクソン 7 の 705 位の A が欠失するフレームシフト突然変異；および
- (m) エクソン 7 の 823 位の G が欠失するフレームシフト突然変異。

10

【請求項 2】

20

TS10q23.3 と称する腫瘍抑制因子の突然変異体をコードする DNA、RNA を含む単離核酸またはその相補体であって、該突然変異体は、以下の突然変異からなる群から選ばれる：

- (a) 腫瘍抑制因子の第 38 アミノ酸が PRO から PHE に変化；
- (b) 腫瘍抑制因子の第 108 アミノ酸が LEU から ARG に変化；
- (c) 腫瘍抑制因子の第 111 アミノ酸が TRP から ARG に変化；
- (d) 腫瘍抑制因子の第 112 アミノ酸が LEU から ARG に変化；
- (e) 腫瘍抑制因子の第 136 アミノ酸が CYS から TYR に変化；
- (f) 腫瘍抑制因子の第 152 アミノ酸が LEU から PRO に変化；
- (g) 腫瘍抑制因子の第 173 アミノ酸が ARG から CYS に変化；
- (h) 腫瘍抑制因子の第 173 アミノ酸が ARG から PRO に変化；
- (i) 腫瘍抑制因子の第 130 コドンが ARG から停止コドンに変化；および
- (j) 腫瘍抑制因子の第 233 コドンが ARG から停止コドンに変化。

30

【請求項 3】

配列番号：53 のアミノ酸配列をコードする DNA または RNA を含む単離核酸。

【請求項 4】

DNA が配列番号：54 のコーディング配列を含む請求項 3 に記載の単離核酸またはその相補体。

【請求項 5】

DNA が配列番号：56 の配列をもつ DNA を含む単離核酸またはその相補体。

40

【請求項 6】

DNA が配列番号：64 の配列をもつ DNA を含む単離核酸。

【請求項 7】

相補的 DNA であり、該腫瘍抑制因子をコードする該領域またはその相補体に作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、請求項 1 から 6 のいずれかひとつに記載の核酸。

【請求項 8】

該腫瘍抑制因子をコードする該領域に作動可能に連結したポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項 8 に記載の核酸。

【請求項 9】

複製起点をさらに含む、請求項 8 に記載の核酸。

50

【請求項 10】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびアデノ関連ウイルスよりなる群から選ばれたウイルスベクターである、請求項 9 に記載の核酸。

【請求項 11】

ウイルス粒子中にパッケージングされている、請求項 10 に記載の核酸。

【請求項 12】

リポソーム中にパッケージングされている、請求項 9 に記載の核酸。

【請求項 13】

(i) 患者からサンプルを採取し、次いで
(ii) 該サンプルの細胞中での機能性 TS 10 q 2 3 . 3 遺伝子産物の発現を測定する段階を含む、カウデン症候群の診断方法。

【請求項 14】

細胞が、胸、卵巣細胞、胸腺細胞および子宮内膜細胞からなる群から選ばれる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

該サンプルが組織サンプルまたは流体サンプルである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

該測定が、該サンプルからの核酸をアッセイすることを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

該サンプルを、該核酸を増幅するのに適した条件に供することをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

該測定が、該サンプルを TS 10 q 2 3 . 3 に免疫学的に結合する抗体と接触させることをさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

該サンプルのタンパク質を E L I S A に供することをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

TS 10 q 2 3 . 3 の発現を非カウデン症候群サンプル中での TS 10 q 2 3 . 3 の発現と比較する工程をさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 21】

該比較が、TS 10 q 2 3 . 3 の発現レベルを評価することを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

該比較が、TS 10 q 2 3 . 3 遺伝子、タンパク質または転写物の構造を評価することを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

該評価が、シーケンシング、野性型オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、突然変異体オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、SSCP、PCR および RNアーゼ保護よりなる群から選ばれる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

該評価が野性型または変異体オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションであり、該オリゴヌクレオチドがチップまたはウエハー上のアレイとして配置される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

カウデン症候群のサンプルが TS 10 Q q 2 3 . 3 のコーディング配列に突然変異を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

突然変異がフレームシフト突然変異である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

突然変異がエクソン 7 にある、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

突然変異が T S 1 0 Q q 2 3 . 3 遺伝子産物の未成熟終結を引き起こす、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

突然変異が欠失突然変異である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 0】

欠失がエクソン 8 にある、請求項 2 9 に記載の方法。

10

【請求項 3 1】

突然変異が挿入突然変異である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 2】

挿入がエクソン 2 にある、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 3】

(i)患者からサンプルを採取し、次いで

(ii)該サンプルの細胞中での機能性 T S 1 0 q 2 3 . 3 遺伝子産物の発現を測定する段階を含む、乳癌になりやすい患者の診断方法。

【請求項 3 4】

細胞が、胸、卵巣細胞、胸腺細胞および子宮内膜細胞からなる群から選ばれる、請求項 3 3 に記載の方法。

20

【請求項 3 5】

該サンプルが組織サンプルまたは流体サンプルである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

該測定が、該サンプルからの核酸をアッセイすることを含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

該サンプルを、該核酸を増幅するのに適した条件に供することをさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

該測定が、該サンプルを T S 1 0 q 2 3 . 3 に免疫学的に結合する抗体と接触させることをさらに含む、請求項 3 3 に記載の方法。

30

【請求項 3 9】

該サンプルのタンパク質を E L I S A に供することをさらに含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

T S 1 0 q 2 3 . 3 の発現を正常サンプル中での T S 1 0 q 2 3 . 3 の発現と比較する工程をさらに含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 4 1】

該比較が、T S 1 0 q 2 3 . 3 の発現レベルを評価することを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

40

【請求項 4 2】

該比較が、T S 1 0 q 2 3 . 3 遺伝子、タンパク質または転写物の構造を評価することを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

該評価が、シーケンシング、野性型オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、突然変異体オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、S S C P、P C RおよびR N アーゼ保護よりなる群から選ばれる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

該評価が野性型または変異体オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションであり、該オ

50

リゴヌクレオチドがチップまたはウエハー上のアレイとして配置される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

サンプルがTS10Qq23.3のコーディング配列に突然変異を含む、請求項33に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍学、遺伝学および分子生物学の分野に関する。より詳しくは、本発明はヒト第10染色体上の腫瘍抑制因子遺伝子の同定に関する。この遺伝子の欠損は例えば神経膠腫などの癌の発生に関する。

10

【背景技術】

【0002】

フルズ(Foulds)(1958)(非特許文献1)は、腫瘍形成について、現在では遺伝子的損傷の蓄積によって起こることがわかっている多段階の生物学的プロセスとして記載している。分子レベルにおいて、腫瘍形成の多段階プロセスには、正の調節エフェクターおよび負の調節エフェクターの両方の崩壊が関係している(ワインバーグ(Weinberg)、1989(非特許文献2))。ボゲルSTEIN(Vogelstein)およびその共同研究者たち(1990)(非特許文献3)は、ヒト結腸カルシノーマの分子的基础が、多数の癌原遺伝子、腫瘍抑制因子遺伝子および修復遺伝子に関与すると仮定している。同様に、網膜芽腫の発生を導く欠損は他の腫瘍抑制因子遺伝子に関連付けて考えられた(リー(Lee)ら、1987(非特許文献4))。さらに別の癌原遺伝子および腫瘍抑制因子が他の多様な悪性腫瘍において同定された。不幸なことに、治療可能な癌が少なからず残されており、癌の影響は破局的である---米国単独でも一年に50万人を超える人々が死亡している。

20

【0003】

癌の破壊的な本質の一例として、中枢神経系の最も一般的な一次腫瘍である星状細胞系の細胞から発生した腫瘍が挙げられる(ラッセル(Russell)およびルビンSTEIN(Rubinstein)1989(非特許文献5))。これらの腫瘍の大部分は成人世代に起こる。一次脳腫瘍もまた、小児科患者における最も一般的な固形癌を占め、15歳未満の子供における癌死の第2の原因である。一次脳腫瘍の推定18,500の新規ケースが1994年には診断された(ポーリング(Boring)ら、1994(非特許文献6))。疫学的研究により脳腫瘍の発生が増加し、それが18歳から35歳までの患者の癌死の第3の最も一般的な原因であることが明らかになっている。脳内での位置のため、および周辺組織に腫瘍細胞が典型的に侵入するため、一次脳腫瘍の治療に関する発明はしばしば制限される。不幸なことであるが、これらの罹患個体の約3分の2は2年以内で死亡にいたるであろう。成人の最も一般的な頭蓋内腫瘍は神経膠細胞系の細胞から生じ、約48%の神経膠細胞腫多形成(GBM)、21%の星状細胞腫(A)(未分化(AA)および低級)および9%の脳室上衣腫および突起膠腫(レビン(Levin)ら、1993(非特許文献7))の頻度で起こる。

30

【0004】

一次脳腫瘍の癌発生においていくつかの遺伝子およびその対応するタンパク質産物に関係した遺伝子研究がある。種々の報告がなされている：上皮増殖因子受容体の増幅およびそのリガンド、形質転換増殖因子-、N-myc; gli、変形スプライシングおよび繊維芽細胞増殖因子受容体の発現およびp53、p16、Rb、神経繊維芽細胞腫遺伝子1および2、DCCおよび染色体番号4、10、17(p53でないもの)、19、22およびX染色体上の推定腫瘍抑制因子遺伝子である(ウォング(Wong)ら、1987(非特許文献8))；エル-アゾウジ(El-Azouzi)ら、1989(非特許文献9)；ニシ(Nishi)ら、1991(非特許文献10)；ジェームズ(James)ら、1988(非特許文献11)；カム(Kamb)ら、1994(非特許文献12)；ヘンソン(Henson)ら、1994(非特許文献13)；ヤマグチ(Yamaguchi)ら、1994(非特許文献14)；ビアンチ(Bianchi)ら、1994(非特許文献15)；ランソン(Ranson)ら、1992(非特許文献16)；ラシード(Rasheed)ら、1992(非特許文献17)；シ

40

50

エック (Scheck) およびクーンズ (Coons)、1993 (非特許文献 18) ; フォン・デムリング (Von Demling) ら (非特許文献 19) ; ルビノ (Rubino) ら、1994 (非特許文献 20) ; リットランド (Ritland) ら、1995 (非特許文献 21)) 。

【0005】

最も頻繁に起こる変化にはEGF-受容体 (~40%)、p53の機能の喪失 (~50%)、p16 (~50%)、Rb (~30%)の増幅および第10染色体上での欠失 (>90%)である。さらに、星状細胞腫瘍の組織学的な悪性の重度または程度は結腸癌腫と同様の遺伝的損傷の蓄積が増加することに相関がある。さらに、変化の中には相対的に細胞系譜特異的または等級特異的であるようなものもある。例えば、染色体19qに対する喪失は、オリゴデンドロ神経膠腫中に有意に生じる一方、染色体10およびEGF受容体の増幅および突然変異は主としてGBMsにおいて生じている。コピー全体の欠失または染色体番号10のセグメントの欠失は、一次脳腫瘍の最も一般的な形態であるGBMsに関連する最も一般的な遺伝的事象として強く示されている。

10

【0006】

GBMs上の細胞遺伝子および後の対立遺伝子欠失の研究は、染色体番号10に関連する、頻度が高く伸展した遺伝子変化を明らかに証明した (ビグナー (Bigner) ら、1988 (非特許文献 22) ; ランソン (Ranson) ら、1992 (非特許文献 16) ; ラシード (Rasheed) ら、1992 (非特許文献 17) ; ジェームズら、1988 (非特許文献 11) ; フジモト (Fujimoto) ら、1989 (非特許文献 23) ; ファルツ (Fults) ら、1990、1993 (非特許文献 24、25) ; カールボム (Karlbohm) ら、1993 (非特許文献 26) ; ラシードら1995 (非特許文献 27) ; ソノダ (Sonoda) ら、1996 (非特許文献 28) ; アルバロサ (Albarosa) ら、1996 (非特許文献 29))。細胞遺伝学的分析によりGBMsにおける一般的事件として染色体番号の変更が変更を示している腫瘍の約60%により明らかに示された。GBMsの対立遺伝子欠失実験は染色体番号10 (90%) と関連のある非常に頻繁である対立遺伝子の不均衡も明らかにした。しかしながら、その喪失は、非常に拡張的かつ頻繁なので、染色体上に局在する一貫した喪失がないことはこれらの分析によって明らかに定義することができない。

20

【0007】

いくつかの最近の実験は10q25-26領域、特にD10S190からD10S216の17cM領域に関連している。D10S587からD10S216のテロメア領域は、染色体番号10の部分的喪失しか示さない、一連の下等および高等神経膠腫を用いる対立遺伝子欠失分析に関連している (ラシードら、1995 (非特許文献 27))。この領域 (~1cM) は失われるかまたは11GBMs、4AA's、1Aおよび乏突起膠腫では無益であり、候補領域の局在を示唆している。この研究はまた、神経膠腫中で起こる第10染色体の欠失を例示した。アルバロサ (Albarosa) ら (1996) (非特許文献 29) はD10S221からD10S209までのマーカーから小児脳腫瘍中の対立遺伝子の欠失に基づく動原体の候補領域を示唆する。サヤ (Saya) ら (非特許文献 30) 、一連のGBMsを使用することにより欠失の2つの一般的な共有領域である10q26および10q24 (D10S192) を示唆している。

30

【0008】

第10染色体の短腕もまた他の腫瘍抑制因子遺伝子を含むことに関係している。研究は、最初に神経膠腫の10p上にある腫瘍抑制因子遺伝子の機能的な証拠を提供し (ステック (Steck) ら、1995) (非特許文献 31) 、後に前立腺に関しても後に示した (サンチェズ (Sanchez) ら、1995 (非特許文献 32) ; ムラカミ (Murakami) ら、1996 (非特許文献 33))。後の研究は、D10S1172およびD10S527の間の11cM領域を示唆した。神経膠腫の対立遺伝子欠失研究は、10p上でさらに広範囲にわたる欠失を示している。神経膠腫の対立遺伝子欠失研究は10p上での広範囲にわたる欠失を示したが、再度確固たる限局は達成されていなかった (カルボム (Karlbohm) ら、1993 (非特許文献 26) ; キンメルマン (Kimmelman) ら、1996 (非特許文献 34)) : 第10染色体のこれらの領域は、以下の図1に示される。さらにその上、EGF-受容体の増幅はまた、染色体10における欠失を腫瘍に殆ど排他的に生じることを示し、これらの遺伝的変更間の可能性のある結合を示唆している (

40

50

フォン・デムリング (Von Deimling) ら、1992 (非特許文献 35))。

【0009】

長腕上の欠失もまた、前立腺、腎臓、子宮、小細胞肺、子宮内膜癌、meningioma、および急性T細胞白血病などに関して報告されている (カーター (Carter) ら、1990 (非特許文献 36) ; モリタ (Morita) ら、1991 (非特許文献 37) ; ハーブスト (Herbst) ら、1984 (非特許文献 38) ; ジョーンズ (Jones) ら、1994 (非特許文献 39) ; レンペル (Rempel) ら、1993 (非特許文献 40) ; ペイフェン (peiffen) ら、1995 (非特許文献 41) ; ピーターゼン (Petersen) ら、1997 (非特許文献 42))。最近、前立腺癌に関する詳細な研究は (1) 第 10 染色体の短腕および長腕は腫瘍抑制因子遺伝子をはっきりと含有しているようであり、および (2) 長腕の抑制因子遺伝子マップでは 10q23 - 24 境界に局在する (グレイ (Gray) ら、1995 (非特許文献 43) ; イットマン (Ittmann) 1996 (非特許文献 44) 、トリバス (Trybus) ら、1996 (非特許文献 45))。これらの3群によって同定した共有欠失領域は D10S215 周辺に集中し、約 10cM を広げる (図1)。候補領域と重複する領域は、しかしながら該領域内での更なる局在はないことが前立腺癌に関して報告された。前立腺癌と関連する対立遺伝子の喪失はまた、試験した腫瘍の約 30 - 40% においてのみ起こると見られている。さらに、欠失は、GBM 同様、一層進行した段階の腫瘍中で観察され、転移能力に関連するかもしれない (ニヘイ (Nihei) ら、1995 (非特許文献 46) ; コミヤ (Komiyama) ら、1996 (非特許文献 47))。これらの結果の組み合わせによりヒト多発性癌は 10q23 - 24 領域を暗示することを示唆している。

10

【0010】

候補領域の位置における差異はいくつかの可能性を示唆している。最初に、10q上の2またはそれ以上の腫瘍抑制因子遺伝子の存在を可能にする。第2に、すべてではない欠失が腫瘍抑制因子遺伝子座に影響を及ぼす。これらの代わりは相互に排他的ではない。その後の可能性の支持において、潜在的な中心体は遺伝的変更、特に破損を生じるであろう 10q25 で起こると示唆される (ボウイライアー (Vouillaire) ら、1993 (非特許文献 48))

20

このすべての情報にもかかわらず、該遺伝子 (または複数の遺伝子) の同定は 10q23 - 24 関連腫瘍抑制因子が曖昧であることに関する。特定の遺伝子の同定およびそれをコードするタンパク質の推定なくしてこの産物を標的とする効果的な療法を発達させることは不可能である。したがって、この領域に位置する腫瘍抑制因子を単離することおよびその構造および機能を決定することは重要な目的である。

30

【非特許文献 1】Foulds, J. *Chronic Dis.*, 8:2-37, 1958.

【非特許文献 2】Weinberg, *Biochemistry*, 28:8263-8269, 1989.

【非特許文献 3】Vogelstein, et al., *Genes Chromosomes Cancer*, 2:2, 159-162, 1990

【非特許文献 4】Lee et al., *Science*, 235:1394-1399, 1987.

【非特許文献 5】Russell and Rubinstein, In: *Pathology of Tumors of the Nervous System*, 5th ed., Williams and Wilkins, eds., pp. 82-219, 1989.

【非特許文献 6】Boring et al., *Cancer Statistics*, 1994 CA, 43:7-26, 1994.

【非特許文献 7】Levin et al., In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 4th ed., DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1993.

40

【非特許文献 8】Wong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6899-6903, 1987.

【非特許文献 9】El-Azouzi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7186-7190, 1989.

【非特許文献 10】Nishi et al., *Oncogene*, 6:1555-1559, 1991.

【非特許文献 11】James et al., *Cancer Res.*, 48:5546-5551, 1988.

【非特許文献 12】Kamb et al., *Science*, 264:436-440, 1994.

【非特許文献 13】Henson et al., *Ann. Neurol.*, 36:714-721, 1994.

【非特許文献 14】Yamaguchi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 :484-488, 1994.

【非特許文献 15】Bianchi et al., *Nature Genetics*, 6:185-192, 1994.

50

- 【非特許文献 1 6】Ransom et al., Genes Chromosom. Cancer 5:357-374,1992.
- 【非特許文献 1 7】Rasheed et al., Genes Chromo. Cancer, 5:75-82,1992.
- 【非特許文献 1 8】Scheck and Coons, Cancer Res., 53:5605-5609, 1993.
- 【非特許文献 1 9】von Deimling et al., Int. J. Cancer, 57:676-680, 1994.
- 【非特許文献 2 0】Rubio et al., Cancer Res., 54:45-47, 1994.
- 【非特許文献 2 1】Ritland et al., Genes. Chromo. Cancer, 12:277-282, 1995.
- 【非特許文献 2 2】Bigner et al., Cancer Res., 48:405-411, 1988.
- 【非特許文献 2 3】Fujimoto et al., Genomics, 4:210-214,1989.
- 【非特許文献 2 4】Fults et al., Cancer Res., 50:5784-5789, 1990.
- 【非特許文献 2 5】Fults and Pedone, Genes Chromosom. Cancer 7: 173-177, 1993. 10
- 【非特許文献 2 6】Karlsson et al., Hum. Genet., 92:169-174, 1993.
- 【非特許文献 2 7】Rasheed et al., Oncogene, 11:2243-2246, 1995.
- 【非特許文献 2 8】Sonoda et al., Cancer Res., 55:2166-2168, 1995.
- 【非特許文献 2 9】Albarosa et al., Am. J. Genet., 58:1260-1267, 1996.
- 【非特許文献 3 0】Steck and Saya, Curr. Opin Oncol., 3:3,476-484, 1991.
- 【非特許文献 3 1】Steck et al., Genes Chromosom. Cancer 712:255-261, 1995.
- 【非特許文献 3 2】Sanchez, et al., Mil Med., 160:8,416-419, 1995.
- 【非特許文献 3 3】Murakami et al., Cancer Res., 56:2157-2160, 1996.
- 【非特許文献 3 4】Kimmelman et al., Genomics 34:250-254, 1996.
- 【非特許文献 3 5】von Deimling, et al., J Neurosurg, 77:2,295-301, 1992. 20
- 【非特許文献 3 6】Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8751-8755, 1990.
- 【非特許文献 3 7】Morita et al., Cancer Res., 51:5817-5820, 1991.
- 【非特許文献 3 8】Herbst et al., Cancer Res., 54:3111-3114, 1994.
- 【非特許文献 3 9】Jones, et al., Genes Chromosomes Cancer, 9:2, 119-123, 1994.
- 【非特許文献 4 0】Rempel et al., Cancer Res., 53:2386-2392, 1993.
- 【非特許文献 4 1】Peiffer et al., Cancer Res., 55:1922-1926, 1995.
- 【非特許文献 4 2】Petersen et al., Brit. J. Cancer 75:79-86, 1997.
- 【非特許文献 4 3】Gray et al., Cancer Res., 55:4800-4803,1995.
- 【非特許文献 4 4】Ittmann, Cancer Res., 56:2143-2147, 1996.
- 【非特許文献 4 5】Trybus et al., Cancer Res. 56:2263-2267, 1996. 30
- 【非特許文献 4 6】Nihei et al., Genes Chromosom. Cancer, 14:112-119, 1995.
- 【非特許文献 4 7】Komiya et al., Genes Chromo. Cancer 17:245-253, 1996.
- 【非特許文献 4 8】Voullaire et al., Am. J. Hum. Genet., 52:1153-1163, 1993.

【発明の開示】

【0011】

(発明の概要)

したがって、本発明の目的は、TS10Q23.3と称する(MMACまたはPTENと称することもある)腫瘍抑制因子を提供することである。また、TS10Q23.3をコードする遺伝子全体またはその一部を表現するDNAを提供することも本発明の目的である。これらの組成物の使用方法を提供することもまた目的である。 40

上記目的にしたがって、ひとつの態様において、TS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子を提供する。1つの例において、ポリペプチドは、配列番号：2、配列番号：10、配列番号：17、配列番号：49、配列番号：55、または配列番号：57で示されるアミノ酸配列を有する。他の例において、ポリペプチドは、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：18、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、または配列番号：63で示されるアミノ酸配列を有する。約10~約50個の連続した残基を持つTS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子の単離したペプチドを提供する。該ペプチドは、例えば、KLHまたはBSAなどの担体分子にコンジュゲート 50

してもよい。

【 0 0 1 2 】

他の態様において、T S 1 0 Q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子に免疫学的に結合するモノクローナル抗体を提供する。該抗体は他のヒトポリペプチドとクロス反応しないかまたはヒトの他のT S 1 0 Q 2 3 . 3 には結合するがヒトT S 1 0 Q 2 3 . 3 には結合しないものである。該抗体は例えば蛍光標識、化学蛍光標識、放射線標識または酵素などの検出可能な標識をさらに含んでいてよい。また、ハイブリドーマ細胞およびそのような抗体を製造する細胞株をも含む。

他の態様には、ポリクローナル抗血清、T S 1 0 Q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子に免疫学的に結合する抗体を含む。該抗血清は任意の動物から得てよいが、好ましくはヒト、マウスまたはイヌ以外の動物からのものである。

さらに他の態様において、ある領域、またはその相補領域を含む核酸はT S 1 0 Q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子をコードし、またはその対立遺伝子変異体またはその突然変異体をコードする。腫瘍抑制因子コーディング領域は任意の哺乳類動物から得たものであって良いが、特定の態様においては、マウス、イヌおよびヒトからの配列から選択される。突然変異には、欠失変異体、挿入変異体、フレームシフト変異体、ナンセンス変異体、ミスセンス変異体またはスプライシング変異体を含む。ひとつの態様において、突然変異は、1つまたはそれ以上の腫瘍抑制因子のエクソンのホモ接合欠失を含む。特定の態様においては、エクソン3, 4, 5, 6, 7, 8または9が欠失する。他の態様においては、エクソン2が欠失する。他の態様においては、エクソン3~9が欠失する。他の態様においては、エクソン2~9が欠失する。特定の態様においては、腫瘍抑制因子は配列番号：2、配列番号：10、配列番号：17、配列番号：49、配列番号：55、または配列番号：57で示されるアミノ酸配列を有する。核酸配列は、配列番号：1、配列番号：9、配列番号：16、配列番号：54、または配列番号：56で示される配列またはその相補配列を有することもできる。さらに、核酸配列は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、または配列番号：27で示される酸配列またはその相補配列を有することもできる。

核酸配列は、配列番号：64で示される酸配列またはその相補配列を有することもできる。核酸はゲノムDNA、相補的DNAまたはRNAである。

【 0 0 1 3 】

ある態様において、突然変異はスプライシング変異体である。特定の態様においては、スプライシング変異は、エクソン3、エクソン8またはイントロン2にある。より特定の態様においては、スプライシング変異の結果、(i) エクソン3の+1位置におけるGからTへの変化、(ii) エクソン8の+1位置におけるGからTへの変化、(iii) イントロン2の-1位置におけるGからTへの変化、が生じる。

他の態様において、突然変異は、ミスセンス変異体である。特定の態様においては、ミスセンス変異は、エクソン2にある。より特定の態様においては、ミスセンス変異の結果、エクソン2の46位置においてTからGへの変化が生じ、LEWがARGになる。他の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン2の28位置においてGからAへの変化が生じ、GLYがGLUになる。他の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン2の112および113位置においてCからTへの変化が生じる。他の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン2の112および113位置においてCCからTTへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第38アミノ酸においてPROがPHEになる。特定の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン5の323位置においてTからGへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第108アミノ酸においてLEWがARGになる。他の特定の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン5の331位置においてTからCへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第111アミノ酸においてTRPがARGになる。他の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン5の335位置においてTからGへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第112アミノ酸においてLEWがARGになる。さらに他の態様において、

ミスセンス変異の結果、エクソン5の407位置においてTからAへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第136アミノ酸においてCYSがTYRになる。他の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン5の455位置においてTからCへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第152アミノ酸においてLEUがPROになる。さらに他の態様においては、ミスセンス変異は、エクソン6にある。さらに詳しくは、ミスセンス変異の結果、エクソン6の517位置においてCからTへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第173アミノ酸においてARGがCYSになる。他の特定の態様において、ミスセンス変異の結果、エクソン6の518位置においてGからCへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第173アミノ酸においてARGがPROになる。

【0014】

他の態様において、突然変異は、ナンセンス変異体である。特定の態様において、ナンセンス変異は、エクソン5にある。より特定の態様においては、ナンセンス変異の結果、エクソン5の388位置においてCからTへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第130コドンにおいてARGが停止コドンになる。他の態様において、ナンセンス変異は、エクソン7にある。より特定の態様においては、ナンセンス変異の結果、エクソン7の697位置においてCからTへの変化が生じ、腫瘍抑制因子の第233コドンにおいてARGが停止コドンになる。他の態様において、ナンセンス変異は、エクソン8にある。より特定の態様においては、ナンセンス変異の結果、エクソン8の202位置においてCからTへの変化が生じる。

本発明のさらに他の態様において、突然変異にはフレームシフト変異体も含まれる。他の態様において、フレームシフト変異は、エクソン7にある。より特定の態様においては、フレームシフト変異の結果、エクソン7の705位置においてAの欠失が生じ、トランケーションを起こした腫瘍抑制因子が発現する。特定の態様において、フレームシフト変異の結果、エクソン7の823位置においてGの欠失が生じ、トランケーションを起こした腫瘍抑制因子が発現する。他の態様において、フレームシフト変異は、エクソン7の98位置におけるTTの挿入である。他の態様において、フレームシフト変異は、エクソン1にある。より特定の態様においては、フレームシフト変異は、エクソン1の16および17位置におけるAAの欠失である。

【0015】

さらに別の態様において、核酸は、該腫瘍抑制因子をコードする相補的DNA、さらに該領域に作動可能に結合したプロモーター、またはその相補物を含む。別の要素は、ポリアダニル化シグナルおよび複製起点である。

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどのウイルスベクターが使用されてよい。該ベクターは「そのままの状態」またはウイルス粒子に納まっていてもよい。代わりに、該核酸はリポソームに包まれた発現ベクターを含んでいてよい。

核酸の多様な大きさが考慮されるが、制限されるものではない：約1212塩基、約1500塩基、約2000塩基、約3500塩基、約5000塩基、約10,000塩基、約15,000塩基、約20,000塩基、約25,000塩基、約30,000塩基、約35,000塩基、約40,000塩基、約45,000塩基、約50,000塩基、約75,000塩基および100,000塩基である。

【0016】

さらに別の態様において、核酸の約10～約50の連続した塩基の単離されたオリゴヌクレオチド、TS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードする単離されたオリゴヌクレオチドおよびその相補物を提供する。該オリゴヌクレオチドは長さ約15塩基、約17塩基、約20塩基、約25塩基または約50塩基であってよい。

さらに別の態様において、(i)被験者からサンプルを入手し；ついで(ii)該サンプルにおける機能的なTS10Q23.3腫瘍抑制因子の発現を決定する工程を含む、癌の診断方法を提供する。癌は、悪性脳腫瘍、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、腎臓癌、悪性リンパ腫、小腸癌、膵臓癌、血液細胞の癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、睾丸癌、卵巣癌、皮膚癌、頭頸部癌、食道癌、骨髄癌および血液の癌であってよい。好ましい態様におい

10

20

30

40

50

て、該癌は前立腺癌または乳癌である。他の好ましい態様において、癌は、例えば悪性脳腫瘍、神経膠腫などである。該サンプルは組織または液体サンプルである。

【0017】

ある一形式において、該方法は該サンプルからの核酸のアッセイに関する。該方法は、さらに該核酸を増幅するために適当な条件にサンプルをかけることを含む。別法として、該方法は該サンプルを例えばELISAなどでTS10Q23.3に免疫学的に結合する抗体を接触させることを含んでいてよい。形式にかかわらず、比較には、TS10Q23.3の発現と癌でないサンプル中のTS10Q23.3を比較することが含まれる。該比較はTS10Q23.3発現のレベルを見てよい。別法として、該比較はTS10Q23.3遺伝子、タンパク質または転写物の構造を評価することを含んでいてよい。そのような形式はシーケンシング、野生型オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、突然変異オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、SSCP^{T M}およびRNアーゼ保護を含んでいてよい。特定の態様には、オリゴヌクレオチドがチップまたはウェーハ上に列を形成する野生型または突然変異オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを評価することが含まれる。

10

【0018】

他の態様において、該腫瘍細胞によって腫瘍抑制因子の取り込みを可能にする条件下、TS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子と該細胞を接触させる工程を含む腫瘍細胞の表現型を変更する方法を提供する。該腫瘍細胞は脳、胚、脾臓、腎臓、リンパ節、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、骨髄および血液組織などの組織から由来してよい。該表現型は、増殖、移動、接触障害、軟アガー増殖または細胞周期から選択されてよい。該腫瘍抑制因子はリポソームに包み込まれるかまたは自由な状態であってもよい。

20

【0019】

別の態様において、(i) TS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードする核酸および(ii)該腫瘍細胞中で活性であるプロモーターであって、該プロモーターは該腫瘍細胞によって核酸の取り込みを可能にする条件下で、腫瘍抑制因子をコードする領域に作動可能に結合しているものと該細胞を接触させる工程を含む腫瘍細胞の表現型を変える方法を提供する。該表現型は、増殖、移動、接触障害、軟アガー増殖または細胞周期であってよい。該核酸はリポソームに包み込まれていてよい、該核酸がレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスおよびヘルペスウイルスである場合、ウイルス粒子に包まれていてもよい。

30

【0020】

さらに別の態様において、(i) TS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードする核酸および(ii)該腫瘍細胞中で活性であるプロモーターであって、該プロモーターは該腫瘍細胞によって核酸の取り込みを可能にする条件下で、腫瘍抑制因子をコードする領域に作動可能に結合しているものと該細胞を接触させる工程を含む腫瘍を治療する方法を提供する。被験者はヒトであってよい。

さらに別の態様において、TS10Q23.3をコードする遺伝子の両方のコピーが妨害されるかまたは他の遺伝子と置き換わるトランスジェニック哺乳動物を提供する。

さらに別の態様において、(i)被験者からサンプルを入手し；ついで(ii)該サンプル中の細胞の機能的TS10Q23.3腫瘍抑制因子の発現を決定する工程を含む癌の程度を決定する方法を提供する。該癌は悪性脳腫瘍であり、その程度は初期の癌および神経膠腫とははっきり区別される。その決定はTS10Q23.3核酸または該サンプル中のポリペプチドのアッセイを含んでいてよい。

40

【0021】

さらに別の実施例において、(i)被験者からサンプルを入手し；ついで(ii)該サンプル中の細胞中で機能的TS10Q23.3腫瘍抑制因子の発現を決定する工程を含む腫瘍転移を推定する方法を提供する。該癌は、転移性および非転移性として区別されるであろう。その決定には、TS10Q23.3核酸または該サンプル中のポリペプチドのアッセイを含んでいてよい。

50

さらに別の態様において、(i) 機能的 T S 1 0 Q 2 3 . 3 ポリペプチドを欠如している細胞を提供し；(ii) 候補基質と該細胞を接触させ；ついで (iii) 該細胞に及ぼす候補基質の効果を決定する工程を含む抗腫瘍活性の候補基質をスクリーニングする方法を提供する。該細胞は、腫瘍細胞、例えば T S 1 0 Q 2 3 . 3.7 のコーディング領域における突然変異を持つ腫瘍細胞であってよい。該突然変異体は欠失変異、挿入変異、フレームシフト変異、ナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異またはスプライシング突然変異であってよい。その決定には、候補基質の存在下での1またはそれ以上の細胞の特徴を、候補基質の不在下での細胞の特徴と比較することを含んでいてよい。その特徴は、T S 1 0 Q 2 3 . 3 発現、ホスファターゼ活性、増殖、転移、接触障害、軟アガー増殖、細胞周期調節、腫瘍形成、腫瘍の進行および組織浸潤であってよい。候補基質は、化学療法剤または放射線治療剤または小分子ライブラリーから選択されるものであってよい。該細胞はイン・ビトロまたはイン・ビボで接触されてよい。

10

【0022】

さらに別の態様において、(i) 少なくとも1つのチロシンキナーゼ部位を含む T S 1 0 Q 2 3 . 3 ポリペプチドを持つことを提供し；(ii) 該細胞を候補基質と接触させ；ついで (iii) 候補基質が該部位のリン酸化に及ぼす影響を決定する工程を含む、抗キナーゼ活性の候補基質をスクリーニングする方法を提供する。その決定には、候補基質の存在下での1またはそれ以上の細胞の特徴を候補基質の不在下での細胞の特徴と比較することを含んでいてよい。その特徴は、T S 1 0 Q 2 3 . 3 のリン酸化された状態、T S 1 0 Q 2 3 . 3 の発現、ホスファターゼ活性、増殖、転移接触障害、軟アガー増殖、細胞周期調節、腫瘍形成、腫瘍の進行および組織浸潤であってよい。候補基質は、化学療法剤または放射線治療剤または小分子ライブラリーから選択されるものであってよい。該細胞は、イン・ビボまたはイン・ビトロで接触してもよい。

20

【0023】

さらに他の態様において、本発明は、被験者からサンプルを入手し；次いで該サンプルの細胞における機能的 T S 1 0 Q 2 3 . 3 遺伝子産物の発現を測定する工程を含む、カウデン症候群の診断方法を提供する。特に好ましい態様において、細胞は、胸、卵巣、甲状腺および子宮内膜から選択する。他の態様において、サンプルは組織または体液サンプルであってよい。本発明の他の態様において、測定は、サンプルから核酸をアッセイすることを含む。より好ましい態様において、該方法はさらに、核酸の増幅に適した条件にサンプルを付すことを含む。他の態様において、該方法はさらに、T S 1 0 Q 2 3 . 3 の発現をカウデン症候群に罹っていないサンプルにおける T S 1 0 Q 2 3 . 3 の発現と比較する工程を含む。特定の態様において、比較とは、T S 1 0 Q 2 3 . 3 の発現レベルを評価することである。より特定の態様において、カウデン症候群のサンプルは、T S 1 0 Q 2 3 . 3 のコーディング配列に突然変異を含む。突然変異は、フレームシフト変異、欠失変異、挿入変異またはミスセンス変異を含む。より特定の態様において、突然変異はエクソン7にある。他の特定の態様において、突然変異は、T S 1 0 Q 2 3 . 3 遺伝子産物の早期終了を起こす。他の態様において、欠失変異はエクソン8にある。別の態様において挿入変異はエクソン2にある。特に好ましい態様において、突然変異は、エクソン7の第791塩基における A T の挿入である。他の特に好ましい態様において、突然変異はエクソン8の第915塩基における13個の塩基対の欠失である。他の好ましい態様において、突然変異はエクソン2の第137塩基における3個の塩基対の挿入である。より詳しくは、該3個の塩基対の挿入により、T S 1 0 Q 2 3 . 3 遺伝子産物において A S N がコードされる。

30

40

【0024】

さらに別の態様において、被験者からサンプルを入手し；次いで該サンプルの細胞における機能的 T S 1 0 Q 2 3 . 3 遺伝子産物の発現を測定する工程を含む、乳癌に罹っている被験者の診断方法を提供する。特別の態様において、細胞は、胸、卵巣、甲状腺および子宮内膜から選択する。他の態様において、サンプルは組織または体液サンプルであってよい。特に好ましい態様において、該方法はさらに、T S 1 0 Q 2 3 . 3 の発現を正常

50

なサンプルにおけるTS10Q23.3の発現と比較する工程を含む。さらに限定された態様において、サンプルは、TS10Q23.3のコーディング配列に突然変異を含む。突然変異は、フレームシフト変異、欠失変異、挿入変異またはミスセンス変異を含む。より特定の態様において、突然変異はエクソン7にある。他の特定の態様において、突然変異は、TS10Q23.3遺伝子産物の早期終了を起こす。他の態様において、欠失変異はエクソン8にある。別の態様において挿入変異はエクソン2にある。特に好ましい態様において、突然変異は、エクソン7の第791塩基におけるATの挿入である。他の特に好ましい態様において、突然変異はエクソン8の第915塩基における13個の塩基対の欠失である。他の好ましい態様において、突然変異はエクソン2の第137塩基における3個の塩基対の挿入である。より詳しくは、該3個の塩基対の挿入により、TS10Q23.3遺伝子産物においてASNがコードされる。

本発明の他の目的、特徴および利点は、後記の詳細な説明において明らかになるであろう。しかし、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい具体例を示しているとはいえ、説明のためのみに提示しているものであり、本発明の範囲内における種々の変更や修飾は、当業者にとっては、この詳細な説明から明らかになるものである。

【0025】

(配列の要約)

配列番号：1 = ヒトTS10Q23.3の遺伝子配列 (図6および9) ; 配列番号：2 = 配列番号：1のCDSからのヒトTS10Q23.3のペプチド配列 ; 配列番号：3 = 配列番号：1の第3-119塩基の翻訳 ; 配列番号：4 = 配列番号：1の第123-242塩基の翻訳 ; 配列番号：5 = 配列番号：1の第246-272塩基の翻訳 ; 配列番号：6 = 配列番号：1の第276-317塩基の翻訳 ; 配列番号：7 = 配列番号：1の第321-449塩基の翻訳 ; 配列番号：8 = 配列番号：1の第453-2243塩基の翻訳 ; 配列番号：9 = マウスTS10Q23.3の遺伝子配列 (図9) ; 配列番号：10 = 配列番号：9のCDSからのマウスTS10Q23.3のペプチド配列 ; 配列番号：11 = 配列番号：9の第14-55塩基の翻訳 ; 配列番号：12 = 配列番号：9の第59-166塩基の翻訳 ; 配列番号：13 = 配列番号：9の第172-222塩基の翻訳 ; 配列番号：14 = 配列番号：9の第223-273塩基の翻訳 ; 配列番号：15 = 配列番号：9の第283-1959塩基の翻訳 ; 配列番号：16 = イヌTS10Q23.3の遺伝子配列 (図9) ; 配列番号：17 = 配列番号：16のCDSからのイヌTS10Q23.3のペプチド配列 ; 配列番号：18 = 配列番号：16の第1-1290塩基の翻訳 ; 配列番号：19 = エクソン1 (図10) ; 配列番号：20 = エクソン2 (図10) ; 配列番号：21 = エクソン3 (図10) ; 配列番号：22 = エクソン4 (図10) ; 配列番号：23 = エクソン5 (図10) ; 配列番号：24 = エクソン6 (図10) ; 配列番号：25 = エクソン7 (図10) ; 配列番号：26 = エクソン8 (図10) ; 配列番号：27 = エクソン9 (図10) ; 配列番号：28 = 第88-98残基のモチーフ ; 配列番号：29 = タンパク質チロシンホスファターゼの保存された触媒ドメイン (Denuら、1996) ; 配列番号：30 = 野生型TS10Q23.3ポリペプチドの第1-60残基 (図12A-12C) ; 配列番号：31 = 突然変異TS10Q23.3ポリペプチドの第1-60残基 (図12D-12F) ; 配列番号：32 = KE突然変異TS10Q23.3ポリペプチドの第1-60残基 (図12G-12I) ; 配列番号：33 = CA6.ex8.FBプライマー ; 配列番号：34 = CA6.ex8.RQプライマー ; 配列番号：35 = CA6.ex8.FCプライマー ; 配列番号：36 = CA6.ex8.RRプライマー ; 配列番号：37 = 第2アンプリコンエクソン8FB-RQを得るために用いた入れ子プライマー ; 配列番号：38 = 第2アンプリコンエクソン9FB-RRを得るために用いた入れ子プライマー ; 配列番号：39 = M5'Fプライマー ; 配列番号：40 = M5'Rプライマー ; 配列番号：41 = M2'Fプライマー ; 配列番号：42 = F3'Rプライマー ; 配列番号：43 = ヒト胎児脳の第1ラウンドPCRにおけるプライマー ; 配列番号：44 = ヒト胎児脳の第1ラウンドPCRにおけるプライマー ; 配列番号：45 = ヒト胎児脳の第2ラウンドPCRにおけるプライマー ; 配列番号：46 = ヒト胎児脳の第2ラウンドPCRにおけるプライマ

10

20

30

40

50

ー；配列番号：47 = 偽遺伝子であってTS10Q23ではない遺伝子から特異的303bp産物を産生するのに用いたプライマー；配列番号：48 = 偽遺伝子であってTS10Q23ではない遺伝子から特異的303bp産物を産生するのに用いたプライマー；配列番号：49 = マウスMMAC1タンパク質の配列；配列番号：50 = ペプチド配列；配列番号：51 = 配列番号：1の第321-1034塩基の翻訳；配列番号：52 = 配列番号：9の第169-750塩基の翻訳；配列番号：53 = 配列番号：16の第1-108塩基の翻訳；配列番号：54 = イヌMMAC1遺伝子の配列；配列番号：55 = 配列番号：54のCDSからのイヌMMAC1タンパク質の配列；配列番号：56 = マウスMMAC1遺伝子の配列；配列番号：57 = 配列番号：56のCDSからのマウスMMAC1タンパク質の配列；配列番号：58 = MMAC1エクソン2における配列にマッチするプライマーMAC1.6f；配列番号：59 = MMAC1エクソン5における配列にマッチするプライマーMAC1.6r；配列番号：60 = 配列番号：56の第1-54塩基の翻訳；配列番号：61 = 配列番号：56の第58-96塩基の翻訳；配列番号：62 = 配列番号：56の第98-178塩基の翻訳；配列番号：63 = 配列番号：56の第182-208塩基の翻訳；配列番号：64 = ヒトTS10Q23.3偽遺伝子の配列。

【0026】

(好ましい態様の詳細な説明)

1. 本発明

上記に述べたとおり、複数の異なるグループがヒト染色体番号10番の10q領域に関連する腫瘍抑制活性の証拠を示してきた。この多数の業績にもかかわらず、活性を担う遺伝子または複数の遺伝子の同定は決定されていない。腫瘍発生神経膠腫細胞に腫瘍抑制因子遺伝子を宿すと疑われる、染色体または染色体の断片のトランスファーに關与する機能的なアプローチを以前には使用した。これらの努力の結果により、推定腫瘍抑制因子遺伝子の生物学的活性の定義を可能にし、そのような局在化に対する援助を可能にした。染色体2および10はU251神経膠腫細胞にトランスファーされ、また、染色体2および10はLG-11細胞にもトランスファーされた。LG-11細胞は染色体10のそのままのコピーを持たないことを示しており、続いてその中止点は10q24で起こるとわかった。染色体番号10番のトランスファーにより抑制された表現型を示すハイブリッド細胞を生じ、腫瘍発生性を喪失して示し(腫瘍の形成はない)および軟アガロース中で増殖させることができる能力の喪失(50Xから1000Xの減少；パーサハウス(perhouse)ら、1993)を示す。そのハイブリッドの指数関数的増殖速度は親細胞に類似であるが、ハイブリッド細胞の飽和密度は親胞より有意に低い(10Xから20X)。染色体番号2番のトランスファーは親細胞同様に作用するハイブリッド細胞を生じる。

【0027】

本研究の1つの目的はネオマイシンタグをつけた染色体番号10番の断片化により染色体番号10番の抑制因子遺伝子の局在を行ない、その後、神経膠腫細胞に断片化した染色体をトランスファーすることである。しかしながら本発明者らはハイブリッド細胞のいくつかが自発的に染色体再配列を受け、挿入された染色体10番の多様な領域しか保有しないハイブリッド細胞を製造することを観察した(パーサハウスら、1993)。ついで本発明者らは、断片化実験を開始する代わりに、そのハイブリッドをサブクロニングし、分析した(ステック(Steck)ら、1995)。挿入された染色体番号10番またはその断片の保有は、情報を与える有益なRFLPマーカーおよびFISH分析によって突き止められた。興味深いことに、挿入された染色体のみが再配列を受ける。染色体番号10番の完全なコピーの挿入は、軟アガロース中で増殖させ、ヌードマウス中で腫瘍を形成するハイブリッド細胞の形質転換した特質の阻害を生じる。

【0028】

これらの2つの表現型は、現在、即時分析によって部分的に分離可能であるようである。いくつかのサブクローン(U251.N10.5a-j)は染色体番号第10番の長腕の主要部分の喪失を明らかにし、軟アガー中で増殖し、ヌードマウス中で腫瘍を形成することに失敗し、よって、染色体(10pterから10q11)の残りの部分に腫瘍抑制性の遺伝子座が存在するこ

10

20

30

40

50

とを示している。対照的に、長腕、10q24から10q26にかけての遠位領域を保有するクローンは、軟アガロース中でもヌードマウス中でも増殖できなかった（図4参照）。これは該染色体の遠位領域にある別の表現型の抑制性領域を示唆する。別の10 - 関連物質の欠如はさらに、染色体番号10番の残りの物質が変更された生物学的表現型を担うことを示唆している。これらの結果は神経膠腫親交に関する染色体番号10番上の2つの表現型上独立の抑制領域の存在を示している（ステック（Steck）ら、1995）。

本発明により、本発明者らは、神経膠腫、乳癌、前立腺癌および他の癌に係するTS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子遺伝子を局在化するいくつかの独立した方策を使用した。これらの方法は、以下の実施例に一層詳細に記載されており、(i)一連のヒト神経膠腫細胞株中での同種の欠失の同定；(ii)腫瘍発生性に関して抑圧されたクローン中での保有の一致領域の決定；および(iii)神経膠腫の多様な程度と対応する正常サンプルに関する対立遺伝子欠失研究を含む。該遺伝子を操作すると、現在、ヒト癌に関連する新規診断および治療方法を発達させる遺伝子によってコードされる情報を利用することができるようである。

【0029】

II. 10q23.3腫瘍抑制因子

本発明により、10q23.3遺伝子座中の遺伝子によってコードされ、本明細書においてはTS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子を同定した。この分子は多様な癌において腫瘍の表現型を抑制することができる。腫瘍抑制因子なる語句は当業者にはよく知られている。他の腫瘍の例としては、少し挙げるとp53、Rbおよびp16である。これらの分子は構造的に顕著である一方、TS10Q23.3が成員である機能的に関連のある分子の群を形成する。これらのほかの腫瘍抑制因子が現在開発されている使用法は、同様に本明細書において応用可能である。

全TS10Q23.3分子に加えて、本発明はまた、腫瘍抑制（または他の）活性を保有しているか、またはしていないポリペプチドの断片に関連する。該分子のN - 末端を含む断片はコーディング領域内に翻訳停止部位を遺伝的に操作することによって製造されてもよい（以下に議論する）。代わりに、例えばプロテアーゼとして知られるタンパク質分解酵素でTS10Q23.3分子の処理により多様なN - 末端断片、C - 末端断片および内部の断片を製造することができる。断片の例には、長さ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、100、200、300、400またはそれを超えるのアミノ酸の図7および図9に与えられている配列の隣接残基を含んでよい。これらの断片は沈殿（例えば硫酸アルミニウム）、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー（イムノアフィニティークロマトグラフィー）または多様なサイズ分離（体積、ゲル電気泳動、ゲル濾過）などの公知の方法により精製されてよい。

【0030】

A. ポリペプチドの構造上の特徴

TS10Q23.3の遺伝子は403アミノ酸ポリペプチドをコードする。この分子の推定分子量47,122である。したがって、最少限でこの分子は、分子量およびpIが試験されるアッセイにおいて標準として使用されてもよい。

122 - 131残基に位置するホスファターゼ一致部位は、配列： p1411行 のチロシンホスファターゼ(PTP)同一配列を完全にマッチする。活性化ドメインの外側は配列は非常に異なっている。PTPsはリン酸化酵素中間体を通して進む。該酵素反応は、システインのチオラートアニオンにより基質のリン原子の核親和性攻撃後のリン酸システイン中間体の形成に関する酵素反応に関する。その反応は2段階化学的プロセスとして代表されることができる：脱リン酸化産物の急激な放出により伴われる酵素にリン酸基転移；およびリン酸の急激な放出に付随してリン酸チオール中間体の加水分解である。触媒競合要素複合体を形成するために、酵素がリン酸含有基質の2価陰イオンと反応する。酵素上で、アスパラギン酸は陽子を加えられなければならない、核親和性システインは、酵素にリン酸基転移に関して2価陽イオンと反応しない（チオラートアニオン）。また、233 - 240および308

10

20

30

40

50

- 315残基で位置するチロシンリン酸化が可能なことおよび128、164、223および335残基で位置するcAMPリン酸化にも注目する。ホスファターゼはキナーゼ部位を持つと知られ、これらの酵素のリン酸化活性は、これらの部位でのリン酸化により調節されることができる。一般的にプロテインホスファターゼは2つの部類に分類される - セリン/トレオニンホスファターゼおよびチロシンホスファターゼである。チロシンホスファターゼのあるものはまた、ホスホセリンおよびホスホトレオニンに対する活性を持つ。

【0031】

キナーゼおよびホスファターゼ間の相互作用およびポリペプチドの多様なリン酸化状態は細胞生理学において重要な特徴として証明される。多様なメカニズムにより、キナーゼおよびホスファターゼはシグナル伝達、エネルギー保存および細胞調節に関する細胞内の異なる経路で作用する。形質転換タンパク質src (コレット (Collet) およびエリクソン (Erickson)、1978) 中の内在性チロシンキナーゼ機能の同定、特にチロシン残基でのリン酸化の役割は細胞増殖および癌の誘発に重要な役割を演じる (ハンター (Hunter) 1991; Bishop, 1991)。プロテインホスファターゼが増殖調節において果たす役割は、その他の多くの生物学的生化学的活性同様に生物学的に重要な分子のリン酸化状態に相関する (コーエン (Cohen)、1994)。

10

【0032】

その配列に基づいて、TS10Q23.3は、チロシンホスファターゼまたは細胞骨格関連タンパク質、チキンテンシンおよびウシオーキシリンに相同である2特異的ホスファターゼをコードすると考えられる (Steckら、1997; Liら、1997)。TS10Q23.3のN末端ハーフは数種のホスファターゼに対して相同であり。その推定コアホスファターゼモチーフは第122 - 134残基に存在する (Denuら、1996; TonksおよびNeelら、1996)。したがって、TS10Q23.3のN末端領域は、酵素的および細胞的に局在する活性をもつ。TS10Q23.3のC末端タンパク質は、第240、315および336

20

残基に3つの潜在的チロシンリン酸化部位を含む。もしリン酸化が行われれば、チロシンのC末端の3つの残基に位置するロイシン残基があるので、チロシン315は潜在的SH2結合部位になる (Songyangら、1995)。2つの潜在的セリンリン酸化部位もまたTS10Q23.3のC末端にハーフに存在する。セリン残基338は、潜在的Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII部位になり、一方セリン355残基は、潜在のカゼインキナーゼII部位になる (HardieおよびHanks、1995)。最後の4つのアミノ酸ITKVは、潜在的PDZ結合ドメインになる (FanningおよびAnderson、1996; SarasおよびHeldin、1996)。PDZドメインは種々の細胞内タンパク質に存在し、ひよ的タンパク質のC末端に直接結合することによりタンパク質 - タンパク質相互作用を媒介すると考えられる。

30

該分子のN - 末端の60程度のアミノ酸はtensinなる接着ブランクに示される細胞骨格タンパク質に幾分のホモロジーを示す。これはTS10Q23.3点突然変異が接触障害、侵入、移動または細胞 - 細胞間シグナル伝達において関与するであろうことを示唆している。ある腫瘍細胞株中に同定されたTS10Q23.3点突然変異はこの領域中で二次的に提案された構造に影響を及ぼす。

40

【0033】

B. 機能的側面

本発明はTS10Q23.3または「野生型」活性の機能をいう場合、問題となっている分子は、悪性状態、すなわち任意の種類 of 異常な増殖調節または例えば、異常状態から転移の妨害または侵入性腫瘍の増殖を妨害するために非常に悪性の状態へと形質転換するのを阻害する能力を持つことを意味する。正常なTS10Q23.3遺伝子産物によって調節されるとみなされるであろう他の表現型は血管形成、接着、移動、細胞 - 細胞シグナル伝達、細胞増殖、細胞分化、密度依存性増殖、固定 (anchorage) 依存性増殖およびそのほかのものである。どの分子がこの活性を持つのかという決定は当業者によく知られたアッセイを用いて達成される。例えば、TS10Q23.3またはその変異体をコードす

50

る遺伝子を機能的 T S 1 0 Q 2 3 . 3 産物を持たない細胞へと形質転換することおよびそれにより不完全な増殖コントロールを示すものは増殖抑制のために T S 1 0 Q 2 3 . 3 機能を持つ分子を同定する。

【 0 0 3 4 】

上記の通り、T S 1 0 Q 2 3 . 3 はホスファターゼであるというきざしがある。残基88から98に位置するチロシンタンパク質の保存された触媒ドメインに完全に合致している。また、推定キナーゼ標的は分子中に局在し、ホスファターゼの他の特徴である。他の腫瘍抑制因子はこの種の活性を同定しているため、T S 1 0 Q 2 3 . 3 の腫瘍抑制におけるホスファターゼ機能を決定するのが望ましいであろう。これはまた、T S 1 0 Q 2 3 . 3 機能の不在に関するスクリーニングアッセイを進展させるのに、または癌治療の開発に、例えば T S 1 0 Q 2 3 . 3 のホスファターゼ機能を標的化すること、T S 1 0 Q 2 3 . 3 が作用する基質を標的化すること、および/または T S 1 0 Q 2 3 . 3 に作用を及ぼすキナーゼまたは複数のキナーゼを標的化することに有利な方法であろう。

10

【 0 0 3 5 】

C. T S 1 0 Q 2 3 . 3 の変異体

該ペプチドのアミノ酸配列変異体は置換、挿入または欠失変異体であり得る。欠失変異体は機能的活性、または免疫原性活性に必須ではないそのままのタンパク質の1またはそれ以上の残基を欠如し、上記の膜貫通配列を欠如した変異体によって例示される。欠失変異体の別の一般的なタイプは、1つの欠如分泌シグナル配列または細胞の特定の部位に結合するタンパク質に関するシグナル配列である。挿入変異体は、典型的に該ポリペプチド中の末端点ではない点でさらなる物質に関係する。これは免疫応答性のエピトープまたは単純に単一残基の挿入を含む。終末の付加、いわゆる融合タンパク質は以下で議論する。

20

【 0 0 3 6 】

置換変異体は典型的にはタンパク質内の1またはそれ以上の別のアミノ酸の交換を含み、他の機能または特性の喪失なしにタンパク質分解による開裂に対しての安定性などのポリペプチドの1またはそれ以上の特性を調節するために設計されていてもよい。この種の置換は、好ましくは保存的であり、すなわち一つのアミノ酸が同様の形および変化のうちの1つで置換されている。保存された置換は当該技術においてよく知られており、かつ例えば変更を含む：アラニンからセリンへ；アルギニンからリジンへ；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへ；アスパラギン酸からグルタミン酸へ；システインからセリンへ；グルタミンからアスパラギンへ；グルタミンからアスパラギン酸へ；グリシンからプロリンへ；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへ；イソロイシンからロイシンまたはバリンへ；ロイシンからバリンまたはイソロイシンへ；リジンからアルギニンへ；メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへ；フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニンへ；セリンからトレオニンへ；トレオニンからセリンへ；トリプトファンからチロシンへ；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへ；およびバリンからイソロイシンまたはロイシンへの変更を含む。

30

【 0 0 3 7 】

本発明のひとつの態様においては、突然変異を作製するために、当業者が当業界で公知の標準的技術を用いるであろうことを企図している。さらに、N末端欠失、C末端欠失、内部欠失ならびにランダムおよび点突然変異についても同様のことを企図するものである。

40

N末端およびC末端欠失は、C末端またはN末端領域の端部に近い適当なシングル制限部位の存在といったような利点を有する欠失突然変異の形態である。DNAはそのような部位で切断され、切断端は、B A L 3 1、エクソヌクレアーゼ I I I , D N A アーゼ I および S 1 ヌクレアーゼなどのヌクレアーゼによって分解される。2つの切断端を再結合すると、制限部位の周囲に種々のサイズの欠失をもつ一連のDNAが作製される。本明細書の記載にしたがって、こういった突然変異から発現したタンパク質について、アポトーシス阻害および/またはチャペロン機能をアッセイすることができる。内部欠失突然変異においても同様の技術を用いることができるが、内部欠失において突然変異は、2つの適当に

50

配置された制限部位を用いることによって作製され、それによって予め決定された欠失を作ることができ、末端を上記のように処理することができる。

【0038】

部分切断突然変異もまた本発明において企図するものである。このような場合、当業者は、反応時間の長さに応じて多数の場所でDNAを切断する"フリークエントカッター"を用いることができる。したがって、反応条件を変えることによって、一連の種々のサイズの突然変異を作製することができ、次いで活性をスクリーニングすることができる。

DNAアーゼなどでDNA配列を切断し、3、6、9、12個などのアミノ酸をコードするヌクレオチドを挿入し、端部をライゲートすることによって、ランダム内部突然変異もまた作製することができる。いったんこのような突然変異を作製すると、野生型のタンパク質にみられる種々の活性について該変異体をスクリーニングすることができる。

特定のタンパク質ドメインをコードする遺伝子の一般的領域を同定すると、点突然変異を用いて、TS10Q23.3に関連する特定の活性においてどのアミノ酸残基が重要であるかという特定性を同定することができる。したがって、当業者は、DNA鎖においてシングル塩基変化を作製することができ、その結果として変質コドンおよびミスセンス変異を作製することができる。

【0039】

以下はタンパク質のアミノ酸の変更に基づき、改良されてさえおり、第2世代分子であり、議論がなされている。例えば、あるアミノ酸は、抗体の抗原部位または基質の分子上の結合部位などの構造と結合能力の相互性の応用可能な喪失なしにタンパク質構造中で置換されているのであろう。その相互作用的能力およびタンパク質の生物学的機能的な活性を定義するので、あるアミノ酸置換体はタンパク質配列中、およびその基礎にあるDNAコーディング領域で製造されることができ、やはり所有物であるのようにタンパク質を入手する。ゆえに、以下に議論するように、生物学的な有用性または活性の適用可能な喪失なしに遺伝子のDNA配列はにおいて多様な変更がなされるであろうということが本発明者らにより考えられている。表1はある独特のアミノ酸をコードするコドンを示している。

そのような変化、アミノ酸のヒドロパシー価 (hydropathic index) が考慮されていよい。親水性アミノ酸指標が当該技術分野において一般的に理解されているタンパク質上で相互作用的に生物学的機能値が存在する (カイト (Kyte) およびドゥーリトル (Doolittle), 1982)。アミノ酸の相対的にヒドロパシー特徴は得られたタンパク質の二次構造に貢献し、今度は、該タンパク質と他の分子の相互作用を定義する、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などである。

各アミノ酸は、その疎水性および帯電特徴を基礎に割り当てられる (カイトおよびドゥーリトル) : イソロイシン (+4.5) ; パリン (+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) ; トレオニン (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) ; 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) である。

【0040】

あるアミノ酸は同様のヒドロパシー指価またはスコアを持つ他のアミノ酸によって置換されてもよいし、同様の生物学的活性、すなわち生物学的機能が同等であるタンパク質をさらに入手することになってもよいことは当業者には明らかである。そのような変化を起こす場合、ヒドロパシー価がおおよそ2以内であることが好ましいアミノ酸の置換を起こす場合に、指数がおおよそ1以内であるものが特に好ましく、またさらに0.5以内であるものが特に好ましい。

アミノ酸のような置換がヒドロパシーに基づき効果的に作成されることができるとまた理解される。米国特許第4,554,101号 (参照のため本明細書に引用する) はその近隣のアミノ酸のヒドロパシーによって支配されるようなタンパク質の最も偉大な局在化した平均的なヒドロパシーがタンパク質の特性に相関する。米国特許第4,554,101号に詳細に記載

10

20

30

40

50

されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；グルタミン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；セリン（+0.3）；アスパルギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（0.4）；プロリン（ 0.5 ± 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）である。

【0041】

アミノ酸がタンパク質の同様の親水性値を持つアミノ酸に置換することが可能であることおよび生物学的同等性タンパク質とおよび免疫学的同等性タンパク質をさらに入手できることが理解されている。そのような変化において、その親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その値が ± 1 以内であるものが特に好ましく、そしてその値が ± 0.5 以内が一層さらに好ましい。

上記概説のように、アミノ酸置換は一般的にアミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、その疎水性、親水性、帯電性、大きさなどの類似性に基づく。多様な前記の特徴を考慮する例示的置換基は当業者によく知られており、：アルギニンおよびリジン、グルタミン酸およびアスパラギン酸、セリンおよびトレオニン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；およびバリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。

【0042】

本発明のポリペプチドの調製の別態様は、ペプチド模倣体（mimetics）の使用である。模倣体はタンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。例えば、ジョンソン（Johnson）ら、バイオテクノロジー・アンド・ファーマシー（BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY）、ペズト（Pezzuto）ら、編、チャプマン（Chapman）およびホール（Hall）、ニューヨーク（1993）中の「ペプチド・ターン・ミメティクス（Peptide Turn Mimetics）」参照。ペプチド模倣体の使用に隠れている潜在的な理論的根拠はタンパク質のペプチド骨格は主として抗体および抗原のアミノ酸などの分子相互作用を促進するためのような方法においてアミノ酸側鎖を正しく判断することに存在する。ペプチド模倣体は天然の分子に類似の分子相互作用を可能にするように期待されている。これらの主義は、上記主義概説に関連して使用され、TS10Q23.3の多数の天然の特性を持つ第2世代の分子を操作することに使用してよい。

【0043】

D. ドメインスイッチング

実施例に記載するように、本発明者らはヒトTS10Q23.3遺伝子の推定マウスホモログおよびイヌホモログを同定した。さらに、突然変異はその機能を変更すると信じられているTS10Q23.3に同定されてきている。これらの実験は、少なくとも2つの理由にとって重要である。最初に、それらはこの遺伝子のさらに別のホモログ、対立遺伝子変異体および突然変異体に関連の種、例えば、ラット、ウサギ、サル、テナガザル、チンパンジー、ヒトニザル、ヒヒ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジおよびネコなどの種に存在していてもよい合理的な予測を提供する。これらのホモログ、変異体および突然変異体の単位rに関してハエ、タンパク質の分析に関連して、ある活性ドメインまたは機能的ドメインが同定されることができる。第2に、これは該分子のさらに変異分析の出発点を提供するであろう。この情報が開示されることができる一つの方法が「ドメインスイッチング」にあるのである。

ドメインスイッチングは、異なっているがこの場合では関連するポリペプチドを使用してキメラ分子の製造に係する。該マウス、イヌおよびヒトのTS10Q23.3の配列をタンパク質の種のTS10Q23.3の配列と比較し、また、これらのポリペプチドの突然変異体および対立遺伝子変異体と比較することによって、これらの分子の機能的に重要な領域に関する推定を行なうことができる。ついで、これらの領域のTS10Q23.3機能に対する重要性を決定する努力において、これらの分子の関連ドメインスイッチをいれることが可能である。これらの分子は、これらの「キメラ」が天然の分子から区別可

能であるということにおける別の価値を持っていてよく、同じ機能を提供する可能性も一方ではある。

配列同一性に基づき、マウス、イヌおよびヒト配列のアミノ酸レベルにおいて、該分子の一次配列における小さな変化でさえ機能に影響を及ぼすことが推論されてもよい。さらに別の突然変異体の分析および二次構造に影響を及ぼす推定される効果がこの理解に添加するであろう。

ドメインスイッチング実験の豊富な基礎を提供するTS10Q23.3の構造上の別の側面はチロシンフォスファターゼ様ドメインおよび推定チロシンリン酸化ドメインである。このドメインは、この機能の特異性を変更するための他のフォスファターゼドメインに適している。さらにTS10Q23.3のと他のホスファターゼ間のホモロジーの調査はこの観察によって保証されている。

【0044】

E. 融合タンパク質

挿入変異体の特定化した種類は融合タンパク質である。この分子は一般的に、第2のポリペプチドのすべてまたは一部にN-末端またはC-末端に結合したそのままの分子のすべてもしくは実質的な部位を有する。例えば、融合は典型的に異種性宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にするタンパク質の種からのリーダー配列を使用する。タンパク質の有用な融合タンパク質には例えば、抗体エピトープなどの免疫学的に活性のあるドメインを融合タンパク質の精製を容易にするために付加することを含む。融合接合部位またはその近辺部位に開裂部位が含まれることにより、精製後の的外れの除去を容易にするであろう。タンパク質の有用な融合には、例えば酵素からの活性部位、グリコシル化ドメイン、細胞標的化シグナルまたは膜貫通領域からの活性部位などの機能的なドメインの結合を含む。関心のある1つの特定の融合には、TS10Q23.3のホスファターゼ部位が欠如しているが、その基質分子を結合することができるその他の領域を含む欠失構築物が包含される。基質-TS10Q23.3複合体の精製に用いることができるポリペプチドへの融合は、同定および分析のための基質の単離に有用である。

【0045】

融合タンパク質発現システムの例としては、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)システム(ファルマシア、ピスカタウェイ、NJ)、マルトース結合タンパク質システム(NEB、ピバリー、MA)、FLAGシステム(IBI、ニューヘブン、CT)および6xHisシステム(キアゲン、チャットワース、CA)が挙げられる。

これらのシステムの幾つかは、数の少ないアミノ酸のみを生み出す組換えポリペプチドを産生する。たとえば、FLAGシステムおよび6xHisシステムの両方は、短い配列のみを付加し、両者とも抗原性が乏しいことが知られており、ポリペプチドの折りたたみにおいて、その天然のコンホメーションに逆の影響を及ぼさない。

さらに他のシステムにおいて、TS10Q23.3融合構築物の免疫原性を増強する融合タンパク質構築物を創作することが可能である。免疫原性を増加することは当業者には公知であり、たとえば、hsp70などのヘルパー抗原とTS10Q23.3との融合、またはジフテリア毒素鎖もしくはIL12などのサイトカイン由来のペプチド配列とTS10Q23.3との融合は、免疫応答を誘発するのに有用である。他の態様において、TS10Q23.3関連組成物が特異的部位または細胞にターゲティングするのを強化する融合構築物を作製することができる。たとえば、ある種のリガンドに対して、融合TS10Q23.3またはTS10Q23.3型のタンパク質は、そのようなリガンドに対する受容体発現部位へ組成物をターゲティングするための有効な手段である。この作法において、TS10Q23.3またはTS10Q23.3関連組成物は、受容体媒介デリバリーを介して細胞内へ誘導される。TS10Q23.3タンパク質は、リガンドへ共有的に結合または融合することができる。このことは、細胞内へのデリバリー機構として用いることができる。タンパク質が結合したリガンドは、次いで受容体発現細胞によって内在化することができる。

他の融合システムは、所望のポリヌクレオチドから融合パートナーを切り離すことが望

10

20

30

40

50

ましいポリペプチドハイブリッドを作製する。1つの態様において、融合タンパク質は、特異的プロテアーゼ認識配列を含むペプチド配列によって組換えTS10Q23.3ポリペプチドに結合する。適当な配列の例として、タバコエッチウイルスプロテアーゼ(ライフ・テクノロジーズ、ガイサースバーグ、MD)またはXa因子(ニュー・イングランド・バイオラプス、ピバリー、MA)によって認識される配列が挙げられる。

【0046】

F. タンパク質の精製

TS10Q23.3またはその変異体を精製するのは望ましい。タンパク質精製技術は当業者によく知られている。これらの技術には、ある一定のレベルにおいて、ポリペプチドおよび非ポリペプチド断片に対する細胞環境の大まかな分別に関係する。他のタンパク質からのポリペプチドを分離すると、関心のあるポリペプチドは、さらにクロマトグラフィーおよび電気泳動技法を用いたさらなる精製により部分的精製または完全な精製(または均一性に対する精製)を行なう。特に純粋なペプチドの調製に適している分析方法はイオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法である。ポリペプチドの精製に特に有効な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィーであるかまたはHPLCである。

10

本発明のある側面は精製に関しており、特定の態様においてはコードサンプル「タンパク質タンパク質またはペプチドの実質的な精製」に関する。本明細書で使用する「精製タンパク質またはポリペプチド」なる語は、組成物に関する意図されており、タンパク質の組成物から単離可能であり、該タンパク質またはペプチドは天然で入手可能な状態に任意の程度比較して精製される。それゆえ、精製したタンパク質またはペプチドはまた、天然に存在するであろう環境から離れたタンパク質またはペプチドをもいう。

20

【0047】

一般的に「精製された」なる語は、多様なほかの化合物を除去するための再分化を受けやすいタンパク質またはペプチド組成物をいい、その組成物は実質的に生物学的活性を保有している。「実質的に精製している」なる語が使用される場合、この名称は、例えば、組成物中のタンパク質が50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれを超える割合であるような組成物の主要成分をタンパク質またはペプチドが形成する組成物をいうであろう。

該タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量する多様な方法は本開示に照らし合わせて当業者には公知である。これらには、例えば、活性化区分の特定活性を決定すること、またはSDS/PAGE分析によって画分内のポリペプチドの量を査定することなどが含まれる。

30

ある画分の精製を評価する好ましい方法には、該画分の特定活性を計算し、それを最初の抽出物の特定活性と比較し、ついでしたがって精製の程度を計算し、本明細書において「-倍の精製数(-fold purification number)」によって検出可能である。活性料を表すのに使用する実際の単位は、勿論、精製後に選択した特定のアッセイ技術に依存し、発現したタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存する。

【0048】

タンパク質精製に使用するのに適当な多様な技術は当業者によく知られている。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などでの沈殿、または熱変性によるかまたは遠心後；イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー工程；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；およびそれらの組み合わせおよびタンパク質の技法である。当業界において一般的に知られるように、多様な精製工程を行なう順序が変化してもよく、またはある工程は省略してもよく、またさらに実質的に生成したタンパク質またはペプチドの適当な調製方法を生じてもよいことが信じられている。

40

該タンパク質またはペプチドがいつも最も精製された状態にて提供されるという一般的な必要条件は全くない。実際、殆ど実質的ではなく精製された産物はある態様における有

50

用性を持つと考えられ得る。部分的な精製は、組み合わせ一層少ない精製工程を用いることにより、または同じ一般的な精製計画の異なる形態を利用することによって達成されてよい。例えば、HPLC機器を用いて達成される陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは一般的に低圧カラムクロマトグラフィー系を利用する同じ技法より高「-倍」精製を生じる。相対的に低い程度の精製を示す方法はタンパク質産物の総回収量において利点があり、または発現されたタンパク質の活性を維持することに利点があつてよい。

【0049】

ポリペプチドの移動はSDS / PAGEの異なる条件で時折有意に変化することができることは公知である（カバルディ（Capaldi）ら、1977）。それゆえ、異なる電気泳動条件の下で、精製されたまたは部分的に精製された発現産物の明らかな分子量が変化するかもしれない。

10

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、ピークのストラタジーンくれた分析での非常に並外れた迅速な分解によって特徴付けられる。これは、適当な流速を維持する非常にきれいな粒子および高圧を使用して達成される。分離は、数分またはせいぜい1時間で達成されることができる。さらに、該サンプルの非常に少量のみを必要とする。というのは、粒子は非常に小さく、該真空容量がbed容量の非常に小さな画分であるように密に詰められているからである。また、該サンプルの濃度は、バンドが該サンプルの非常にわずかな希釈が存在するとても狭いものであるため、それほど高い必要はない。

ゲルクロマトグラフィーまたは分子篩クロマトグラフィーは、分子の大きさに基づく特別な型の分割クロマトグラフィーである。ゲルクロマトグラフィーの後ろにある理論は、カラムは、小孔を含む不活性基質の小さな粒子で調製されているのだが、大きさにより、分子が孔を通過するかその周辺にあるように小分子と大分子を分離するというものである。粒子が作成される物質が該分子に吸着しない限り、流速を決定する唯一の因子が大きさである。したがって、分子は形が比較的一定である限り、大きさを小さくしてカラムから溶出される。ゲルクロマトグラフィーは異なる大きさの分子を分離するためにしのがれる。というのは、分離は、pH、イオン化強度、温度などのすべての他の因子から独立しているからである。実際には、吸着は全くなく、ゾーンの分離は少なく、そして溶出容量は分子量に対する単純な事象に関連する。

20

【0050】

アフィニティークロマトグラフィーは、単離すべき物質と特異的に結合することができる分子間の特有的なアフィニティを信頼するクロマトグラフィー手法である。カラム物質は結合パートナーの1つを難溶性マトリクスに共有結合させることによって合成される。ついで、カラム物質は該溶液からの物質を特異的に吸収することができる。溶出は結合が起きない条件に変化させることによって起こる（pH、イオン化強度、温度などを変える）。

30

炭水化物含有化合物の精製に有用であるアフィニティークロマトグラフィーの特定の型は、レクチンアフィニティークロマトグラフィーである。レクチンは多様なポリサッカリドおよび糖タンパク質に結合する物質の類である。レクチンは通常臭化シアンによってアガロースに結合している。セファロースに結合したConcanavalin Aは使用されるこの種類の最初の物質であり、ポリサッカリドの単離においておよび糖タンパク質の単離において広く使用されレンズマメレクチンを含むタンパク質のレクチン、N-アセチルグリコサミニル残基の精製に有用である小麦生殖凝集素およびヘリックスポマティア（*Helix pomatia*）レクチンである。レクチンそのものは炭水化物のリガンドを持つアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製される。ラクトースはヒマシマメ（castor bean）およびピーナツからのレクチンを純粋にするために使用した；麦芽糖はレンズマメおよびジャックビーン（jack bean）から抽出するのに有用である。N-アセチル-Dガラクトサミンはダイズからのレクチンを精製するために使用される；N-アセチルグリコサミニルは麦芽からのレクチンに結合する；D-ガラクトサミンは2枚貝からのレクチン入手するのに使用し、L-フコースはハスからのレクチンに結合する。

40

マトリクスはそれ自身は任意の程度まで分子に吸着しない物質であるべきであり、広い

50

範囲の化学的安定性、物理的安定性および温度安定性を持つ。リガンドは、その結合特性を影響しないような方法で結合すべきである。該リガンドは相対的にしっかりした結合も提供すべきである。およびサンプルまたはリガンドを破壊することなく物質を溶出することができるべきである。アフィニティークロマトグラフィーの最も一般的な形態の1つは、イムノアフィニティークロマトグラフィーである。本発明で使用するために適している抗体の製造については以下に議論する。

【0051】

G. 合成ペプチド

本発明はまた、本発明の多様な態様において使用するための一層小さなTS10Q23.3関連ペプチドについても記載する。その相対的に小さなサイズのため、本発明のペプチドは従来の技術により、溶液中または固相支持体上で合成されることもできる。多様な自動合成は、市販されており入手可能であり、公知のプロトコールに従って使用することができる。例えば、ステュワート (Stewart) およびヤング (Young) (1984); タム (Tam) ら、(1993); メリフィールド (Merrifield) (1986); およびバラニー (Barany) およびメリフィールド (1979)、各々は参照のため本明細書に含有する。短いペプチド配列または重複ペプチドのライブラリーはたいてい約6から約35から50までのアミノ酸であり、本明細書に記載される選択された領域に対応するものであり、容易に合成でき、ついで応答性のペプチドを同定するために設計されるスクリーニングアッセイにおいてスクリーニングできる。代わりに、組換えDNA技法は本発明のペプチドをコードする各酸配列が発現ベクターに挿入され、適当な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクションされ、ついで発現に適切な条件下で培養されてよい。

米国特許第4554101号(本発明の参考文献である)もまた、親水性に基く一次アミノ酸配列からのエピトープの同定および製造を教示している。Hoppに開示されている方法を通じて、当業者であれば、本明細書に開示のDNA配列のいずれかによってコードされるアミノ酸配列のいずれかからエピトープを同定することができるであろう。

【0052】

H. 抗原組成物

本発明はまた、抗体の産生に関する動物の免疫に関する抗原としてTS10Q23.3タンパク質またはペプチドの使用に関して提供する。TS10Q23.3またはその一部がカップリングし、結合し、結び付けられ、コンジュゲートされるかまたはリンカー、ポリリンカーまたは誘導体化されたアミノ酸を介して1またはそれ以上の薬剤に化学的に結合していることを想像できる。これば、両または特異性または多価組成物またはワクチンが製造されるように行なわれる。これらの組成物の調製に使用される方法は、当業者によく知られており、例えば製薬学的に許容し得るように動物に投与するのに適しているべきである。好ましい薬剤は、キーホール・リンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) (KLH) またはウシ血清アルブミン (BSA) である。

【0053】

III. 核酸

本発明はまた、他の具体例において、TS10q23.3コードする遺伝子を提供する。ヒト、イヌおよびマウスのTS10q23.3分子遺伝子が同定されている。しかし、当業者であれば、これらの2つの核酸を用いて、容易に種々の他種の関連する相同体を同定することができるが、本発明はこれらの遺伝子に限定されるものではない(ラット、ウサギ、サル、テナガザル、チンパンジー、類人猿、ヒヒ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコなど)。この遺伝子のマウスとイヌの相同体の発見は、よりヒトに関連性が近い種が、実際に同様の相同体を持っているかもしれないという事実の存在を有望にするものである。

さらに、本発明が本明細書に開示されている特定の核酸に限定されないことは明白である。以下に議論するように、"TS10q23.3遺伝子"は、種々の異なる塩基を含み、さらにまだ、本明細書に開示するヒトおよびマウス遺伝子と機能的に(幾つかの場合においては、構造的に)区別しえない対応するポリペプチドを産生することができる。

同様に、ある核酸に対するどのようなレファレンスでも、その核酸を含む宿主細胞を包

10

20

30

40

50

困るものであり、幾つの場合においては、その核酸の産物を発現することができるものとして理解すべきである。さらに、治療的考察に加えて、本発明の核酸を発現する細胞は、TS10q23.3の機能を誘発、抑制、阻害、増大、妨害、終結、刺激または増強させる作用剤をスクリーニングする際に有用である。

【0054】

A.10q23.3をコードする核酸

図6および図9に開示されたヒト遺伝子および図9に開示されたマウス遺伝子が、本発明のTS10q23.3遺伝子である。本発明の核酸は、TS10q23.3遺伝子全体、腫瘍抑制またはホスファターゼ機能を発現するTS10q23.3のドメインまたは本明細書に記載されたTS10q23.3のいずれかの他のフラグメントをコードする。該核酸は、ゲノムDNAから誘導、すなわち、特定の有機体のゲノムから直接クローニングされる。しかし、好ましい具体例において、該核酸は、相補的DNA(cDNA)を包含する。また、cDNAプラス天然のイントロンまたは他の遺伝子から誘導されたイントロンもまた本発明において企図される。このように設計された分子は、"ミニ遺伝子"と呼ばれることもある。最小の使用法として、これらの核酸および本発明の他の核酸は、たとえばゲル電気泳動において分子量標準として用いることができる。

10

語句"cDNA"は、テンプレートとしてメッセンジャーRNA(mRNA)を用いて作製されたDNAを意味することを意図している。ゲノムDNAまたはゲノム、非または部分切断RNAテンプレートからポリメライズされたDNAとは異なって、cDNAを用いる利点は、cDNAが本質的に対応するタンパク質をコードする配列を含むことである。最適発現のために非コーディング領域が必要である場合、あるいは最適発現のためにイントロンなどの非コーディング領域がアンチセンス方策において標的とされている場合など、全または部分ゲノム配列が好ましい場合がある。

20

【0055】

また、核酸配列が僅かに異なるが、それにもかかわらず、同じタンパク質をコードする天然の変異体によって、ある1つの種のある1つのTS10q23.3が表されることも企図している(表1参照)。

本明細書において、語句"TS10q23.3をコードする核酸"とは、全細胞核酸から単離された核酸分子を意味する。好ましい具体例において、本発明は、本質的に図6および図9に記載された核酸配列に関する。語句"図6または図9に記載された"とは、該核酸配列が、図6または図9の一部と実質的に対応することを意味する。本明細書において、語句"機能的に等価なコドン"とは、アルギニンまたはセリンに対する6つのコドンなどの同じアミノ酸をコードするコドン(後記表1参照)、および後記に議論するように、生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンを意味する。

30

【表 1】

アミノ酸			コドン			
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
システイン	Cys	C	UGC	UGU		
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU		
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG		
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU		
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU		
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU	
リシン	Lys	K	AAA	AAG		
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG			
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU		
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG		
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC UCG UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG			
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU		

10

20

【 0 0 5 6 】

遺伝暗号の縮重を考慮して、ヌクレオチドの少なくとも50%、通常少なくとも約60%、さらに通常少なくとも約70%、最も多くは約80%、好ましくは少なくとも約90%および最も好ましくは約95%が、図9と同一である配列が、"図9に記載の"配列といえよう。図9に記載の配列と本質的に同じ配列もまた、標準的条件下においてハイブリッド形成して図9の相補配列を含む核酸セグメントとなりうる配列として機能的に定義しうる。

30

本発明のDNAセグメントとしては、上述したような、生物学的にTS10q23.3と機能が等価のタンパク質およびペプチドをコードするセグメントが挙げられる。このような配列は、核酸配列およびそれによってコードされるタンパク質において天然に生じる事がわかっている、コドンの過剰およびアミノ酸の機能的等価性の結果として生じる。別法として、機能的に等価なタンパク質またはペプチドを、タンパク質の構造において変化を工作するといったような組換えDNA技術を適用して創生することができる。人間によって設計された変化は、部位特異的突然変異誘発技術の適用によって導入することができるが、あるいはランダムに導入した後に所望の機能をスクリーニングしてもよい。

【 0 0 5 7 】

B. オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー

40

当然、本発明には、図6および図9に記載されている配列に対して相補的であるか、または本質的に相補的であるDNAセグメントが包含される。"相補的"である核酸配列とは、標準的ワトソン-クリックの相補ルールに従う塩基対でありうる配列である。本明細書において、語句"相補的配列"とは、上記と同じ核酸比較法で評価しうるような実質的に相補的な配列であるか、または本明細書に記載するような相対的緊縮条件下において図6および図9の核酸セグメントにハイブリダイズしうるものとして定義される核酸配列を意味する。このような配列は、全TS10q23.3タンパク質またはその機能的あるいは非機能的フラグメントをコードすることができる。

また、該ハイブリダイズセグメントは、より短いオリゴヌクレオチドであってもよい。長さが17塩基の配列は、ヒトゲノム内で一回だけ発生すべきであり、したがって、独特

50

の標的配列を特定するのに十分である。より短いオリゴヌクレオチドのほうがインピボ経路において作りやすく、かつ増やしやすけれども、ハイブリッド形成の特異性の測定において、多数の他の因子が関わってくる。その相補的標的に対するオリゴヌクレオチドの結合親和性および配列特異性は、長さが増えると増大する。たとえば、これらに限定されるものではないが、8、9、10、11、12、12、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれ以上の塩基対からなるオリゴヌクレオチドを用いることを企図するものである。250、500、1000、1212、1500、2000、2500、3000または3431塩基およびさらに長い塩基をコードする、より長いポリヌクレオチドも企図するものに含まれる。このようなオリゴヌクレオチドを、たとえばサザンプロットおよびノーザンプロットにおけるプローブとして、および増幅反応におけるプライマーとして用いる。

10

【0058】

好適なハイブリッド形成条件は、当業者には公知である。或る適用、たとえば、部位特異的突然変異誘発によるアミノ酸の置換では、より低い緊縮条件が必要であることがわかる。これらの条件下では、プローブおよび標的鎖の配列が完全に相補的ではなくて、1つまたはそれ以上の位置にミスマッチがある場合でさえもハイブリッド形成が生じる。塩濃度の増加および温度の低下によって、条件の緊縮性が低くなる。たとえば、NaCl約0.1~0.25M、温度約37~約55において、中程度の緊縮条件になり、塩約0.15~0.9M、温度約20~約55において、低い緊縮条件になる。このように、ハイブリッド形成条件は、容易に操作することができ、それゆえに所望の結果に応じて選択し得る一般的な方法となるのである。

20

他の具体例では、たとえば、50mMトリス-HCl(pH8.3)、3mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、温度約20~約37において、ハイブリッド形成が達成される。他のハイブリッド形成条件としては、10mMトリス-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5μM MgCl₂、温度約40~約72が挙げられる。ホルムアミドおよびSDSも他のハイブリッド形成条件に用いることができる。

本発明のプローブおよびプライマーを用いる方法のひとつは、TS10q23.3に関連する遺伝子の探索、特に他の種からのTS10q23.3の相同体の探索である。マウス相同体が存在することによって、ヒトTS10q23.3の他の相同体が、マウスよりも、より近い種およびより遠縁の種において発見されるであろうことが強く示唆される。スクリーニングにはRNA分子の分析が含まれるが、通例、標的DNAは、ゲノムまたはcDNAである。ハイブリッド形成の緊縮性およびプローブの領域を変化させることによって、相同性の程度の異なる相同体を見出すことができる。

30

【0059】

本発明のプローブおよびプライマーを開発するためのもう1つの方法は、部位特異的突然変異誘発である。部位特異的突然変異誘発は、基本的なDNAの特異的突然変異誘発を介して、個別のペプチド、または生物学的機能等価タンパク質またはペプチドを製造するのに有用な技術である。該技術はさらに、前述の考察の1つあるいはそれ以上を組み合わせ、1つあるいはそれ以上のヌクレオチド配列の変化をDNAへ導入することによって、配列変異体を作製し、試験することが容易になる。部位特異的突然変異誘発によって、所望の突然変異ならびに十分な数の近接のヌクレオチドのDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列を用いる突然変異体の産生が行われ、トラバースされる欠失ジャンクションの両端に安定な二重体を形成するのに十分な大きさと配列複雑性をもつプライマー配列が提供される。代表的には、変更される配列ジャンクションの両端に約5から0残基をもつ長さ約17~25ヌクレオチドのプライマーが好ましい。

40

該技術は、代表的には、一本鎖体および二本鎖体の両方で存在するバクテリオファージベクターを使用する。部位特異的突然変異誘発に有用な代表的なベクターとしては、M13ファージといったようなベクターが挙げられる。このようなファージベクターは、市販されており、その使用方法は、一般に当業者には公知である。二本鎖プラスミドもまた部

50

位特異的突然変異誘発において日常的に使用され、対象の遺伝子をファージからプラスミドへ移す段階を省くことができる。

【0060】

一般に、部位特異的突然変異誘発は、最初、その配列内に所望のタンパク質をコードするDNA配列を含む一本鎖ベクターを得るか、または二本鎖ベクターの二本の鎖を解くことによって行われる。所望の突然変異を生じさせるオリゴヌクレオチドは、合成的に製造される。次いで、このプライマーを、ハイブリッド形成条件を選択する際のミスマッチの程度を考慮して、一本鎖DNA調製物とアニーリングし、E. coliポリメラーゼIクレノーフラグメントなどのDNAポリメライズ酵素で処理し、突然変異を生じた鎖の合成を完成する。このようにして、1つの鎖がもとの非変異配列をコードし、第二の鎖が所望の突然変異を含むヘテロ二重体を形成する。次いで、このヘテロ二重体ベクターを用いて、E. coliなどの適当な細胞の形質転換を行い、突然変異配列アレンジメントを生じている組換えベクターを含む配列を選択する。

部位特異的突然変異誘発を用いて選択された遺伝子の配列変異体の作製は、潜在的に有用な種を作製するという手段で提供されるが、これらに限定されるものではなく、遺伝子の配列変異体を得られる他の方法がある。たとえば、所望の遺伝子をコードする組換えベクターを、ヒドロキシルアミンなどの突然変異誘発剤で処理して配列変異体を得てもよい。

【0061】

C. アンチセンス構築物

突然変異腫瘍抑制剤が機能しない場合が幾つかある。それどころか、"野生型"分子において突然変異ポリペプチドが過剰量で発現される場合でさえも、それらは遺伝子置換療法によって克服することができない突然変異的機能をもっている。アンチセンス処置は、このような状況に立ち向かう方法のひとつである。アンチセンス技術はまた、細胞系またはトランスジェニックマウスの発達におけるTS10q23.3の"ロックアウト"機能に対し、調査、診断およびスクリーニングの目的でも使用できる。

アンチセンス方法論の利点は、核酸がその"相補的"配列と対を形成する傾向にあるという事実である。相補性とは、ポリヌクレオチドがワトソン-クリック相補性ルールに従って塩基対を形成することができるということを意味する。すなわち、相対的に大きいプリンが、相対的に小さいピリミジンと塩基対を形成して、DNAの場合、グアニンとシトシン(G:C)およびアデニンとチミン(A:T)、あるいはRNAの場合、アデニンとウラシル(A:U)という組み合わせを形成する。ハイブリッド形成配列においてイノシン、5-メチルシトシン、6-メチルアデニン、ヒポキサンチンなどの普遍性の少ないものを含めても、対形成に干渉しない。

ポリヌクレオチドで二本鎖(ds)DNAを標的化すると、三重ヘリックスが形成される；RNAを標的化すると二重ヘリックスが形成される。アンチセンスポリヌクレオチドは、標的細胞に導入されが場合、その標的ポリヌクレオチドに特異的に結合し、転写、RNA切断、移入、翻訳および/または安定性に干渉する。アンチセンスRNA構築物、あるいはこのようなアンチセンスRNAをコードするDNAを用いて、インビトロまたはインビボにて、ヒトを含めた宿主動物といったような宿主細胞内における遺伝子転写または翻訳もしくはその両方を阻害することができる。

【0062】

アンチセンス構築物は、遺伝子のプロモーターおよび他のコントロール領域、エクソン、イントロンに、あるいはエクソン-イントロン境界にさえも結合するように設計することができる。ほとんどの有効なアンチセンス構築物は、イントロン/エクソンスプライスジャンクションに相補的な領域を含むことを企図されている。したがって、好ましい具体例は、50-200塩基対からなるイントロン-エクソンスプライスジャンクション領域に相補的なアンチセンス構築物を含むことが求められる。その標的選択性に大きく影響を及ぼすことなく該構築物に含めることができるエクソン配列がいくつか存在することが観察されている。含まれるエキソン性部分の量は、使用する特定のエキソンおよびイントロ

10

20

30

40

50

ン配列に応じて変化する。エクソン過剰DNAが含まれるかどうかは、単純に該構築物をインビトロでテストし、正常な細胞機能に影響を及ぼすかどうか、あるいは相補的配列を有する関係する遺伝子の発現に影響を及ぼすかどうかを決定することによって容易にテストすることができる。

前記にて定義したように、"相補性"または"アンチセンス"は、その全長において実質的に相補的であり、僅かな塩基ミスマッチをもつポリヌクレオチド配列を意味する。たとえば、長さ15塩基対では、それらが13または14の位置において相補的ヌクレオチドをもつ場合に相補的であるということができる。天然においては、完全に相補的な配列とは、その全長において完全に相補的であり、塩基対のミスマッチがない配列である。相同性の程度がより低いその他の配列も含まれる。たとえば、相同性が高い限定された領域をもつが、非相同領域(リボザイムなど、後記)も含んでいるアンチセンス構築物を設計することができる。これらの分子の相同性は50%より小さいけれども、適切な条件下においては、標的配列に結合することができる。

ゲノムDNAの一部とcDNAまたは合成配列とを組み合わせ、特異的構築物を作製することができる。たとえば、最も遠い構築物においてイントロンが望まれる場合、ゲノムクローンをを用いる必要がある。構築物の残りの部分に対して、cDNAまたは合成ポリヌクレオチドが、より都合の良い制限部位を提供し、したがって、配列の残部に対して使用される。

【0063】

D. リボザイム

"負の優性"突然変異腫瘍抑制剤への他のアプローチは、リボザイムを使用することである。タンパク質は核酸の触媒として伝統的に用いられているが、別のクラスの巨大分子が、この試みにおいて有用であることがわかってきている。リボザイムは、部位特異的に核酸を切断するRNA-タンパク質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特異的触媒部位をもつ(KimおよびCook、1987; Gerlachら、1987; ForsterおよびSymons、1987)たとえば、多くのリボザイムは、高度の特異性をもってホスホエステルトランスファー反応を促進し、オリゴヌクレオチド基質において、数個のホスホエステルのうちのただ1つを切断する(Cookら、1981; MichelおよびWestoff、1990; Reinhold-HurekおよびShub、1992)。この特異性は、基質が化学反応に先だって、特異的塩基対相互反応を介してリボザイムの内部ガイド配列(IGS)に結合するという要件に起因している。

最初、リボザイム触媒は、核酸に関係する配列特異的切断/ライゲーション反応の一部として観察されている(Joyce、1989; Cookら、1981)。たとえば、米国特許第5354855には、あるリボザイムが、公知のリボヌクレアーゼよりも大きな配列特異性をもつエンドヌクレアーゼとして作用し、DNA制限酵素の配列特異性に似ているが報告されている。したがって、配列特異的リボザイムが媒介する遺伝子発現の阻害は、特に治療としての適用に適している(Scanlonら、1991; Sarverら、1990)。近年、リボザイムが、それらが適用される幾つかの細胞系において遺伝子の変化を誘発させ、変化した遺伝子が癌遺伝子H-ras、c-fosおよびHIVの遺伝子を含むことが報告された。この種の研究のほとんどに、特異的リボザイムによって切断される特異的突然変異コドンに基づき、標的mRNAの修飾が関係している。

【0064】

E. クローニング、遺伝子移入および発現のためのベクター

いくつかの具体例においては、発現ベクターを用いてTS10q23.3ポリペプチド産物を発現させ、次いで、精製し、たとえば、ワクチン接種された動物に抗血清またはモノクローナル抗体を産生させるのに用い、さらにそれを用いてさらに実験を行う。他の具体例では、発現ベクターを遺伝子療法に用いる。発現には、ベクターに提供される適当なシグナルが必要であり、それには、宿主細胞に対象の遺伝子を発現させる、ウイルスおよび哺乳動物由来のエンハンサー/プロモーターといったような種々の調節要素が含まれる。宿主細胞内におけるメッセンジャーRNAの安定性および翻訳能力を最適化するように

設計されたエレメントも定義される。産物を発現する永続的で、安定な細胞クローンを創立するための多数の優性ドラッグ選択性マーカーの使用条件もまた提供される。ドラッグ選択性マーカーの発現とポリペプチドの発現をリンクするエレメントである。

【0065】

(i) 調節エレメント

プロモーター： この出願において、語句"発現構築物"とは、核酸をコードする配列の一部または全部が転写されるような遺伝子産物をコードする核酸を含む、どのようなタイプの遺伝子構築物もが含まれることを意味する。転写物は、タンパク質に翻訳されるが、必須というわけではない。ある具体例において、発現には、遺伝子の転写および遺伝子産物へのmRNAの翻訳の両方が含まれる。他の具体例では、発現には、対象の遺伝子をコードする核酸の転写のみが含まれる。

遺伝子産物をコードする核酸は、プロモーターの転写調節下にある。"プロモーター"とは、遺伝子の特異的転写を開始するのに必要な、細胞の合成機構によって認識されるDNA配列、または合成機構を導入するDNA配列を意味する。語句"転写調節下"とは、プロモーターがRNAポリメラーゼ開始および遺伝子発現を調節する核酸に関連して、正しい位置および方向性にあることを意味する。

語句"プロモーター"は、本明細書においては、RNAポリメラーゼIIに対する開始部位の周囲に集まる転写調節モジュールのグループを意味する。どのようにプロモーターが組織されるかについての多くの見解は、HSVチミジンキナーゼ(tk)およびSV40早期転写酵素ユニットなどの数種のウイルスプロモーターの分析から得られている。より最近の研究によって予測されてきたように、これらの実験から、プロモーターが、それぞれおよそ7-20bpのDNAからなり、一個またはそれ以上の転写アクチベーターまたはリプレッサータンパク質に対する認識部位を含む、分離した機能モジュールからなるということがわかってきている。

【0066】

各プロモーターにおいて少なくとも1つのモジュールが、RNA合成の開始部位を置くように機能する。このもっとも良く知られている例は、TATAボックスであるが、哺乳類末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40遅延遺伝子のプロモーターといったような、TATAボックスを持たないいくつかのプロモーターにおいては、それ自身の開始部位に横たわっている分離エレメントが開始場所の決定を補助する。

さらなるプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を調節する。近年、多数のプロモーターが機能エレメントを開始部位の下流に含むことがわかってきているが、代表的には、これらは開始部位の上流30-110bpの領域に位置している。プロモーターエレメント間のスペーシングは、しばしばフレキシブルであり、そのためエレメントがもう1つのエレメントに対して逆方向になるかまたは移動する場合、プロモーター機能は保存される。tkプロモーターにおいて、プロモーターエレメント間のスペーシングは、活性の低下芽始まる前に、50bpまで増加可能である。プロモーターに応じ、個々のエレメントが、共同作動的または独立的のいずれかにて機能して、転写を活性化しうることがわかる。

それが、標的細胞内で核酸の発現を指示することが可能である限りは、対象の核酸配列の発現を調節するのに用いる特定のプロモーターは、重要であるとは考えられない。したがって、ヒト細胞が標的である場合、核酸コーディング領域に近接した位置にあり、ヒト細胞において発現可能なプロモーターのコントロール下にあることが好ましい。一般的に述べると、このようなプロモーターはヒトあるいはウイルスプロモーターのいずれかを含んでいる。

【0067】

種々の具体例において、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)早期遺伝子プロモーター、SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端リピート、ラットインスリンプロモーターおよびグリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼを用いて、対象コ

ード配列の高レベルの発現を得ることができる。発現レベルが既定の目的にとって十分であるならば、対象のコード配列の発現を達成することが当業者には公知である他のウイルスおよび哺乳類細胞またはバクテリオファージプロモーターも同様に本発明に企図される

特定の生理的シグナルに応答して調節されるプロモーターを選択することにより、遺伝子産物の誘導可能な発現が得られる。たとえば、導入遺伝子の発現、またはマルチシストロニックベクターを用いる場合の複数導入遺伝子の発現が、ベクターが産生される細胞に対して毒性である場合、1つまたはそれ以上の導入遺伝子の発現を阻害または低減化するのが望ましい。産生細胞系に対して毒性である導入遺伝子の例は、プロ-アポトーシスおよびサイトカイン遺伝子である。数種の誘導可能なプロモーターシステムが、導入遺伝子産物が毒性であるウイルスベクターの産生において利用することができる。

10

【0068】

エクジソンシステム（インビトロゲン、カールスパッド、CA）は、そのようなシステムのひとつである。このシステムは、哺乳動物細胞において対象の遺伝子の調節された状態で発現するように設計されている。該システムは、導入遺伝子の発現は実質的に最小限ではないが、200倍以上の誘導性を可能にしている強く調節された発現メカニズムからなる。このシステムは、のショウジョウバエのヘテロダイマーエクジソン受容体に基いており、エクジソンまたはムリステロンAといったようなその類縁体が受容体に結合する場合、受容体はプロモーターを活性化して、下流導入遺伝子を発現させ、高レベルのmRNA転写物が得られる。このシステムにおいて、ヘテロダイマー受容体の両モノマーは、ひとつのベクターから構成的に発現されるが、対象遺伝子の発現を駆動させるエクジソン応答性受容体は、他のプラスミド上にある。したがって、このタイプのシステムの対象遺伝子トランスファーベクターへの工作は、有用である。次いで、対象遺伝子を含むプラスミドおよび産生細胞の受容体モノマーの共トランスフェクションを行うことにより、潜在的に毒性の導入遺伝子を発現することなく、遺伝子トランスファーベクターが産生される。適当な時点において、エクジソンまたはムリステロンAによって導入遺伝子の発現を活性化することができる。

20

【0069】

有用な他の誘導可能なシステムは、GossenおよびBujard（GossenおよびBujard、1992；Gossenら、1995）によって独自に開発されたTet-Off（登録商標）またはTet-On（登録商標）システムである。このシステムもまた、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどのテトラサイクリン誘導体に応答して、高レベルの遺伝子発現を調節された状態で発現させる。Tet-Onシステムでは、ドキシサイクリンの存在下で遺伝子発現が作動されるが、Tet-Offシステムではドキシサイクリンの不在下で遺伝子発現が作動される。これらのシステムは、大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロンから誘導された2つの調節エレメントに基いている。テトラサイクリンリプレッサーが結合するテトラサイクリンオペレーター配列およびテトラサイクリンリプレッサータンパク質。対象遺伝子を、テトラサイクリン応答性エレメントがその中に存在するプロモーターの後ろでプラスミドにクロニングする。第2のプラスミドは、テトラサイクリン制御トランスアクチベーターと呼ばれ、Tet-Offシステムでは、単純ヘルペスウイルス由来のVP16ドメインおよび野生型テトラサイクリンリプレッサーからなる調節エレメントを含む。したがって、ドキシサイクリンの不在下において、転写が構成的に行われる。Tet-Onシステムでは、テトラサイクリンリプレッサーは野生型ではなく、ドキシサイクリンの存在下で転写を活性化する。テトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下で産生細胞が成長させることができ、潜在的毒性導入遺伝子の発現を阻止することができるが、ベクターが患者に誘導されるときに、遺伝子発現が構造的に行われるので、遺伝子療法用ベクター産生には、Tet-Offシステムが好ましい。

30

40

【0070】

幾つかの状況において、遺伝子療法ベクターにおいて、導入遺伝子の発現を調節することが望ましい。たとえば、所望の発現レベルに応じて、種々の強さの活性をもつ異なるウイルスプロモーターを用いることができる。哺乳動物細胞では、CMV即時早期プロモ-

50

ターは、強い転写活性化を提供するためにしばしば用いられる。強度の低いCMVプロモーターの修飾バージョンもまた、導入遺伝子の低レベルの発現が望まれる場合に用いられている。造血細胞における導入遺伝子の発現が望まれる場合、MLVまたはMMTV由来のLTRといったようなレトロウイルスプロモーターがしばしば用いられる。所望の効果に応じて用いられる他のウイルスプロモーターとしては、SV40、RSV LTR、HIV-1およびHIV-2 LTR、E1A、E2AまたはMLP領域由来などのアデノウイルスプロモーター、AAV LTR、カリフラワーモザイクウイルス、HSV-TKおよびトリ肉腫ウイルスが挙げられる。

同様に、組織特異的プロモーターを用いて、潜在的毒性または標的組織でない組織に対する望まない効果が減少されるように、特異的組織または細胞における転写を行うことができる。たとえば、PSA、プロバシン、プロスタティック酸ホスファターゼまたは前立腺特異的カリクレイン(hK2)を用いて前立腺において遺伝子発現を標的化することができる。同様に、次のプロモーターを用いて他の組織において遺伝子発現を標的化することができる。

【0071】

【表 2】

組織特異的プロモーター

組織	プロモーター	
膵臓	インスリン	
	エラスチン	
	アミラーゼ	
	p d r - 1 p d x - 1	10
	グルコキナーゼ	
肝臓	アルブミンPEPCK	
	HBVエンハンサー	
	α フェトプロテイン	
	アポリポプロテインC	
	α -1アンチトリプシン	20
	ビテロゲニン, NF-AB	
	トランスチレチン	
骨格筋	ミオシンH鎖	
	筋クレアチンキナーゼ	
	ジストロフィン	
	カルパインp 9 4	30
	骨格 α アクチン	
	速トロポニン1	
皮膚	ケラチンK 6	
	ケラチンK 1	
肺	CFTR	
	ヒトサイトケラチン1 8 (K 1 8)	40
	肺表面タンパク質A, BおよびC	
	CC-1 0	
	P 1	
平滑筋	s m 2 2 α	
	SM- α -アクチン	

内皮	エンドセリン-1	
	E-セレクチン	
	フォンビルブランド因子	
	T I E (Korhonenら、1995)	
	KDR / f l k - 1	
メラノサイト	チロシナーゼ	10
脂肪組織	リポプロテインリパーゼ (Zechnerら、1988)	
	アジプシン (Spiegelmanら、1989)	
	アセチルC o Aカルボキシラーゼ (PapeおよびKin、1989)	
	グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ (Daniら、1989)	
	アジポサイトP2 (Huntら、1986)	
血液	β グロブリン	20

【0072】

いくつかの適応症においては、遺伝子療法ベクターの投与後、特定の回数において転写を活性化することが望ましい。これは、ホルモンまたはサイトカイン調節可能なプロモーターにおいてなしうるものである。たとえば、適応症が、特定のステロイドが産生されるかまたは送られる生殖腺組織である場合の遺伝子療法では、アンドロゲンまたはエストロゲン調節プロモーターの使用が都合がよい。このようなホルモン調節可能なプロモーターとしては、MMTV、MT-1、エクジソンおよびルビスコ (R u B i s c o) が挙げられる。甲状腺、脳下垂体および副腎ホルモんに応答するような他のホルモン調節プロモーターは、本発明において有用であることが予測される。使用できると考えられるサイトカインおよび炎症タンパク質応答プロモーターとしては、KおよびTキニノゲン (Kageyamaら、1987)、c - f o s、TNF - 、C - 反応性タンパク質 (Arconeら、1988)、ハプトグロビン (Oliveroら、1987)、血清アミロイドA2、C / E B P 、 I L - 1、I L - 6 (PoliおよびCortese、1989)、補体C3 (Wilsonら、1990)、I L - 8、 - 1酸糖タンパク質 (ProwseおよびBaumann、1988)、 - 1アンチプシン、リポプロテインリパーゼ (Zechnerら、。1988)、アンジオテンシノーゲン (Ronら、1991)、フィブリノーゲン、c - j u n (ホルボールエステル、TNF - 、紫外線照射、レチノイン酸および過酸化水素によって誘導しうる)、コラゲナーゼ (ホルボールエステルおよびレチノイン酸によって誘導される)、メタロチオネイン (重金属およびグルコルチコイド誘導可能)、ストロメリシン (ホルボールエステル、インターロイキン - 1およびEDFによって誘導可能)、 2マクログロブリンおよび 1アンチキモトリプシンが挙げられる。

【0073】

細胞周期調節可能プロモーターが本発明に有用であることが予想される。たとえば、ピシストロン遺伝子療法ベクターでは、細胞をG1相にとどめるp16などの第1遺伝子の発現を駆動させる強いCMVプロモーターの使用に続いて、細胞周期のG1相において活性であるプロモーターのコントロール下でp53などの第2遺伝子が発現し、それによって細胞がアポトーシスに導かれる"第2ヒット"が提供される。種々のサイクリン類、PCNA、ガレクチン - 3、E2F1、p53およびBRCA1といったような他のプロモ-

ターが使用できる。

オステオカルシン、低酸素症応答エレメント (HRE)、MAGE-4、CEA、フェトプロテイン、GRP78/BiPおよびチロシナーゼなどの腫瘍特異的プロモーターもまた、腫瘍細胞における遺伝子発現の調節に用いることができる。本発明に使用しうる他のプロモーターとしては、Lac-調節可能、化学療法誘発 (MDRなど) および熱 (高熱症) 誘発可能プロモーター、照射誘発可能 (EGR (Jokira、1995))、インヒビリン、RNApolIII tRNAmetおよび他のアミノ酸プロモーター、U1 snRNA (Barlettら、1996)、MC-1、PGK、アクチンおよびグロビンなどが挙げられる。有用である他の多くのプロモーターが、WalterおよびStein (1996) にリストされている。

10

上記プロモーター単独使用または他のプロモーターとの組み合わせ使用のいずれもが、所望する作用に応じて、本発明において有用であることが予想される。さらに、このプロモーターのリストは、包括的または制限的にとらえるべきではなく、当業者であれば、本明細書に開示されるプロモーターおよび方法に関連して使用することができる他のプロモーターについて知ることができるであろう。

【0074】

エンハンサー：エンハンサーは、同じDNA分子において離れた位置にあるプロモーターからの転写を増強する遺伝子エレメントである。エンハンサーは、プロモーターと良く似たように組織される。すなわち、それらは多くの個別のエレメントからなり、各エレメントは、1つまたはそれ以上の転写タンパク質に結合する。エンハンサーとプロモーターの間の基本的な差異は、操作上のことである。エンハンサー領域は全体として、離れたところで転写を刺激することができなければならない。このことはプロモーター領域またはその成分エレメントでは層である必要はない。一方、プロモーターは、特定の部位および特定の方向性においてRNA合成の開始を指示する、1つまたはそれ以上のエレメントをもたなければならないが、エンハンサーにはこのような特性はない。プロモーターおよびエンハンサーはしばしばオーバーラップし、隣接しており、非常に類似したモジュラー組織を持つように見えることが多い。

20

下記に示すのは、上記リストした組織特異的プロモーターのほかに、さらに苦加えるプロモーターのリストである (表3および表4)。補足すると、(真核プロモーターデータベースEPDBによる) どのようなプロモーター/エンハンサー組み合わせ物でも、遺伝子発現に用いることができる。デリバリーコンプレックスの一部または付加的遺伝子発現構築物のいずれかとして、適当な細菌ポリメラーゼが提供されれば、真核細胞は、細菌プロモーターからの細胞質転写をサポートすることができる。

30

【0075】

【表 3】

<u>エンハンサー／プロモーター</u>	
免疫グロブリン重鎖	
免疫グロブリン軽鎖	
T細胞受容体	
HLA DQ α およびDQ β	10
β インターフェロン	
インターロイキン2	
インターロイキン2受容体	
MHCクラスII5	
MHCクラスII HLA DR α	
β アクチン	20
筋クレアチンキナーゼ	
プレアルブミン (トランスチレチン)	
エラスターゼ I	
メタロチオネイン	
コラゲナーゼ	
アルブミン遺伝子	
α フェトタンパク質	30
τ グロブリン	
β グロブリン	
e-fos	
c-HA-ras	
インスリン	40
神経細胞接着分子 (NCAM)	
α 1アンチトリプシン	
H2B (TH2B) ヒストン	
マウスまたはI型コラーゲン	
グルコース調節タンパク質 (GRP94およびGRP78)	

ラット成長ホルモン	
ヒト血清アミロイドA (SAA)	
トロポニンI (TN I)	
血小板由来増殖因子	
デュシェンヌ筋ジストロフィー	
SV40	10
ポリオーマ	
レトロウイルス	
パピローマウイルス	
B型肝炎ウイルス	
ヒト免疫不全ウイルス	
サイトメガロウイルス	20
<u>テナガザル白血病ウイルス</u>	

【 0 0 7 6 】

【表 4】

エレメント	インデューサー
MT 11	ホルボールエステル (TPA) (重鎖)
MMTV(マウス哺乳類腫瘍ウイルス)	グルココルチコイド
β インターフェロン	ポリ (r I) X ポリ (r c)
アデノウイルス 5 E2	E1a
c-jun	ホルボールエステル(TPA), H ₂ O ₂
コラゲナーゼ	ホルボールエステル(TPA)
ストロメライシン	ホルボールエステル(TPA), IL-1
SV40	ホルボールエステル(TPA)
マウスMX遺伝子	インターフェロン, ニューカッスル 病ウイルス
GRP78遺伝子	A23187
α -2-マクログロブリン	IL-6
ビメンチン	血清
MHC クラス I 遺伝子 H-2k B	インターフェロン
HSP70	E1a、SV40 ラージT抗原
プロリフェリン	ホルボールエステル-TPA
腫瘍壊死因子	FMA
甲状腺刺激ホルモン	甲状腺ホルモン
インスリンEボックス	グルコース

10

20

30

40

【0077】

ポリアデニル化シグナル： cDNA 挿入物を用いる場合、遺伝子転写の適切なポリアデニル化を起こすためにポリアデニル化シグナルを含むことが望ましい。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の実行を成功させることにおいて極めて重大であるとは考えられず、ヒト成長ホルモンおよびSV40ポリアデニル化シグナルなどの配列も用いることができる。ターミネーターもまた発現カセットのエレメントとして企図されるものである。これらのエレメントは、カセットから他の配列へのメッセージレベルを増強することお

50

よび読みを最小化するのに役立つ。

【0078】

I R E S : 本発明の具体例において、内部リボソーム結合部位 (I R E S) エレメントを使用して多重遺伝子またはポリシストロン性メッセージを作成する。I R E S エレメントは、5'メチル化C a p 依存性翻訳のリボソームスキャンモデルをバイパスし、内部部位で翻訳を開始することができる (PelletierおよびSonenberg、1988)。ピカノウイルスファミリーに属する2つのメンバー (ポリオおよびエンケファロマイオカルジチス) のI R E S エレメント (PelletierおよびSonenberg、1988) および哺乳類メッセージのI R E S (MacejakおよびSarnow、1991) が開示されている。I R E S エレメントは、異種オープンリーディングフレームに結合することができる。多重オープンリーディングフレームは、一緒に転写され、それぞれI R E S によって分離され、ポリシストロン性メッセージを作成する。I R E S エレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームがリボソームにアクセスして、翻訳することができる。多重遺伝子は、シングルメッセージを転写するためのシングルプロモーター/エンハンサーを用いて発現される。

10

どのような異種オープンリーディングフレームでもI R E S エレメントに結合することができる。これには、分泌タンパク質、マルチサブユニットタンパク質、独立した遺伝子によってコードされるタンパク質、細胞内または膜結合タンパク質および選択可能なマーカーに対する遺伝子が含まれる。この経路において、数種のタンパク質の発現を、1つの構築物および1つの選択可能なマーカーとともに同時に細胞内へ遺伝子工作することができる。

20

【0079】

(ii) 選択可能なマーカー

本発明の具体例において、細胞には本発明の核酸構築物が含まれ、ひとつの細胞は発現構築物内にマーカーを含むことによってインピボまたはインピトロで同定することができる。このようなマーカーによって、細胞に同定可能な変化が付与され、発現構築物を含む細胞を容易に同定できるようになる。通常、薬物選択的マーカーはクローニングおよび形質転換物の選択を助け、たとえば、ネオマイシン、プロマイシン、ハイグロマイシン、D H F R、G P T、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択可能なマーカーである。また、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (t k) またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) などの酵素を使用してよい。免疫学的マーカーも使用することができる。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されることが可能である限りは、使用する選択可能なマーカーが重要なものであるとは考えられない。さらなる選択可能なマーカーが当業者にとって公知である。

30

【0080】

(iii) 発現ベクターのデリバリー

発現ベクターを細胞に導入する経路は多数存在する。本発明の具体例において、発現構築物は、ウイルスまたはウイルスゲノム由来の工作された構築物を含んでいる。受容体媒介性エンドサイトーシスを介して細胞内へ入るウイルスの能力、宿主ゲノムへ組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定的および効率的に発現するウイルスの能力ゆえに、ウイルスは哺乳類細胞に外来性遺伝子を移入するための魅力的な候補である (Ridgeway、1988; NicolasおよびRubenstein、1988; BaichwalおよびSuden、1986; Temin、1986)。遺伝子ベクターとして最初に用いられたウイルスは、パポウイルス (シミアンウイルス40、ウシパピローマウイルス、およびポリオーマ) (Ridgeway、1988; BaichwalおよびSuden、1986) およびアデノウイルス (Ridgeway、1988; BaichwalおよびSuden、1986) といったようなD N A ウイルスであった。これらは、相対的に外来性D N A 配列に対するキャパシティが小さく、宿主の範囲に制限がある。さらに、許容細胞内でのそれらの発癌力および細胞障害効果は安全性に関する事柄を提起する。それらは、たった8 k b までの外来性遺伝物質しか収容することができないが、用意に種々の細胞系および実験動物に導入することができる (NicholasおよびRebinstein、1988; Te

40

50

min、1986)。ベクターは細胞の内部で複製することができる。別の態様においては、ベクターは複製不能であり、デリバリー前にヘルパーT細胞において複製する。適当なベクターは公知であり、米国特許5252479およびPCT公開公報WO93/07282ならびに米国特許5691198、5747469、5436146および5753500に開示されている。

【0081】

アデノウイルス： インビボデリバリーの好ましい方法のひとつでは、アデノウイルス発現ベクターを使用する。"アデノウイルス発現ベクター"とは、(a)構築物のパッケージングをサポートする；および(b)クローニングされたアンチセンスポリヌクレオチドを発現するのに十分なアデノウイルス配列を含む構築物を包含することを意味する。これに関連して、発現は遺伝子産物が合成されることを必要としない。

発現ベクターは、遺伝子的に工作されたアデノウイルスである。アデノウイルスの遺伝子的組織の知識(36kb、直線、二本鎖DNAウイルス)によって、アデノウイルスDNAの大きなピースと7kbまでの外来性配列の置換が可能になる(GrunhausおよびHorwitz、1992)。レトロウイルスとは異なって、なアデノウイルスDNAは潜在的遺伝毒性なしにエピソーム的作法で複製することができるので、宿主細胞がアデノウイルスに感染しても、染色体組み込みは起こらない。また、アデノウイルスは、構造的に安定であり、大量に増殖した後にゲノム再構成が検出されていない。アデノウイルスは、細胞サイクルの時期を考慮することなく、実質上すべての上皮細胞に感染することができる。これまでに、アデノウイルス感染は、ヒトの急性呼吸器疾患などの軽い疾患のみに関係していることがわかっている。

【0082】

アデノウイルスは、ゲノムが中程度の大きさであり、取り扱いが容易であり、力価が高く、標的細胞の範囲が広く、かつ感染能力が高いので、遺伝子運搬ベクターとして特に好適である。ウイルスゲノムの両端には、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要なcisエレメントである、100-200塩基対の逆方向反復(ITRs：inverted repeats)が含まれている。ゲノムの初期(E)および後期(L)領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分けられる異なる転写ユニットを含んでいる。E1領域(E1AおよびE1B)は、ウイルスゲノムおよび2、3の細胞遺伝子の転写の調節をつかさどるタンパク質をコードする。E2領域(E2AおよびE2B)の発現により、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成がなされる。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子の発現および細胞停止に関与している(Renan、1990)。ウイルスキャプシドタンパク質の大部分が含まれる、後期遺伝子の産物は、主要後期プロモーター(MLP)によって生み出されるシングル第1次転写物の重大なプロセッシング後のみに発現される。MLP(16.8m.u.に位置する)は、感染の後期中特に有効であり、このプロモーターから生み出されるすべてのmRNAは、それらを翻訳に適したものにす、5'-3分節リーダー(TPL)配列をもつ。

現在のシステムでは、組換えアデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターを用いた相同的組換えから作製される。2つのプロウイルスベクター間の可能な組換えにより、野生型アデノウイルスが、このプロセスから作製される。したがって、個々のブランクからウイルスのシングルクローンを単離し、そのゲノム構造を審査することが重要である。

【0083】

複製不能である、アデノウイルスベクターの作製および増殖は、ヒト胚腎細胞からAd5 DNAフラグメントによって形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現する、293と称されるユニークヘルパー細胞系に従属している(Graham、1977)。E3領域はアデノウイルスゲノムから分与しうるので(JonesおよびShenk、1978)、293細胞のヘルプを受けて、アデノウイルスベクターは、E1、E3または両方の領域に外来性DNAを運搬する(GrahamおよびPreovec)。天然において、アデノウイルスは、およそ105%の野生型ゲノムをパッケージすることができるが(Ghosh-Choudhuryら、198

7)、これは約2 kb過剰のDNAに対するキャパシティである。E1およびE3領域に置換可能な約5.5 kbのDNAと組み合わせ、アデノウイルスベクターの最大キャパシティは7.5 kb以下、あるいはベクター全長の約15%である。80%以上のアデノウイルスゲノムがベクターバックボーンに残り、それらはベクターが生み出す細胞毒性源である。また、E1欠失ウイルスの複製不能性は不完全である。たとえば、ウイルス遺伝子発現の漏れが、高度多重性感染(MOI)において現在入手可能なベクターに観察された(Muligan、1993)。

【0084】

ヘルパー細胞系がは、ヒト胚腎細胞、筋細胞、造血細胞または他のヒト胚間充織細胞または上皮細胞といったようなヒト細胞から誘導することができる。また、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスに対して許容性である他の哺乳類の細胞から誘導することもできる。このような細胞として、たとえば、ベロ細胞または他のサル胚間充織細胞または上皮細胞がある。上述したように、好ましいヘルパー細胞は、293である。

近年、Racherら(1995)に、293細胞および増殖するアデノウイルスの改良された培養法が開示された。ひとつの方法では、天然の細胞集合体を個々の細胞を、100-200mlの培地を入れた1リットルのシリコンコーティングしたスピネルフラスコ(Techne、ケンブリッジ、UK)にて培養することによって成長させる。40rpmで攪拌し、細胞の生存率をトリパンブルーで評価する。他の方法では、Fibra-Celマイクロキャリア(Bibby Sterlin、ストーン、UK)(5g/l)を次のように用いる。5mlの培地で再懸濁した細胞植え込み物を250mlのエレンマイヤーフラスコに入れた該キャリア(50ml)に加え、時々震とうしながら1-4時間置く。次いで培地を50mlの新鮮な培地と交換し、震とうを開始する。ウイルス産生のために、細胞を約80%の集密となるまで成長させ、その後、培地を交換し(最終体積の25%まで)、0.05のMOIでアデノウイルスを加える。培養物を一夜静置し、次いで、体積を100%まで増加し、さらに72時間震とうする。

【0085】

アデノウイルスベクターが複製不能であること、または少なくとも条件付不能であることという要求以外には、アデノウイルスベクターが本発明を成功裏に実行することによって重大であるとは考えられない。アデノウイルスは、42種類の異なるセロタイプまたはサブグループA-Fのいずれであってもよい。本発明に用いる条件付複製不能アデノウイルスベクターを得るためには、サブグループCの5型アデノウイルスが好ましい開始材料である。5型アデノウイルスは、生化学的および遺伝子的常包が非常によくわかっており、歴史的にアデノウイルスをベクターとして用いる構築物のほとんどに用いられてきているヒトアデノウイルスであるというのがその理由である

上述したように、本発明の代表的なベクターは複製不能であり、アデノウイルスE1領域を持たない。したがって、E1コーディング配列が除去された位置に対象遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入するのが、もっとも簡便である。しかし、構築物をアデノウイルス配列に挿入する位置は、本発明において重大なことではない。Karlsonら(1986)に記載されているように、対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを、E3置換ベクターにおいて消失したE3領域の代わりに、もしくはE4が欠失したヘルパー細胞系またはヘルパーウイルス補体のE4領域に挿入することもできる。

アデノウイルスは成長および増殖させるのが容易であり、インビトロおよびインビボにおいて宿主範囲が広範である。このグループのウイルスは高力価(10^9 10^{11} ユニット/mlなど)であり、感染応力も高い。アデノウイルスのライフサイクルは、宿主細胞ゲノムへの組み込み必要としない。アデノウイルスベクターによってデリバリーされる外来性遺伝子はエピソーマルであり、それゆえに宿主細胞に対する遺伝毒性が低い。野生型アデノウイルスを用いたワクチン接種の研究においても副作用は報告されておらず(Couchら、1963; Topら、1971)、その安全性および治療上有効なインビボ遺伝子運搬ベクターであることは明らかである。

アデノウイルスベクターは、真核遺伝子発現(Levreroら、1991; Gomez-Foixら、

10

20

30

40

50

1992) およびワクチンの開発 (Grunhaus および Horwiz, 1992; Graham および Prevec, 1992) に用いられている。近年、動物実験により、組換えアデノウイルスを遺伝子療法に用いることが示唆された (Stratford-Perricaudet および Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet ら, 1990; Rich ら, 1993) 組換えアデノウイルスを異なる組織に投与する研究として、気管滴下 (Rosenfeld ら, 1991; Rosenfeld ら, 1992)、筋肉注射 (Ragot ら, 1993)、末梢静脈血管注射 (Herz および Gerard, 1993) および脳内ステレオタクチック植え込み (Le Gal La Salle ら, 1993) などがある。

【0086】

レトロウイルス： レトロウイルスは、逆転写を行って感染した細胞内でその RNA を二本鎖 DNA に変換する能力を特徴とする一本鎖 RNA ウイルスのグループである (Coffin, 1990)。次いで、得られる DNA をプロウイルスとして細胞内染色体へ安定に組み込み、ウイルスタンパク質の合成を行う。組み込みによって、レシピエント細胞およびその子孫細胞にウイルス遺伝子配列が保有される。レトロウイルスゲノムは、キャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素およびエンベロープ成分をそれぞれコードする gag、pol および env の 3 つの遺伝子を含んでいる。gag 遺伝子から上流に発見された配列は、ゲノムをピリオンにパッケージングするシグナルを含んでいる。2 つの長い末端反復 (LTR) 配列が、ウイルスゲノムの 5' および 3' 末端に存在する。これらは、強力なプロモーターおよびエンハンサー配列を含んでおり、宿主細胞ゲノムに組み込むためにも必要である (Coffin, 1990)。

レトロウイルスベクターを構築するためには、複製不能なウイルスを産生するためのウイルス配列の代わりに、対象の遺伝子をコードする核酸をウイルスゲノムへ挿入する。ピリオンを産生するためには、gag、pol および env 遺伝子を含むが、LTR を含まないパッケージング細胞系およびパッケージング成分を構築する (Mann ら, 1983)。cDNA、およびレトロウイルス LTR ならびにパッケージング配列を含む組換えプラスミドを細胞系に導入する場合 (リン酸カルシウム沈降法などにより)、パッケージング配列によって、組換えプラスミドの RNA 転写物がウイルス粒子にパッケージされるようになり、次いで培養培地へ分泌される (Nicolas および Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann ら, 1983)。次いで、組換えレトロウイルスを含む培地を、集め、必要に応じて濃縮し、遺伝子運搬に使用する。レトロウイルスベクターは、広範なタイプの細胞に感染することができる。しかし、組み込みおよび安定した発現には、宿主細胞の分割が必要である (Paskind ら, 1975)。

【0087】

近年、レトロウイルスベクターを特異的に標的化するために設計される新規なアプローチが、ウイルスエンベロープにラクトース残基を化学的に付加することによるレトロウイルスの化学的修飾にもとづいて発達してきた。この修飾によってシアログリコタンパク質受容体を介する肝細胞の特異的感染が可能になった。

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特定の細胞受容体に対するビオチン化抗体を使用するという、組換えレトロウイルスの標的化への異なるアプローチが設計された。クラス I およびクラス II の主要細胞適合性複合体抗原に対する抗体を用いて、異所性ウイルスによる、表面抗原を生み出す種々のヒト細胞の感染が実証された (Roux ら, 1989)。

本発明のすべての態様において、レトロウイルスベクターの使用に対しては制限がある。たとえば、通常、レトロウイルスベクターは、細胞ゲノム内のランダムな部位に組み込む。このことから、宿主遺伝子の遮断またはウイルス調節配列の挿入による挿入突然変異誘発が起こり、フランキング遺伝子の機能を妨害する (Varmus ら, 1981)。欠陥ウイルス使用に関するもうひとつの関係は、パッケージング細胞における野生型複製コンピテントウイルスの潜在的出現である。これは、組換えウイルスの完全な配列が、宿主細胞ゲノムに組み込まれた gag、pol、env 配列の上流に挿入されるという組換えイベントに由来する。しかし、今や新規なパッケージング細胞系が入手可能であり、組換えの可能性は

大きく減少すべきである (Markowitzら、1988; Hersdorfferら、1990)。

【0088】

ヘルペスウイルス：単純ヘルペスウイルス (HSV) は神経親和性なので、神経系疾患の治療において大きな関心もたれている。さらに、宿主細胞染色体に組み込まれることなく、または他の宿主細胞代謝を変化させることなく、ならびに潜在中に活性であるプロモーターが存在しつつ、非分裂神経細胞において潜在性感染を創立する HSV の能力は、HSV を興味深いベクターにしている。多くの注目が HSV の神経親和性適用に集まっているけれども、このベクターは、他の組織にも広い宿主範囲で利用することができる。

HSV を興味深いものにして他の因子は、ゲノムの大きさと構成である。HSV は大きいので、複数の遺伝子または発現カセットの組み入れに関して、他の、より小さいウイルスシステムよりも問題性が少ない。さらに、種々の性能 (一時性、強度など) をもつ異なるウイルスコントロール配列の有用性が、他のシステムにおけるよりも広い範囲で発現をコントロールすることを可能にしている。ウイルスが相対的に少ないスプライスマッセージしか持たないこと、さらに、遺伝子的工作が容易であることもまたこのウイルスの利点である。

また、HSV は相対的に工作が容易であり、高い力価で成長させることができる。したがって、十分な MOI を得るために必要なボリュームの点および繰り返し投与の必要性が少ない点の両方において、デリバリーにおける問題が少ない。遺伝子療法ベクターとしての HSV をレビューするために、Glorisoら (1995) を参照せよ。

【0089】

サブタイプ 1 および 2 で称される HSV は、ヒトが直面した最も一般的な感染仲介者のうちのひとつである、エンベロープをもつウイルスであり、世界中で多数のヒト患者が感染している。大きい、複合した二本鎖 DNA ゲノムは、たくさんの異なる遺伝子産物をコードしており、その幾つかは、スプライスされた転写物から誘導される。ビリオンおよびエンベロープ構成成分に加えて、該ウイルスは、プロテアーゼ、リボ核酸レダクターゼ、DNA ポリメラーゼ、ssDNA 結合タンパク質、ヘリカーゼ/プライマーゼ、DNA 依存性 ATP アーゼ、dUTP アーゼなどの多くの他のタンパク質をコードする。

HSV 遺伝子は、発現が調和的に調節され、配列的にカスケード形式で並んでいる幾つかのグループを形成する (Honesty および Roizman、1974; Honesty および Roizman、1975; Roizman および Sear、1995)。遺伝子 (感染後に発現される遺伝子の第 1 セット) の発現は、番号 16 のビリオンタンパク質または 形質導入因子によって強化される (Postら、1981; Batterson および Roizman、1983; Campbellら、1983)。

遺伝子の発現は、4 遺伝子によってコードされる機能的 遺伝子産物 (最も重要なものは ICP4 である) (DeLucaら、1985)。遺伝子 (大きなビリオン構造タンパク質をコードするヘテログループの遺伝子) は最適発現のためにウイルス DNA 合成の開始を必要とする (Hollandら、1980)。

ゲノムの複雑性と一致して、HSV のライフサイクルは全く複雑なものである。ウイルス粒子の合成をもたらし、最終的には細胞死にいたる溶菌サイクルに加えて、ウイルスは、未決定のシグナルが溶菌サイクルの繰り返しの引き金をひくまでゲノムが神経節に維持される潜在期に入る能力をもっている。HSV のビルレント変異体が開発されており、遺伝子療法状況においては容易に入手可能である (米国特許 5672344)。

【0090】

アデノ関連ウイルス：近年、アデノ関連ウイルス (AAV) が、一般に用いられているレトロウイルスおよびアデノウイルスベクターの強力な代替物として現れ出している。レトロウイルスおよびアデノウイルス媒介性遺伝子トランスファーの研究は、前者の強力なガン遺伝子特性および後者に関連する免疫原的問題への関心を喚起するけれども、AAV は、このような病原的適用のいずれにも関連しない。

さらに、AAV は、他のベクターよりも、よりその所望性を高める幾つかのユニークな特徴をもっている。レトロウイルスとは異なり、AAV は非分裂細胞に感染することができる; 野生型 AAV は、ヒト細胞の第 19 染色体への部位特異的組み込みにおいて特徴が

ある (KotinおよびBern、1989; Kotinら、1990; Kotinら、1991; Samulskiら、1991); およびAAVはまた、アンチガン遺伝子の特性ももっている (Ostroveら、1981; BernsおよびGiraud、1996)。組換えAAVゲノムは、AAVITRsのうち対象のDNA配列を分子的にクローニングし、野生型AAVゲノムの完全コーディング配列を排除することによって構築される。このように作製されたAAVベクターは野生型AAVのコーディング配列のいずれかを欠いているが、なお、インビトロおよびインビボの両方での形質導入における安定な染色体組み込みおよび組換え遺伝子の発現という特性を保持している (Berns、1990; BernsおよびBohensky、1987; Bertranら、1996; Kearns、1996; Ponnazhaganら、1997a)。最近まで、AAVは、ほとんどすべてのタイプの細胞および種交差バリアーでさえも感染すると信じられていた。しかし、今や、AAV感染が受容体媒介性であることが実証されている (Ponnazhaganら、1996; Mizukamiら、1996)。

10

20

30

40

50

【0091】

AAVは、約4700塩基対の直線、一本鎖DNAを利用する。折り曲げられた末端繰り返し配列がゲノムに隣接している。2つの遺伝子が、ゲノム内に存在し、多くの異なる遺伝子産物を生み出す。第1のcap遺伝子は、VP-1、VP-2およびVP-3と称する3つの異なるビリオンタンパク質 (VP) を産生する。第二のrep遺伝子は、4つの非構造タンパク質 (NS) をコードする。これらのrep遺伝子産物の1種またはそれ以上が、トランス作用AAV転写に応答可能である。AAVの配列は、Srivastavaら (1983) および米国特許5252479 (完全な内容は特に本発明の参考文献である) によって提供されている。

AAVにおける3つのプロモーターは、マップユニットにおいて、ゲノム内のその位置によって名づけられている。左から右にかけてp5、p19およびp40である。転写によって6つの転写物が生み出され、3つのプロモーターそれぞれから2つが開始され、各ペアのひとつがスプライスされる。マップユニット42-46から誘導されたスプライス部位は、各転写物において同じである。4つの非構造タンパク質が、より長い転写物から誘導され、3つのビリオンタンパク質はすべて小さいほうの転写物から生じる。

AAVは、ヒトにおいてはどのような病原性状態にも関連がない。興味深いことに、有効な複製が行われるために、AAVが単純ヘルペスウイルスIおよびII、サイトメガロウイルス、シュドラーピースウイルスおよびもちろんなアデノウイルスなどから"ヘルピング"機能を必要とすることである。もっとも特徴的なヘルパーは、アデノウイルスであり、このウイルスの多くの"早期"機能がAAV複製を補助することが明らかになっている。AAVrepタンパク質の低レベルの発現は、AAV構造発現を抑えると考えられ、ヘルパーウイルス感染がこのブロックを除去すると考えられる。

【0092】

ワクシニアウイルス: ワクシニアウイルスベクターは、組成物の構築の容易性、相対的高レベルでの発現が得られること、宿主範囲が広いことおよび運ぶDNAのキャパシティが大きいことから、広範囲に用いられている。ワクシニアウイルスは、著しい"A-T"嗜好性を呈する、約186kbの直線、二本鎖DNAゲノムを含む。約10.5kbの折り曲げられた末端繰り返し配列がゲノムに隣接している。大部分の本質的遺伝子は、ボックスウイルス間に最も高く保存されている中央領域に位置すると考えられる。ワクシニアウイルスのオープンリーディングフレームは150から200であると見積もられている。両方の鎖がコーディングされているけれども広範なオーバーラップは、一般的ではない。

少なくとも25kbをワクシニアウイルスのゲノムに挿入することができる (SmithらおよびMoss、1983)。プロトタイプワクシニアウイルスベクターは、相同的組換えを介してウイルスチミジンキナーゼ遺伝子内に挿入された導入遺伝子を含む。ベクターはtk-表現型に基いて選択する。エンケファロミオカルジチスウイルスの非翻訳ラダー配列の含有、発現レベルは常套のベクターよりも高く、導入遺伝子は24時間で感染細胞タンパク質の10%以上に蓄積される (Elroy-Steinら、1989)。

【0093】

非ウイルストランスファー： センスおよびアンチセンス遺伝子構築物を効率よく発現させるために、発現構築物を細胞内にデリバリーしなければならない。このデリバリーは、細胞系の形質転換を行う実験操作としてインビトロにて、あるいは疾患の治療としてインビボまたはインビトロにて行うことができる。デリバリーのメカニズムのひとつは、ウイルス感染を介することであり、発現構築物を感染ウイルス粒子内に封入する。

発現構築物を培養した哺乳類細胞内に運搬する方法としてウイルスを用いない幾つかの方法も本発明に用いることができる。これらの方法として、リン酸カルシウム沈降法 (GrahamおよびVan Der Eb、1973; ChenおよびOkayama、1987; Rippeら、1990)、D E D A - デキストラン (Gopal、1985)、電気穿孔法 (Tur-Kaspaら、1986; Potterら、1984)、直接マイクロインジェクション (HarlandおよびWeintraub、1985)、D N A - 装填リポソーム (Nicolau、およびSene、1982; Fraleyら、1979) およびリポフェクタミン - D N A 複合体、細胞音波処理法 (Fecheimerら、1987)、高速マイクロ発射装置による遺伝子爆撃法 (Yangら、1990) および受容体媒介移入 (WuおよびWu、1987; WuおよびWu、1988) が挙げられる。これらの技術のいくつかは、インビボまたはインビトロの使用において有効である。

発現構築物を細胞にいったんデリバリーすると、対象遺伝子をコードする核酸を異なる部位に配置し、発現させることができる。具体例においては、該遺伝子をコードする核酸を細胞のゲノム内に安定に組み込む。この組み込みは、相同的組換えによって同種の位置および方向性にする (遺伝子置換) か、あるいはランダムな不特定の位置にする (遺伝子オーギュメンテーション) ことができる。他の具体例においては、D N A の分離したエピソームとして核酸を細胞内に安定に維持する。このような核酸セグメントまたは"エピソーム"は、宿主細胞のサイクルとは独立して、あるいは同調して維持および複製を行うに十分な配列をコードしている。どのように発現構築物を細胞にデリバリーするか、そして細胞内のどこで核酸を保持するかは、使用した発現構築物のタイプに応じて決める。

【0094】

本発明の他の具体例においては、発現構築物は、単純に、無処置 (NAKED) の組換え D N A またはプラスミドからなる。該構築物の運搬は、物理的または化学的に細胞膜を透過し得る、前述の方法いずれ方法でもおこなってもよい。このことは特にインビトロにおける運搬に適用されるが、インビボでも同様に適用することができる。Dubenskyら (1984) は、ポリオーマウイルス D N A をリン酸カルシウム沈降体として成体および新生児マウスの肝臓および脾臓に注入し、活発なウイルス複製および急性感染を実証するのに成功した。BrevenistyおよびNeshif (1986) もまた、リン酸カルシウム沈降処理したプラスミドの直接腹腔内注射により、移入された遺伝子の発現が得られることを実証した。対象遺伝子をコードする D N A もまた同様の作法でインビボにて運搬され、遺伝子産物を発現することができることが想定される。

さらに他の本発明の具体例においては、無処置の D N A 発現構築物を細胞内に運搬するために粒子爆撃法が用いられる。この方法は、細胞を生かしたまま細胞膜に孔を穿ち、D N A を細胞内に導入するための、D N A 被覆マイクロ発射体を高速に加速する能力に依存している (Kleinら、1987)。小さい粒子を加速するいくつかの装置が開発されている。

このような装置のひとつは、高圧放電を用いて、作動力を順に生み出す電流を発生させることを利用している (Yangら、1990)。使用するマイクロ発射体は、タングステンまたは金のビーズなどの生物学的に不活性な物質からなる。

【0095】

ラットおよびマウスの肝臓、皮膚および筋組織などの選択された器官が、インビボにて爆撃されている (Yangら、1990; Zeleninら、1991)。これには、組織または細胞を外科処置に付し、銃砲と標的器官の間にある組織を切除することが必要である (エキスピボ処置)。特定の遺伝子をコードする D N A をこの方法によってデリバリーすることができ、この方法は本発明の参考として組み込まれている。

本発明のさらに他の具体例においては、発現構築物をリボソーム内に補足する。リボソームは、リン脂質二重膜および内部水性媒体を特徴とする小胞構造である。多重ラメラリポソームは、水性媒体によって分離される多重脂質層をもつ。これは、リン脂質を過剰の水性媒体に懸濁すると形成される。閉鎖構造が形成される前に脂質成分は自己再構成され、水分および脂質二重層間の溶解した溶質を補足する (GhoshおよびBachhawat、1991)。リポフェクタミン-DNA複合体も本発明に含まれる。

インビトロにおけるリボソーム媒介性核酸デリバリーおよび外来性DNAの発現は非常に成功しやすい。Wongら(1980)には、培養されたヒヨコ胚、HeLaおよび肝臓癌細胞における、リボソーム媒介性デリバリーおよび外来性DNAの発現が実証されている。Nicolauら(1987)は、ラットにおいて静脈内注射後のリボソーム媒介性遺伝子運搬に成功した。

【0096】

本発明の別の具体例においては、リボソームと血液凝集ウイルス(HVJ)との複合体を作製する。このことによって、細胞膜との融合が促進され、リボソームに封入されたDNAの細胞内への導入をプロモートされることが示されている(Kanedaら、1989)。他の具体例では、リボソームを核非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)と複合あるいは結合させている(Katoら、1991)をHVJおよびHMG-1の両方と複合あるいは結合させている。このような発現構築物がインビトロおよびインビボにて核酸の運搬および発現に有効に用いられる場合、それらは、本発明に適用可能である。細菌プロモーターをDNA構築物に用いる場合、リボソーム内に適当な細菌ポリメラーゼが含まれることも望まれる。

特定の遺伝子をコードする核酸を細胞へデリバリーするのに用いることができる他の発現構築物は、受容体-媒介性デリバリービヒクルである。これらは、ほとんどの真核細胞における受容体-媒介性エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的取り込みという利点をもっている。種々の受容体の細胞型特異的分散により、デリバリーは特異性が高い(WuおよびWu、1993)。

受容体媒介性遺伝子標的化ビヒクルは、一般に2つの成分からなる：細胞受容体-特異的リガンドとDNA-結合剤である。いくつかのリガンドが受容体媒介性遺伝子運搬に用いられてきた。最も広範囲にわたって特徴がわかっているリガンドは、アシアロオロソムコイド(ASOR)(WuおよびWu、1987)およびトランスフェリン(Wagnerら、1990)。最近、ASORと同じ受容体を認識する合成ネオ糖タンパク質は、遺伝子デリバリービヒクルとして使用されている(Fercolら、1993; Peralesら、1994)および上皮増殖因子(EGF)もまた遺伝子をうるこ状のカルシノーマ細胞へデリバリーするのに用いられている(Myers、EPO0273085)。

【0097】

他の具体例においては、デリバリービヒクルは、リガンドおよびリボソームからなる。たとえば、Nicolauら(1987)は、ラクトシル-セラミド、ガラクトース末端アシアル糖リオリドをリボソームに封入し、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加を観察した。したがって、リボソームを持つ/持たない、いくつかの受容体-リガンド系によって、特定の遺伝子をコードする核酸を、肺、上皮または腫瘍細胞などのタイプの細胞へ特異的にデリバリーすることができる。たとえば、EGF受容体のアップレギュレーションを呈している多くの腫瘍細胞において、遺伝子をコードする核酸の媒介性デリバリーのための受容体として上皮増殖因子(EGF)を用いることができる。マンノースを用いて肝臓細胞上のマンノース受容体を標的化することができる。また、CD5(CLL)、CD22(インパ腫)、CD25(T細胞白血病)およびMAA(黒色肉腫)に対する抗体も、同様に標的化部分として用いることができる。

別の具体例においては、遺伝子運搬を、エクスビボ条件下で、より容易に行うことができる。エクスビボ遺伝子療法とは、動物からの細胞を単離し、インビトロにて細胞へ核酸をデリバリーし、次いで修飾細胞を動物へ戻すことを意味する。これには、動物、または細胞および組織の一次培養物から、組織/器官を外科的に除去することが含まれる。

10

20

30

40

50

一次哺乳類細胞培養物は、種々の方法で調製することができる。インビトロ実験中、および発現構築物と接触している間中、細胞を生かしておくためには、細胞を、正しい割合の酸素と二酸化炭素ならびに栄養と接触させ、微生物による汚染からは保護することが必要である。細胞培養技術については、文献が多数存在するが、Freshner (1 9 9 2) にも開示されている。

【 0 0 9 8 】

前述の具体例のひとつにおいては、タンパク質の産生のために遺伝子トランスファーを使用して細胞を不死化することが関係している。対象の遺伝子を前述のようにして適当な宿主細胞へ運搬し、次いで、細胞を適当な条件下で培養する。実質上いずれかのポリペプチドをコードする遺伝子をこの方法において用いることができる。組換え発現ベクター、およびそれらに含まれるエレメントの製造については前に記している。別の言い方をすれば、産生されるべきタンパク質は、細胞内で正常に合成される内在性タンパク質である。

有用な哺乳類宿主細胞系の例としては、V e r oおよびH e L a細胞ならびにチャニーズハムスター卵巣の細胞系、W 1 3 8、B H K、C O S - 7、2 9 3、H e p G 2、N I H 3 T 3、R I NおよびM D C K細胞が挙げられる。さらに、挿入された配列の発現を調節する宿主細胞株、あるいは所望の作法で遺伝子産物を修飾し、プロセッシングする宿主細胞株を選択する。タンパク質産物のこのような修飾（グリコシル化など）およびプロセッシング（切断など）はタンパク質の機能にとって重要である。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的および特異的メカニズムをもっている。適当な細胞系または宿主系を選択して、発現した外来性タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にすることができる。

それぞれ、t k -、h g p r t -またはa p r t -細胞内にある、H S Vチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子などの多くの選択系を用いることができるが、これらに限定されるものではない。また、抗代謝産物耐性を、d h f r（に耐性を付与）；g p t（ミコフェノール酸に対する耐性を付与）；n e o（アミノグリコシドG 4 1 8に対する耐性を付与）；およびh y g r o（ヒグロマイシンに対する耐性を付与）に対する選択の基準として用いることができる。

【 0 0 9 9 】

動物細胞をインビトロにて2つのモードで増殖させることができる：増殖するときに、培養物のバルク全体に懸濁物として成長する非足場依存性細胞として、または固体基質への付着を必要とする足場依存性細胞（すなわち、単層型細胞増殖）として、である。

連続樹立細胞系からの非足場依存性あるいは懸濁培養物は、細胞あるいは細胞製品を大規模に製造する場合に最も広範囲に用いられている手段である。しかし、懸濁培養細胞は、潜在的腫瘍化能および付着T細胞よりもタンパク質産産が低いといったような制限を有している。

攪拌タンク内での大規模な哺乳動物細胞の培養は、組換えタンパク質の製造において通例の方法である。2つの懸濁培養反応槽のデザイン、すなわち、攪拌型反応槽と空気揚水型反応槽が広く用いられている。攪拌型槽は、インターフェロンの製造において8 0 0 0 リットルのキャパシティで順調に用いられている。細胞は、高さと直径の比率が1：1～3：1のステンレスのタンク内で増殖する。通常、培養物は、平たいブレード状のディスクあるいは海中で用いるプロペラのパターンをもつ、1つまたはそれ以上の攪拌器で混合される。平たいブレードよりも剪断力の小さい攪拌器システムもある。混合は、磁氣的に組み合わせられた駆動力によって直接的あるいは間接的に駆動される。間接的駆動では、攪拌軸をシールすることによって微生物による汚染のリスクが軽減される。

【 0 1 0 0 】

最初は微生物発酵用で使用され、後に哺乳動物培養に用いられた空気揚水反応槽は、培養物の攪拌および酸素処理の両方のために気流を利用している。気流は、反応槽内の上昇セクションに導入され、内容物を循環させる。気体は、培養物の表面で開放され、液体を含まない気体のバブルは、反応層の下降セクションに移動する。このデザインの主な利点

は、単純性および機械的攪拌を必要としないことである。代表的には、高さと直径の比率は10:1である。空気揚水反応槽のスケールアップは比較的容易であり、それによって気体の移動性は良好になり、剪断力はより小さくなる。

本発明の抗体は、免疫沈降法を用いた抗原の単離に特に有用である。免疫沈降法は、複合体混合物から標的抗原成分を分離することが必要であり、少量のタンパク質の区別あるいは単離に用いられる。胆汁塩などの他の作用剤もよいが、非イオン性塩が好ましく、酸性pHまたは二価のカチオンの存在下で沈降する。抗体およびその用途について以下にさらに記載する。

【0101】

III. TS10q23.3との反応性を有する抗体の発生

別の面では、本発明は本発明のTS10q23.3分子と免疫反応性である抗体、またはその一部を意図するものである。抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。好ましい実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。抗体を製造および確認する手法は該分野でよく知られている（例えば、ハウエル(Howell)およびレーン(Lane)(1988)を参照）。

簡潔に言えば、ポリクローナル抗体は本発明のポリペプチドからなる免疫原で動物を免疫化し、該免疫化した動物から抗血清を収集することで製造する。広範囲の動物種を抗血清の産生において使用可能である。典型的に、抗-抗血清の産生に使用する動物は兎、マウス、ラット、ハムスター、豚または馬などの非-ヒトの動物である。比較的大量の血液量を有しているために、兎はポリクローナル抗体の産生にとって好ましい選択肢である。

イソ型の抗原にとって特異的なポリクローナルおよびモノクローナル両抗体は、該分野の当業者にとって一般的に知られているように、通常の免疫化の技法を用いて製造可能である。本発明の化合物の抗原エピトープを含有する組成物を兎またはマウスなどの1以上の実験動物を免疫化させ、次いで本発明の化合物に対して特異的な抗体を産生させることができる。抗体が発生する時間が経過した後、単に該動物から採血し、全血液から血清サンプルを製造して、ポリクローナル抗血清を得ることができる。

【0102】

本発明のモノクローナル抗体は、エライザ法およびウエスタンブロット法などの標準的免疫化学操作法や組織染色などの免疫組織化学操作法、さらにTS10q23.3-関連抗原エピトープに特異的な抗体を利用し得る他の操作法に適用することが提案される。加えて、異種のあるTS10q23.3に特異的なモノクローナル抗体を他の有用な応用に利用することも提案される。

一般的に、TS10q23.3に対するポリクローナルおよびモノクローナル両抗体を様々な実施態様において使用可能である。例えば、それらをcDNAまたは他のTS10q23.3をコードする遺伝子を得るために、抗体クローニングプロトコールにおいて使用可能である。それらはまた、細胞または動物中のTS10q23.3関連ペプチドの影響を分析するための阻害研究においても使用可能である。抗-TS10q23.3抗体をまた、様々な細胞事象の間TS10q23.3の分布を分析するために、例えば細胞周期における異なる時点でのTS10q23.3ポリペプチドの細胞または組織-特異的分布を決定するために免疫局在化研究においても有用となる。該抗体の特に有用な利用は、天然または組換えTS10q23.3を精製する場合、例えば抗体アフィニティーカラムを用いる場合である。該免疫学的技法全てにおける操作が本発明の開示に照らして当業者に知られている。

【0103】

抗体を製造および確認する手法は該分野でよく知られている（例えば、ハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane)(1988)による引例（このものを本明細書中に盛り込む）を参照）。モノクローナル抗体製造のより特定の例として、以下の実施例を挙げる。

該分野でよく知られているとおり、得られた組成物は該免疫原性において多岐にわたる。したがって、ペプチドまたはポリペプチド免疫原を担体にカップリングさせることで達成可能となるように、宿主免疫系を促進することが場合により必要となる。典型的かつ好

10

20

30

40

50

ましい担体としては、キーホールリンペットヘモシアニン(K L H)および牛血清アルブミン(B S A)が挙げられる。オボアルブミン、マウス血清アルブミンおよび兔血清アルブミンなどの他のアルブミンもまた担体として使用可能である。担体タンパク質にポリペプチドを接合する手法は該分野でよく知られており、グルタルアルデヒド、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス - ジアゾ化ベンジジンが挙げられる。

該分野でよく知られているとおり、特定の免疫原組成物の免疫原性をアジュバントとして知られる免疫応答の非 - 特異的刺激物質を用いることで拡張可能である。典型的および好ましいアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント(殺菌した結核菌を含有する免疫応答の非 - 特異的刺激物質)、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントなどが挙げられる。

【0104】

ポリクローナル抗体の産生に用いる免疫原組成物の量は免疫化するのに用いた動物と同様に免疫原の性質で変わってくる。該免疫原を投与するのに、様々な経路を用いることが可能である(皮下、筋肉内、皮内、静脈内および腹腔内)。免疫化した後、免疫化された動物の血液を様々な時点でサンプリングすることで、ポリクローナル抗体の産生を追跡可能である。第2に、ブースター、注入を行なうことも可能である。適当な力価を達成するまで、ブースティングおよびタイターリングの工程を繰り返した。免疫原性の望むレベルが得られると、該免疫化動物から血を採り、血清を単離、貯蔵可能であり、および/またはm A b s を発生させるために該動物を使用することもできる。

M A b s を、米国特許第4,196,265号に例示の技法(本明細書中に引例として盛り込む)などの公知技法を用いて容易に製造可能である。典型的に、本技法は選択した免疫原組成物、例えば精製もしくは部分的に精製したT S 1 0 q 2 3 . 3 タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドまたは高レベルのT S 1 0 q 2 3 . 3 を発現する細胞を用いて適当な動物を免疫化することを含有する。該免疫化組成物を、抗体産生細胞を刺激するのに有効な方法で投与する。マウスおよびラットなどのげっ歯類が好ましい動物であるが、しかしながら、兎、羊、蛙細胞を使用することも可能である。ラットを用いると特定の利点を供することが可能であるが(ゴーディング(Goding)による(1986))、好ましいのはマウスであり、最も煩雑に用いられおよび一般的に高いパーセンテージで安定な融合が得られる理由でB A L B / c マウスが最も好ましい。

【0105】

免疫化に続き、抗体を産生する能力を有する体細胞、特にB - リンパ球(B - 細胞)をm A b 発生プロトコールにおいて使用するために選択する。該細胞は生検脾臓、扁桃もしくはリンパ節から得られ、または末梢血液試料から得られる。脾臓細胞および末梢血球が好ましく、前者は分裂血漿未分化期にある抗体産生細胞の源として豊富であるため、また後者は末梢血液が容易に入手可能であるために好ましい。しばしば、1群の動物を免疫化し、最も高い抗体力価を有する動物の脾臓を取り、該脾臓をシリンジで均一化することで脾臓リンパ球を得る。典型的に、免疫化したマウスからの脾臓はおよそ $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ リンパ球を含有する。

次いで、免疫化した動物からの抗体産生Bリンパ球を不死化骨髄腫細胞、一般的に免疫化した動物と同種のものの細胞と融合する。ハイブリドーマ産生融合法に使用するのに適した骨髄腫細胞系としては、抗体を産生せず、高い融合効率を有し、目的の融合細胞(ハイブリドーマ)だけの増殖を支持する特定の選択培地では生長し得ないような酵素欠損のものが好ましい。

当業者に知られているように、多くの骨髄腫細胞のいずれか1つを使用可能である(ゴーディングによる(1986); キャンベル(Campbell)による(1984))。例えば、免疫化された動物がマウスである場合、P 3 - X 6 3 / A g 8、P 3 - X 6 3 - A g 8 . 6 5 3、N S 1 / 1 . A g 4 1、S P 2 1 0 - A g 1 4、F O、N S O / U、M P C - 1 1、M P C 1 1 - X 4 5 - G T G 1 . 7 およびS 1 9 4 / 5 X X 0 B u 1 を; ラットの場、R 2 1 0 . R C Y 3、Y 3 - A g 1 . 2 . 3、I R 9 8 3 F および4 B 2 1 0 を; 並びにU - 2 6 6、

10

20

30

40

50

GM1500 - GRG2、LICR - LON - HMy2 および UC729 - 6 を使用可能であり、これらは全て、細胞融合と併せて有用である。

【0106】

抗体産生脾臓もしくはリンパ節細胞および骨髄腫細胞のハイブリッドを発生する方法は通常、体細胞を骨髄腫細胞と2:1の比で混合することからなるが、該比は細胞膜の融合を促進する1個の薬剤または複数の薬剤(化学的または電氣的)の存在下、各々約20:1~約1:1までの多岐にわたる。センダイウイルスを用いた融合法は既に記載されており(コーラー(Kohler)およびミルステイン(Milstein)による(1975);(1976))、37%(v/v)PEGなどのポリエチレングリコール(PEG)を用いるものがある(ゲフター(Geffer)らによる(1977))。電氣的に誘導された融合法の使用もまた適当である(ゴードイングによる(1986))。

10

融合製法により通常、低頻度($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-8}$)で生長しうる(viable)ハイブリッドを産生する。しかしながら、生長しうる融合したハイブリッドは選択培地中で培養することによって母細胞、未融合細胞(特に、通常無限に分割し続ける未融合骨髄腫細胞)から分化するので、このことは問題にならない。該選択培地は一般的に、組織培養培地においてヌクレオチドの新生合成を遮断する薬剤を含有するものである。典型的かつ好ましい薬剤はアミノプテリン、メトトレキセートおよびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートはプリンおよびピリミジンの両新生合成を遮断する一方、アザセリンはプリン合成だけを遮断する。アミノプテリンもしくはメトトレキセートを用いる場合、培地はヌクレオチドの源としてヒポキサンチンおよびチミジンで補足する(HAT培地)。アザセリンを用いる場合、培地をヒポキサンチンで補足する。

20

好ましい選択培地はHAT培地である。ヌクレオチド再生経路を操作することの可能な細胞だけがHAT培地中で生存可能である。該骨髄腫細胞は再生経路の重要な酵素、例えばヒポキサンチン・ホスホリボシル・転移酵素(HPR T)が欠損しており、生存不可能である。B-細胞は本経路をオペレートすることができるが、それらは培地中で限られた寿命を有しており、一般的に約2週間以内に死亡する。したがって、選択培地中で生存可能な唯一の細胞は骨髄腫とB-細胞から形成するハイブリッドである。

【0107】

本培地により、選別された特定のハイブリドーマ由来のハイブリドーマの集団が提供される。典型的に、ハイブリドーマの選別はマイクロタイタープレート中で単一クローン希釈によって細胞を培養し、続いて個々のクローン上清を目的の反応に対して調べる(約2~3週間後)ことで行なう。該アッセイは感度がよく、簡単でかつ早急なラジオイムノアッセイ、酵素免疫アッセイ、細胞毒性アッセイ、ブランクアッセイ、ドット免疫結合アッセイなどが挙げられる。

30

次いで、選別したハイブリドーマを連続して希釈し、個別に抗体-産生細胞系中でクローンし、次いで該クローンを無限に生長させてmAbを得る。該細胞系を2通りの基本的な方法でmAb産生に利用可能である。ハイブリドーマの試料を、初期の融合において体細胞と骨髄腫細胞を提供するために使用するタイプの組織適合性動物中(腹膜腔中が多い)に注入する。該注入された動物は融合細胞ハイブリッドによって産生された特定のモノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。次いで、血清もしくは腹水などの動物の体液を採取して、高濃度のmAbを得る。該個々の細胞系はインビボで培養することもでき、その場合mAbは培地中に自然に分泌され、該培地から高濃度で容易に得られる。どちらの手法により産生したmAbも、要すれば、ろ過、遠心分離、およびHPLCもしくはアフィニティークロマトグラフィーなどの様々なクロマトグラフィー法を用いてさらに精製される。

40

【0108】

個々の細胞系もまたインビトロで培養することができ、その場合mAbは培地中に自然に分泌され、該培地から高濃度で容易に得られる。

どちらの手法により産生したmAbも、要すれば、ろ過、遠心分離、およびHPLCもしくはアフィニティークロマトグラフィーなどの様々なクロマトグラフィー法を用いてさ

50

らに精製される。本発明のモノクローナル抗体のフラグメントは、ペプシンまたはパパインなどを用いる酵素消化および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断などの方法によって、精製モノクローナル抗体から得ることができる。別法として、本発明に包含されるモノクローナル抗体フラグメントは自動ペプチド合成機を用いて合成することができる。

分子クローニング的アプローチを用いてモノクローナル抗体を産生することも本発明の企図するものに含まれる。このために、免疫感作した動物の脾臓から単離したRNAから組み合わせ免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製し、抗原を発現している細胞およびコントロール細胞（正常ウイルス腫瘍細胞など）を用いてパニングすることにより適当な抗体を発現しているファージミドを選択する。慣例のハイブリドーマ技術を凌ぐこのアプローチの利点は、1回のラウンドで約 10^4 倍の抗体を産生し、スクリーニングすることができること、およびHおよびL鎖の組み合わせによって新たな特異性が生み出され、それによって適当な抗体を見出す機会が増加することである。

【0109】

ヒト化モノクローナル抗体は、遺伝子工作技術を用いて定常領域および/または可変領域のフレームワーク配列がヒトの配列と置き換えるという修飾がなされているが、依然としてもとの動物の特異性も残している動物起源の抗体である。このような抗体は通例、ヒト抗原に対する特異性をもつげっ歯類抗体から誘導される。このような抗体は一般的にインビボにおける治療的適用に有用である。この方策は、外来性抗体への宿主の応答を低減化し、ヒトエフェクター機能の選択を許可する。

ヒト化免疫グロブリンを産生する技術は当業者には公知である。たとえば、米国特許5693762には、1つまたはそれ以上の相補性決定領域(CDR)をもつヒト化免疫グロブリンの産生方法およびその組成物が開示されている。無傷の抗体に組み合わせる場合、ヒト化免疫グロブリンはヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、エピトープを含むタンパク質または他の化合物といったような抗原に対してドナー免疫グロブリンと同様の親和性を保持している。

本発明に有用な抗体の産生を教示するその他の米国特許（本発明の参考文献である）として、米国特許5565332（組み合わせアプローチを用いるキメラ抗体の産生が記載されている）；4816567（組換え免疫グロブリンが記載されている）；および4867973（抗体-治療剤複合体が記載されている）が挙げられる。

【0110】

米国特許5565332には、親抗体と同じ結合特異性を有するが、ヒト特徴が強化されている抗体または抗体フラグメントの産生方法が記載されている。ヒト化抗体は鎖シャッフリング（本発明に有用なこのような方法と同様におそらくファージ提示技術を用いて）によって得ることができる。米国特許5565332の全内容は本発明の参考文献である。Hoonら（1993）に記載されているように、ヒト抗体は、EBVでB細胞を形質転換し、続いてセクレターのクローニングを行うことによって産生することもできる。

本発明のさらに別の態様は、TS10Q23.3抗体が検出可能な標識または細胞毒性剤に結合している抗体複合体である。診断用抗体複合体は、種々のイムノアッセイにおいてインビトロ診断剤として、および造影技術などにおいてインビボ診断剤として使用することができる。

特定の抗体複合体は、一次的にインビトロでの使用を意図されるものを含み、その場合、抗体は第2結合リガンドまたは色素産生基質と接触すると着色生成物を生み出す酵素（酵素タグ）に結合している。適当な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（ホースラディッシュ）水素ペルオキシダーゼおよびグルコースオキシダーゼが挙げられる。好ましい第2結合リガンドは、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン化合物である。このような標識の使用は、当業者には公知であり、米国特許3817837；3850752；3939350；3996345；4277437；4275149および4366241などに記載されている。これらは、本発明の参考文献である。

10

20

30

40

50

【0111】

本発明の放射活性標識モノクローナル抗体は、当業界で公知の方法にしたがって産生することができる。たとえば、モノクローナル抗体をヨウ化ナトリウムまたはカリウムおよび次亜塩素酸ナトリウムなどの化学的酸化剤またはラクトピルオキシダーゼなどの酵素的酸化剤と接触させてヨウ化することができる。本発明のモノクローナル抗体は、リガンド交換プロセス、たとえば、スズ溶液でパーテクネートを還元し、還元されたテクネチウムをセファデックスカラムでキレート形成し、次いで抗体をこのカラムに供することによって、あるいはパーテクネート、 SnCl_2 、フタル酸ナトリウム-カリウム溶液および抗体をインキュベートするなどの直接標識技術によって、テクネチウム^{99m}で標識することができる。

10

金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合するのにしばしば用いられる中間の機能性グループは、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。蛍光標識としては、ローダミン、フロレセインイソチオシアネートおよびレノグラフィンが挙げられる。

【0112】

IV. TS10q23.3を含有する癌の診断

本発明者はTS10q23.3の変質が悪性腫瘍と関連することを見出した。したがって、TS10q23.3およびそれに対応する遺伝子を癌の診断または予後指示物質として使用可能である。さらに特に、TS10q23.3に関連する点突然変異、欠先変異、挿入または調節摂動(regulatory perturbation)は、癌を引き起こしたりもしくは癌の発生を促進し、一次部位での癌の進行を引き起こしたりもしくは促進し、および/または転移を引き起こしたりもしくは促進する可能性がある。TS10q23.3によって影響を受け得る悪性腫瘍に関連した他の現象としては血管形成および組織侵襲が挙げられる。

20

【0113】

A. 遺伝子診断

本発明の1実施態様は、TS10q23.3の発現における変化を検出する方法からなる。この方法は、TS10q23.3のレベルを決定することまたは発現させた生成物における特定の変質を決定することからなり得る。明らかに、この種のアッセイは関連癌の診断において重要性を持つ。該癌としては脳の癌(神経こう、髄芽腫、神経こう星状細胞腫、乏突起こう腫、脳室上皮腫)、肺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、小腸、血球、リンパ節、結腸、乳、子宮内膜、胃、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭部と頸部(head and neck)、食道、骨髄、血液または他の組織の癌を含有する。特に、本発明は神経こう腫(グリオーム)の診断に関する。

30

生体試料はいかなる組織または液体であってもよい。様々な実施態様としては、皮膚、筋肉、顔、脳、前立腺、乳、子宮内膜、肺、頭部と頸部、膵臓、小腸、血球、肝臓、精巣、卵巣、結腸、皮膚、胃、食道、脾臓、リンパ節、骨髄もしくは腎臓の細胞が挙げられる。他の実施態様としては、末梢血液、リンパ液、腹水、血漿、胸膜滲出液(胸水)、痰、脳脊髄液、涙液、便もしくは尿などの液体試料が挙げられる。

使用する核酸は、標準方法論(サンプルックらによる(1989))に従い、生体試料中に含まれる細胞から単離する。該核酸は遺伝的DNAまたは分画もしくは全細胞RNAであってよい。RNAを用いる場合、該RNAを相補的DNAに変換することを望むことも可能である。1実施態様において、RNAは全細胞RNAであり、他方ではポリ-A RNAである。通常、核酸は増幅される。

40

場合によっては、試料中の関係する特定の核酸を増幅によって直接に、または増幅後第2の公知の核酸を用いて同定する。次に、同定した生成物を検出する。特定の利用の場合、該検出は可視手段(例えば、ゲルの臭化エチジウム染色)により行ない得る。別法として、該検出は放射線標識もしくは蛍光標識の化学発光、放射性シンチグラフを介した、または電気的もしくは熱的インパルス信号を用いるシステムを介した該成物の間接的な同定を含有する(アフィマックス・テクノロジー(Affymax Technology); ベラス(Bellus)、1994)。

50

【0114】

検出に続いて、該患者において見られた結果を、正常人およびTS10q23.3に関連した病気を持った患者の統計学的に有意な対照群のデータと比較する。本方法において、様々な臨床状態で検出したTS10q23.3の量もしくは種類を関連付けることが可能である。

本発明者らによって様々なタイプの欠損が同定されている。したがって、"変質"とは欠損、挿入、点突然変異および重複をはじめとするものであると理解できる。点変異により停止コドン、フレームシフト変異またはアミノ酸置換が生じる。体細胞突然変異は非-生殖細胞系列組織中で起こるものである。生殖細胞系列組織はいかなる組織中でも生じ、遺伝可能である。コード領域の内側および外側での変異はまた、遺伝子の転写を変えることで産生した、あるいは不安定化する際にまたは他に転写物(mRNA)もしくはタンパク質のプロセッシングを変える際に産生したTS10q23.3の量に影響を及ぼし得る。

10

【0115】

腫瘍サプレッサー遺伝子のひとつの対立遺伝子が、生殖細胞損傷の遺伝または体細胞突然変異の獲得によって不活性化される場合、細胞はがん原性形質転換に向かう遺伝的段階をとる。該遺伝子の他の対立遺伝子の不活性化は、通常、体細胞突然変異または染色体対立遺伝子欠失を含み、その結果としてヘテロ接合度の損失(LOH)が生じる。一方、腫瘍サプレッサー遺伝子の両コピーはホモ接合欠失によって失われる。

TS10Q23.3における新規突然変異を同定しようとする本発明者らの開始段階は、1次腫瘍および腫瘍細胞系(TCL)を10Q23の領域内のLOHに関してプレスクリーニングすることであった。1次腫瘍標本およびTCLのLOHを、TS10Q23.3遺伝子座に近接する第10染色体上の多形短タンデムリピートマーカを用いて診査した(表)6。このサンプルパネルにおいて、本発明者らは、結腸標本における頻度の20%からグリア芽細胞腫マルチフォーム(GBMs)における頻度の75%までの範囲にて、1次腫瘍標本におけるLOHを観察し、全体のLOH頻度は~49%であった。サンプルサイズが9以上であるTCLでは、LOHの発生率は28%(結腸)から82%(GBMs)まで変化し、全体の頻度は~46%であった。

20

【0116】

TS10Q23.3遺伝子座の周囲にLOHを呈している1次腫瘍において、本発明者らは、乳癌にフレームシフト突然変異、小児GBMにナンセンス突然変異、小児GBMにスプライシング変異体およびメラノーマにミスセンス突然変異を検出した(表7)。本発明者らは、LOHを呈しているTCLも研究し、TS10Q23.3のコーディング領域に影響を及ぼす10個のホモ接合欠失を同定した(図13Aおよび図13B)。ホモ接合欠失は、星状細胞腫、膀胱腫、乳癌、グリア芽細胞腫、肺がん、メラノーマおよび前立腺ガン由来のTCLに存在した。細胞系のうちの2つは、9つのTS10Q23.3エクソンすべてを失っていたが、他の8つのTCLは、遺伝子の異なるコーディング部分をホモ接合的に欠失していた。残りのTCLの分析では、ひとつのフレームシフト、ひとつのナンセンスおよび7つの非保存性ミスセンス変異体が見られた(表7)。これらの独特の突然変異は、これらの突然変異を同定するように特別に設計されたオリゴヌクレオチドまたはこれらのマーカを野生型TS10Q23.3から区別する抗体で標的化される。

30

40

他のTS10Q23.3遺伝子における突然変異を本発明にしたがって同定することができる。多岐にわたり異なるアッセイが本観点において予想され、例えばフロレッセント・イン・シチュー・ハイブリダイゼーション(fluorescent in situ hybridization; FISH)、直接DNAシーケンシング、PFG分析(パルスフィールド電気泳動)、サザンもしくはノーザンブロット法、一本鎖立体配座分析(single-stranded conformation analysis; SSCA)、RNAse保護アッセイ(リボヌクレアーゼ保護アッセイ)、対立遺伝子-特異的オリゴヌクレオチド(allele-specific oligonucleotide; ASO)、ドットプロット分析、変性勾配ゲル電気泳動法、PFLPおよびPCR-SSCPが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0117】

50

(i) プライマーおよびプローブ

本明細書中で定義する通り、語句「プライマー」は鋳型 - 依存工程において形成されつつある核酸の合成を初回免疫可能ないかなる核酸をも含有することを意味する。典型的に、プライマーは長さ：10～20塩基対のオリゴヌクレオチドであるが、それより長い配列も使用可能である。プライマーは二本鎖もしくは一本鎖の形態で供されるが、一本鎖の形態が好ましい。プローブはプライマーとして作用し得るが、プローブは個別に定義する。プローブはおそらく初回免疫可能であろうが、標的DNAもしくはRNAに結合するよう設計し、増幅工程で使用する必要はない。

好ましい実施態様では、該プローブまたはプライマーは放射性同位元素 (^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^3H もしくは他の標識)、発蛍光団 (ローダミン、フルオロセリン) または化学発光物質 (ルシフェラーゼ) を用いて標識する。

【0118】

(ii) 鋳型依存性増幅法 (Template Dependent Amplification Methods)

多くの鋳型依存性工程は与えられた鋳型試料中に存在するマーカー配列を増幅するのに役立つ。最善の公知増幅法の1つは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCRTM と呼ばれる) であり、このものは米国特許番号第4,683,195、4,683,202および4,800,159中およびインニスラ (1990) 中に詳細に記載されており、該各々を本明細書中にそっくりそのまま引例として盛り込む。

簡潔に言えば、PCRにおいて、マーカー配列の反対相補鎖上の領域に相補的である2個のプライマー配列を製造する。過剰のデオキシヌクレシド・トリホスフェートをDNAポリメラーゼ (例えば、タック (Taq) ポリメラーゼ) と共に反応混合物に加える。マーカー配列が試料中に存在するならば、該プライマーは該マーカーに結合し、ポリメラーゼはヌクレオチドを加えることでマーカー配列に沿ってプライマーを伸張するようになる。反応混合物の温度を上昇および低下させることで、該伸張プライマーは該マーカーから解離して反応生成物を形成し、過剰のプライマーはマーカーおよび反応生成物に結合し、そして該工程は繰り返される。

逆転写PCR増幅製法を増幅されたmRNAの量を定量するのに用いられる。逆転写RNAのcDNAへの逆転写方法は公知であり、サンプルックら (1989) により記載されている。逆転写の変質法は熱的に安定なRNA - 依存DNAポリメラーゼを使用する。該方法はWO90/07641 (1990年12月21日発行) 中に記載されている。ポリメラーゼ連鎖方法論は該分野で公知である。

【0119】

別の増幅方法はリガーゼ連鎖反応 ("LCR") であり、このものはEPO番号320 308中に記載されており、このものを引例として本明細書中にそっくりそのまま盛り込む。LCRにおいては、2個の相補的プローブ対を作製し、標的配列の存在下、各対を互いに接する (abut) ように標的の反対相補鎖に結合させる。リガーゼの存在下、2個のプローブ対を連結させると一本鎖単位を形成する。PCRの場合と同様に温度を繰り返し変化させることで、結合ライゲート単位は標的から解離し、次いで過剰のプローブ対のライゲーションに対する "標的配列" として作用する。米国特許番号第4,883,750号では、プローブ対の標的配列に対する結合についてLCRと同様の方法を記載している。

Q - レプリカーゼ (PCT出願番号 PCT/US87/00880に記載) をまた、本発明においてさらに別の増幅方法として使用可能である。本方法においては、標的の領域と相補的な領域を有するRNAの複製配列をRNAポリメラーゼの存在下試料に加える。ポリメラーゼは複製配列をコピーし、次いで検出可能となる。

等温増幅法 (該方法において、制限エンドヌクレアーゼおよびリガーゼを、制限部位の一方の鎖におけるヌクレオチド：5' - [アルファ - チオ]トリホスフェートを含む標的分子の増幅を達成するために使用する) をまた、本発明の核酸の増幅に使用可能である (ウォルカー (Walker) らによる (1992))。鎖置換増幅 (SDA) は鎖置換の多重ラウンドおよび合成 (すなわち、ニックトランスレーション) を含む核酸の等温増幅を行なう別方法である。SDAについては米国特許5270184および5445166ならびにWalkerら

10

20

30

40

50

(1992b)、好温性SDAについてはSpargoら(1996)を参照せよ。

【0120】

修復連鎖反応(RCR)と呼ばれる同様な方法は、増幅用に標的にされた領域にわたるいくつかのプロープのアニーリング、続いて4個の塩基中2個だけが存在する修復反応を含有するものである。該他方の2個の塩基を簡易検出用にビオチニル化した誘導体として加えることも可能である。同様なアプローチがSDAにおいて用いられる。標的特異的配列をまた環状プロープ反応(CPR)を用いて検出可能である。CPRにおいては、非-特異的DNAの3'および5'配列並びに特異的RNAの中間配列を有するプロープを試料中に存在するDNAにハイブリッドさせる。ハイブリダイゼーションの際、反応液をリボヌクレアーゼHを用いて処理し、該プロープの生成物を消化後、放出される異なる生成物として同定する。初期の鑄型を別の環状プロープにアニーリングし、該反応を繰り返す。

さらに別の増幅方法(GB番号2 202 328およびPCT出願番号PCT/US89/01025中に記載し、これらの各々は引例として本明細書中にそっくりそのまま盛り込む)を本発明に関連して使用可能である。前者の利用としては、"修飾"プライマーをPCR-似、鑄型-および酵素-依存性合成において使用する。該プライマーを捕捉分子(例えば、ビオチン)および/または検出分子(例えば、酵素)を用いて標識化することにより、修飾可能である。後者の利用においては、過剰の標識化プロープを試料に加える。標的配列の存在下、該プロープは結合し、触媒的に切断される。切断後、該標的配列は過剰のプロープによって結合された無傷のまま放出される。該標識プロープの切断により、標的配列の存在がシグナルされる。

【0121】

他の核酸増幅法としては、転写に基づく増幅システム(transcription-based amplification systems: TASA)、例えば核酸配列に基づく増幅(nucleic acid sequence based amplification: NASBA)および3SR(コー(Kwoh)らによる(1989);ギンゲラス(Gingeras)らによるPCT出願WO88/10315、本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)が挙げられる。3SRおよびNASBAについて、米国特許5409818、Fahyら(1991)およびCompton(1991)を参照せよ。NASBAの場合において、核酸は増幅のために、標準フェノール/クロロホルム抽出、臨床試料の熱変性、溶菌緩衝液を用いた処理、並びにDNAおよびRNAを単離するためのミニスピンカラムまたはRNAの塩化グアニジニウム抽出により製造可能である。これらの増幅法は標的特異的配列を有するプライマーのアニーリングを含有する。重合に続き、二本鎖DNA分子を再び熱変成しながら、DNA/RNAハイブリッドをリボヌクレアーゼHを用いて消化する。どちらの場合も、一本鎖DNAは第2の標的特異的プライマーを加え、続いて重合することで完全に二本鎖となる。次いで、該二本鎖DNA分子をT7もしくはSP6などのRNAポリメラーゼにより多重的に転写する。等温サイクリック反応において、該RNAを一本鎖DNAに逆転写し、次いで二本鎖DNAに変換し、次いでT7もしくはSP6などのRNAポリメラーゼを用いて再び1回転写する。該生じた生成物は、先端を切った状態もしくは完全な状態に関わらず、標的特異的配列を示す。

【0122】

ダベイ(Davey)ら(EPO番号329 822、このものを本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)は、一本鎖RNA("ssRNA")、ssDNAおよび二本鎖DNA(dsDNA)(これらは本発明と関連して使用可能である)の臨床的な合成を含有する核酸増幅工程を開示している。該ssRNAは第1のプライマーオリゴヌクレオチド用の鑄型であり、このものは逆転写酵素(RNA-依存性DNAポリメラーゼ)により伸張される。次いで、リボヌクレアーゼH(リボヌクレアーゼH、DNAもしくはRNAのどちらかを有する二重らせん中でのRNAに特異的なリボヌクレアーゼ)を作用させて、該RNAを生成したDNA:RNA二重らせんから除去する。生成したssDNAは第2のプライマー用鑄型であり、このものとしてはまた鑄型に相同なRNAポリメラーゼプロモーター(T7RNAポリメラーゼにより例示される)5'の配列が挙げられる。次いで、本プロモーターをDNAポリメラーゼ(大腸菌DNAポリメラーゼIのラージ"クレノウ"フラグ

メントによって例示される)によって伸張し、二本鎖DNA("dsDNA")分子(該分子はプライマー間で初期のRNAのものと同一の配列を有し、加えて一方の末端でプロモーター配列を有する)を生じる。本プロモーター配列は該DNAの多くのRNAコピーを作るために適当なRNAポリメラーゼによって使用可能である。次いで該コピーを非常に速やかな増幅を起こす該サイクルに再入力可能である。酵素を適当に選ぶことで、本増幅は各サイクルで酵素を加えることなく等温的に行うことが可能となる。本工程の臨床性の理由で、出発配列をDNAもしくはRNAどちらの形態もとるように選択可能である。

【0123】

ミラー(Miller)らによるPCT出願WO89/06700(このものを本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)では、標的一本鎖DNA("ssDNA)へのプロモーター/プライマー配列のハイブリダイゼーション、続いて該配列に関する多くのRNAコピーの転写に基づく核酸配列の増幅スキームを開示している。本スキームはサイクリックではなく、すなわち新しい鑄型は生成するRNA転写物から産生されるものではない。他の増幅方法としては"RACE"および"一部位での(one-sided)PCR(登録商標)"(フローマン(Frohman)(1990);オーハラ(Ohara)らによる(1989);各々を本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)が挙げられる。

10

核酸(生成する"ジ-ヌクレオチド"の配列を有し、結果該ジ-ヌクレオチドを増幅する)の存在下、2個(もしくはそれ以上)のオリゴヌクレオチドのライゲーションに基づく方法もまた、本発明の増幅段階で使用可能である。フー(Wu)らによる(1989)(このものを本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)。

20

【0124】

(iii) サザン/ノーザンプロット法

プロット法は当業者にとって公知である。サザンプロット法は標的としてのDNAの使用を含有し、一方ノーザンプロット法は標的としてのRNAの使用を含有する。cDNAプロット法は多くの点でRNA種のプロット法に類似であるが、各々は異なる種類の情報を提供する。

簡単に言えば、プローブは、適当なマトリックス(ニトロセルロースのフィルターが多い)上で免疫化したDNAもしくはRNA種を標的にするのに使用する。分析を促進するために、該異なる種をいくらか分離するべきである。このことは核酸種のゲル電気泳動、続く該フィルター上での"プロッティング"により達成されることが多い。

30

引き続き、該プロットされた標的を変性および再ハイブリダイゼーションを促進する条件下、プローブ(通常、標識化したもの)と共にインキュベートする。該プローブは該標的との塩基対となるように設計されているので、プローブは変性条件下標的配列の一部と結合する。次いで、未結合プローブを除去し、検出を上記に記載の通り達成する。

【0125】

(iv) 分離法

一般に、特定の増幅が起こったかどうかを決定する目的で、鑄型および過剰のプライマーから1または2段階で増幅生成物を分離することが望ましい。1実施態様において、標準法を用いたアガロース、アガロース-アクリルアミドまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動により、増幅生成物を分離する。サンプルクラ(1989)を参照。

40

または、分離を達成するためにクロマトグラフィー法を使用可能である。このものとしては、本発明において使用可能な多くの種類;吸着、分配、イオン-交換およびモレキュラーシーブのクロマトグラフィーがあり、それらを使用するための多くの専門的な技法としてはカラム、ペーパー、薄層およびガスクロマトグラフィーが挙げられる(フライフェルダー(Freifelder)による(1982))。

【0126】

(v) 検出法

該マーカ配列の増幅を確認するために、生成物を視覚化してもよい。1つの典型的な視覚化方法としては臭化エチジニウムを用いたゲルの染色およびUV光下での視覚化が挙げられる。または、該増幅生成物を放射線-または蛍光-標識化ヌクレオチドを用いて完

50

全に標識化するならば、該増幅生成物を X - 線フィルムに被曝するかまたは適当な刺激スペクトルの下で視覚化し、続いて分離することが可能である。

1 実施態様においては、視覚化を間接的に達成する。増幅生成物の分離に続いて、標識化した核酸およびプローブを該増幅化したマーカ配列と接触させる。該プローブは蛍光団と接合させることが好ましいが、放射線標識化してもよい。別の実施態様では、該プローブを結合パートナーに接合させるが、該結合パートナーとは抗体もしくはビオチンおよび検出可能な分子を持つ他の結合対などである。

1 実施態様においては、標識化したプローブによって検出を行なう。該技法は該分野の当業者にとってよく知られており、また分子プロトコールに関する多くの標準的な本の中にも示されている。サンプルックら(1989)を参照。例えば、発色団または放射性同位体プローブもしくはプライマーは増幅の間またはその後の標的を同定する。

前述の1例が米国特許第5,279,721号に記載されており(このものを本明細書中に引例として盛り込む)、そこでは自動化電気泳動用の装置および方法並びに核酸の転移が開示されている。該装置によりゲルの余分な操作が必要なく、電気泳動およびプロットングが可能であり、理論的には本発明による方法を実行するのに適当である。

加えて、上記に記載の増幅生成物を、標準配列分析法を用いて特定の種類の变化を同定するために配列分析に供することが可能である。或る方法においては、最適シーケンシング用に設計したプライマーの組を用いた配列分析により遺伝子の完全分析を行なう(ピグノン(Pignon)らによる(1994))。本発明は該タイプの分析の一部もしくは全部に使用可能な方法を提供する。本明細書中に開示の配列を用いて、直接シーケンシングにより分析可能な T S 1 0 q 2 3 . 3 遺伝子を通じて配列の増幅が許容されるようにオリゴヌクレオチドプライマーを設計可能である。

【0127】

(v i) キット成分

T S 1 0 q 2 3 . 3 を検出およびシーケンシングするのに要する必須の物質および試薬の全て並びにそれらの変形を、キット中で共に組み立てることが可能である。このものは一般的に予め選択したプライマーおよびプローブからなる。また、様々なポリメラーゼ(R T、T a q、シークエナーゼ^{T M}など)をはじめとした核酸を増幅するのに適当な酵素、デオキシヌクレオチドおよび緩衝液を、増幅するのに必要な反応混合物を提供するために含有してもよい。該キットはまた一般的に適当な媒体中、各プライマーもしくはプローブに対するのと同様に各個々の試薬および酵素に対して異なる内容物からなる。

【0128】

(v i i) 相対定量的(Relative Quantitative) R T - P C R に関するデザインおよび理論的考察

R N A の c D N A への逆転写(R T)、続く相対定量的 P C R (R T - P C R) を、患者から単離した特定の m R N A 種の相対濃度を決定するのに使用可能である。特定の m R N A 種の濃度変化を決定することで、特定の m R N A 種をコードする遺伝子が別々に発現したことが分かる。

P C R の場合、増幅される標的 D N A の分子の数は、ある要因によって増加し、ある試薬が限定に達するまで、反応の各サイクルで2近くまで増加する。その後、増幅の速度はサイクル間での増幅された標的が増加しなくなるまで次第に減少する。周期の数(cycle number)を X 軸にとり、増幅した標的 D N A の濃度の l o g を Y 軸にとってグラフをプロットするならば、プロットした点を結ぶことで特徴的な形の曲線を形成する。第1のサークルではじめると、該線の勾配は正でかつ一定となる。これは曲線の直線部分という。試薬が限界に達した後、該線の勾配は減少し始め、結局は0となる。この点で、増幅した標的 D N A の濃度は漸近線となり、ある一定値となる。このことを曲線のプラトー部分という。

P C R 増幅の直線部分における標的 D N A の濃度は、反応を始める前は標的の出発濃度に対して正比例である。同数の周期で完結し、該直線範囲内にある P C R 反応における標的 D N A の該増幅生成物の濃度を決定することで、初期の D N A 混合物における特定の標

的配列の相対濃度を決定することが可能となる。該DNA混合物が異なる組織もしくは細胞から単離したRNAから合成したcDNAであるならば、誘起された標的配列由来の特定mRNAの相対的含有量(relative abundance)を個々の組織または細胞について決定可能である。PCR生成物の濃度と相対的mRNA含量の間で本正比例することは該PCR反応において直線範囲においては真実である。

【0129】

該曲線のプラトー部分における標的DNAの最終濃度は、反応混合物中の試薬の利用率(availability)によって決定され、このものは標的DNAの初期濃度から独立している。したがって、RNA母集団を収集するために、mRNA種の相対的含有量をRT-PCRで決定する前に満たさなければいけない第1の条件は、増幅PCR生成物の濃度をPCR反応が曲線の直線部分にある時にサンプリングすることである。

10

【0130】

特定のmRNA種の相対的含有量を十分に決定するためにRT-PCR実験において満たさなければいけない第2の条件は、増幅可能なcDNAの相対的濃度をある程度独立した基準にまで規格化しなければいけないことである。RT-PCR実験の目標は試料中の全mRNA種の平均含量に相対的な特定のmRNA種の含量を決定することである。下記に記載する実施例において、 α -アクチン、アスパラギン合成酵素およびリポコルテンIIのmRNAを、他のmRNAの相対的含有量を比較するための外部および内部標準として使用可能である。

競争的PCRにおける多くのプロトコールは、標的としてほとんど無視できる内部PCR標準を使用可能である。該PCR増幅の生成物を該直線期の中にサンプルする場合、該戦略は有効である。反応がプラトー期に達するときに該生成物をサンプルするならば、含量の劣る生成物が相対的に過剰に現れてくる。異なる発現に対してRNA試料を調べる場合のように、多くの異なるRNA試料について相対的含有量を比較することは、RNAの相対的含有量の差異が実際よりも少なく現れるように曲解することになる。内部標準が標的よりもずっと多いならば、このことは重大な問題ではない。内部標準が標的よりも多いならば、RNA試料間で直接に直線の比較を行なうことが可能である。

20

上記の議論は、臨床的に誘導された物質におけるRT-PCRアッセイに関する理論的考察を記載するものである。臨床的試料中に内在する問題はその量が多岐にわたること(規格化が問題になる)、およびその質が多岐にわたること(信頼できる内部コントロール(標的よりも大きいものが好ましい)との共増幅を必要とする)。RT-PCRを内部標準と共に相対定量的RT-PCRとして行なうならば、これらの問題の両方を克服できるであろうが、その場合内部標準は標的cDNAフラグメントよりも大きい増幅可能なcDNAフラグメントであり、また内部標準をコードするmRNAの存在量が標的をコードするmRNAのおよそ5~1000倍以上である必要がある。本アッセイは、各mRNA種の絶対含量ではなく、相対的含有量を測定するものである。

30

【0131】

外部標準プロトコールと共に慣例の相対定量的RT-PCRを用いて、他の研究を行なうことも可能である。該アッセイは増幅曲線の直線部分においてPCR生成物をサンプルする。該サンプリングに対して至適なPCRサイクルの数は、各標的cDNAフラグメントに対して経験的に決定しなければいけない。加えて、様々な組織試料から単離した各RNA母集団の逆転写生成物を増幅可能なcDNAの等濃度について注意深く規格化しなければいけない。該アッセイは絶対mRNA含量を測定するので本濃度は非常に重要である。絶対mRNA含量は規格化した試料中のみの異なる遺伝子発現の手段として使用可能である。増幅曲線の直線範囲を経験的に決定しおよびcDNA製造を規格化することは煩雑かつ時間を浪費する工程であるが、生じるRT-PCRアッセイは内部標準と併せた相対定量的RT-PCRアッセイから派生するアッセイよりも優れていることがある。

40

本利点の1つの理由としては、内部標準/競合物質がなくても全試薬を増幅曲線の直線範囲内の単一PCR生成物に変換することが可能であり、したがって該アッセイの感度が増加することである。別の理由としては1個のPCR生成物とだけ共にある場合、電気泳

50

動ゲル上での生成物の表示または別の表示方法が複雑にならず、バックグラウンドがほとんどなく、および解釈がより容易であることである。

【 0 1 3 2 】

(v i i i) チップ技法

本発明者によって特に熟考されたものは、ハシア(Hacia)ら(1996)およびシューマカー(Shoemaker)ら(1996)により記載されたものなどのチップに基づいた - D N A 技法である。簡単に言えば、該技法は大量の遺伝子を早急にかつ正確に分析するための定量方法である。遺伝子をオリゴヌクレオチドと付加するかまたは一定のプロブアレイを用いることで、標的分子を高密度アレイとして分離し、またハイブリダイゼーションに基づいてこれらの分子をスクリーニングするために、チップ技法を使用できる。ピース(Pease)らによる(1994) ; フォドル(Fodor)らによる(1991)をも参照。

10

【 0 1 3 3 】

B . 免疫診断

本発明の抗体は、エライザ法およびウエスタンブロット法などの技法を用いて、健康なおよび病的組織中の T S 1 0 q 2 3 . 3 内容物を確認するのに使用できる。これはまた悪性腫瘍の存在の有無に関するスクリーンまたは将来の癌の予測に供し得る。

エライザアッセイにおいて本発明の抗体を使用することを考えてみる。例えば、抗 - T S 1 0 q 2 3 . 3 抗体は選択表面上に、好ましくはポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルなどのタンパク質アフィニティーを阻害する表面に免疫化する。不完全に吸収された物質を除去するために洗浄後、試験抗血清に関して抗原的に中性であると知られている、牛血清アルブミン(B S A)、カゼインもしくは粉末ミルクの溶液などの非特異的タンパク質を用いて、該アッセイプレートウェルを結合もしくは被覆することが望ましい。このため、免疫化表面上での非特異的吸収部位は遮断され、したがって該表面上での抗原の非特異的結合によってバックグラウンドは減少する。

20

抗体を該ウェルに結合させ、バックグラウンドを減少するために未反応物質を用いて被覆しおよび非結合物質を除去するために洗浄した後、該免疫化した表面を該試料と接触させ、免疫複合体(抗原/抗体)が形成するような方法で調べた。

【 0 1 3 4 】

試験試料と結合抗体間で特定の免疫複合体を形成させ、続いて洗浄し、免疫複合体の挙動およびその形成量を、第1抗体と異なる T S 1 0 q 2 3 . 3 に対して特異性を有する第2抗体に同様に供することによって決定した。適当な条件としては、B S A、牛ガンマグロブリン(B G G)およびホスフェート緩衝塩液(P B A) / ツイーン(Tween、登録商標)などの希釈剤を用いて試料を希釈することが好ましい。該添加剤はまた非特異的バックグラウンドの減少を助ける傾向がある。次いで、層化した抗血清を約2 ~ 4時間、好ましくは約25 ~ 約27の次数の温度でインキュベートする。インキュベートに続き、抗血清と接触させた表面を非免疫複合物質を除去するために洗浄する。好ましい洗浄方法としては、P B S / ツイーン(登録商標)などの溶液、またはボレート緩衝液を用いた洗浄が挙げられる。

30

検出手段を供給するために、第2の抗体が適当な色素原性の基質を用いてインキュベートする場合に着色を生じさせる会合した酵素を有することが好ましい。したがって、例えば該第2抗体と結合させた表面を、免疫複合体の形成が生じるのに好ましい期間および条件下でウレアーゼもしくはペルオキシダーゼ接合抗ヒト I g G を用いて接触およびインキュベートさせることが望まれる(例えば、P B S / ツイーン(登録商標)などのP B S 含有 - 溶液中室温で2時間インキュベートする)。

40

【 0 1 3 5 】

第2の酵素標識化抗体を用いてインキュベートし、引き続き非結合物質を除去するために洗浄後、標識の量を、酵素標識がペルオキシダーゼの場合、尿素およびプロモクレゾールパープルもしくは2, 2' - アジノ(azino) - ジ - (3 - エチル - ベンゾチアゾリン) - 6 - スルホン酸(A B T S)、およびH₂O₂などの染色原性基質を用いてインキュベートすることで定量化する。次いで、例えば可視スペクトル分光計を用いて着色の

50

程度を測定することによって定量を達成する。

先のフォーマットを最初に該アッセイプレートに試料を結合させることで変化することが可能である。次いで、アッセイプレートを用いて一次抗体をインキュベートし、続いて一次抗体に対し特異性を有する標識化二次抗体を用いて結合一次抗体を検出する。

種々の有用な免疫検出法の段階が、Nakamuraら(1987;本発明の参考文献である)などの科学文献に記載されている。最も単純かつ直接的認識において、イムノアッセイは結合アッセイである。好ましいイムノアッセイは、種々のタイプのラジオイムノアッセイ(RIA)および免疫ビーズ捕捉アッセイである。組織切片を用いる免疫組織化学的検出もまた特に有用である。しかし、検出がこのような技術に限定されないことは容易に認められるであろうし、ウエスタンブロットティング、ドットブロットティング、FACS分析なども本発明に用いることができる。

【0136】

本発明の抗体組成物はイムノブロットまたはウエスタンブロット分析において非常に有用である。ニトロセルロース、ナイロンなどの固体支持体マトリックスもしくはその組み合わせ上に免疫化したたんぱく質を同定するための高アフィニティー一次試薬として、該抗体を使用可能である。免疫沈降と併せ、続いてゲル電気泳動を行なうことで、該抗体は抗原を検出する際に使用する1工程試薬として使用可能であるが、ここで抗原を検出の際に使用する二次試薬により相反する(adverse)バックグラウンドが起こる。ウエスタンブロット法と併せて使用する免疫学に基づく検出法としては、この点で特に使用すべきと考えられる有毒な分子に対する酵素活性-、放射性標識-、または蛍光-標識化した二次抗体が挙げられる。このような標識の使用に関する米国特許としては、3817837;3850752;3939350;3996345;4277437;4275149および4366241が挙げられ、これらは本発明の参考文献である。もちろん、当業界で公知の第2抗体またはビオチン/アビジンリガンド結合アレンジメントなどの第2の結合リガンドの使用を通じてさらなる利点を見出すことができる。

【0137】

V. 活性化化合物のスクリーニング方法

本発明は、さらに、TS10q23.3および活性フラグメントおよびそれをコードする核酸の、TS10q23.3活性の刺激、TS10q23.3の欠損の克服、または突然変異体TS10q23.3分子の効果のブロックのいずれかおける活性に関して化合物のスクリーニングすることにおける使用を企図する。これらのアッセイは、様々な異なる形式を用いることができ、それに関してそのスクリーニングが行われる、「活性」の種類に依存し得る。企図される機能的な"読み出し情報(read-out)"には、化合物への結合、化合物による基質、リガンド、レセプターまたは他の結合パターンへの結合の阻害、ホスフェート活性、抗ホスファターゼ活性、TS10q23.3のリン酸化、TS10q23.3の脱リン酸化、細胞-細胞間シグナル伝達の阻害または刺激、増殖、転移、細胞分裂、細胞移動、軟寒天コロニー形成、接触阻害、侵入性、血管形成、アポトーシス、腫瘍の進行または他の悪性表現型が含まれる。

本発明のポリペプチドは、組み合わせライブラリーテクノロジーの結果として現れた化合物のスクリーニングにも使用できる。組み合わせライブラリーテクノロジーは、ポリペプチドの活性を調節する能力について、おびただしい数の異なる物質を試験する効率的な方法を提供する。このようなライブラリーおよびその用途は当業界では公知である。ペプチドライブラリーの使用が好ましい。たとえば、WO97/02048を参照せよ。

【0138】

簡単に述べると、ポリペプチドの活性を調節する物質のスクリーニング方法には、1つまたはそれ以上の試験物質を適当な反応培地においてポリペプチドと接触させ、処理したポリペプチドの活性を試験し、次いで試験物質で処理していない比較反応培地におけるポリペプチドの活性と比較することが含まれる。処理および非処理ポリペプチド間の活性の相異は試験物質の調節効果を示すものである。

活性の調節のスクリーニングに先立つかまたはそれに加えて、酵母2ハイブリッドシス

テム (Bartelら、1993; FieldsおよびSong、1989; ChevrayおよびNathans、1992; Leeら、1995など) などにおいて、試験物質のポリペプチドと相互作用する能力をスクリーニングすることができる。このシステムは、物質の実際のポリペプチド調節能力を試験する前の粗スクリーニングとして用いることができる。それとは別に、該スクリーニングはK V L Q T 1またはK C N E 1特異的結合パートナーへの、試験物質の結合をスクリーニングするため、またはK V L Q T 1またはK C N E 1ポリペプチドの模擬体を見つけるために使用することができる。

ポリペプチドの活性を調節するかまたはそれに影響を及ぼす物質の同定に続いて、該物質をさらに研究する。さらに、該物質は加工し、および/または製品または配合品、もしくは医薬、医薬組成物、薬物などの組成物などの製品として使用することができる。これらは個々に投与することができる。

したがって、本発明は、種々の態様において、本明細書の記載にしたがってポリペプチド活性のモジュレーターとして核酸分子を用いて同定された物質ばかりでなく、このような物質を含む医薬組成物、医薬、薬物または他の組成物、このような物質を、L Q Tの治療(予防的治療を含む)などのために患者に投与することを特徴とする方法、L Q Tの治療のための投与用組成物の製造におけるこのような物質の使用、およびコーディングのような物質を医薬的に許容し得る賦形剤、ビヒクルまたは担体ならびに必要な応じて他の成分と混合することを特徴とする医薬組成物の製造方法にまで拡張される。

【0139】

A. in vitro アッセイ

1つの態様では、本発明をT S 1 0 q 2 3 . 3分子またはそのフラグメントに結合する化合物のスクリーニングに適用する。ポリペプチドまたはフラグメントは溶液中で遊離状態であるか、支持固体に固定されているか、細胞内または細胞表面上で発現するかのいずれかであり得る。ポリペプチドまたは化合物のいずれかを標識し、それにより結合の測定を可能にし得る。

別の態様では、アッセイにより、天然または人工の基質または結合パートナーに対するT S 1 0 q 2 3 . 3の結合の阻害を測定することができる。競合結合アッセイは、試薬のうちの1つ(T S 1 0 q 2 3 . 3、結合パートナーまたは化合物)を標識して行うことができる。通常、ポリペプチドが標識された物質であろう。結合した標識に対するフリーの標識のレベルの量を測定し、結合または結合の阻害について測定することができる。

化合物の高処理量スクリーニングのためのさらなる技術は、W O 8 4 / 0 3 5 6 4に記載されている。大量の小さなペプチド試験化合物を、例えばプラスチックピンまたは他の表面などの固体の基面上で合成する。ペプチド試験化合物は、T S 1 0 q 2 3 . 3と反応し、洗浄される。結合したポリペプチドを様々な方法により検出する。

精製したT S 1 0 q 2 3 . 3を、前述の薬物スクリーニング技術において使用するためのプレート上で直接コーティングすることができる。しかしながら、そのポリペプチドに対する非中和抗体を使用して、そのポリペプチドを固相に固定化することができる。また、反応領域(好ましくは末端領域)を含む融合タンパク質を使用して、T S 1 0 q 2 3 . 3活性領域を固相に連結させることができる。

T S 1 0 q 2 3 . 3の野生型または自然もしくは作製された突然変異を含む様々な細胞系を使用して、T S 1 0 q 2 3 . 3の様々な機能上の特質について、そして候補化合物がこれらの特質に対してどのように影響を及ぼすかについて調べることができる。突然変異の作製方法が本明細書の他の箇所に記載されている。悪性へと導くか、その一因となるか、および/または悪性を引き起こす、T S 1 0 q 2 3 . 3における自然に生ずる突然変異も記載されている。そのようなアッセイでは、化合物を適当に製剤化し、その生化学的性質を付与し、そして標的細胞と接触させる。アッセイによっては、培養細胞が必要であるかもしれない。次いで、数多くの異なる生理学的アッセイによって細胞を調べることができる。あるいは、T S 1 0 q 2 3 . 3の機能または関係する経路を調査し得る分子解析を行うことができる。これには、タンパク質発現、酵素機能、基質利用、T S 1 0 q 2 3 . 3を含む様々な分子のリン酸化状態、c A M Pレベル、m R N A発現(全細胞またはポリ

10

20

30

40

50

A RNAのディファレンシャルディスプレイ)に関するアッセイおよびその他のアッセイなどのアッセイが含まれる。

【0140】

B. in vivo アッセイ

本発明は、様々な動物モデルの使用も包含する。ここでは、ヒトとマウスのTS10q23.3の間でみられた同一性によって、それが正常に発現する動物系全体においてTS10q23.3の機能を調べるすばらしい機会が与えられる。正常なTS10q23.3を発現することができない突然変異細胞系を開発し単離することによって、ヒトおよび他の動物における癌を高度に予測し得るマウスの癌モデルを作製することができる。これらのモデルは、模擬的な原発性および/または転移性腫瘍に対して腫瘍細胞の正所性(orthotopic)または全身的投与を用いることができる。あるいは、悪性変換および/または腫瘍の進行に關与するある特定の事象の原因であると分かっている試薬を与えることにより動物において癌を誘導することができる。最後に、野生型TS10q23.3を欠損しているトランスジェニック動物(以下に記載)を癌の発生と処置のためのモデルとして用いることができる。

10

試験化合物による動物の処置には、適当な形態の、化合物の動物への投与が含まれる。投与は、口、鼻、口腔粘膜、直腸、膺、皮膚を含むがこれらに限られない臨床的または非臨床的目的で利用し得るいずれかの経路によるものである。あるいは、投与は、気管内、点滴注入、気管支点滴、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射によるものであってもよい。特に企図されるのは、全身的な静脈内注射、血液またはリンパ液供給および腫瘍内注射による局所投与である。

20

in vivoでの化合物の効果の測定には、様々な異なった判断基準を含み得る。このような判断基準には、生存率、腫瘍負荷(burden)または腫瘍塊の減少、腫瘍の進行の阻止または遅延、腫瘍の除去、転移の阻害または阻止、活性レベルの増加、免疫エフェクタ機能の改善および食物摂取量の改善が含まれる。

【0141】

C. 合理的な薬物設計

合理的な薬物設計の目標は、生物学的に活性なポリペプチドまたは化合物の、それらが相互作用するような構造的なアナログ(アゴニスト、アンタゴニスト、インヒビター、結合パートナーなど)を製造することである。このようなアナログを作製することにより、天然の分子よりもより活性なまたはより安全な薬物を作ることが可能であり、それは変化に対する異なった感受性を有するかまたは様々な他の分子の機能に影響を及ぼす。1つのやり方においては、TS10q23.3またはそのフラグメントに関する三次元構造を作製する。これは、X線結晶学、コンピューターモデリングまたはその両方の方法の組合せによって達成できる。別の方法である「アラニンスキャン」は、分子全体にわたるアラニンによる残基のランダムな置換と測定された機能に対する生じた影響に關係するものである。

30

機能的アッセイにより選択されたTS10q23.3特異的抗体を単離した後、その結晶構造を解析することも可能である。原則として、この手段によって、後の薬物設計がそれに基づくことができるファーマコア(pharmacore)が得られる。概して、機能的、薬理的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作製することによって、タンパク質結晶学を全体的に回避することができる。鏡像の鏡像として、抗イディオタイプの結合部位は、もとの抗原のアナログであると予想される。次に、抗イディオタイプを使用して、化学的または生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定し単離することができる。次に、選択されたペプチドはファーマコアとして役立つであろう。抗イディオタイプは、抗原として抗体を使用して、抗体の製造について本明細書に記載された方法を用いて作製することができる。

40

このように、改善されたTS10q23.3活性を有する、または刺激因子、インヒビター、アゴニスト、アンタゴニストまたはTS10q23.3またはTS10q23.3機能によって影響される分子として働く薬物を設計することができる。クローンされたTS

50

0 q 2 3 . 3 配列を利用することにより、十分な量の T S 1 0 q 2 3 . 3 を製造して結晶学的研究を行うことができる。さらに、ポリペプチド配列に関する知識により、構造 - 機能間の関係をコンピューターを利用して予測することを可能にする。

【 0 1 4 2 】

ポリペプチド機能のモジュレーターとして同定された物質は、天然においてはペプチドまたは非ペプチドである。非ペプチド"小分子"は多数のインビトロ医薬用途に好ましいことが多い。したがって、該物質の模擬体(特にペプチド)は医薬用途に適している。

公知の医薬的活性化合物の模擬体の設計は、"リード"化合物に基いた医薬品の発展への公知のアプローチである。活性化合物の合成が困難または高価である場合、または純粋なペプチドが、消化管にあるプロテアーゼによってすばやく分解される傾向があるなど経口組成物として不適当な活性剤であるなど特定の投与方法にとって不適当である場合に、これが望ましい。模擬体の設計、合成および試験は、一般に多数の分子について標的特性をランダムにスクリーニングすることを避けるために用いられる。

通例、標的特性をもつ化合物から模擬体を設計するのに行われる数種の段階がある。第1に、標的特性を決定するのに重大かつ重要な化合物の特定の部分を決定する。ペプチドの場合、これは、各残基を順番に置換するなど、ペプチドのアミノ酸配列をシステムチックに変化させることによって行うことができる。通例、ペプチドのアラニン走査を用いてこのようなペプチドモチーフを精製する。化合物の活性領域を構成するこれらの部分または残基はその"ファルマコフォア"として知られている。

一度ファルマコフォアが見出されると、立体化学、結合、サイズおよび/または荷電などの物理的特性にしたがって、分光光学技術、エックス線回折データおよびNMRなどのデータを用いてその構造のモデルが作製される。コンピューター分析、類似性マッピング(原子間の結合よりもむしろファルマコフォアの荷電および/またはポリウムを模すものである)および他の技術を用いてこのモデリングプロセスを行うことができる。

このアプローチの別の態様においては、リガンドおよびその結合パートナーの3次元構造をモデル化する。これは、リガンドおよび/または結合パートナーが、結合のコンホメーションを変化する場合に特に有用であり、模擬体の設計においてモデルがこれを考慮したものにする。

次いで、ファルマコフォアを模擬する化学的グループが接合しうるテンプレート分子を選択する。テンプレート分子およびそれに接合された化学的グループは、リード化合物の生物学的活性を保持しつつも、模擬体が合成しやすく、医薬的に許容しうるものであり、インビボで分解しないものになるように常套的に選択することができる。さらに、模擬体がペプチドベースである場合、ペプチドを、その堅固さを強化するために環化することによってさらに安定性が達成される。次いで、このようなアプローチによって見出された模擬体をそれらが標的特性をもっているかどうか、あるいはどの程度それを呈しているかを調べるためにスクリーニングする。

【 0 1 4 3 】

V I . T S 1 0 q 2 3 . 3 に関連した悪性腫瘍の処置方法

本発明はさらに、別の態様では、癌の処置に関する。処置し得る癌のタイプは、本発明にしたがえば、T S 1 0 q 2 3 . 3 が関与するもののみに限られる。関与することにより、T S 1 0 q 2 3 . 3 が突然変異を起こしているかまたは異常であることは必要ですらなく、この腫瘍抑制因子の過剰発現が細胞内の他の病変を実際に克服し得る。このように、T S 1 0 q 2 3 . 3 療法を用いて、脳(グリア芽細胞腫、星状細胞腫、希突起グリオーム、上衣細胞腫)、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、膵臓、小腸、血液細胞、結腸、胃、胸部、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭および頸部、食道、骨髄、血液またはその他の組織の癌を含む、広く様々な腫瘍を処置し得ることが企図される。

多くの状況では、腫瘍細胞を殺すかまたは正常な細胞死または「アポトーシス」を受けると誘導する必要はない。むしろ、有意義な処置を達成するために必要とされることは、腫瘍の成長をある程度まで遅らせることである。腫瘍の成長は完全にブロックされるかもしれないが、いくつかの腫瘍の退縮が達成されるかもしれない。「寛解」および「腫

10

20

30

40

50

瘍負荷 (burden) の減少」などの臨床学的な用語もまた、与えられた通常の語法が企図される。

【0144】

A. 遺伝子ベースの治療

本発明者によって企図される治療態様の1つは、いくつかの癌の腫瘍形成に關与する事象において分子レベルで介入することである。具体的には、本発明者は、癌細胞に、TS10q23.3をその細胞に提供することが可能な発現構築物を提供することを意図する。ヒト、マウス、およびイヌの遺伝子間の配列相同性ゆえに、これらの核酸のいずれもがヒトの治療に使用でき、同様に、同じまたは生物学的に等価なポリペプチドをコードし得る上記の遺伝子配列変異体のいずれもが使用できる。発現ベクターの詳細な議論とそこで使用される遺伝子エレメントは、参考のため本節の一部とする。特に好ましい発現ベクターは、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスベクターである。また、リポソームで包まれた発現ベクターも好ましい。

当業者は、*in vivo* および *ex vivo* の状況で遺伝子送達を如何にして適用するかについてよく理解している。ウイルスベクターについては、一般にウイルスベクターストックを調製する。ウイルスの種類とその達成できる力価によって、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} の感染性粒子を患者に送達する。相対的取り込み効率を比較することにより、同様の計算をリポソーム製剤または他の非ウイルス製剤に関して外挿し得る。薬学的に許容し得る組成物としての製剤は、以下に記載する。

様々な腫瘍のタイプについて様々な経路が企図される。経路に關する以下の節で、考えられる経路の詳細なリストを記載する。実際にはいずれかの腫瘍に対して、全身的な送達が企図される。このことは、微細なまたは転移性の腫瘍については特に重要であることがわかるであろう。分散した腫瘍の塊が見つかる場合は、様々な、直接的、局所のおよび領域的な手段が講じられ得る。例えば、発現ベクターを腫瘍に直接注射し得る。腫瘍床は、切除前、切除中または切除後に処置することができる。切除後は、一般に、術後に入れておいたカテーテルによってベクターを送達する。腫瘍の血管構造を利用し、維持している静脈または動脈に注入することによって腫瘍にベクターを導入することができる。より末梢の血液供給経路も利用することができる。

異なる態様では、*ex vivo* 遺伝子治療が企図される。この方法は、骨髓に關連する癌の処置に特に適しているがそれに限られない。*ex vivo* の態様では、患者の細胞を取り出して少なくともある期間体外で維持する。この期間、治療を行い、その後でその細胞を患者に再導入し、うまくいけば、試料中のいかなる腫瘍細胞も殺されていると期待される。

自己骨髓移植 (ABMT) は、*ex vivo* 遺伝子治療の一例である。基本的に、ABMTの背景にある概念は、患者が、その患者自身の骨髓ドナーとなるということである。即ち、通常致死投与量の放射線照射または化学療法をその患者に投与して腫瘍細胞を殺し、*ex vivo* で維持(および多分膨張)した患者自身の細胞でもって骨髓細胞を再び生着させる。骨髓はしばしば腫瘍細胞で汚染されているので、骨髓からこれらの細胞を一掃することが望ましいからである。この目標を達成するための遺伝子治療の使用は、本発明にしたがって用いられ得るTS10q23.3とはまた別の方法である。

【0145】

当業界で公知の遺伝子伝達システムが、本発明の遺伝子療法において有用である。これらには、ウイルスおよび非ウイルス伝達法が含まれる。パポバウイルス (SV40、Madzakら、1992)、アデノウイルス (Berkner、1992; Berknerら、1988; Gorz inliaおよびKapikian、1992; Quantinら、1992; Rosenfeldら、1992; WilkinsonおよびAkrigg、1992; Stratford-Perricaudetら、1990; Schneiderら、1998)、ワクシニアウイルス (Moss、1992; Moss、1996)、アデノ関連ウイルス (Muzyczka、1992; Ohiraら、1990; RussellおよびHirata、1998)、HSVおよびEBVを含むヘルペスウイルス (Margolskee、1992; Johnsonら、1992; F

10

20

30

40

50

inkら、1992; BreakefieldおよびGeller、1987; Freeseら、1990; Finkら、1996)、レンチウイルス(Naldiniら、1996)、シンドビスおよびセムリキフォレストウイルス(Berglundら、1993)およびトリレトロウイルス(BandyopadhyayおよびTemin、1984; Petropoulosら、1992)、マウス(Miller、1992; Millerら、1985; Sorgeら、1984; MannおよびBaltimore、1985; Millerら、1988)およびヒト起源(Shimadaら、1991; Helsethら、1990; Pageら、1990; BuchschacherおよびPanganiban、1992)などの多くのウイルスを遺伝子伝達ベクターまたは遺伝子伝達ベクターの修復用ベースとして用いられる。

当業界で公知の非ウイルス遺伝子伝達法には、リン酸カルシウム共沈法(Grahamおよびvan der Eb、1973; Pellicerら、1980)などの化学的技術、マイクロインジェクション(Andersonら、1980; Gordonら、1980; Brinsterら、1981; ConstantiniおよびLacy、1981)、リポソーム経由膜融合媒介性伝達(Felgnerら、1987; WangおよびHuang、1989; Kanedaら、1989; Stewartら、1992; Nabelら、1990; Limら、1991)および直接DNA取り込みおよび受容体媒介DNA伝達(Wolfrら、1990; Wuら、1991; Zenkeら、1990; Wuら、1989; Wolfら、1991; Wagnerら、1990; Wagnerら、1991; Cottenら、1990; Curielら、1992; Curielら、1991)などの機械的技術が含まれる。ウイルス媒介遺伝子伝達は、リポソームデリバリーを用いる直接インビボ遺伝子伝達と組み合わせることができ、それによってウイルスベクターを周囲の非分裂細胞ではなく腫瘍細胞へ直接移せるようになる。さらに別法として、レトロウイルスベクター産生細胞系を腫瘍細胞に注入することができる(Culverら、1992)。産生細胞の注入は、ベクター粒子の継続的な源を提供する。この技術は外科手術不可能な脳腫瘍をもつヒトに使用されている。

【0146】

生物学的および物理的遺伝子伝達法を組み合わせるというアプローチにおいては、いずれかのサイズのプラスミドDNAをアデノウイルスヘクソタンパク質に特異的なポリリン複合抗体と組み合わせ、得られる複合体をアデノウイルスベクターに結合させる。次いで、三分子複合体を用いて細胞に感染させる。アデノウイルスベクターは、効率的に結合し、内在化し、対のDNAが損傷を受ける前にエンドソームを分解する。アデノウイルスに基づくベクターのデリバリーのための他の技術については、Schneiderら(1998)および米国特許5691198; 5747469; 5436146および5753500を参照せよ。

リポソーム/DNA複合体は、インビボにおいて直接遺伝子伝達を媒介しうることがわかっていて、標準的リポソーム調製において、遺伝子伝達プロセスは非特異的であるが、局在化したインビボ取り込みおよび発現が、直接インサイトゥ投与後などの腫瘍蓄積において報告されている。

遺伝子療法に関連する発現ベクターは、その中でクローニングされてきたポリヌクレオチドを発現するのに十分な配列を含む構築物が包含されることを意図するものである。ウイルス発現ベクターにおいて、構築物は、構築物のパッケージングをサポートするのに十分なウイルス配列を含んでいる。ポリヌクレオチドがTS10Q23.3遺伝子をコードするならば、発現は対応するタンパク質を産生するであろう。ポリヌクレオチドがアンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイムをコードするならば、発現はアンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイムを産生するであろう。したがって、この状況において、発現は、タンパク質産物が合成されることを要求しない。発現ベクターにクローニングされたポリヌクレオチドに加えて、ベクターは、真核細胞において機能するプロモーターも含んでいる。クローニングされたポリヌクレオチド配列はプロモーターのコントロール下にある。適当な真核細胞プロモーターには前述したものが含まれる。発現ベクターは、選択可能なマーカーおよび本明細書に記載されたその他の配列といったような配列も含んでいる。

【0147】

B. 免疫療法

免疫療法は、一般的に、免疫エフェクタ細胞と癌細胞を標的とし破壊する分子の使用によるものである。免疫エフェクタは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカーに対し特異的な抗体であり得る。抗体は単独で、治療のエフェクタとして働くかまたは他の細胞を編成して細胞殺傷を実際に引き起こすことができる。抗体は薬物または毒物（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）と共役し、単に標的剤として働くこともある。あるいは、エフェクタは腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を運ぶリンパ球であることもある。様々なエフェクタ細胞には細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。

本発明によれば、(i)細胞の表面上で発現しないようであり、そして(ii)TS10q23.3の不在でなく存在が正常な状態と関係するといわれるならば、免疫エフェクタの標的としてTS10q23.3が働き得ることはないようである。しかし、TS10q23.3の特定の突然変異体は、抗体、抗体コンジュゲートまたは免疫エフェクタ細胞のいずれかを使用する免疫療法によって標的となり得ることは可能である。

より可能性の高いシナリオは、免疫療法が組合せ療法の一部として、TS10q23.3を標的とする遺伝子治療とともに使用できるということである。組合せ療法のための一般的な方法は、以下に記載する。一般に、腫瘍細胞は、標的化しやすい、即ち他の大部分の細胞には存在しないマーカーを有しているはずである。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのうちのいずれかが本発明に関する標的化に適当であり得る。一般的な腫瘍マーカーには、胎児性癌抗原、前立腺特異的抗原、尿の腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲンレセプター、ラミニンレセプター、erbBおよびp155が含まれる。

【0148】

免疫複合体：本発明はさらに、突然変異TS10Q23.3などの癌マーカーに結合する抗体が細胞毒性剤に結合されるイムノトキシンを提供する。イムノトキシンテクノロジーは、かなり進歩した技術であり、当業者には公知である。イムノトキシンは、抗体成分がもう1つの作用剤、特に細胞を殺したり、細胞の成長または分裂を抑制する能力をもつ、細胞毒性剤またはその他の抗細胞剤に連結される作用剤である。

本明細書で用いる語句"毒性"および"毒性部分"とは、殺傷または抑制特性を有する、細胞毒性剤またはその他の抗細胞剤を意味する。したがって、毒素は、抗体と複合体を形成し、活性体として細胞にデリバリーされ、そこで非常に有害な影響を及ぼす薬学的作用剤である。

イムノトキシンの製造は、一般に当業者に公知である(米国特許4340535などを参照せよ；本発明の参考文献である)。IgGに基くイムノトキシンは代表的に、よりすぐれた結合能力を呈し、そのFab'フラグメントに基くイムノトキシンよりも血液中のクリアランスが遅いが、Fab'フラグメントに基くイムノトキシンは、一般に、IgGに基くイムノトキシンと比べて、よりすぐれた組織貫通能力を呈することも公知である。

抗細胞剤としてはたとえば、化学療法剤、放射性同位体ならびに細胞毒素が挙げられる。化学療法剤としてはたとえば、ステロイドなどのホルモン；シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキセートまたはアミノプテリンなどの代謝拮抗物質；アントラシクリン；ミトマイシンC；ピンカルカロイド；デメコルシン；エトポシド；ミトラマイシン；またはクロラムブシルもしくはメルファランなどのアルキル化剤が挙げられる。

【0149】

好ましいイムノトキシンは、A鎖毒素、リボソーム不活性化タンパク質、サルシン、アスペルギリン、レスチリクトシン、リボヌクレアーゼ、ジフテリア毒素またはシュードモナウエクトキシンといったような植物、真菌または細菌由来の毒素である。毒素-抗体構築物はイムノトキシン業界では公知であり、抗体への結合についてもよく知られている。もちろん、種々の毒素を組み合わせてひとつの抗体分子へ結合させることもでき、それによって多様な、あるいは増強された細胞毒性を調整される。

抗体に結合する毒素のひとつのタイプはリシンであり、デグリコシル化リシンA鎖が特

10

20

30

40

50

に好ましい。本明細書で用いる語句"リシン"とは、天然源から得られるリシンおよび組換え手段によって調製されたリシンの両方を意味する。種々の'組換え体'または'遺伝子工芸された'リシン分子が、当業界で公知であり、それらすべてを本発明に用いることができる。

効力が優れていること、半減期が長いこと、および臨床グレードおよびスケールでそれを経済的に製造することが実現可能であることから、デグリコシル化リシン A 鎖 (d g A) が好ましい (インランド・ラボラトリーズ、オースチン、TX から市販されている)。30個のN末端アミノ酸がナガラゼ (シグマ) によって除去されている先端を欠いたリシン A 鎖もまた用いることができる。

【0150】

1つまたはそれ以上の毒素部分を抗体に結合またはカップリングすることは、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合および複合体形成などの種々のメカニズムによって達成される。好ましい結合方法は、化学的架橋体、天然ペプチドまたはジスルフィド結合の使用といったような共有結合である。

共有結合は、存在する側鎖の直接縮合または外因的架橋分子の組み込みによって達成される。タンパク質分子を他のタンパク質、ペプチドまたはアミン感応基にカップリングする際に、多くの二価または多価作用剤が有用である。カップリング剤の例としては、カルボジイミド、ジソシアネート、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が挙げられる。このリストは当業界で公知の多様なカップリング剤の包括であることを意図するものではなく、むしろ、使用しうる、より通例的なカップリング剤の例示にすぎない。

このましい具体例においては、最初に抗体を誘導体化し、次いでその誘導産物に毒素成分を結合させる。本明細書で用いる語句"誘導体化"とは、適当な架橋剤で抗体物質を化学的に修飾することを記載するために用いる。このような方法で用いる架橋剤の例としては、ジスルフィド結合を含むリンカー S P D P (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) および S M P T (4 - スクシンイミジル - オキシカルボニル - (2 - ピリジルジチオ) トルエン) が挙げられる。

【0151】

イムノトキシンがいったん標的細胞に入ると、抗体部分から毒素部分が解放されることが可能でなければならない臨床的に有効なイムノトキシンを現実化するには、生物学的に解放しうる結合が特に重要である。システインなどのアミノ酸に含まれている、あるいはそれぞれのタンパク質構造に導入された、スルフヒドリル基の間での単純直接ジスルフィド結合形成、および入手可能または設計されたリンカー部分を用いるジスルフィド連結といったような、多くのタイプの結合構築物が知られている。

多くのタイプのジスルフィド結合含有リンカーが公知であり、それらを用いて毒素部分を抗体に効率よく複合させることができるが、インビボでの安定性が優れており、作用部位に結合する前に毒素部位が解放されることが阻止されるので、立体的に妨害されたジスルフィド結合リンカーなどが一般に好ましい。特に好ましい架橋試薬は S M P T であるが、S A T A、S P D P および 2 - イミノチオレートといったような他のリンカーも使用できる。

いったん複合させると、未複合の A 鎖または抗体などのコンタミネーションを除去するために、精製することが重要になる。毒性が増加される可能性があるため、未複合の A 鎖を除去することが重要である。さらに、複合体および未複合体間での抗原に対する競合の可能性を回避するために未複合の抗体を除去することが重要である。どの状況においても、多くの精製技術が見出されており、臨床的に有用であるのに十分な純度まで複合体を精製することができる。

【0152】

一般に、最も好ましい技術は、ゲル濾過またはゲル透過段階におけるブルー - セファロースの使用である。ブルー - セファロースは Cibacron Blue 3 G A と アガロース を含むカラム物質であり、免疫複合体の精製に有用であることがわかっている。ブルー - セファロ

10

20

30

40

50

ースの使用によって、イオン交換とA鎖の結合の特性が組み合わせられ、未複合結合物から複合結合物が良好に分離される。ブルー-セファロースは、複合体調製物から遊離(未複合)抗体を排除する。遊離(未複合)毒素(dgAなど)を排除するために、常套のゲル濾過操作または高性能液体クロマトグラフィーのいずれかを用いる分子排除クロマトグラフィー段階を行う。

【0153】

十分に精製された複合体を調製した後、通常、該複合体を非経口投与しうる医薬組成物に配合することが望まれる。これは、適当な医薬組成物を含む媒体を最終精製段階で使用することにより行われる。このような配合物は代表的に医薬緩衝剤、賦形剤、安定化剤などを含む。医薬的に許容しうる組成物は、滅菌されており、非免疫原性であり、非発熱原性であるものである。その詳細な調製方法は当業界で公知であり、本明細書にも記載されている。内毒素コンタミネーションは、できるかぎりの安全レベル、たとえば0.5 ng/mgタンパク質以下にすべきである。

本発明の適当な医薬組成物は、一般に、滅菌水溶液などの許容しうる希釈剤または賦形剤と混合した所望の複合体を約10~約100 mg/ml含み、複合体の最終濃度が約0.25~約2.5 mg/mlにする。

上述したように、本発明の抗体は、1つまたはそれ以上の抗腫瘍剤、サイトカイン、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ホルモン、核酸などの化学療法剤と結合することができ、したがって、該抗体複合体を用いてTS10Q23.3発現癌細胞を標的化することができる。抗体未複合作用剤と比べた場合、抗体-複合作用剤の利点は、抗体によってもたらされた選択性が追加されることである。

抗体を複合させるのに利用し得る、種々の化学療法剤および薬理学的作用剤の分析においては、効率よく抗体と複合体を形成し、薬理学的に機能することがあらかじめ明らかにされているものであることを特に考慮したい。これまでに使用されている抗新生物剤の例としては、ドクソルピシン、ダウノマイシン、メトトレキセート、ビンブラスチンが挙げられる。さらに、ネオカルジノスタチン、マクロマイシン、トレニモンおよび-アマンチンなどの他の作用剤の追加についてもこれまでに述べられている。本明細書に記載されている適当な作用剤のリストはもちろん、組織への特異的デリバリーのための抗体に医薬的作用剤を結合するための技術が十分に確立されていることにおける例示にすぎない。

したがって、一般に、抗体のアミノ酸または炭化水素基に結合または架橋するのに利用しうる、第1または第2アミン基、ヒドラジドまたはヒドラジン基、カルボキシルアルコール、ホスフェートまたはアルキル化基を含む薬理学的作用剤と抗体を複合させることが可能であると考えられている。タンパク質構造の場合、イムノトキシンに関して上述したように、このことは、架橋剤という手段によって最も容易に達成される。結合は、薬物と抗体の間の酸適応性アシルヒドラゾンまたはシス-アコニチル架橋という手段によっても、薬物の-カルボキシル基と抗体のアミノ酸の間のL-Leu-L-AlaL-Leu-L-Alaといったようなペプチドスペーサーを用いることによっても達成することができる。

【0154】

C. タンパク質治療

別の治療方法は、TS10q23.3ポリペプチド、活性フラグメント、合成ペプチド、その模擬体または他のアナログの患者への供給である。タンパク質は、組換え発現法によって製造できるか、または十分に小さければ、自動化されたペプチドシンセサイザーによって製造することができる。製剤は、投与形態と目的に基づいて選択でき、リポソーム製剤および典型的な医薬調製物が含まれるが、これらに限られない。

D. 免疫療法、典型的な化学療法または放射線治療との組合せ治療

DNA傷害剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床的腫瘍学における主要な問題を示している。現在の癌研究の目標の1つは、化学療法および放射線療法の効力を改善する方法を見つけることである。1つの方法は、このような典型的な治療法を遺伝子治療と結びつけることによるものである。例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HS-tk)遺伝子は

10

20

30

40

50

、レトロウイルスベクター系により脳腫瘍に送達したとき、抗ウイルス剤ガンシクロビルに対する感受性をうまく誘導する (Culver, 1992)。本発明の状況では、TS10q23.3置換療法が化学療法または放射線療法による介入と組み合わせて同様に使用し得ることが企図される。上記のように、TS10q23.3と免疫療法とを結びつけることが効果的であるとわかるであろう。

細胞を殺傷、細胞増殖を阻害、転移を阻害、血管形成を阻害またはそうでなければ腫瘍細胞の悪性の表現型を逆転または減少させるために、本発明の方法と組成物を使用して、一般に「標的」をTS10q23.3発現構築物および少なくとも1つの他の試薬と接触させることができる。これらの組成物は、細胞の殺傷または細胞増殖の阻害に対し有効な合計した量で提供される。この過程は、発現構築物と試薬または因子とを同時に細胞に接触させることを含むことができる。これは、細胞を両方の試薬を含む1つの組成物または薬理的製剤と接触させるか、または細胞を、1つの組成物が発現構築物を含みもう一方の組成物が試薬を含んでいる、2つの別個な組成物または製剤と同時に接触させることによって達成することができる。

【0155】

別法として、遺伝子治療の処置は、数分間～数週間の期間において、他の試薬による処理の前または後に行うことができる。他の試薬および発現構築物が別々に細胞に適用される態様では、一般に、有意な期間が各送達の期間の間で終わらず、試薬と発現構築物が、都合よく複合的効果を細胞に及ぼすことが、依然としてできるようにする。そのような場合においては、細胞を両種とそれぞれ他の12～24時間以内に、より好ましくはそれぞれ他の約6～12時間以内に接触させ得ることが企図され、遅延時間はわずかに約12時間が最も好ましい。しかし、いくつかの場合において、処置のための期間を有意に延長することが望ましいかも知れないが、その場合それぞれの投与の間に数日(2、3、4、5、6または7)～数週間(1、2、3、4、5、6、7または8)が経過する。

TS10q23.3または他の試薬の1を越える投与が望ましいであろうということも考えられる。以下に例示するような様々な組合せを用いることができる。TS10q23.3は「A」、他の試薬は「B」とする。

- A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
- A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
- A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

他の組合せが企図される。再び、細胞殺傷を達成するために、両方の試薬を細胞を殺傷するに有効な合計した量で細胞に送達する。

組合せ治療において使用するに適切な試薬または因子は、細胞に適用したときにDNA傷害を誘導するいずれかの化合物または処置方法である。そのような試薬および因子には、放射線照射、およびDNA傷害を誘導する波動、例えば、線照射、X線、UV照射、マイクロ波、放射電子などが含まれる。「化学療法剤」としても記載されている様々な化合物は機能してDNA傷害を誘導し、そのすべては、本明細書に開示した組合せ処置方法において使用することを意図する。使用することが意図される化学療法用試薬には、例えば、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル(5FU)、エトポシド(VP-16)、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマシシンC、シスプラチン(CDDP)および過酸化水素も含まれる。本発明はまた、照射ベースか実際の化合物であるかに関わらず、1またはそれ以上のDNA傷害剤の組合せの使用も含む。例えばX線とシスプラチンの使用またはシスプラチンとエトポシドの使用など。ある特定の態様において、TS10q23.3発現構築物と組み合わせたシスプラチンの使用は、この化合物として特に好ましい。

【0156】

本発明に従う癌の処置では、腫瘍細胞を発現構築物に添加した試薬と接触させることができる。これは、局所化した腫瘍部位にX線、UV光、線またはマイクロ波などの放射線を照射することによって達成することができる。あるいは、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル、エトポシド、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシ

10

20

30

40

50

ンCまたはより好ましくはシスプラチン等の化合物を含む医薬組成物を患者に治療上有効量で投与することによって腫瘍細胞を試薬と接触させることができる。上記のようにTS10q23.3発現構築物と組み合わせることにより、試薬を調製して組合せ治療組成物またはキットとして使用することができる。

核酸、具体的にはDNAを直接架橋する試薬は、TS10q23.3との共同性の、抗腫瘍性の組合せへと導くDNA傷害を促進すると考えられる。シスプラチンなどの試薬および他のDNAアルキル化剤が用いられ得る。シスプラチンは、癌を処置するために広く使用されており、臨床的適用に使用される有効用量は、全3コースについて3週間ごとに5日間20mg/m²である。シスプラチンは、口からは吸収されないので、静脈、皮下、腫瘍内または腹腔内注射により送達しなければならない。

DNAに傷害を与える試薬には、DNA複製、有糸分裂、および染色体分離を妨害する化合物も含まれる。そのような化学療法用化合物には、ドキソルビシンとしても知られるアドリマイシン、エトポシド、ペラパミル、ポドフィロトキシンなどが含まれる。腫瘍の処置のために臨床的環境において広く使用されるように、これらの化合物を、アドリマイシンについて、21日の間隔を以て25~75mg/m²の範囲でボラス注射により静脈内投与し、エトポシドについて35~50mg/m²で静脈投与または静脈投与量の2倍を経口で投与する。

【0157】

核酸前駆体およびサブユニットの合成および忠実度を崩壊する試薬もまた、DNA傷害をもたらす。それ自体で、数多くの核酸前駆体が開発されている。特に有用なのは、詳細に渡る試験を受けた、容易に入手し得る試薬である。そのようなものとして、5-フルオロウラシル(5-FU)等の試薬は腫瘍組織によって優先的に使用され、このことが、この試薬を腫瘍細胞の標的化にとって有用なものにしている。かなり毒性であるが5-FUは、局所を含む、広範囲の担体中で適用可能であり、3~15mg/kg/日の範囲の用量での静脈投与が一般的に使用される。

DNA傷害を引き起こし、広範囲に使用されている他の因子には、線、X線として一般に知られているもの、および/または腫瘍細胞への放射性同位元素の望ましい送達が含まれる。DNA傷害因子の他の形態には、マイクロ波およびUV照射なども企図される。これら因子のすべては、DNA前駆体、DNAの複製および修復、および染色体の構築と維持において、広範囲のDNA傷害を引き起こすようである。X線の用量範囲は、一定期間(3~4週間)の場合は1日50~200レントゲン、一回の用量は2000~6000レントゲンである。放射性同位体の用量範囲は非常に広く、その同位体の半減期、放射する放射線の強度およびタイプ、および腫瘍細胞による取りこみに依存する。

当業者は、"Remington's Pharmaceutical Science" 15版、33章、特に624~652頁によって教示される。処置する患者の状態に応じて、用量をいくらか変えることが必要であろう。投与の責任者が、少なくとも、個々の患者にとって適当な用量を決定する。更に、ヒトの投与については、調製物を、FDA Office of Biologics スタンドガードが要求する無菌状態、発熱原性、一般的安全性および純度の標準に適合させる。

発明者らは、10q23関連の癌患者へのTS10q23.3発現構築物の正所性投与は、臨床性の疾患を阻止する治療上効果的な遺伝子の送達のための非常に効率的な方法であろう。同様に、化学療法または放射線療法は患者の身体の特定の冒された領域を目的とし得る。あるいは、発現構築物および/または試薬の全身的送達は、ある種の状況、例えば広範囲の転移が起こっている場合に適当であり得る。

TS10q23.3を標的とする治療を化学療法および放射線療法と組み合わせることに加えて、他の遺伝子治療との組合せが有利であろうということも企図される。例えば、TS10q23.3およびp53またはp16突然変異体を同時に標的化することは、改善された抗癌処置をもたらし得る。他のいずれかの腫瘍関連遺伝子は、考えられるところでは、このようにして標的化することができる。例えば、p21、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、BCRA2、p16、FHIT、WT-1、MEN-1、MEN-I、BRCA1、VHL、FCC、MCC、ras、myc、neu、raf、erb、src、fms、jun、

10

20

30

40

50

trk、rei、gsp、hst、bclおよびabl。

T S 1 0 q 2 3 . 3 の処置において、前述の治療のいずれかがそれ自身有用であるとわかるかもしれないということも指摘される。これに関して、化学療法および非T S 1 0 q 2 3 . 3 遺伝子治療の組合せを参照することは、これらの方法が別々に用いられ得るということも企図すると理解するべきである。

【 0 1 5 8 】

E . 患者への投与のための製剤および経路

臨床的な適用を意図する場合、医薬組成物 - 発現ベクター、ウイルスストック、タンパク質、抗体および薬物 - を意図する適用に適切な形態に調製する必要があるであろう。一般に、このことは発熱原ならびにヒトまたは動物に有害となり得る他の不純物を本質的に含まない組成物の調製を必要とするであろう。

適当な塩および緩衝剤を用いてベクターを安定に送達し、標的細胞に取りこませることが一般に望ましいであろう。緩衝剤は、組換え細胞を患者に導入する場合にも用いられ得る。本発明の水溶性組成物は、薬学的に許容し得る担体または水性媒体に溶解または分散させた、細胞に対する有効量のベクターを含んでいる。そのような組成物を接種物ともいう。「薬学的または薬理的に許容し得る」なる語は、動物またはヒトに投与した場合に、有害な、アレルギー性の、または他の不適当な反応を生じない分子および組成物を意味する。本明細書に使用される「薬学的に許容し得る担体」には、いずれかのおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸着遅延剤などが含まれる。そのような媒体および試薬の薬学的に活性な物質に対する使用は、当技術分野においてよく知られている。いずれかの慣用の媒体または試薬が本発明のベクターまたは細胞と相容れない場合を除けば、治療用組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分も組成物に入れることができる。

本発明の活性な組成物には、典型的な医薬調製物が含まれる。本発明に従うこれら組成物の投与は、その経路を経て標的組織が利用できる限りいずれの慣用の経路によるものであろう。これには、口、鼻、口腔粘膜、直腸、膣または皮膚が含まれる。あるいは、投与は、正所性、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射によるものであってよい。そのような組成物を、前掲の薬学的に許容し得る組成物として通常は投与する。

活性な化合物は、非経口的または腹腔内投与することもできる。遊離塩基または薬理的に許容し得る塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適当に混合した水の中で調製することができる。分散液はグリセリン、ポリエチレングリコール液およびその混合物の中でおよび油中で調製することもできる。保存および使用の通常条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を阻止するための保存剤を含有している。

【 0 1 5 9 】

注射可能な使用に適切な医薬形態には、滅菌水溶液または分散液および滅菌した注射可能な溶液または分散液の即時調製のための滅菌した粉末が含まれる。いずれの場合にも、その形態は滅菌状態であり、注射器から容易に出る程度に流動性でなければならない。製造および保存の条件下で安定でなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセリン、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、適当なそれらの混合物および植物油を含んでいる溶媒または分散媒体であり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合は必要な粒径を維持することにより、および界面活性剤の使用により、適当な流動性を維持することができる。微生物の作用の阻止は、様々抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チロメサルなどにより行うことができる。多くの場合においては、等張剤、例えば当または塩化ナトリウムを含有させることが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期間の吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中で使用することにより行うことができる。

滅菌した注射可能な溶液は、活性化合物を適当な溶媒中に必要な量で、上で列挙した様

々な他の成分とともに入れた後、必要に応じ、滅菌濾過によって調製する。一般に、分散液は、様々な活性成分をベースとなる分散媒体および上記で列挙した必要な他の成分を含む滅菌ビークルに入れることによって調製する。滅菌した注射可能な溶液の調製のための滅菌した粉末の場合には、好ましい調製方法は、活性成分といずれかのさらなる所望の成分の粉末が前述のその滅菌濾過した溶液から得られる、真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0160】

本明細書に使用される、「薬学的に許容し得る担体」には、いずれかおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および試薬の使用は、当分野でよく知られている。いずれかの慣用の媒体または試薬が活性成分と相容れない場合を除いて、治療用組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分もその組成物に入れることができる。

10

経口投与に関して、本発明のポリペプチドに賦形剤を加え、非摂取性の口洗剤および歯磨き剤の形態で使用することができる。口洗剤は、必要な量で活性成分を適当な溶媒、例えばホウ酸ナトリウム溶液(Dobell's溶液)に入れて調製することができる。あるいは、活性成分をホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび炭酸水素カリウムを含む防腐性洗剤に入れることができる。活性成分を歯磨き剤(ジェル、ペースト、粉末およびスラリーを含む)に分散させることもできる。活性成分は、水、結合剤、研磨剤、香料、発泡剤、および湿潤剤を含んでいてもよいペースト状の歯磨き剤に治療上有効な量で加えることができる。

20

本発明の組成物は、中性のまたは塩の形態で製剤化することができる。薬学的に許容し得る塩には、酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基と形成した)が含まれ、それは例えば塩酸またはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成する。遊離のカルボキシル基と形成した塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化鉄などの無機の塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機の塩基から誘導することもできる。

製剤化の後、溶液を投与形態に適したやり方および治療上有効な量で投与する。製剤は、注射可能な溶液、薬物放出カプセルなどの様々な投与形態で容易に投与される。水溶液での非経口投与に関しては、例えば、溶液は、必要であれば適当に緩衝化し、希釈液を十分な生理食塩水またはグルコースでまず等張させる。これらの特定の水溶液は、特に静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適当である。これに関連して、使用することができる滅菌した水性媒体は、本明細書の開示に照らして当業者によく知られるであろう。例えば、一回の投与量を1 mLの等張NaCl溶液に溶解し、1000 mLの皮下注入液に加えるかまたは意図した輸注部位に注入することができる(例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences"15版、1035~1038および1570~1580頁参照)。処置する患者の状態によって、投与量の変更が幾分必要になるであろう。投与の責任者が、少なくとも、個々の患者にとって適当な投与量を決定する。更に、ヒトの投与については、調製物を、FDA Office of Biologics スタンダードが要求する無菌状態、発熱原性、一般的安全性および純度の標準に適合させる。

30

40

【0161】

VII. トランスジェニック動物/ノックアウト動物

本発明の1つの態様では、機能的なTS10q23.3ポリペプチドまたはその変異体をコードする機能的な移植遺伝子を含んでいるトランスジェニック動物を作製する。TS10q23.3移植遺伝子を発現するトランスジェニック動物、そのような動物に由来する組換え細胞系およびトランスジェニック胚は、TS10q23.3の機能を誘導するまたは抑制する試薬をスクリーニングおよび同定するための方法において有用であり得る。本発明のトランスジェニック動物はまた、癌などの徴候を研究するための方法として使用することもできる。

50

本発明の1つの態様では、TS10q23.3 移植遺伝子をヒト以外の宿主に導入して、ヒトまたはネズミTS10q23.3 遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作成する。トランスジェニック動物は、移植遺伝子の発現を可能にするやりかたで、移植遺伝子をゲノムへ統合させることにより作成する。トランスジェニック動物を作成するための方法は、一般的にWagner および Hoppe (参考のために本明細書の一部とする米国特許第4,873,191号)、その全内容を参考のために本明細書の一部とするBrinsterら、1985、および"Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual"第2版(その全内容を参考のために本明細書の一部とする Hogan, Beddington, Costantini および Long 編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994)に記載されている。

内因性のTS10q23.3を相位的組換えにより移植遺伝子と内因性遺伝子との間で置換することが望ましいこともあり、または内因性の遺伝子が"ロックアウト"動物の調製におけるように欠失によって除かれることもある。典型的には、ゲノム配列に連結したTS10q23.3 遺伝子を、マイクロインジェクションによって受精卵へ移す。マイクロインジェクションした受精卵を宿主となるメスに着床させ、子孫を移植遺伝子の発現についてスクリーニングする。トランスジェニック動物は、爬虫類、両生類、鳥類、哺乳類および魚類等の数多くの動物に由来する受精卵から作製することができる。特に好ましい態様では、TS10q23.3を過剰発現するまたは突然変異体のポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスを作成する。あるいは、"ロックアウト"マウスにおけるTS10q23.3の不在により、TS10q23.3タンパク質の欠損がin vivo で細胞に対して有する効果についての研究を可能にする。ロックアウトマウスはまた、TS10q23.3に関連する癌の発生に関するモデルを提供する。

ロックアウト動物の作製方法は、一般的に、Shastry (1995、1998) および Osterrieder および Wolf (1998) に記載されている。所望の時点でロックアウトされるまで遺伝子が活性である条件付きのロックアウト動物の作製方法は、一般にFeilら (1996)、Gagnetenら (1997) およびLobe および Nagy (1998) に記載されている。これらの文献は本発明の参考文献である。

上に記載したように、トランスジェニック動物およびそのような動物に由来する細胞系は、ある種の試験の実験において使用することができる。これに関して、野生型または突然変異体TS10q23.3を発現することが可能なトランスジェニック動物および細胞系を試験物質に曝露することができる。これらの試験物質を、野生型のTS10q23.3発現および/または機能を増強する、または突然変異体のTS10q23.3の発現または機能を損なわせる能力についてスクリーニングすることができる。

【実施例】

【0162】

以下の実施例を、本発明の好ましい態様を説明するために記載する。以下の実施例に記載された技術は、本発明の実施においてよく機能することが発明者によって発見された技術を意味することが当業者によって認識され、したがってその実施のための好ましい態様を構成すると解釈される。しかし、当業者は、本明細書の開示に照らして、開示される特定の態様に多くの変更を加えることができ、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、類似または同様の結果が得られるということを理解する。より具体的には、本明細書に記載の試薬を、化学的にもそして生理学的にも関連するある試薬で置き換えることができると同時に、同じかまたは同様の結果が達成されるということが明らかであろう。当業者に明らかなそのような同様の置換および変更はすべて、添付の請求の範囲によって定義された発明の精神、範囲および概念の内に存在すると考えられる。

【0163】

実施例 1

グリオーマ細胞系におけるホモ接合欠失

本発明者は、第10染色体上のゲノム物質のホモ接合欠失を同定するために、正常な細胞とともに21の一連のグリオーマ細胞系および初代培養に由来するDNAを試験した。予め関連する領域のまたはその付近のおおよその位置付けのためにマーカーを選択した(

図1)。分析した細胞は、Department of Neuro-Oncology U T M D A C C (L G 1 1、E F C - 2、P L - 1、P C - 1、J W、F G - 2、F G - 0、N G - 1、P H - 2、K E、P C - 3 および D 7 7) で作製され、商業的に入手可能であり (U 1 3 8、A 1 7 2、U 3 7 3、U 8 7、U 2 5 1、U 1 1 8 および T 9 8 G)、または協力者から得た (1 3 wk astro, D 5 4 - M G)。マーカーは、Research Genetics, Huntsville, AL または報告された配列から合成した。細胞系 E F C - 2 は、D 1 0 S 2 1 5 の周辺の4つのマーカーに関係する大きなホモ接合欠失を示した (図 2)。この欠失はまた、その領域に位置する Y A C 7 4 6 h 6 を使用する F I S H によっても観察された。他の3つの細胞系 (D - 5 4、A 1 7 2、および L G 1 1) もまた、A F M 0 8 6 でホモ接合欠失を示し、それによりその領域が推定の腫瘍抑制遺伝子を含んでいることを強く意味している (図 2)。2組のプライマー (多重の) の存在下で P C R ^{T M} 反応における欠失を行い、適当な増幅条件を確認した。すべての欠失を (少なくとも) 3回の反応によって確認した。この同じ領域は前立腺癌にも関係している (Grayら、1995)。細胞系におけるホモ接合欠失はまた、小細胞肺癌における 3 p 2 1 . 3 での腫瘍抑制遺伝子座を決定するために使用されている (Dalyら、1993 ; Kokら、1994 ; Weiら、1996)。

【 0 1 6 4 】

実施例 2

抑制されたハイブリッド細胞における 1 0 q 座の維持

発明者の第2の計画は、抑制されたハイブリッドクローンにおいて維持されるが復帰変異体クローンには存在しない、第10染色体の領域を試験することであった。この解析は、第10染色体上の2つの腫瘍抑制因子座の存在を証明し、維持された領域を解析した、本発明者の以前の研究をさらに進めたものである。10qのすべてまたは一部を維持しているハイブリッドは、軟アガロースおよびヌードマウスにおいて増殖できなかった ("完全に"抑制されたクローン)。一方、挿入された染色体10qの大部分を失ったハイブリッド細胞は、軟アガロースにおいて増殖したが、非腫瘍形成性であった ("部分的に"抑制されたクローン ; Steckら、1995 ; 図3、右側)。もとのクローン U 2 5 1 N 1 0 . 6、N 1 0 . 7 および N 1 0 . 8 は 1 0 q のフラグメントのみ維持していることが以前に示された (Pershouseら、1993 ; Steckら、1995)。情報を提供する、更なるマイクロサテライトマーカーを使用して、3つの維持された領域を3つの抑制されたクローンすべてにおいて同定した ; D 1 0 S 2 1 9 から D 1 0 S 1 1 0 までの 2 2 c M 領域、D 1 0 S 1 9 2 から D 1 0 S 1 8 7 までの 1 4 c M 領域、および D 1 0 S 1 6 9 から D 1 0 S 1 1 3 4 までの 1 8 c M 領域 (図 3)。

この制限を回避するために、ハイブリッド U 2 5 1 N 1 0 . 7 に由来するはじめに移入したネオマイシン耐性タグを付与した第10染色体を、マウス A 9 細胞への、マイクロ細胞が媒介する染色体の移入によって "レスキュー" した。これにより、すべてのヒトのマイクロサテライトマーカーによって、第10染色体の存在を知ることができる。この分析の基礎は、すべての "完全に" 抑制されたサブクローンは共通の領域を維持しており、この領域は "部分的に" 抑制されたサブクローンでは除かれているということである。第10染色体に特異的なプローブを使用する F I S H によって測定されるとおり、N 1 0 . 7 は維持された第10染色体のサイズにおいてかなりの不均一性を示したということは、さらに弾みをつけた。また、このレスキューに使用したハイブリッド細胞を、軟アガロース増殖についてはじめに分析したが、コロニーの形成がなかったことが示された。移入したヒト第10染色体を含むマウスハイブリッドは、すべて第10染色体の短腕を含んでいた。同じ領域が軟アガロースにおいて増殖した "部分的に" 抑制されたクローン (N 1 0 . 5 a - j) において維持されており (Steckら、1995)、10q腫瘍抑制遺伝子を含んでいるこの領域 (1 0 p t e r - 1 0 q 1 1) が除かれていた。10qの維持された領域の試験は、かなりの不均一性を示した (図 3)。クローンの大部分は、10q23 - 26の部分的なまたは広範な欠失のいずれかを示した。2つの領域のみが試験したすべてのサブクローンに維持された。維持されたセントロメア領域の大部分は、マーカー D 1 0 S 2 1 0 および D 1 0 S 2 1 9 を含んでいた。しかし、これらのマーカーは、もとの N 1 0 . 6 および / または N 1 0 .

10

20

30

40

50

8 クローンには存在しておらず、この領域が除かれていた(図3)。D10S215のテロメア(~4cM)以外の領域は、D4S536のセントロメアであった。マーカーAFM086およびD10S536は、試験したすべてのクローンに維持されていた(図3、囲みの領域)。これらのマーカーは、部分的に抑制されたクローンには存在していなかった(N10.5a-j)。これらの結果は、AFM086付近の共通の領域が、表現型が抑制されているすべてのハイブリッド細胞において維持されていることを証明している。この同じ領域は、いくつかのグリオーム細胞系においては欠失している。

この分析にはいくつかの制限がある。第1に、レスキューしたクローンは、生物学的活性については分析できないので、移入の間またはその後で第10染色体に起こり得るいかなる変化も測定できない。この懸念に対し部分的に取り組むために、本発明者の分析を、クローンが回収可能になればできる限りすぐに行った。さらに、染色体のこの部分の維持は *in vitro* の人工的な欠失のみを"訂正(correct)"し得る。その結果、アレル欠失試験を行ってこの領域がグリオームと関係しているかどうかについて調べた。また、別の領域が、1つのクローン(C7)以外のすべてのクローンがこの領域を維持していたD10S1158の分析によって示唆された。しかし、AFM086で維持された領域もまたホモ接合欠失を示し、これによりD10S1158と比較されるとおり、2つの別法に關係している。さらに、腫瘍抑制遺伝子領域が優先的に維持され、10qの残りが断片化されることに興味を持って注目する。

【0165】

実施例3

10qのアレル欠失分析

第10染色体に特異的なマイクロサテライトマーカーを用い、一連の53の神経膠腫試料および対応患者リンパ球からのDNAでアレル欠失分析を行った。この分析は、本発明の重要な領域もまた神経膠腫試料に關与しているか否かを決定するために行った。GBMからの試料の大部分において広範囲の欠失が觀察され、38のGBMのうち30は第10染色体のほとんどもしくは完全な欠失を示した。試料を未分化星状細胞腫から採取した場合には大部分において欠失の程度は低くなったのに対し、星状細胞腫およびほとんどの寡突起膠腫では欠失を觀察することは稀であった(図4、データは示していない)。この分析に用いたマーカーの大部分は10q23-26にマッピングされた(Gyapayら、1994)。他の分析と同様、欠失の共通の領域はほとんどのGBM試料における大きな欠失のため、納得のいくように示すことはできなかった(Fulitsら、1993; Rasheedら、1995)。

しかしながら、調べたGBM試料については、一つ(#9、図4)を除いてすべての腫瘍試料でD10S579~D10S541の領域を含む欠失が認められた。さらに一つのアミノ酸のみが本発明者らの重要な領域内に欠失を示し、星状細胞腫は示さなかった。2つの寡突起膠腫は該重要な領域内に欠失を示したが、これら両者は悪性と診断されていた。この分析は幾つかの可能性を示す。第一に、本発明者らの重要な領域に關与する欠失は、低度の腫瘍ではなくGBMにおいて主として起こる。このことは、本発明者らの重要な領域中の第10q染色体上の腫瘍抑制遺伝子の喪失がGBMへの進行に伴う遺伝子変化を表していることを示唆している。この仮説を支持するものとして、低度の腫瘍でも第10q染色体上に欠失が生じるけれども、これら試料について10q上の欠失の共通の領域は同定されなかった。この觀察が今度は、第10q腫瘍抑制遺伝子の欠失が主としてGBMと關連しており、10q上の欠失のすべてが腫瘍抑制遺伝子に影響を及ぼすわけではないという示唆を支持している。領域D10S216~D10S587は、広範な欠失を示したが、幾つかのGBMは該領域でヘテロ接合性の保持を示した(腫瘍#2、#9、#13、#26; 図4)。また、低度の腫瘍を本分析から除外すれば、本発明者らの領域はすべてのGBMで示唆される。この独立のアプローチの組み合わせは、とりわけAFM086において10q腫瘍抑制遺伝子が領域D10S215~D10S541にマッピングされることを示唆している。

【0166】

10

20

30

40

50

実施例 4

候補腫瘍抑制遺伝子領域のマッピング

本発明者らによって同定された重要な領域は、AFM086に集中し、D10S215およびD10S541によって境界とされている(図2および8)。この領域は比較的小さく、幾つかの個々のYAC(787d7; 746h8; 934d3)内に含まれている。EFC-2中期広がり(spreads)でのYAC746h8のFISH染色は、YACが部分的に観察され、両側に隣接するYACが存在することから、ホモ接合性の欠失がYAC内に含まれることを示している。該領域中のすべてのマーカーについて細菌人工染色体(BAC)またはPACを単離した(図8)。該領域のBACコンテイングは、該領域へのBACマッピングの末端配列から構築した。幾つかの顕著な特徴が認められた。まず、2つの重複するBACが同定され(46b12および2f20)、106d16のゲノムの完全さが確認された。第二に、NotI部位がBACの一方の末端に同定された。NotI部位の存在およびSacII、EagIおよびBssHIIを用いた同時制限消化は、106d16内にCpG島(island)が存在することを示唆している。

BAC106d16からのEcoRI断片を用い、以前にホモ接合性のAFM086であることが示されている神経膠腫細胞において、サザンブロットングによりホモ接合性欠失の程度を調べた(図2および5)。右側(EcoRI断片14)は、CpG島らしいものを含み、4つの細胞株のうち3つに存在する。NotI/EcoRI(#3)断片を、幾つかのBACおよび神経膠腫細胞株を含むサザンブロットにおいてプローブとして用いた(図2)。テロメア側(右側)の欠失は、EFC-2細胞を除き、46b12からのプローブを用いて検出されなかった。しかしながら、106d16によって定められる領域(~65kb)内に別のホモ接合性欠失が観察された。バンド3のホモ接合性欠失はLG11細胞およびEFC-2細胞において観察されるが、他の神経膠腫細胞または正常な対照には観察されない。106d16(バンド12)はすべての細胞において観察され(EFC-2は変化した移動バンドを示す)、ホモ接合性欠失が完全に106d16内に含まれることを示唆していた。

【0167】

実施例 5

重要な領域内で発現された遺伝子の同定

BAC106d16からのEcoRI断片を生成し、アガロースゲル電気泳動によりサイズ分離した。個々のバンドまたは同じサイズのバンドのプールをpSPL3(GIBCO,ゲイサーズバーグ、メリーランド)にライゲートした。推定エクソンを製造業者の記載に従って同定した。2つのエクソンが捕捉ベクター中に正しくスプライシングされた。これらエクソンは、バンドプール2、3、4、5およびバンド7からのものであった。捕捉したエクソンの配列を決定し、知られた捕捉ベクター配列により定めた。発現された配列タグ(dbEST)データベースのBLASTサーチを用い、5つの潜在的な発現配列タグ(EST)を同定した。2つのEST(gb/H92038、AA009519)を観察したところ、これらエクソンのいずれかまたは両者を含んでいた(一方のESTは間違った方向ではあったが)。

シーケンシングプライマーをESTから生成し、BAC46b12を鋳型として用いて推定エクソン-イントロン境界を定めるのに用いた。9つのエクソンを同定した。ESTとゲノム鋳型との配列の相違を補正した。これらエクソンはすべてBAC46b12内に含まれていた。各エクソンに隣接するイントロン配列からプライマーを生成し、各エクソンのアンプリコン単位を形成した。エクソンのうちの2つは、BAC106d16EcoRI配列からの捕捉エクソンに対応していた。この遺伝子の配列を図6に示す。予測されるアミノ酸の読み取りは、ATG開始部位、TGAおよびTAA終止コドンのインフレームでの存在、配列のどこにでも3つのすべての読み取り枠で存在する複数の終止コドン、9つのスプライシング部位、および開始部位の近傍に存在するコザック配列により定めた。この403アミノ酸配列を図7および図9に示す。予測される分子量は47,122であり、pIは5.86である。

10

20

30

40

50

タンパク質産物の可能な機能的役割は、幾つかのタンパク質モチーフへのその配列ホモロジーにより示唆される。残基 88 ~ 98 からの重要なモチーフ [IHCKAGKGRGTG] (配列番号 : 28) は、プロテインチロシンホスファターゼの保存された触媒ドメイン [(I/V)HCxAGxxR(S/T)G] (配列番号 : 29) (Denuら、1996) と正確に一致する。腫瘍抑制遺伝子のホスファターゼ機能と一致する幾つかの他のモチーフが同定された。

アンプリコン (遺伝子の種々の領域から生成される PCR^{T M} 産物) をランダムプライミング cDNA から生成した。アンプリコンの配列は DNA 配列に対応する。非重複アンプリコンを用いて種々の臓器からの正常組織のノーザンプロットをプローブした (Clontech、パロアルト、カリフォルニア ; 多組織プロット)。すべてのアンプリコンにより、ノーザンプロット上の 5.5 ~ 6 kb の主要なバンドおよび幾つかの主要でないバンドが同定された。調べたすべての組織 (心臓、脳、胎盤、肺臓、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸および末梢血リンパ球) でメッセージが発現された。

10

【0168】

実施例 6

変異分析

変異分析を最初に 2 つの範囲 (fronts) で行った。まず、ホモ接合性欠失を有することが示された神経膠腫細胞株を候補遺伝子の存在について分析した。図 8 に示すように、AFM086 の欠失を示した細胞株はすべて、候補遺伝子の複数のエクソンのホモ接合性欠失を有していた。さらに、欠失は遺伝子の中央においても生じたのでエクソン 2 とエクソン 7 との間に欠失境界 (すべての細胞株において同様の欠失) を定める。遺伝子の中央に影響を及ぼす欠失はさらに、同定された遺伝子の変異の標的遺伝子を表すことを示している。

20

配列変異の予備分析もまた一連の神経膠腫細胞株で行った。調べた神経膠腫細胞株のうち 3 つを除くすべてにおいて変異および / または欠失が観察された (表 5)。表中の塩基番号は、全配列ではなくエクソンの配列を指すものであり、すなわち U251 についてはエクソン 7 の 98 番目の塩基である。

【0169】

【表 5】

候補遺伝子において同定された変異

細胞	細胞タイプ	変異	予測される効果
1 U87	神経膠腫	スプライスジャンクション エクソンc;G+1>T	スプライシング 変異体
2 U138	神経膠腫	スプライシング部位 エクソンh;G+1>T	スプライシング 変異体
3 U251	神経膠腫	2bp 付加エクソンG;98 ins TT	
4 U373	神経膠腫	フレームシフトエクソンG	
5 EFC-2	神経膠腫	—すべてのエクソン	生成物なし
6 D54	神経膠腫	—エクソンC—I	生成物なし
7 A172	神経膠腫	—エクソンC—I	生成物なし
8 LG11	神経膠腫	—エクソンB—I	生成物なし
9 T98G	神経膠腫	ミスセンスエクソンB;T46->G	leu>arg
10 KE	神経膠腫	ミスセンスエクソンB;G28->A	gly>glu
11 F60	神経膠腫	終止変異エクソンH;C202->T	終止停止
12 D77	神経膠腫	変異なし(10q について不均質)	
13 PC-3	低度	変異なし	
14 PH-2	低度	変異なし	
15 nLnCap	前立腺	欠失エクソンA,16-17delAA; 変異B,C53->T	サイレント

10

20

30

40

また、エクソンの欠失は前立腺細胞株であるLnCapでも認められた。変異/欠失を示さなかった神経膠腫細胞は低度の腫瘍(PC-3およびPH-2)由来のものであり、第10染色体のアレル欠失は期待されず、これらの細胞について観察した。他の細胞(D77)は一次細胞培養であり、第10染色体は該遺伝子内の1bp多型からヘテロ接合性であることが示された。乳癌細胞株もまた変異を示した。この最初の分析は、10q腫瘍

50

抑制遺伝子の喪失が神経膠芽細胞腫および疾患進行の重要な分子マーカーとなるとの本発明者らの結論を支持するものである。

【0170】

実施例7

癌標本および腫瘍細胞系におけるTS10Q23.3突然変異の分析

さらに広範な実験において、本発明者らは、342個の初期腫瘍標本および種々の癌のタイプ由来のTS10Q23.3遺伝子座に明らかなLOHを呈している164個の腫瘍細胞系(TCL)におけるTS10Q23.3突然変異の発生率を報告する。TS10Q23.3遺伝子座に明らかなヘテロ接合損失(LOH)を示す75個のTCLから、本発明者らは、TS10Q23.3のコーディング部分を除去する10個のホモ接合欠失および1つのフレームシフト、1つのナンセンスおよび7つのミスセンス変異体を見出した。一方、LOHに対して予備スクリーニングされた84個の初期腫瘍から、本発明者らは、それぞれ1つのフレームシフト損傷、ナンセンス突然変異、スプライシング変異体およびミスセンス変異体のみを検出した。興味深いことには、TS10Q23.3メッセージの発現は、正常脳組織と比べて高グレードのグリア芽腫において有意に低減化されていることを示していた。

方法

LOH分析：全ゲノムDNAを凍結標本または脱パラフィン切片から精製した。全ゲノムDNAは、Easy-DNAキット(インビトロゲン、サンディエゴ、CA)を用いて癌細胞系から精製した。LOH分析は、(Tengら、1996;Steckら、1995の記載にしたがって行った。この実験で用いた多形ショートタンデムリピートマーカーは：D10S1687(ヘテロ接合度指標、HI=0.81;p-テロメアからのLdb(Collinsら、1996)照射マップ位置、RL=85Mb)、D10S579(HI=0.59;RL=86.4Mb)、D10S541(HI=0.78;RL=86.5Mb)、AFM280WE1(HI=nd;RL=87Mb)、AFMA114XB1(HI=0.70;RL=91.9Mb)およびD10S1753(HI=0.74;RL=92.48Mb)である。AFM086WE1によって定義されたTS10Q23.3は、86.5Mbである。LOHは、試験した各個体の腫瘍および正常DNAから産生されたSTRマーカーアンプリコンを定量的に比較することによって、初期腫瘍標本において大多数のケースについて評価した。TCLおよびいくつかの初期腫瘍のケースにおいて、AFMA114XB1、D10S541およびD10S1753の明らかなヘミ接合性を合わせたものに基いてLOHを評価した;与えられたこれら3つのSTRマーカーのすべてがホモ接合性である可能性は、0.017以下である。

ホモ接合欠失スクリーニング：テンプレートとして細胞系ゲノムDNAを用い、TaqPlus(ストラタジーン、ラホイア、CA)またはAmpliTaq Gold(パーキンエルマー、フォスターシティ、CA)にて入れ子PCR増幅を行った。TS10Q23.3およびMMK4+アンプリコンの産生に用いたプライマーおよび使用したPCR条件を以下に記載する。20μlの第2反応を2~3%NuSheep(FMCバイオプロダクツ)アガロースゲル上でフラクシオン化し、続いて視覚化した。

突然変異スクリーニング：本発明者らは、腫瘍標本のゲノムDNAまたはTCLにおいて入れ子PCR増幅を行い、Steckら(1997)の操作にいくつかの変更を加えて、配列変異体について得られるアンプリコンをスクリーニングした。最初に、エクソン6FB-RRプライマーペアを用いて増幅されたシングル第2アンプリコンでエクソン6をスクリーニングした。2番目に、FA-RPプライマーを用いてエクソン8の第1増幅を行ったのち、次のFB-RQおよびFC-RRプライマーを用いて2つの第2アンプリコンとしてエクソンをスクリーニングした。

【0171】

CA6.ex8.FB GTTTTCCCAGTCACGACGAGGTGACAGATTTTCTTTTTTA (SEQ ID NO:33)

CA6.ex8.RQ AGGAAACAGCTATGACCATTCGGTTGGCTTTGTCTTTA (SEQ ID NO:34)

CA6.ex8.FC GTTTTCCCAGTCACGACGCATTTGCAGTATAGAGCGT (SEQ ID NO:35)

CA6.ex8.RR AGGAAACAGCTATGACCATAGCTGTACTCCTAGAATTA (SEQ ID NO:36)

10

三番目に、イントロンにおけるモノヌクレオチドのランが乏しい色素プライマーシーケンシングを引き起こしたので、本発明者らは、それぞれ入れ子プライマー 5' - TTTT TTTT TAGGACAAAATGTTTC - 3' (配列番号: 37) および 5' - AATTTCAGACTTTTGTAAATTTGTG - 3' (配列番号: 38) を用いて、第2アンプリコンエクソン8FB-RQおよびエクソン9FB-RRについて色素ターミネーター配列データを得た。本発明者らは、スクリーニングしたすべてのサンプルにおいて、90%以上の範囲のTS10Q23.3コーディング配列を得た; すべての突然変異は新たに増幅した産物をシーケンシングすることによって確認した。

RT-PCR (登録商標) 発現: 10個の正常組織および10個のハイグレードグリア芽細胞腫標本の凍結切片からメッセンジャーRNAを単離した。凍結切片(20個それぞれ5μm)をカットし、mRNAを単離するために用いた(Micro-Fast Track; インビトロゲン、サンディエゴ、CA)調節した切片を組織学的に診査し、切片は、優勢的に正常または腫瘍細胞を含むことが明らかとなった。正常切片は、正常な過程の治療開頭術中、腫瘍がない領域から得た。Superscript II およびコーディング領域 - 28から347または345から1232に対応するTS10Q23.3を増幅するためのプライマーを用いて相補的DNAを作製した。用いたプライマーは以下のものであった。

20

M5'F: TCCTTTTTCTTCAGCCACAG (SEQ ID NO:39)

M5'R: ATTGCTGCAACATGATTGTC (SEQ ID NO:40);

M3'F: TGACAATCATGTTGCAGCA (SEQ ID NO:41);

F3'R: TTTATTTTCATGGTGTATCC (SEQ ID NO:42).

30

PCR条件は、アニーリング段階を53で行った以外はこれまでに述べたものと同様である。

【0172】

TS10Q23.3偽遺伝子の特徴づけ: Pfuポリメラーゼおよび入れ子PCR方策を用いて、ヒト胎児脳cDNAから、DNAフラグメントを増幅した。開始時のμl反応は100ngのcDNAを含んでいた。増幅の最初のラウンドで用いたプライマーペアCTTCAGCCACAGGCTCCCAAGAC (配列番号: 43) およびGGTGTTTTATCCCTCTTG (配列番号: 44) であり、この後、反応物を20倍に希釈し、CGGGATCCATGACAGCCATCATCAAAGAGATC (配列番号: 46) プライマーで再度増幅した。使用したPCR条件は、開始時の変性段階を94で5分間、次いで94で45秒、55で30秒および72で1分間を30サイクルであった。この偽遺伝子の染色体での位置を決めるために、本発明者らは、Genebridge 4パネル(ゲノムシステムズ)を用いて照射ハイブリッドマッピングを行い、次のプライマーペアは、TS10Q23.3ではなくて偽遺伝子から特定の303bp産物を生成するために設計した: ATCCTCAGTTTGTGGTCTGC (配列番号: 47) およびGAGCGTGCAGATAATGACAAA (配列番号: 48)。このSTSを用いて、本発明者らは、偽遺伝子が第9染色体上の役60cRに位置することを決定した。さらに、本

40

50

発明者らは、この偽遺伝子をもつ2つの細菌人工クローン(BAC)、145c22および188122を単離しており、そのゲノムDNA配列を確認している。TS10Q23.3コーディング配列と偽遺伝子の配列を比較すると、次の塩基相異が明らかとなった：T2G, C89T, T202C, T242C, G248A, A258G, G397A, A405T, G407A, T531C, T544G, C556G, A672G, C700T, A705G, C720T, C900TおよびA942G。ヒトTS10Q23.3偽遺伝子のヌクレオチド配列は配列番号：64である。

TS10Q23.3は腫瘍抑制因子遺伝子であることが明らかなので、この遺伝子における新規突然変異を同定するための本発明者らの開始時の段階は、10Q23のこの領域内のLOHについて、初期腫瘍およびTCLをプレスクリーニングすることであった。TS10Q23.3遺伝子座の近くにある第10染色体上の多形ショートタンデムリピートマーカを用い、全部で342個の初期腫瘍標本および164個のTCLをLOHについて診査した(表6)。このサンプルのパネルにおいて、本発明者らは、初期腫瘍標本におけるLOHの頻度が結腸標本での20%からグリア芽細胞腫(GBM)における75%の範囲であることを観察した。サンプルサイズが9より大きいTCLについては、LOHの発生率は、28%(結腸)から82%(GBM)と変化し、全体の頻度は~46%であった。

【0173】

【表6】

腫瘍標本および腫瘍細胞系のLOH分析

腫瘍タイプ	腫瘍標本		腫瘍細胞系	
	LOH/スクリーニング ¹	配列 ^{2,3}	LOH/スクリーニング ¹	配列 ^{2,4}
脳(グリア芽)	40/53 ⁵ (75%)	26 ⁵	9/11 ⁵ (82%)	7 ⁵
小児脳	5/7	7(2)	-	-
膀胱	-	-	3/4	2
胸	32/67 ⁵ (48%)	31 ⁵	14/22(64%)	13
盲腸	-	-	1/6	1
結腸	3/15 ⁶ (20%)	1	7/25(28%)	7
十二指腸	-	-	1/1	1
子宮内膜	6/13(46%)	0	-	-
頭部および頸部	9/14(64%)	9	-	-
腎臓	8/20 ³ (40%)	8 ³	-	-
白血病	-	-	11/23(48%)	11
肺	10/27(37%)	7	7/17(41%)	6
リンパ腫	-	-	2/3	2
メラノーマ	10/21(48%)	15	7/14(50%)	3
神経芽腫	-	-	0/3	-
卵巣腫	10/19(52%)	9	3/8	3
膵臓前立腺	7/19(37%)	0	5/12(42%)	5
網膜芽腫	10/24(42%)	8(2)	1/1 ⁷	-
肉腫	-	-	0/2	-
肉腫	4/16(25%)	6(2)	-	-
下顎腺	-	-	1/1	1
精巣	-	-	3/5	3
甲状腺	6/17(35%)	2	0/2	-
子宮	-	-	0/4	-
転移性 ⁸	6/10(60%)	8(2)	-	-
合計	166/342 ⁵ (49%)	137(8) ^{5,9}	75/164(46%)	65

1) LOHパーセントはサンプルサイズが9以上のもののみについて計算した；2) 増幅およびシーケンシングが成功したサンプル(>90%のコーディング配列がスクリーニングされた)；3) シーケンシングされたLOHなしのサンプルの数を括弧内に示す。ある初期腫瘍DNA、特に膵臓および子宮内膜のカルシノーマは、マイクロ切断パラフィン固定切片から単離されたが、テンプレートの品質が悪かったので>90%の範囲でシーケ

10

20

30

40

50

ンシングを失敗した；4)スクリーニングされたすべてのTCLが明らかなLOHを示した。TS10Q23.3のコーディング部分におけるホモ接合欠失はシーケンシングによってスクリーニングされなかった；5)これらの合計はSteckら(1997)によってすでに報告されたサンプルを含む；6)肝臓転移にはLOHは、みられなかったが、これらの結腸サンプルのうち5つは肝臓に転移していた癌からなる。；7)前立腺系、NCIH660(TCL10F4)は、Liら(1997)によって特徴付けられており、TS10Q23.3のエクソン2~9からホモ接合欠失があることがわかった；8)こららの転移腫瘍標本は、アデノカルシノーマ、肉腫、腎細胞カルシノーマおよびメラノーマ由来であった。転移性損傷は、ソケイ部へ転移したメラノーマ以外は、肺へのものであった；9)シーケンシングによって分析されたこれらの137個の標本のうち、45個が報告されており(Steckら、1997)、8個がLOHなしであり、84個がLOHを示した。

10

【0174】

初期腫瘍におけるTS10Q23.3のコーディング変異体を調査するために、本発明者らは、LOHを示した腫瘍DNAから増幅したこの遺伝子のエクソンおよびフランキングスプライスジャンクションからなるアンプリコンをシーケンシングした。このアプローチにおける警告事項は、この遺伝子の発現レベルに影響を及ぼす調節突然変異の同定に失敗することである。さらに、このスクリーニングは、ホモ接合突然変異およびヘテロ接合突然変異の発生率は低いことが予想されるけれども、これらの突然変異の発見の可能性を排除することである。前に、本発明者らは、グリア芽細胞腫、胸部および腎臓カルシノーマにおけるTS10Q23.3コーディング変異体の発生率がそれぞれ、6/26(23%)、2/14(14%)および1/4であることを報告した(Steckら、1997)。この実験において、TS10Q23.3遺伝子座の周囲にLOHを示す84個の初期腫瘍から、本発明者らは、フレームシフト突然変異(胸部カルシノーマ)、ナンセンス突然変異(小児GBM)、スプライシング変異体(小児GBM)およびミスセンス変異体(メラノーマ；表7)を検出した。

20

【表 7】

初期腫瘍および腫瘍細胞系から同定されたTS10Q23.3変異体

サンプル	タイプ	突然変異	エクソン/イントロン	コドン	予想された効果
PGT-2	小児骨肉腫 ¹	G>Tat-1	イントロン2	-	スプライシング変異体
MT-1	メラノーマ	CC112-113TT	エクソン2	38	Pro>Phe
TCL10B1	胸	T323g	エクソン5	108	Leu>Arg
TCL10H2	白血病	T331C	エクソン5	111	Trp>Arg
TCL11E12	グリア芽細胞腫	T335G	エクソン5	112	Leu>Arg
PGT-5	小児骨肉腫 ¹	C388T	エクソン5	130	Arg>Stop
TCL10A7	胸	G407A	エクソン5	136	Cys>Tyr
TCL10F5	下顎腺	T455C	エクソン5	152	Leu>Pro
TCL10H8	白血病	C517T	エクソン6	173	Arg>Cys
TCL10F7	睾丸	G518C	エクソン6	173	Arg>Pro
TCL11F5	グリア芽細胞腫	C697T	エクソン7	233	Arg>Stop
BT-88	胸 ^{1, 2}	705delA	エクソン7	235	タンパク質 先欠け
TCL10A3	胸	823DdelG	エクソン7	275	タンパク質 先欠け

10

20

30

1) 初期腫瘍標本; 2) 対応正常DNAの分析により、この初期胸部腫瘍サンプルのTS10Q23.3の突然変異が体細胞性であることを明らかにされている。対応する正常DNAが入手できなかったため、他の3つの初期腫瘍標本におけるTS10Q23.3の変質についての同様の分析は不可能であった。しかし、本発明者らは、すでにSteckら(1997)によって観察された初期腫瘍突然変異の9つすべてが、体細胞的に発生することを決定している。

【0175】

初期腫瘍に加えて、本発明者らは、TS10Q23.3遺伝子における変質について一連の腫瘍細胞系を診査した。これらのTCLによって、本発明者らは、白血病、リンパ腫、神経芽腫、腎芽腫ならびに膀胱、睾丸および子宮癌などスクリーニングされた初期腫瘍のパネルに存在しなかった癌のタイプを研究する機会を与えられた。LOHを示している75個のTCLから、本発明者らは、TS10Q23.3のコーディング領域に影響を及ぼす10個のホモ接合欠失を同定した(図13Aおよび図13B)。ホモ接合欠失はTCLにおいて、星状細胞腫(1/1)、膀胱カルシノーマ(1/3)、胸部カルシノーマ(1/14)グリア芽細胞腫(2/8)、肺カルシノーマ(1/7)、メラノーマ(4/7)および前立腺カルシノーマ(1/2)に存在した。細胞系のうち二つは、すべての9つのTS10Q23.3エクソンを喪失していたが、他の八つのTCLは該遺伝子の異なるコーディング部分がホモ接合欠失していた。残りの65個のTCLの分析において、1つのフレームシフト、1つのナンセンスおよび7つの非保存性ミスセンス変異体が明らかになった(表7)。

40

50

TCLにみられた突然変異と比べて、初期腫瘍におけるTS10Q23.3にみられた突然変異の頻度が相対的に低いゆえに、本発明者らは、一連の10個のGBMおよび10個の正常標本においてTS10Q23.3の発現を診査した。すべての正常サンプルはTS10Q23.3の発現を示したが、GBMではコノメッセージの有意な発現はみられなかった(図13Cおよび図13D)。曝露を長くすると弱いシグナルが観測されるサンプルもあったが、切片における正常細胞のコンタミネーションあるいは腫瘍細胞内のTS10Q23.3発現の低さゆえに、本発明者らは、これらのレベルのメッセージが検出されるかどうかを区別することができなかった。しかし、この観察結果から、TS10Q23.3の変質された発現が、これらのGBMの腫瘍原性において潜在的に役割を演じることが示唆される。TS10Q23.3発現の阻害のメカニズムおよび他のタイプの初期腫瘍におけるTS10Q23.3の発現レベルは現在研究中である。

10

【0176】

本発明者らは、LOHおよびTS10Q23.3の変質についてあらかじめスクリーニングされている初期腫瘍およびTCLの大きなパネルを研究している。このセットの84個の初期腫瘍において、本発明者らは、4つのみの潜在的に不活性化されているTS10Q23.3突然変異を検出した。本発明者らの以前の発見(Steckら、1997)を総合すれば、初期グリア芽細胞腫で8/31(26%)、初期胸ガンで3/31(10%)、初期腎臓で1/8(13%)および初期メラノーマ腫瘍で1/11(9%)がTS10Q23.3の変質を示した。興味深いことに、5つの小児GBMのうち2つが、非機能性タンパク質の発現を導くTS10Q23.3変質を示し、このことが、小児疾患におけるTS10Q23.3のかかわりをさらに分析することの正当性を裏付ける。セットの75個のTCLにおいて、本発明者らは、全部で19個の推定の不活性化されているTS10Q23.3突然変異を観察した。

20

【0177】

異なるタイプの癌におけるTS10Q23.3突然変異の実際の発生率は、おそらく初期腫瘍でみられる頻度とTCLでみられる頻度の間であると思われる。本発明者らの発見は、初期腫瘍と比べて、TCLのTS10Q23.3における突然変異の発生率は有意に高い(表6)。膀胱癌におけるp16の突然変異について、同様の知見がSpruckらによって報告されている(Spruck IIIら、1994)。この相異は、おそらく1つかまたはそれ以上の次に述べる可能性によるものと思われる。第1は、インビトロにおける培養を成功させるためには、腫瘍細胞が、インビボで獲得される、ある組み合わせの遺伝子損傷を必要とすること。第2は、TS10Q23.3における突然変異イベントが、インビトロにおいて成長に有利に作用するかまたはTCLの培養中にクローン選択を起こすことができること。第3は、初期GBM標本10/10においてみられるTS10Q23.3の発現の実質的低下が、ある腫瘍がこの遺伝子にコーディング突然変異を有することができず、代わりに機能性TS10Q23.3の発現レベルが低下することを示唆すること。そして第4は、正常細胞コンタミネーションおよび初期腫瘍の標本異種性が、TS10Q23.3遺伝子座において有意な数のTCLに見られる突然変異的メカニズムであるホモ接合欠失を阻止しうることである。コントロール発現においては、腫瘍サンプル内で5%の正常組織DNAのコンタミネーションが存在してさえ、これらの操作を用いるホモ接合欠失の同定が阻止される。したがって、初期腫瘍においてTS10Q23.3に影響を及ぼすホモ接合欠失の存在は、本発明者らの分析によって容易に理解されうるものであり、その発生を評価する別のアプローチを必要とするであろう。しかし、さらなる問題点は、第9q染色体に位置する明らかにスプライシングされていないTS10Qq23.3偽遺伝子の存在である; TS10Qq23.3のコーディング配列は、16/1209塩基において、この推定偽遺伝子とは異なっている(方法の項を参照)。

30

40

TS10Qq23.3の変質の問題点は、変異体のスペクトルが異なることを示している。同定された非保存性ミスセンス置換はすべて、TS10Qq23.3の推定ホスファターゼドメイン内のそのN末端部分において見出される。逆に、TS10Qq23.3の先欠けを引き起こす損傷は、遺伝子全体に分散している。もしもTS10Qq23.3の

50

先欠け体すべてが非機能性であるならば、データはTS10Qq23.3のカルボキシ末端領域が活性タンパク質の発現に必須であることを示す。このことは、潜在的リン酸化部位およびPDZモチーフがTS10Qq23.3機能にとって重要であるという理解に一致する。これとは別に、このタンパク質のC末端領域の配列は適当な折りたたみのために必要である。これまでに報告されているTS10Qq23.3における生殖細胞突然変異のみがカウデン症候群に罹患している患者において検出されていること(Liawら、1997)；特徴付けられたすべての他の初期腫瘍TS10Qq23.3変異体が体細胞に生じていることは、興味深いことである(表7)。観察されたTS10Qq23.3の変質から、この遺伝子の多くの別個の損傷が、集団で存在することが予想される。全般的に、データは、TS10Qq23.3が多くのタイプの癌の発生において重要な役割を演じる腫瘍抑制因子であることを示唆している。

10

【0178】

実施例8

乳癌の早期発症におけるTS10Qq23.3突然変異の役割：カウデン症候群に関連する誘因およびBRCA1陰性ケースにおける排除

方法

臨床材料： インフォームドコンセントの後、カウデン症候群の患者から血液サンプルを得た。ひとつのアリコートはDNA抽出に用いたが、第2のサンプルから末梢血液単核細胞を精製し、EBV形質転換リンパ芽球細胞系の生成に用いた。CSの診断は、国際カウデン協会CD診断基準を用いて行った(Nelenら、1996)。早期発症乳癌の患者について、サンプルは、年齢35歳以下(診断時の平均年齢は27.7歳)の乳癌が進行しており、CSの臨床的診断を受けたことがない、これまでにBRCA1において明らかに有害な突然変異を保持していることがわかっていない女性63名からなる(サンプルのうち5名の女性は、意義が未知のミスセンス多形を保持していた)。これらの女性は、BRCA1突然変異を保持することの危険性が高い家族から選ばれた、20箇所の共同研究所からの関連のない798個のサンプルのサブセットである。大部分の家族は、多数のケースの乳癌、若年における乳癌の診断および卵巣癌の発生率が原因で選ばれたものであり、これらの条件はこれまでにBRCA1の生殖細胞突然変異に関連することがわかっている。幾つかの家族は二親等まで拡張された。アメリカ合衆国にある協会からのすべてのサンプルは、乳癌の遺伝学に関する調査実験に参加している患者から集められた。アメリカ合衆国以外の協会からのサンプルは、該協会と等価の団体によって課された、ヒト患者にかかわる調査に関する適当なガイドラインにしたがって集められた。各家族からの1人の代表者のみをサンプルに含め、遺伝子マーカーによってBRCA1に関連することがわかっている家族は含めなかった。家族または集団実験の際に行われる、よりコントロールされたサンプリングとは対照的に、これは高い危険性の臨床状態にある患者の間の相異性を示す不均質なサンプルである。このことが、サブグループのサンプル頻度が一般的集団の頻度を反映することを必要としない方法を求める本発明者らの分析を方向付けてるものとなっている。したがって、本発明者らは、たとえば、30歳で乳癌を診断された女性が有害なBRCA1またはTS10Qq23.3(MMCA1ともいう)の突然変異を保持する蓋然性を評価することができるが、本発明者らは、一般的集団におけるこのような女性の頻度を評価することはできない。TS10Qq23.3実験に用いたすべてのサンプルは無作為に使用した。

20

30

40

【0179】

DNA抽出： インフォームドコンセントが得られた後、Q1Aamp blood Maxiキットを用いて全血またはリンパ芽細胞系から患者のゲノムDNAを抽出した。OD₂₅₀で濃度を測定し、OD₂₆₀/OD₂₈₀の比率によって純度をチェックした。

遺伝子型決定： リサーチジェネティクスから第10染色体遺伝子座のためのプライマーペアを得た。³³P-ATPおよびポリヌクレオチドキナーゼの存在下で前進鎖プライマーをエンド標識した。全反応体積30μLにてPCR反応を行った。反応は、各プライマー10mM、デオキシヌクレオチド200mM, TaqDNAポリメラーゼ1.5ユ

50

ニットおよびゲノムDNA 50 ngで構成されたものであった。PCRは、94 変性45秒、55 アニリング45秒および72 伸張1分を35サイクル行った。最後に10分間の伸張を行った。20 μLの停止溶液(95%ホルムアミド、1 mMのEDTA、0.25%のプロモフェノールブルー0.25%のキシレンシアノール)を加えてPCR反応をとめた。次いで、反応物を94 で5分間変性し、8%変性ポリアクリルアミドゲル上で生成物を分離した。ゲル上にサイズ標準を含むSequaMark(リサーチジェネティクス)によって対立遺伝子のサイズを決定した。

結合分析: MLINKを用いて2点結合分析を行った。20歳以下の個体は未知とみなした。疾患遺伝子頻度は0.000001と等しくせつとし、マーカー対立遺伝子頻度をILINKを用いて評価した。MLINKおよびILINKの両方をLINKAGEパッケージ・ヴァージョン5.2(Lathropら、1984)から得た。家族Dにおける最も起こりそうなハプロタイプの再構築は、GENEHUNTER(Kruglyakら、1996)を用いて行った。家系図は、Cyrillic・ヴァージョン2.02を用いて作図した。

【0180】

結果

カウデン症候群(CS)(LloydおよびDermis、1963)または多重過誤腫症候群(Wearyら、1972)は、皮膚、胸腺、胸、結腸および脳といったような種々の組織における過誤腫および良性腫瘍の発生に関連する常染色体支配性疾患である。CSの患者は乳癌の危険性が高くなっていることが示唆されており(Brownsteinら、1978)、他の感受性症候群にみられるように、該患者らは、若年において乳癌を発生させるようである。CSは、特定の皮膚損傷、毛根鞘腫(小胞漏斗の腫瘍)にも関連しており、したがって、この乳癌感受性症候群は、皮下バイオマーカーの存在によって認識されうる(Brownsteinら、1977; 1978)。本発明者らは、この症候群の臨床的および病理学的結果について詳細に研究しており、CSにおける悪性胸部疾患を発症する平均年齢が46歳であること、乳癌に冒された女性の年齢範囲が33歳から74歳であることを実証している。さらに、本発明者らが研究したCSの女性のうち非常にわずかしか乳癌の家族歴をもたなかった。興味深いことには、CSの男性は乳癌の発生の危険性が増加しないようであった(Brownsteinら、1978)。本発明者らは、CSの女性が過増殖の良性胸部疾患を発生させ、乳癌の発生前に多重胸部生検の履歴を頻繁に報告していることも明らかにしている。したがって、皮膚疾患および良性胸部疾患の履歴によって、危険性の高い集団において、乳癌の発生前に、冒された個体の同定することができるようになる。

CSの遺伝子座が第10染色体に存在することがすでに実証されている(Nelenら、1996)。その研究では、全部で12の家族が診査され、マーカーD10S215とD10S564の間のカウデン決定インターバルが同定された。これらの家族の中で冒された個体は、CSおよびレールミット-デュークロー病(LDD)(Nelenら、1996; Liawら、1997);小脳の形成異常の神経節細胞腫を特徴とする稀な脳疾患(Albrechtら、1992)であった。このエリアの精密なマッピングによって、この初期の結果が洗練され(Liawら、1997)、マーカーD10S215とD10S564の間のCS遺伝子の位置決定がサポートされる。さらに最近では、CSをもつ4つの家族において、冒された個体が、第10染色体上のカウデン決定インターバルに位置するPTEN(Liら、1997)、TS10Qq23.3(Steckら、1997)またはTEP1(Liら、1997)として知られる遺伝子において生殖細胞突然変異をもつことが明らかにされている(Liawら、1997)。興味深いことには、予測されたTS10Qq23.3タンパク質は、タンパク質フォスファターゼの触媒ドメインならびに細胞骨格タンパク質、テンシンおよびオーキシリンに対して有意な相同性をもつ配列モチーフを含んでいる(Liら、1997; Steckら、1997)。さらに、胸部、脳、前立腺および腎臓のヒト腫瘍または腫瘍細胞系においてTS10Qq23.3におけるコーディング領域突然変異が観察される(Liら、1997; Steckら、1997)。この遺伝子の機能は未知であるが、おそらくTS10Qq23.3は細胞増殖のコントロールにおいてある役割を演じ、その機能の損失はヒト腫瘍の発生において重要であると思われる。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 1 】

C S 一族における連鎖分析および突然変異スクリーニング

第 10 染色体上の C S の遺伝子座を示している観察を拡張するために、本発明者らは、C S の臨床的証拠をもつ 4 つの家族において、カウデン決定インターバルに位置する 5 つのマーカーを用いて 2 点連鎖分析を行った (Nelen ら、1996)。すべての家族を詳細に診査し、国際カウデン協会 C D 診断基準を用い、この症候群の診断を行った (Nelen ら、1996)。2 つの小さい家族が、第 10 染色体上の 3 つの遺伝子座への結合を排除できない陽性 LOD スコアを示した (図 8 の家族 A および B を参照せよ)。上記と同一の臨床的結果をもつ 2 つの他の家族は、この領域のいくつかのマーカーに対して有意な陰性 LOD スコアを示した (図 8 の家族 C および D を参照せよ)。異質性テストも行ったが、有意な結果は得られなかった。これらの結果は、ハプロタイプの構築によって確認した (図 15)。特に、家族 C において、個体 2 は、彼女の冒された子供たちの両方に、彼女の冒されていない父から遺伝したハプロタイプをうつした。最後に、家族 D では、個体 2 および 20 が、彼らの冒された関連者のものとは異なるハプロタイプを受け継いでいた。

10

【 0 1 8 2 】

【表 8】

C A リポートマーカーをもつ C D 家族の 2 点分析

	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
FAMILY A							
D10S579	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S215	0.30	0.30	0.28	0.26	0.20	0.15	0.08
D10S541	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S1739	0.30	0.30	0.28	0.26	0.20	0.15	0.08
D10S564	0.30	0.30	0.28	0.26	0.20	0.15	0.08
FAMILY B							
D10S579	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S215	0.30	0.29	0.26	0.21	0.13	0.06	0.02
D10S541	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S1739	0.30	0.29	0.26	0.21	0.13	0.06	0.02
D10S564	0.30	0.29	0.26	0.21	0.13	0.06	0.02
FAMILY C							
D10S579	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S215	-infinity	-3.40	-2.00	-1.40	-0.80	-0.44	-0.19
D10S541	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S1739	-0.05	-0.06	-0.09	-0.13	-0.16	-0.15	-0.09
D10S564	-infinity	-3.40	-2.00	-1.40	-0.80	-0.44	-0.19
FAMILY D							
D10S579	-infinity	-1.52	-0.28	0.11	0.28	0.19	0.05
D10S215	-infinity	-1.58	-0.33	0.07	0.25	0.18	0.05
D10S541	-infinity	-1.44	-0.39	0.01	0.22	0.18	0.06
D10S1739	-2.20	-0.45	0.14	0.32	0.35	0.23	0.08
D10S564	-0.03	0.08	0.30	0.38	0.35	0.22	0.07

20

30

infinity = 無限大

40

【 0 1 8 3 】

【表 9】

突然変異	エクソン/イントロン	予想される効果
1. 79 lins A T	エクソン 7	フレームシフト
2. 915 del 13	エクソン 8	フレームシフト
3. 137 ins 3	エクソン 2	1 つのアミノ酸挿入

50

PCRおよびシーケンシングに基いたアプローチを用いて、本発明者らは、これらの4つの家族からの16人の冒された個体において、Steckら(1997)に記載されたプライマーを用いて、TS10Qq23.3のエクソン9および関連スプライスジャンクションを診査した。興味深いことには、これらの16人の個体のうち4人が40歳前の乳癌であった。本発明者らは、CSの標準的症候および徴候を示しているこれら4つの家族からのこれらの16人の個体においてコーディング配列に突然変異を検出することができなかった。

【0184】

CSの個体における突然変異分析

次いで、本発明者らは、その一族が本発明者らの連鎖実験に用いられなかった23個のCSの家族からの31名の冒された個体をスクリーニングした。31名の個体のうち、13名は5つの家族からの親類の個体であった。したがって、合計23名の親類でない発端者が選別された。独身の冒された女性(Waltonら、1986)は、コーディング配列のエクソン7においてフレームシフト突然変異を表していた(図16参照)。特に、本発明者らは、791番ヌクレオチドの後のATの挿入(791 ins AT)およびそれによってフレームシフトおよび下流未成熟終結コドンが生じることを明らかにした。興味深いことに、この女性は36歳で乳房造影陰性乳癌を発症しており、それは予防的乳房切除時に発見されたものであった(Waltonら、1986)。発端者には、冒されていない兄弟ならびに冒された娘がいた。これらの個体におけるエクソン7の直接シーケンシングから、冒された娘に同一の突然変異が存在すること(図16)および冒されていない兄弟には突然変異がないことが明らかになった。CSおよび早期発症乳癌(33歳)の2番目の個体の実験において、本発明者らは、エクソン2に三塩基挿入があり(137 ins 3)、それによって1つのアミノ酸(Asn)が挿入されることを明らかにした。最後に、左右乳癌および子宮内膜癌の女性において、本発明者らは、エクソン8の13塩基対のフレームシフト欠失を同定した(915 del 12)。これらのデータから、CSに(Liawら、1997)、特にCSおよび乳癌に(Brownsteinら、1978)に関連するTS10Qq23.3のさらに3つの突然変異対立遺伝子が明らかになった。しかし、20の家族からの27名の個体において、本発明者らは、TS10Qq23.3のコーディング配列に突然変異を検出できなかった。この集団において、これらの個体のうち7名が乳癌に冒されていたが、これらの女性のすべては40歳以降に乳がんを発症していた。これらの7名のうち1名は左右乳癌であった。したがって、全体で、家族データならびにこれらの個体データを合わせて、本発明者らは、3つのCS家族からの4名の個体にコーディング配列突然変異を検出したが、24のCS家族からの他の43名の個体にはコーディング配列変質(ミスセンスまたはサイレント変異など)を検出できなかった。

【0185】

早期発症乳癌の女性における突然変異分析

早期発症乳癌(40歳以前の乳癌の出現)における胸部腫瘍形成を調節する遺伝メカニズムの存在について強い主張がなされている(Clausら、1990)。CSは常染色体優性型式で遺伝するので、この集団における乳癌の進行を調節する遺伝メカニズムは早期発症乳癌の進行においても役割を演じることができる。本発明者らは早期発症乳癌およびCSにおいて生殖細胞系TS10Qq23.3突然変異を検出し、この遺伝子における突然変異は胸部腫瘍および胸部腫瘍細胞系で相対的に高い頻度で発生するので(Steckら、1997)、本発明者らは、生殖細胞系TS10Qq23.3突然変異の役割をさらに研究することを望んだ。生殖細胞系TS10Qq23.3突然変異に潜在的に富むサンプルセットを求めて、本発明者らは、35歳以前(診断平均年齢27.7歳)に乳癌を発症し、CSの臨床的診断がだされておらず、あらかじめBRCA1に非常に有害な突然変異を保持していないことが明らかとなっている63名の女性において該遺伝子をシーケンシングした(サンプル中の5名の女性は、有意性が未知のミスセンス多形を保持していた)。このサンプルセットにおいては9つのエクソンにコーディング配列変質は検出されなかった。逆に、非アシュケナジ乳癌患者の同様に確認されたセットにおいてまったく同じ突然変

異検出および分析判断基準を用いて、本発明者らは、BRCA1において7つの有害な突然変異および5つの有意性が未知のミスセンス多形を予想どおり検出した。さらに、TS10Qq23.3において生殖細胞系突然変異を保持している前記4名のCS患者から、本発明者らは、200以上の生殖細胞系染色体においてこの遺伝子のコーディング配列に配列多形を検出していおらず、事実、ヒトとチンパンジーの配列の間に、ただ1つの配列相異(サインレント)を見出すのみである。もし、TS10Qq23.3におけるコーディングおよびプロキシマルスプライスジャンクション配列変異体の頻度がこのサンプルを引き出した集団の5%であったならば、本発明者らは1つまたはそれ以上のこのような変異体を検出する95%のチャンスを得ていたであろう。

【0186】

検討

カウデン症候群は、独特の皮下バイオマーカーである毛根鞘腫をもっているため、乳癌を発症しやすくする常染色体優性遺伝症候群とは異なるものである(Brownsteinら、1997; 1978)。さらに、CSの女性は、乳癌の発症前に良性胸部疾患のための多様な胸部生検を受けた履歴をもつことが多い。これらの女性のほとんどが乳癌の家族歴をもっていなかった。今日までのところ、もっとも多く刊行物に記載されている臓器特異的癌感受性をともなうCS関連疾患は、女性の乳癌である(Brownsteinら、1977)。これらの個体において高い頻度で癌を明らかに発症する他の臓器系は胸腺などである。BRCA1における突然変異をともなう関連疾患(Fordら、1995)といったような他の常染色体乳癌感受性症候群とは逆に、この症候群における卵巣癌の進行は、きわめて稀である。しかし、CSには、これらの症候群および若年における乳癌の発症ならびに左右乳癌の可能性の増加が含まれる。これまでの観察から、第10染色体10Q22-23へのCSの関連性が実証された(Nelenら、1996)。さらに、PTEN(Liら、1997)、TS10Qq23.3(Steckら、1997)またはTEP1(LiおよびSun、1997)として知られる遺伝子(Liawら、1997)における突然変異がCSの個体と関連性があること(Liawら、1997)も今や明らかである。

本明細書で報告された観察において、本発明者らは、特にCSと乳癌に冒されている個体において、CSに関連するTS10Qq23.3のコーディング配列中の3つの新規な生殖細胞系突然変異を同定した。2名の親類であるCS患者において、本発明者らは、冒された母親および彼女の冒された娘において同一である、エクソン7におけるフレームシフト突然変異、およびその結果としての未成熟終結コドンについて述べた。2名の冒された個体のうちひとりが、36歳で乳癌を発症したので、このTS10Qq23.3突然変異は、早期発症乳癌に関連すると思われる。第三の冒された個体では、本発明者らは、エクソン8において13塩基対の欠失を同定した。この個体は若年にて乳癌を発症しなかったが、左右乳癌の病歴をもっていた。興味深いことに、彼女はタモキシフェンを投与されつつ子宮内膜癌も発症した。もし子宮内膜癌がCS(Starinkら、1986)およびタモキシフェンの使用(Fornanderら、1989)に関連しているならば、このひとりの女性における疾患の発症への両危険因子の寄与は、知られていないものである。しかし、これは、タモキシフェンを投与されながら子宮内膜癌をはっしょうする女性のサブ集団は、CSおよび/またはTS10Qq23.3における突然変異をもつという可能性をもたらす。最後に、本発明者らは、33歳で乳癌を発症した別の女性のエクソン2において三塩基の挿入を同定した。

【0187】

本発明者らが実験を行った一連のCS個体において、本発明者らは、3つの家族からの4名の個体において生殖細胞系TS10Qq23.3突然変異を検出したが、残りの24の親類でない家族からの43名の個体にはどのようなコーディング配列変質も認めなかった。これらのデータは、本発明者らの限りある連鎖情報にサポートを加えるものであり、すべてのCS家族が第10染色体に同定された遺伝子座に結びつくものではないということを示唆している。本発明者らが行った実験は、TS10Qq23.3の5'調節領域または3'非翻訳領域における突然変異、あるいは、CSに関連するメチル化サイレンシン

10

20

30

40

50

グなどの発現レベルを変えてしまう他のメカニズムを除外するものではないが、連鎖データとDNAシーケンシングの結果の両方が、CSが遺伝的に異種性であるという考えをサポートする。皮膚およびその他の臓器の過誤腫の形成をともなう別の常染色体優性疾患である結節硬化症は、染色体9q34 (Hainsら、1991) および染色体16p13.3 (Kandtら、1992) に位置する別の遺伝子座と遺伝子的に異種性であることが明らかにされている。本発明者らの結果は、これがCSにとっても真実であることを示している。なぜこれが初期の観察において明らかにされなかったのかははっきりとはしていないが、おそらく診査された初期の家族の民族的背景によるものと思われる (Nelenら、1996; Liawら、1997)。さらに、これらの個体のうちいくつかは、CSおよびレールミット・デュクロー病をともなっており、それは本発明者らがCS発端者またはCS家族においてこれまでに見たことがないものであった (Nelenら、1996; Liawら、1997)。

早期発症乳癌における胸部腫瘍の形成を調節する遺伝的メカニズムについての強い主張がなされている。事実、早期発症乳癌は、BRCA1 (Mikiら、1994) およびBRCA2 (Woosterら、1995) における突然変異に関連している。CSは、早期発症乳癌に関連しており、該癌は通常、管のカルシノーマである (Brownsteinら、1977; Brownsteinら、1978)。この症候群の名前の由来であるレイチェル・カウデンは、31歳で明らかに乳癌で死亡した (LloydおよびDennis、1963; Brownsteinら、1978)。本明細書に記載するように、本発明者らは、早期発症乳癌をもつ2名のCS個体および左右乳癌をもつ1名の個体においてTS10Qq23.3突然変異を同定した。しかし、発明者らが、早期発症乳癌であり、CSの徴候がなく、あらかじめ野生型配列のBRCA1をもつことがわかっている女性のサブグループについて生殖細胞系TS10Qq23.3突然変異を調査したとき、本発明者らは、どのような配列変異体も検出することができなかった。これらのデータから、TS10Qq23.3における生殖細胞系突然変異が、早期発症乳癌の少なくともこのサブ集団においては頻繁には起こらないことが示唆される。

【0188】

実施例9

アデノウイルス媒介性MMAC1/P TEN遺伝子トランスファーによるグリア芽細胞腫の腫瘍腫瘍形成性の抑制

MMCA1/P TENの腫瘍抑制因子としての機能をさらに評価するために、さらに実験を設計した。腫瘍細胞への能率的、一時的なMMACの形質導入複製欠陥アデノウイルス (MMCB) を構築した。この実験で提示されたデータは、MMAC1/P TENのインピボにおける腫瘍抑制活性をサポートし、この組換えアデノウイルスベクターによるインピボ遺伝子トランスファーが癌遺伝子療法に有用であることを示唆する。

【0189】

材料および方法

細胞系： アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) からMMAC1突然変異グリア芽細胞腫細胞系U87MGを入手した。7%CO₂を含む湿潤雰囲気下、37にて、培養培地 (DME/10%FBS/1%L-グルタミン) 中で細胞を維持した。293個の胚性腎臓細胞もATCCから入手し、10%PBSを補充したDME培養培地で成長させる。

RT-PCR分析： U87MG細胞 (Tri試薬、リサーチ・センター) から、製造者指示書にしたがって、全RNAを単離した。MuLV-RT (RNAPCRキット、パーキン-エルマー)、ランダムヘキサマーおよび他のキット試薬を用いてRNAを逆転写し、次いでMMAC1のエクソン2および5にそれぞれマッチする配列であるプライマーMAC1.6f (5'-CTG CAG AAA GAC TTG AAG GCG TA-3'、配列番号：58) およびMAC1.6r (5'-GCC CCG ATG TAA TAA AATA TGC AC-3'、配列番号：59) を用いてPCRを行った。増幅条件は、95 変性1分、次いで95 で15秒、55 で30秒のサイクルを25回、次いで

72 で5分であった。予想される正常産物のサイズは317bpであった。U87MGからの異常バンドをアガロースゲルから切り取り、精製し(UltraClean、M oバイオ・ラブズ)、次いで自動シーケンサー(A B I 3 7 3 A、パーキン-エルマー)で直接シーケンシングを行った。

【0190】

ウイルス： 野生型p53を含む組換えアデノウイルス(FTCB)を(Willsら、1994)の記載にしたがって構築した。このベクターのゲノムはE1およびE3領域ならびにIXタンパク質遺伝子に欠失をもっており、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)即時早期プロモーター/エンハンサーのコントロール下に導入遺伝子を発現する。p53を全長MMAC1をコードするcDNAで置き換える以外は、Steckら(1997)と同様の作法で、MMAC1/PTEENベクターMMCBを正確に構築した。その導入遺伝子、強化緑色蛍光タンパク質(クローンテック)以外は、MMCBにマッチするようにコントロールベクターGFCBを構築した。もう1つのマッチングコントロールベクター、ZZCBは導入遺伝子なしで構築した。CMVプロモーターによって駆動する大腸菌LacZを発現するBGCAコントロールベクターは、パッケージングサイズ制約ゆえに、E1およびE3ならびにIXタンパク質遺伝子の欠失以外に部分E4欠失をもつゲノムから構築した。すべてのウイルスを293個の細胞で成長させ、Huygheら(1997)にしたがって、DEACラムクロマトグラフィーによって精製した。ウイルス粒子濃度を、Resource Q HPLC(Shabramら、1997)によって決定し、ウイルスDNAの自動シーケンシングによって、すべての導入遺伝子の一次構造を変化させた。

MMAC1タンパク質の免疫検出： 成長培地1ミリリットル当たりのウイルス粒子数(pn/ml)を変えて24時間、GFCBまたはMMCBで単層細胞を感染させた。ウイルス含有溶液を24時間除去し、細胞は、この時点で採集するかまたは成長培地とともに冷凍して後で集めるかのいずれかにて処理した。冷リン酸緩衝食塩水(PBS)にスクラッピングすることによって細胞を集め、遠心分離し、さらに冷PBSでもう一度洗浄し、次いで、冷凍-解凍し、溶解緩衝液[MOPS 50mM、pH7.0、NaCl 150mM、1%NP-40、5%グリセロール、EDTA 0.4mMおよびDTT 1mMならびにIXコンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル(ベーリンガー・マンハイム)を補充]に再懸濁した。10000×gで15分間遠心分離して細胞溶解液を清澄化し、上清をタンパク質含量について標準化した。プレキャスト8%TRIS-グリシンゲル(ノベックス)を用いるSDS-PAGEにてサンプルを分解し、次いで、ポリ(二弗化ニリデン)膜(Immobilon-P)に移して、ウエスタンブロットティングを行った。膜を5%スキムミルクを含むTBSTでブロックし、次いで抗MMAC1ウサギポリクローナル抗体(BL74)、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ(アマーシャム)と複合させたロバ-ウサギIgGでブロットティングした。コダックXAR-5フィルムを用いる化学発光(HCLキット、ピアス)によってMMAC1を検出した。

FACS感染性アッセイ： U87MG細胞を 2×10^5 細胞/ウエルの濃度で6ウエルプレートに植え、一夜インキュベートし、次いで、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 粒子数/mlの濃度範囲で24時間GFCBに感染させた。トリプシン処理して細胞を採集し、フローサイトメトリー(ベクトン・ディッケンソンFACSscan)によって緑色蛍光をアッセイした(525nmピーク検出、FL-1フィルター)。細胞を前面および側面スキャッターから散乱させ、~99%の未感染細胞が陰性であるような蛍光強度の遮断部を確立した。次いで、感染細胞のパーセンテージの最小評価を表す、この遮断部よりも蛍光の大きいGFCB感染細胞のパーセンテージを決定した。

【0191】

³H-チミジン取り込みアッセイ： 96ウエルのマイクロタイタープレート(コスター)に 5×10^3 細胞/ウエルの濃度で細胞を植え、一夜インキュベートした。ZZCB、GFCB、FTCBおよびMMCBを $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 粒子/mlの範囲になるように培養液で希釈したものを細胞単層に三回加え、次いで24時間インキュベートした。感染後24時間の時点でウイルス含有溶液を除去し、新しい組織培養培地に取り替えて

さらに24時間置く。採集前に1ウエル当たり1 μCi の ^3H -チミジンで細胞を処理した。細胞をグラスファイバーフィルター上に集め、液体シンチレーション (Top Count、パッカード) を用いて ^3H -チミジン取り込みを測定した。緩衝液処理コントロールに対するパーセンテージとして結果をプロットした (平均 \pm SD)。

細胞計数/生存率アッセイ: U87MG細胞の垂集密的細胞単層を種々の濃度のMMCBまたはGFCBアデノウイルスで3回感染させて24時間後、上清を新鮮な組織培養培地に取り替えてさらに48時間置く。次いで、細胞をトリプシン処理により採集し、細胞計数器を用いるトリパンブルー排除法にて生存細胞を計数した。

【0192】

軟寒天コロニー形成アッセイ: 5×10^6 、 5×10^7 または 5×10^8 粒子/一盛り (fill) で24時間上記のように感染させたU87MG細胞を、0.35%寒天を含む組織培養培地に懸濁し、35mm組織培養ウエルに入れた0.7%寒天上に3回置く。7% CO_2 を含む湿潤雰囲気下、37℃にて、組織培養培地で覆った培養物、毎日該培地を取り替えながら5日間インキュベートした。感染後14日目にコロニーの成長を評価した。

腫瘍原性アッセイ: 1×10^7 細胞/T225フラスコの密度で、U87MG細胞を植えた。一夜インキュベートした後、 5×10^7 または 1×10^8 粒子/mlのアデノウイルスGFCB、FTCB、BGCAまたはMMCBで細胞単層を24時間感染させた。感染または未感染細胞をトリプシン処理によって採集し、培地で洗浄し、トリパンブルーで染色された細胞を計数し、無胸腺nu/nu雌性マウス(シモンセン・ラブス)に皮下注射した (5×10^6 生存細胞/フラスコ)。21日目と30日目にマウスの腫瘍に点数を付けた; Vernierキャリパーで三次元の腫瘍直径を測定し、それらの積として腫瘍の量を算出した。

【0193】

結果および討論

U87MGヒトグリア芽細胞腫細胞 (PontenおよびMacintyre、1968) を、その報告されたMMAC1突然変異 (Steckら、1997)、軟寒天コロニー形成能力ならびにヌードマウスにおける皮下腫瘍原性に基く実験用に選択した。エクソン2および5におけるプライマー (実施例9の方法セクション参照) を用いてU87MGのRNAから誘導された異常に小さいRT-PCR産物は、シーケンシングにより、イントロン3スプライドナー部位突然変異に一致して、エクソン3が欠けていることが発見された。エクソン3は45bp (15コドン) を含み、フレーム内読み取り産物は可能であるけれども、喪失された残基は天然のタンパク質における保存されたヘリックスをコードし、その損失は、Fumariら (1997) によって測定された成長阻害活性を除去した。

精製された組換えMMAC1含有アデノウイルス (MMCB) は、ウサギポリクローナル抗体を用いる、細胞溶解液のウエスタンブロッティングによって、U87MG細胞における導入遺伝子の発現においてその特徴が付与された (図17)。内在性MMAC1タンパク質は、未感染またはコントロールウイルス感染細胞においては検出されなかったが、MMCB感染細胞において用量依存様式で24時間の感染期間の終了まで、ならびに48時間目、72時間目および96時間目に検出された (図17)。この実験では、U87MG神経膠腫細胞における効率的な形質導入および外在性MMAC1タンパク質の正確な発現を証明し、さらにBL74を用いるウエスタンブロッティングによってその検出を実証した。

【0194】

U87MG細胞の感染能は、緑色蛍光タンパク質をコードする導入遺伝子以外はMMCBと同一の組換えアデノウイルスを用いるFACS分析によって定量的に評価した (図18)。予想されるS字形感染曲線が得られ、それから、 5×10^7 粒子/mlのウイルス投与24時間で85~90%の細胞が感染したことを見積もった。ここで用いた投与パラメーターは、プラーク形成単位またはその派生物、感染の多様性に基いたものではないことに留意すべきであり、アデノウイルス濃度および感染時間が、インビトロ形質導入の第

10

20

30

40

50

1の決定要素であることがこれまでに明らかになっている(Nyberg-Hoffman)。

ウイルス濃度の範囲における³H-チミジン取りこみによって、「MMCB」対「コントロールアデノウイルス感染U87MG細胞」のインビトロ増殖を測定した(図19A)。U87MGは、ほとんどのウイルス用量において、2つのコントロールアデノウイルス(GFCBおよびZZCB)と比べて、MMCBによって特異的に阻害された；幾つかの細胞系においてこれまでに留意されているように(Harrisら、1995)、高いアデノウイルス濃度(たとえば 1×10^9 粒子/ml)では、非特異的阻害効果が優勢であった。

感染の開始後72時間での生存細胞を計数することによる二番目のインビトロアッセイにて成長阻害が確認され(図19B)、同じ用量のGFCBと比べてMMCBはこの時点での細胞数を約50%まで減少した。この阻害は、規模において一過性プラスミド形質導入を用いて観察される阻害(Furnariら、1997)に匹敵するものであった。MMCBおよびGFCB感染培養物は72時間の時点での生存率において類似しており、細胞水泡化または核断片化といったような細胞死の形態学的証拠はMMCB処理ではみられなかった。

【0195】

「MMCB」対「GFCBまたはFTCB」による形質導入に続いての軟寒天コロニー形成によって、足場依存性成長におけるMMAC1の効果も評価した。後者は確立された腫瘍抑制因子遺伝子でアッセイを実証するために行った。 5×10^7 粒子/mlの用量で24時間後、GFCBコントロールと比べて、MMCBまたはFTCBのコロニー形成は約50%まで阻害されたが、MMCBまたはFFCBのいずれかの 5×10^8 粒子/mlの用量では、>85%の阻害(GFCBと比べて)が達成された(図20)。したがって、MMAC1の用量依存型、遺伝子特異的効果が、このインビトロアッセイにおいて明らかであった。

MMCB感染U87MG細胞 5×10^6 個/注射を、3つの異なるコントロールアデノウイルス[GFCB(E1/E3バックグラウンドマッチングの緑色蛍光タンパク質)、FTCB(E1/E3バックグラウンドマッチングのp53)、およびBGCA(E1/E3/E4バックグラウンドマッチングのLacZ)]に感染した同数の細胞/注射と比較することにより、2つの腫瘍原性アッセイを行った(表10)。実験1と2の相違点は、一方は2つの用量レベルを使用し他方は1つを使用したこと、および終了日がそれぞれ21日目と30日目であることであった。実験1の低用量レベルにおいて非常に小さい($\sim 10 \text{ mm}^3$)腫瘍が3個みられた以外は、MMCB感染U87細胞は、21日目または30日目において完全に非腫瘍原性であった。未感染またはコントロールアデノウイルス感染細胞を注射した39匹のマウスにはすべて腫瘍が形成された。リポーター遺伝子含有コントロールアデノウイルス、GFCBおよびBGCAは、緩衝液処理細胞と比べて、平均腫瘍サイズを減少する活性をいくらか有していたが、これは本発明者らによって以前に"アデノウイルス効果"として注目されたものである(Willsら、1994; Harrisら、1995)。p53含有アデノウイルスは、平均腫瘍サイズにおいて、より劇的な効果をもっていたが($\sim 68 \text{ mm}^3$)、依然として6匹のマウスすべてに腫瘍が形成された。U87MG細胞は野生型配列のp53対立遺伝子を含むけれども、これらの結果は、他者により報告された、これらの細胞へのp53アデノウイルス遺伝子トランスファーによる成長阻害効果と一致する(Gomez-Manzaniら、1996; Kockら、1996)。いずれの場合でも、これらのデータは、適度のウイルス用量におけるU87MG細胞中のMMCBの遺伝子特異的腫瘍抑制活性を示す。

【0196】

組換えアデノウイルス遺伝子トランスファーシステムを用いて、U87MG細胞におけるMMAC1/P TENのインビトロ成長阻害活性を示した。組換えアデノウイルスの使用は、MMAC1などの強力に成長阻害するタンパク質を安定に発現している腫瘍細胞の実験において従来技術では困難であったことを避けるのに役立った。MMAC1の特異的腫瘍抑制活性は、インビボアッセイにおいて最もはっきりと検出され、このことは腫瘍抑制機能を測定する腫瘍原性アッセイの重要性をサポートしている。これらのデータは、

グリア芽細胞腫瘍形成におけるMMAC1不活性化の役割をサポートし、さらにインビボにおけるMMAC1/PTEEN遺伝子トランスファーが、強力な癌治療アプローチとみなされうることを示唆している。

【0197】

本発明の組成物および方法は、好ましい具体例という表現で記載されているが、本明細書に記載された該組成物および/または方法にならびに段階または方法の段階の順序を、本発明の概念、意図および範囲を逸脱することなく、変更を加えることができるということは当業者には明らかであろう。さらに詳しくは、化学的および生理学的に関連した作用剤を本明細書で記載した作用剤と置換しても、同じまたは類似した結果が得られることも明らかであろう。当業者には明らかなこのような類似の置換および修飾のすべては、添付の請求の範囲に定義されるような本発明の意図、範囲および概念に含まれると考える。

10

【0198】

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に示したものの補足となる例示的な手順その他の詳細を提供する限りにおいて、参照のため本明細書中に引用される。

Albarosa *et al.*, *Am. J. Genet.*, 58:1260-1267, 1996.

Albrecht. *et al*, *Cancer*, 70:869-875, 1992.

Anderson WF, et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5399-5403.

Arcone *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 16(8):3195-3207, 1988.

20

Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.

Bandyopadhyay PK and Temin HM (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:749-754.

Barany and Merrifield. *The Peptides*, Gross and Meienhofer. eds., Academic Press, New York, pp. 1-284. 1979.

Bartel PL. et al. (1993). "Using the 2-hybrid system to detect protein-protein interactions." In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, Oxford University Press, pp. 153-179.

Bartlett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8852-8857, 1996.

30

Batterson and Roizman, *J. Virol.*, 46:371-377, 1983.

Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem*, A311: 1355-1376, 1994.

Benvenisty and Neshif, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986.

- Berglund P, et al. (1993). *Biotechnology* 11:916-920.
- Berkner KL, et al. (1988). *BioTechniques* 6:616-629.
- Berkner KL (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:39-66.
- Berns and Bohenzky, *Adv. Virus Res.*, 32:243-307, 1987.
- Berns and Giraud, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 218:1-23, 1996.
- Berns, *Microbiol Rev.*, 54:316-329, 1990.
- Bertran, et al., *J Virol.*, 70 (10)6759-6766, 1996.
- Bianchi et al., *Nature Genetics*, 6:185-192, 1994. 10
- Bigner et al., *Cancer Res.*, 48:405-411, 1988.
- Bishop, J.M., *Cell*, 64:2351-248, 1991.
- Boring et al., *Cancer Statistics, 1994 CA*, 43:7-26, 1994.
- Breakefield XO and Geller AI (1987). *Mol. Neurobiol.* 1:337-371.
- Brinster RL, et al. (1981). *Cell* 27:223-231.
- Brinster et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 4438-4442, 1985.
- Brownstein, et al., *JAMA*, 238:26, 1977.
- Brownstein, et al, *Cancer*, 41:2393-2398, 1978. 20
- Buchschacher GL and Panganiban AT (1992). *J. Virol.* 66:2731-2739.
- Campbell et al., *J. Mol. Biol.*, 180:1-19, 1984.
- Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977
- Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8751-8755, 1990.
- Chang et al., *Hepatology*, 14:124A, 1991.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Chevray PM and Nathans DN (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5789-5793.
- Claus, et al., *Am. J. Epidemiol.*, 131:961-972. 1990. 30
- Coffin. Retroviridae and Their Replication. In: *Virology*. Fields et al., eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.
- Cohen, P., *Bioessays*, 61-583-588, 1994.
- Collet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2021-2024, 1978.
- Compton J (1991). *Nature* 350:91-92.
- Cook et al., *Cell*, 27:487-496, 1981.
- Costantini F and Lacy E (1981). *Nature* 294:92-94.
- Cotten M. et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4033-4037. 40

- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988
- Culver *et al.*, *Science*, 256:1550-1552, 1992.
- Curiel DT, *et al.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8850-8854.
- Curiel DT, *et al.* (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:147-154.
- Daly *et al.*, *Oncogene* 8:1721-1729, 1993.
- Dani, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:10119-10125, 1989.
- Davey *et al.*, EPO No. 329 822. 10
- DeLuca *et al.*, *J. Virol.*, 56:558-570, 1985.
- Denu *et al.*, *Cell* 87:361-364, 1996.
- Dubensky *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
- El-Azouzi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7186-7190, 1989.
- Elroy-Stein *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1989.
- EP 329 822, Davey *et al.*
- Fahy E, *et al.* (1991). *PCR Methods Appl.* 1:25-33. 20
- Fanning and Anderson, *Curr Biol*, 6:11, 1385-1388, 1996.
- Fearron and Vogelstein, *Cell*, 61:759-767, 1990.
- Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Feil *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10887-10890, 1996.
- Felgner PL, *et al.* (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.
- Ferkol *et al.*, "*FASEB J.*", 7:1081-1091, 1993.
- Fields S and Song O-K (1989). *Nature* 340:245-246.
- Fink DJ, *et al.* (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:11-19. 30
- Fink DJ, *et al.* (1996). *Ann. Rev. Neurosci.* 19:265-287.
- Fodor *et al.*, *Science*. 251:767-773, 1991.
- Ford, *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 57:1457-1462, 1995.
- Fornander *et al.*, *Lancet*, 1, 8630:117-120, 1989.
- Forster and Symons. *Cell*, 49:211-220, 1987.
- Foulds, *J. Chronic Dis.*, 8:2-37, 1958.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Freese A. *et al.* (1990). *Biochem. Pharmacol.* 40:2189-2199. 40

- Freifelder, *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. Wm. Freeman and Co., New York, NY, 1982.
- Freshner, *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd ed., Oxford/New York, IRL Press, Oxford University Press, 1992.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Friedman T (1991). In Therapy for Genetic Diseases, T. Friedman, ed., Oxford University Press, pp. 105-121.
- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990. 10
- Fujimoto *et al.*, *Genomics*, 4:210-214, 1989.
- Fults and Pedone, *Genes Chromosom. Cancer* 7:173-177, 1993.
- Fults *et al.*, *Cancer Res.*, 50:5784-5789, 1990.
- Fumari *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12479-12484, 1997
- GB Application 2 202 328
- Ganeten *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25:3326-3331, 1997.
- Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3: 231-236, 1977.
- Gerlach *et al.*, *Nature London*, 328:802-805, 1987. 20
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*. Wu *et al.*, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 87-104, 1991.
- Gingeras *et al.*, PCT Application WO 88/10315,
- Glorioso *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 49:675-710, 1995.
- Goding, 1986, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fla., pp. 60-61, and 71-74, 1986.
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Gomez-Manzani *et al.*, *Cancer Res*, 6:694-699, 1996. 30
- Gopal. *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Gordon JW. *et al.* (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7380-7384.
- Gorziglia M and Kapikian AZ (1992). *J. Virol.* 66:4407-4412.
- Gossen and Bujard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551, 1992.
- Gossen *et al.*. *Science*, 268:1766-1769, 1995.
- Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, E.J. Murray, ed., Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973. 40

- Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
- Gray *et al.*, *Cancer Res.*, 55:4800-4803, 1995.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Gyapay *et al.*, *Nat. Genet.*, 7:246-339, 1994.
- Hacia *et al.*, *Nature Genetics*, 14:441-447, 1996.
- Haines *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 49:764-772, 1991.
- Hardie and Hanks. In: *The Protein Kinase Facts Book*, 1995 10
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Harlow and Lane. *Antibodies: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Harris *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 3:121-130, 1995.
- Helseth E. *et al.* (1990). *J. Virol.* 64:2416-2420.
- Henson *et al.*, *Ann. Neurol.*, 36:714-721, 1994.
- Herbst *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3111-3114, 1994.
- Hermonat and Muzycska, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990. 20
- Herz and Gerard. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
- Holland *et al.*, *Virology*, 101:10-18, 1980.
- Honess and Roizman, *J. Virol.*, 14:8-19, 1974.
- Honess and Roizman, *J. Virol.*, 16:1308-1326, 1975.
- Hoon *et al.*, *J. Urol.*, 150(6):2013-2018, 1993.
- Horwich, *et al.*, *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Hunt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3786-3790, 1986.
- Hunter. *Cell*, 64-249-270, 1991. 30
- Huyghe *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 6:1403-1416, 1995.
- Innis *et al.*, *PCR Protocols*, Academic Press, Inc., San Diego CA, 1990.
- Ittmann, *Cancer Res.*, 56:2143-2147, 1996.
- James *et al.*, *Cancer Res.*, 48:5546-5551, 1988.
- Johnson PA. *et al.* (1992). *J. Virol.* 66:2952-2965.
- Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" IN: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto *et al.*, eds., Chapman and Hall, New York, 1993.
- Joki *et al.*, *Human Gene Ther.*, 6:1507-1513, 1995.
- Jones and Shenk. *Cell*, 13:181-188, 1978. 40

- Jones, *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer*, 9:2, 119-123, 1994.
- Kageyama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262(5):2345-2351, 1987.
- Kamb *et al.*, *Science*, 264:436-440, 1984.
- Kaneda Y, *et al.* (1989). *J. Biol. Chem.* 264:12126-12129.
- Kandt *et al.*, *Nature Genet.*, 2:37-41, 1992.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karlbom *et al.*, *Hum. Genet.*, 92:169-174, 1993.
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986. 10
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kearns *et al.*, *Gene Ther.*, 3:748-755, 1996.
- Kim and Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8788-8792, 1987.
- Kimmelman *et al.*, *Genomics* 34:250-254, 1996.
- Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Kock *et al.*, *Int. J. Cancer*, 67:808-815, 1996.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976. 20
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kok *et al.*, *Cancer Res.* 54:4183-4187, 1994.
- Komiya *et al.*, *Genes Chromo. Cancer* 17:245-253, 1996.
- Korhonen, *et al.*, *Blood*, 86(5):1828-1835, 1995.
- Kotin and Berns, *Virol.*, 170:460-467, 1989.
- Kotin *et al.*, *Genomics*, 10:831-834, 1991.
- Kotin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2211-2215, 1990.
- Kruglyak, *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 58:347-363, 1996. 30
- Kwoh *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 86: 1173, 1989.
- Kyte and Doolittle. *J. Mol. Biol.*, 157, 1:105-132, 1982.
- Lathrop, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3443-3446, 1984.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Lee *et al.*, *Science*, 235:1394-1399, 1987.
- Lee JE, *et al.* (1995). *Science* 268:836-844.
- Levin *et al.*, In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 4th ed., DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1993.
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991. 40

- Li and Sun, *Cancer Res.*, 57:2124-2129, 1997.
- Li *et al.*, *Science*, 275:1943-1947, 1997.
- Liaw *et al.*, *Nature Genet.*, 16:64-67, 1997.
- Lim CS, *et al.* (1991). *Circulation* 83:2007-2011.
- Lloyd and Dennis, *Ann. Intern. Med.*, 58:136-142, 1963. ,
- Lobe and Nagy, *Bioessays*, 20:200-208, 1998.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Madzak C. *et al.* (1992). *J. Gen. Virol.* 73:1533-1536. 10
- Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2nd ed., Hogan *et al.*, eds.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- Mann R and Baltimore D (1985). *J. Virol.* 54:401-407.
- Mann *et al.*. *Cell.* 33:153-159, 1983.
- Margolskee RF (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:67-95.
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- Merrifield, *Science*, 232: 341-347, 1986.
- Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216:585-610, 1990. 20
- Miki *et al.*, *Science*, 266:66-71, 1994.
- Miller *et al.*, PCT Application WO 89/06700
- Miller AD, *et al.* (1988). *J. Virol.* 62:4337-4345.
- Miller AD (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:1-24.
- Miller AD. *et al.* (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5:431-437.
- Mizukami *et al.*, *Virology*, 217:124-130, 1996.
- Morita *et al.*, *Cancer Res.*, 51:5817-5820, 1991.
- Moss B (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:25-38. 30
- Moss B (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11341-11348.
- Mulligan. *Science*, 260:926-932, 1993.
- Murakami *et al.*, *Cancer Res.*, 56:2157-2160, 1996.
- Muzyczka N (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97-129.
- Myers. EP 0273085
- Nabel EG. *et al.* (1990). *Science* 249:1285-1288.
- Nabel (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:399-410.

- Nakamura *et al.*, In: *Handbook of Experimental Immunology* (4th Ed.), Weir, E., Herzenberg, L.A., Blackwell, C., Herzenberg, L. (eds). Vol. 1, Chapter 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
- Naldini L, et al. (1996). *Science* 272:263-267.
- Nelen *et al.*, *Nature Genet.*, 13:114-116, 1996.
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988.
- Nicolau and Sene. *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*. *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987. 10
- Nihei *et al.*. *Genes Chromosom. Cancer*, 14:112-119, 1995.
- Nishi *et al.*. *Oncogene*, 6:1555-1559, 1991.
- Nyberg-Hoffman *et al.*, *Nat. Medicine*, 7:808-811, 1997.
- Ohara *et al.*. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 5673-5677, 1989.
- Ohi S. et al. (1990). *Gene* 89:279-282.
- Olivierio *et al.*. *EMBO J.*, 6(7):1905-1912, 1987.
- Osterrieder and Wolf, *Rev. Sci. Tech.* 17:351-364, 1998. 20
- Ostrove *et al.*, *Virology*, 113:532-533, 1981.
- Page KA, et al. (1990). *J. Virol.* 64:5270-5276.
- Pape and Kim. *Mol. Cell. Biol.*, 974-982, 1989.
- Paskind *et al.*. *Virology*, 67:242-248, 1975.
- PCT/US87/00880
- PCT/US89/01025
- PCT published application WO 93/07282
- PCT Published Application WO 97/02048 30
- Pease *et al.*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5022-5026, 1994.
- Peiffer *et al.*. *Cancer Res.*, 55:1922-1926, 1995.
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*. 334:320-325, 1988.
- Pellicer A. et al. (1980). *Science* 209:1414-1422.
- Perales *et al.*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4086-4090, 1994.
- Pershouse *et al.*. *Cancer Res.* 53:5043-5050, 1993.
- Petersen *et al.*, *Brit. J. Cancer* 75:79-86, 1997.
- Petropoulos CJ. et al. (1992). *J. Virol.* 66:3391-3397. 40
- Pignon *et al.*. *Hum. Mutat.*, 3: 126-132, 1994.

- Poli and Cortese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:8202-8206, 1989.
- Ponnazhagan *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 8:275-284, 1997a.
- Ponnazhagan *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 77:1111-1122, 1996.
- Post *et al.*, *Cell*, 24:555-565, 1981.
- Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Prowse and Baumann, *Mol Cell Biol*, 8(1):42-51, 1988.
- Quantin B, *et al.* (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584.
- Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995. 10
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Ransom *et al.*, *Genes Chromosom. Cancer* 5:357-374, 1992.
- Rasheed *et al.*, *Genes Chromo. Cancer*, 5:75-82, 1992.
- Rasheed *et al.*, *Oncogene*, 11:2243-2246, 1995.
- Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*, 357:173-176, 1992.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.
- Rempel *et al.*, *Cancer Res.*, 53:2386-2392, 1993.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990. 20
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham:Butterworth, pp. 467-492. 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Ritland *et al.*, *Genes. Chromo. Cancer*, 12:277-282, 1995.
- Rosenfeld *et al.*, *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991. 30
- Rosenfeld MA. *et al.* (1992). *Cell* 68:143-155.
- Roux *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Rubio *et al.*, *Cancer Res.*, 54:45-47, 1994.
- Russell D and Hirata R (1998). *Nature Genetics* 18:323-328.
- Russell and Rubinstein, In: *Pathology of Tumors of the Nervous System*, 5th ed., Williams and Wilkins. eds., pp. 82-219, 1989.
- Sambrook *et al.*, In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Samulski *et al.*, *EMBO J.*, 10:3941-3950, 1991. 40

- Sanchez *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 2551-2556, 1996.
- Sanchez, *et al.*, *Mil Med.*, 160:8, 416-419, 1995.
- Saras and Heldin CH, *Trends Biochem Sci.* 21, 12 455-458, 1996.
- Sarver *et al.*, *Science*, 247:1222-1225, 1990.
- Scanlon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10591-10595, 1991.
- Scheck and Coons, *Cancer Res.*, 53:5605-5609, 1993.
- Schneider G, *et al.* (1998). *Nature Genetics* 18:180-183. 10
- Shabram *et al.*. " *Hum. Gene Ther.*, 8:453-465, 1997.
- Shastry, *Experientia* 51:1028-1039, 1995.
- Shastry, *Mol. Cell. Biochem.* 181:163-179, 1998.
- Shimada T, *et al.* (1991). *J. Clin. Invest.* 88:1043-1047.
- Shoemaker *et al.*. *Nature Genetics* 14:450-456, 1996.
- Smith and Moss, *Gene*, 25:21-28, 1983.
- Songyang *et al.*, *J Biol Chem.* 270(44): 26029-26032, 1995
- Sonoda *et al.*, *Cancer Res.*, 55:2166-2168, 1995. 20
- Sorge J, *et al.* (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:1730-1737.
- Spargo CA, *et al.* (1996). *Mol. Cell. Probes* 10:247-256.
- Speigelman, *et al.*. *J. Biol. Chem.*, 264(3), 1811-1815, 1989.
- Spruck, *et al.*, *Nature*,:370:6486, 183-184, see also Comment in *Nature* 1994 Jul 21, 370, 6486:180 1994
- Srivastava *et al.*, *J. ViroL.*, 45:555-564, 1983.
- Starink, *et al.*, *Clin. Genet.*, 29:222-233, 1986.
- Steck and Saya, *Curr. Opin Oncol.*, 3:3, 476-484, 1991.
- Steck *et al.*, *Genes Chromosom. Cancer* 712:255-261, 1995. 30
- Steck *et al.*. *Nature Genet.*, 15:356-362, 1997.
- Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stewart MJ, *et al.* (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:267-275.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, Gene transfer into animals: the promise of adenovirus. In: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenaer *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61. 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*. *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Tam *et al.*. *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- Tavtigian *et al.*, *Nature Genet.*, 12:333-337, 1996. 40

- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Teng *et al.*, " *Cancer Res.*, 57:5221-5225, 1997.
- Tonks and Neel, *Cell* 87:3, 365-368, see also Comment in *Cell* 1996 Nov 1, 87, 3:361-4. 1996.
- Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.
- Trybus *et al.*, *Cancer Res.* 56:2263-2267, 1996.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- U. S. Patent 4,554,101
- U. S. Patent 4,683,195 10
- U. S. Patent 4,683,202
- U. S. Patent 4,800,159
- U. S. Patent 4,873,191, Wagner and Hoppe
- U. S. Patent 4,883,750
- U. S. Patent 5,252,479
- U.S. Patent 5,270,184
- U. S. Patent 5,279,721
- U. S. Patent 5,354,855 20
- U.S. Patent 5,409,818
- U.S. Patent 5,436,146
- U.S. Patent 5,455,166
- U. S. Patent 5,672,344
- U.S. Patent 5,691,198
- U.S. Patent 5,747,469
- U.S. Patent 5,753,500.
- Varmus *et al.*, *Cell.* 25:23-36, 1981. 30
- Vogelstein. *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer*, 2:2. 159-162, 1990.
- von Deimling. *et al.*, *J Neurosurg.* 77:2, 295-301, 1992.
- von Deimling *et al.*, *Int. J. Cancer*, 57:676-680, 1994.
- Voullaire *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 52:1153-1163, 1993.
- Wagner and Hoppe U.S. Patent No. 4,873,191
- Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 9:3410-3414, 1990.
- Wagner E. *et al.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4255-4259. 40

- Wagner *et al.*, *Science*, 260:1510-1513, 1993.
- Walker *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89:392-396, 1992a.
- Walker GT, *et al.*, (1992b). *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696.
- Walther and Stein, *J. Mol. Med.*, 74:379-392, 1996.
- Walton, *et al.*, *Surgery*, 99:82-86, 1986.
- Wang CY and Huang L (1989). *Biochemistry* 28:9508-9514.
- Wang *et al.*, *Cancer Res.*, 57:351-354, 1997.
- Weary, *et al.*, *Arch. Dermatol.*, 106:682-690, 1972.
- Wei *et al.*, *Cancer Res.* 56:1487-1494, 1996.
- Weinberg, *Biochemistry*, 28:8263-8269, 1989.
- Wilkinson GW and Akrigg A (1992). *Nucleic Acids Res.* 20:2233-2239.
- Wills *et al.*, *Human Gene Therapy*, 5:1079-1088, 1994.
- Wilson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 6181-6191, 1990.
- Wolff JA, *et al.* (1990). *Science* 247:1465-1468.
- Wolff JA, *et al.* (1991). *BioTechniques* 11:474-485.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wong *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6899-6903, 1987.
- Wooster *et al.*, *Nature*, 378:789-792, 1995.
- Wu and Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu *et al.*, *Genomics*, 4:560, 1989.
- Wu CH, *et al.* (1989). *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987.
- Wu GY, *et al.* (1991). *J. Biol. Chem.* 266:14338-14342.
- Yamaguchi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:484-488, 1994.
- Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:9568-9572, 1990.
- Zechner *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2394-2401, 1988.
- Zelenin *et al.*, *FEBS Lett.*, 280:94-96, 1991.
- Zenke M, *et al.* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3655-3659.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0199】

【図1】ヒト染色体番号10番上の腫瘍抑制因子遺伝子座の候補の位置。ヒト染色体番号10番上の多様な遺伝子座は腫瘍抑制活性の部位でありえるものとして示された。これらの遺伝子座および報告したグループを記載している。

【図2】神経膠腫細胞株中の同種欠失の例示。多様な神経膠腫細胞株を染色体番号10番の遺伝子座の両方のコピーにおける欠失の存在に関してスクリーニングした。遺伝子座は垂直軸上に示され、かつ水平軸を横切るように、挙げられている。同種の喪失は色付き楕円によって示されている。マーカー AFMA086WG9 (AFM086) の存在について、神経膠腫細胞系 D54、EFC-2、A172 および LG11 を審査した。マーカーは

、個々の反応において数個の付加的第10染色体多形アレルを用いる多重ポリメラーゼ鎖反応において、欠失していることが明らかになった。アレルD10S196は、PCR（登録商標）反応のコントロールとして示す。EFC-2細胞は、4つの隣接マーカークのホモ接合欠失を示した（図2参照）。

【図3】染色体番号10番の例示：ハイブリッドクローン中のDNA微小衛星マーカークの存在または不在。マウスA9細胞にトランスファーした体細胞ハイブリッドクローンU251.N10.7の11のサブクローンからの微小衛星マーカークに特異的な染色体番号10番に対応するDNAの存在（塗りつぶした円）または不在（中抜き円）染色体番号10番の領域を示す。U251.N10.6およびU251.N10.8体細胞ハイブリッドは完全に抑圧されたクローンであり、軟アガロース中で全く増殖を示さないか殆ど増殖を示さず、また、U251.N10.5AおよびCサブクローンは部分的に抑圧されている（ステック（Steck）ら、1995）。完全に抑圧されたクローンと部分的に抑圧されたクローンとの差異は、腫瘍抑制因子遺伝子の機能的な局在を提供する。腫瘍抑制因子遺伝子を含む可能性のある領域は、ボックスによって示されている。10q23.3のボックスでは同種欠失と対立遺伝子欠失分析によって示された領域と重複する（図2および図4参照）。

【図4】ヒト神経膠腫における染色体番号10番の欠失マップ。D10S551からD10S583までのマーカークによって区切られた領域は10cM領域に位置している。微小衛星は、最も確率的にありそうな結合順で示され、ギアペイ（Gyapay）ら、1994によって記載されるように放射ハイブリッドマップに基づいたおよその染色体位置にマッピングされている。未分化アストロサイトーマおよび1つの神経膠腫には関係がない染色体番号101番の領域は、該腫瘍のボックス領域に示されている。同種欠失分析から定義され、この分析によって排除されない重要な領域は右側の実線によって示す。

【図5】BAC 106d16のマッピング。106d16と称するBACのマッピングおよびサザンブロットティングによる同種欠失の証明を示す。106d16の部分的な制限マップを示す。そのブロットティングの説明をEFC-2細胞におけるEcoバンド番号#14（Mr 約11kb）の同種の欠失を示す。

【図6A】TS10Q23.3のコーディング配列および-5'-および3'-フランキング領域。コーディング領域を太字で、最初にイン・フレームでストップコドンがあるように示している。

【図6B】図6Aの続きを示す図である。

【図7】TS10Q23.3産物の推定アミノ酸配列。略語は、Aはアラニン；Cはシステイン；Dはアスパラギン酸；Eはグルタミン酸；Fはフェニルアラニン；Gはグリシン；Hはヒスチジン；Iはイソロイシン；Kはリジン；Lはロイシン；Mはメチオニン；Nはアスパラギン；Pはプロリン；Qはグルタミン；Rはアルギニン；Sはセリン；Thaトレオニン；Vはバリン；Wはトリプトファン；Yはチロシンである。ホスファターゼ同一部位は太字で表す；チロシンリン酸化部位はイタリック体で示し、下線を付している。

【図8】10q23.3の欠失分析。10q23.3における同種の欠失を持つと最初に示されている神経膠腫株をTS10Q23.3の存在に関して再度分析した。塗りつぶした円はその遺伝子領域が存在することを示し；中抜き円は遺伝子領域中の同種の欠失を示している。*はトラップされたエクソンを示す。

【図9A】ヒト10q23.3とマウスおよびイヌホモログとのホモロジー比較。開始ATGコドンおよびメチオニンアミノ酸をスタート（1）ポジションで設計している。終結コドンはTGA（1210）である。ゲノムまたはアミノ酸レベルでのヒトおよびマウスまたはイヌの配列間の変更を比較された配列において星により示している。ヒトおよびイヌのアミノ酸配列は同一である；マウスの配列は、398位置において異なり、マウスではセリンであるが、イヌおよびヒトにおいてはトレオニンである。

【図9B】図9Aの続きを示す図である。

【図9C】図9Bの続きを示す図である。

【図9D】図9Cの続きを示す図である。

【図9E】図9Dの続きを示す図である。

10

20

30

40

50

【図9F】図9Eの続きを示す図である。

【図9G】図9Fの続きを示す図である。

【図9H】図9Gの続きを示す図である。

【図9I】図9Hの続きを示す図である。

【図10A】TS10Q23.3のエクソン配列および周辺イントロン領域。 エクソンは開始部位1で大文字で示しており、イントロンは小文字で示している；開始コドンが第1位で始まり、3'エクソン/イントロン境界がそれぞれ79と80位である最初のエクソンは除く。小文字は(表5)、最初のエクソンを除き、この図に存在する配列の数に対応している。U87およびU138の突然変異はエクソン(それぞれGおよびH)の後最初のイントロンG残基[G+l>T]である。T98GおよびKEに関して、点突然変異はそれぞれエクソンBの46位および28位である。LnCap細胞に関して、突然変異は最初のイントロンにおける塩基16および17の欠失である。

【図10B】図10Aの続きを示す図である。

【図10C】図10Bの続きを示す図である。

【図10D】図10Cの続きを示す図である。

【図10E】図10Dの続きを示す図である。

【図11AB】TS1023.3における第二構造の分析。 図11A: 親水性プロット；図11B: 表面確率(Surface probability)プロットである。

【図11CD】TS1023.3における第二構造の分析。 図11C: 可撓性プロット；図11D: 抗原価プロットである。

【図11EF】TS1023.3における第二構造の分析。 図11E: 両親媒性ヘリックスプロット；図11Fは両親媒性シートプロットである。

【図11G】TS1023.3における第二構造の分析。 図11Gは第二構造プロットである。

【図12AB】TS10Q23.3における推定の特徴の比較および点突然変異T98GおよびKE。 図12A: 野生型ポリペプチドの1-60残基の親水性プロット；図12B: 野生型ポリペプチドの1-60残基の表面確率プロット。TS10Q23.3の42残基でのT98G突然変異(Leu Arg)は、TS10Q23.3の提供されたヘリックス第二構造の喪失を生じる。KEの36残基でのT98G突然変異(Gly Gly)は、その領域における提案されたヘリックス第二構造のオリゴヌクレオチド長さを有意に増加させる。両突然変異は同じヘリックス構造に影響を及ぼすであろう。また親水性における少しの変化および表面確率は上昇する。

【図12C】TS10Q23.3における推定の特徴の比較および点突然変異T98GおよびKE。 図12C: 野生型ポリペプチドの1-60残基の二次構造プロット。TS10Q23.3の42残基でのT98G突然変異(Leu Arg)は、TS10Q23.3の提供されたヘリックス第二構造の喪失を生じる。KEの36残基でのT98G突然変異(Gly Gly)は、その領域における提案されたヘリックス第二構造のオリゴヌクレオチド長さを有意に増加させる。両突然変異は同じヘリックス構造に影響を及ぼすであろう。また親水性における少しの変化および表面確率は上昇する。

【図12DE】TS10Q23.3における推定の特徴の比較および点突然変異T98GおよびKE。 図12D: KE変異体の1-60残基の親水性プロット；図12E: KE変異体の1-60残基の表面確率プロット。TS10Q23.3の42残基でのT98G突然変異(Leu Arg)は、TS10Q23.3の提供されたヘリックス第二構造の喪失を生じる。KEの36残基でのT98G突然変異(Gly Gly)は、その領域における提案されたヘリックス第二構造のオリゴヌクレオチド長さを有意に増加させる。両突然変異は同じヘリックス構造に影響を及ぼすであろう。また親水性における少しの変化および表面確率は上昇する。

【図12F】TS10Q23.3における推定の特徴の比較および点突然変異T98GおよびKE。 図12F: KE変異体の1-60残基の第二構造プロット。TS10Q23.3の42残基でのT98G突然変異(Leu Arg)は、TS10Q23.3の提供されたヘリックス第二構造の喪失を生じる。KEの36残基でのT98G突然変異(Gly Gly)は、その領域における提案されたヘリックス第二構造のオリゴヌクレオチド長さを有意に増加させる。両突然変異は同じヘリックス構造に影響を及ぼすであろう。また親水性における少しの変化および表面確率は

10

20

30

40

50

上昇する。

【図12GH】TS10Q23.3における推定の特徴の比較および点突然変異T98GおよびKE。図12G：T98G変異体の1-60残基の親水性プロット；図12H：T98G変異体の1-60残基の表面確率プロット。TS10Q23.3の42残基でのT98G突然変異（Leu Arg）は、TS10Q23.3の提供されたヘリックス第二構造の喪失を生じる。KEの36残基でのT98G突然変異（Gly Gly）は、その領域における提案されたヘリックス第二構造のオリゴヌクレオチド長さを有意に増加させる。両突然変異は同じヘリックス構造に影響を及ぼすであろう。また親水性における少しの変化および表面確率は上昇する。

【図12I】TS10Q23.3における推定の特徴の比較および点突然変異T98GおよびKE。図12I：T98G変異体の1-60残基の第二構造プロット。TS10Q23.3の42残基でのT98G突然変異（Leu Arg）は、TS10Q23.3の提供されたヘリックス第二構造の喪失を生じる。KEの36残基でのT98G突然変異（Gly Gly）は、その領域における提案されたヘリックス第二構造のオリゴヌクレオチド長さを有意に増加させる。両突然変異は同じヘリックス構造に影響を及ぼすであろう。また親水性における少しの変化および表面確率は上昇する。

【図13A】ヒト腫瘍細胞系におけるTS10Q23.3遺伝子のホモ接合欠失および早期グリア芽細胞腫におけるTS10Q23.3 mRNA発現レベル。次の配列タグ部位：（1）TS10Q23.3エクソン1、（2）TS10Q23.3エクソン2、（3）TS10Q23.3エクソン3、（4）TS10Q23.3エクソン4、（5）TS10Q23.3エクソン5、（6）TS10Q23.3エクソン6、（7）TS10Q23.3エクソン7、（8）TS10Q23.3エクソン8、（9）TS10Q23.3エクソン9、（10）コントロールMKK4エクソン8を用いるPCR増幅によってそれぞれ診査した、4つの細胞系、乳癌TCL11A11、メラノーマTCL11D7、メラノーマTCL11D9および白血病TCL10G9（ホモ接合欠失したTS10Q23.3を含まないコントロールサンプル）を示す。

【図13B】ヒト腫瘍細胞系におけるTS10Q23.3遺伝子のホモ接合欠失および早期グリア芽細胞腫におけるTS10Q23.3 mRNA発現レベル。スクリーニングされたTCLのTS10Q23.3遺伝子に見られるホモ接合欠失。黒マルはホモ接合欠失のないエクソンを示し、白マルは失われたエクソンを表す。

【図13C】ヒト腫瘍細胞系におけるTS10Q23.3遺伝子のホモ接合欠失および早期グリア芽細胞腫におけるTS10Q23.3 mRNA発現レベル。RT-PCR分析によって検出されたヒト正常脳およびGBMサンプルにおけるTS10Q23.3メッセージの発現。TS10Q23.3の5'末端アンプリコンを示す。レーンは、PL-1低グレード神経膠腫からのコントロールアンプリコン（C）ならびに7つの正常および腫瘍サンプルである。診査した10個のGBMのうち6個を、TS10Q23.3遺伝子座およびTS10Q23.3遺伝子変質体の周囲のLOHについて診査した。6個のサンプルすべてがLOHを提示したが、発明者がそれらのDNAをシーケンシングによってスクリーニングしても、突然変異は検出されなかった。等価の品質および量のプレートコントロールとしてGADPHメッセージの発現レベルを用いた。

【図13D】ヒト腫瘍細胞系におけるTS10Q23.3遺伝子のホモ接合欠失および早期グリア芽細胞腫におけるTS10Q23.3 mRNA発現レベル。すべての正常およびGBMサンプルのGADPHに対するTS10Q23.3のRT-PCRアンプリコン強度の比率。

【図14】TS10Q23.3の推定の機能ドメインおよび道程された変質の位置の描写。TS10Q23.3のN-末端ハーフはホスファターゼならびに細胞骨格タンパク質、テンシンおよびオーキシンと相同である（茶色枠）。コアフォスファターゼドメイン（赤色枠）、3つの潜在性チロシンリン酸化部位（青色枠）および2つの潜在性セリンリン酸化部位（黄色枠）の位置も示す。PDZモチーフ、ITKVは、タンパク質のC-末端に位置する。Steckら（1997）、Liら（1997）およびLiawら（1997）によって同定されたTS10Q23.3の変異および本実験によって検出された変質を示す（青の

10

20

30

40

50

矢印はミスセンス置換、黒の矢印はフレーム内挿入または欠失、緑の矢印は潜在性スプライシング変異、およびTS10Q23.3のトランケーションを引き起こす赤の矢印はフレームシフトまたはナンセンス変異を示す)。星印は、カウデン病の患者において見出された生殖系列突然変異を示し(Liawら、1997)、黒マルは、推定的に独立したDNAサンプルにおいて観察された損傷を示す。

【図15】CSを持つ4つの家族における第10染色体上にマーカーを有するハプロタイプの構築。

【図16】CSおよび初期乳癌を持つ1つの家族のTS10Q23.3のDNAシーケンシング。罹患した母親(黒マル)においては、エクソン5に2つの塩基対(AT)挿入がみられるが、罹患していない男兄弟(白マル)にはみられない。罹患した娘にはAT挿入が遺伝していた。

10

【図17】外因性MMAC1タンパク質の発現。U87MG細胞を表示されている濃度(粒子数/ml)でMMCBまたはGFCBに24時間感染させ、次いで、溶解液をただちに(第24時間)または24時間後(第48時間)に調製した。「方法」の項目の記載にしたがってウエスタンブロッティングを行った。タンパク質サイズのマーカーを左に示す。Liauら(1997)に記載されているように、MMAC1タンパク質は、約5kDの位置に移動した。

【図18】FACS感染性アッセイ。U87MG細胞をインジケーター/濃度で24時間感染させた。緑色の蛍光性タンパク質を発現している細胞のフラクションをフローサイトメトリーで定量した。pn/ml: アデノウイルス粒子数/ml。

20

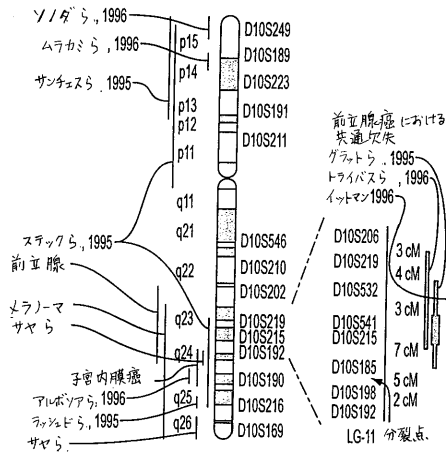
【図19A】MMCBによるインビトロ増殖の阻害。図19A: ³H-チミジンの取りこみ。誤差バーはS.D.である(3回実験)。pn/ml: アデノウイルス粒子数/ml。

【図19B】MMCBによるインビトロ増殖の阻害。19B: 生存細胞計数アッセイ。誤差バーはS.D.である(3回実験)。pn/ml: アデノウイルス粒子数/ml。

【図20】軟寒天コロニー形成。U87MG細胞を表示されている濃度でGFCB、MMCBまたはFTCBに24時間感染させた。平均コロニー数±S.D.をプロットする。pn/ml: アデノウイルス粒子数/ml。

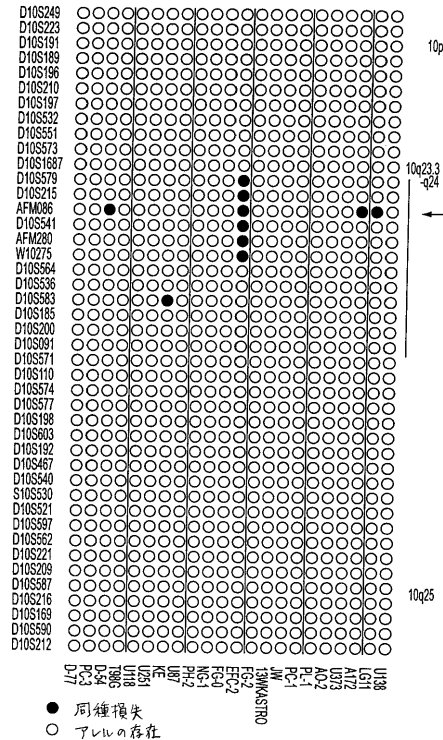
【 図 1 】

FIG. 1



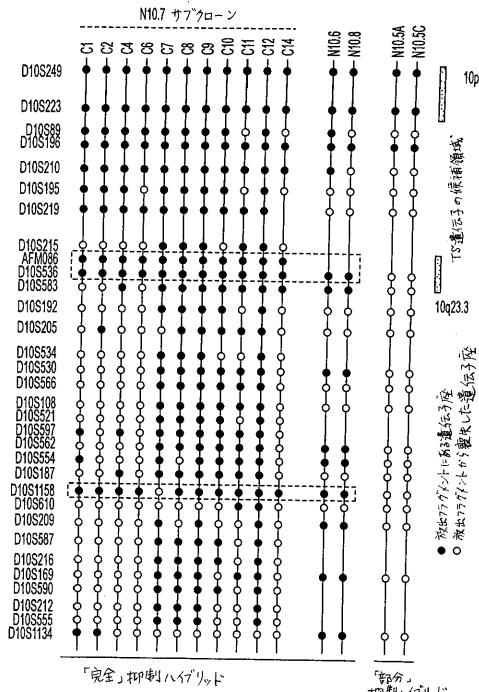
【 図 2 】

FIG. 2



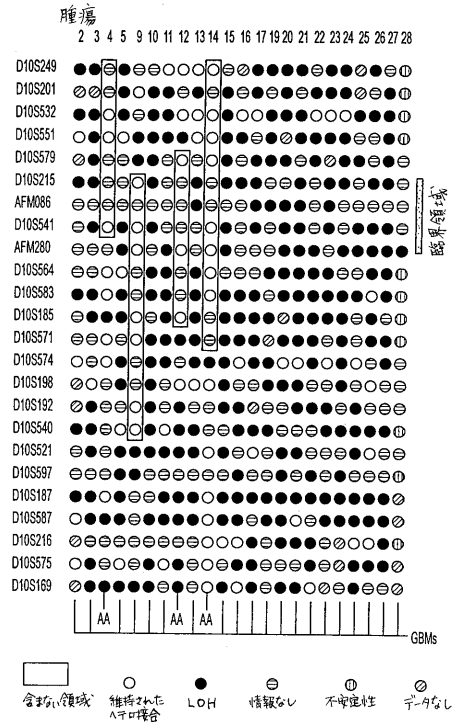
【 図 3 】

FIG. 3

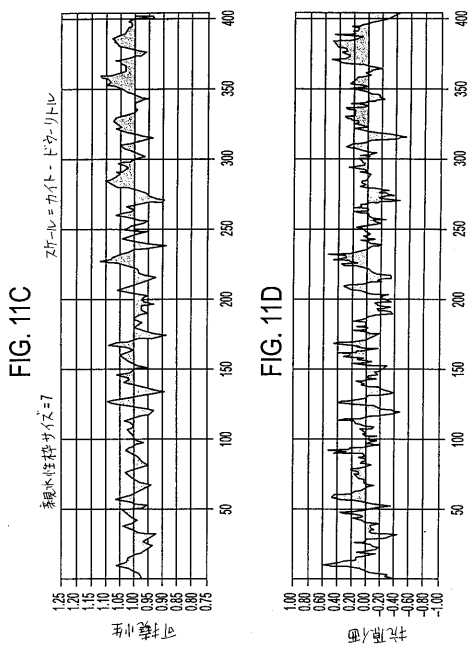


【 図 4 】

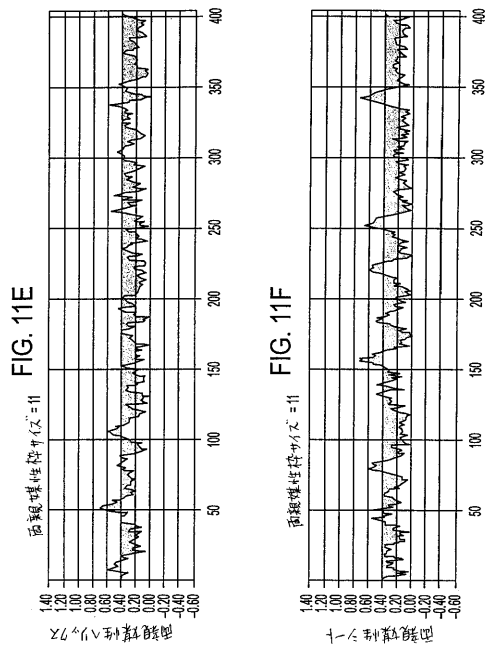
FIG. 4



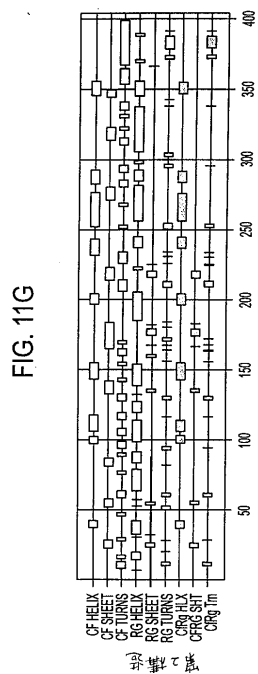
【 図 1 1 C D 】



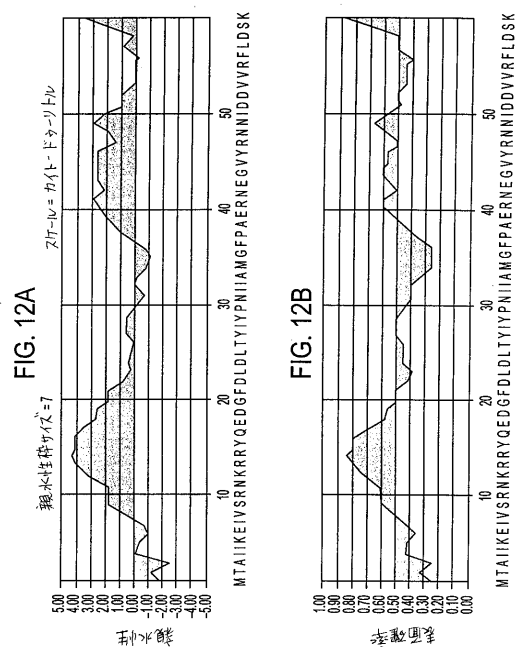
【 図 1 1 E F 】



【 図 1 1 G 】

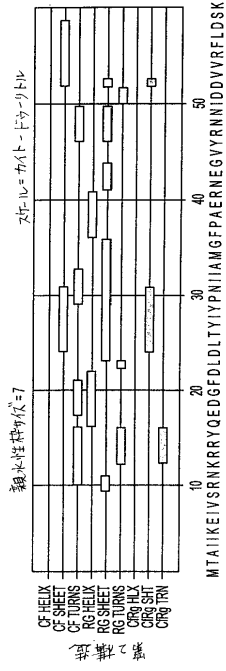


【 図 1 2 A B 】



【 図 1 2 C 】

FIG. 12C



【 図 1 2 D E 】

FIG. 12D

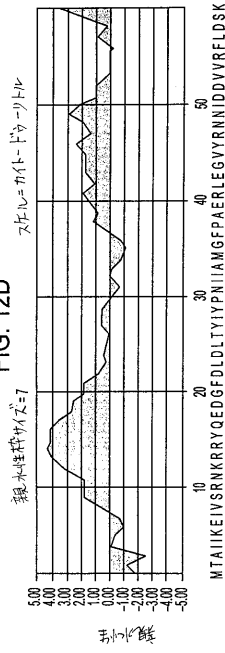
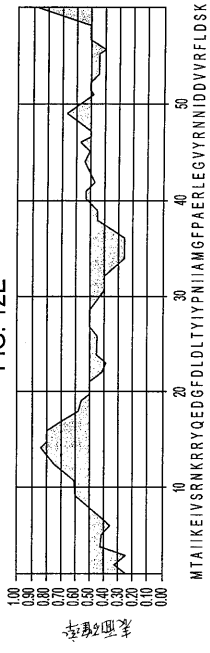
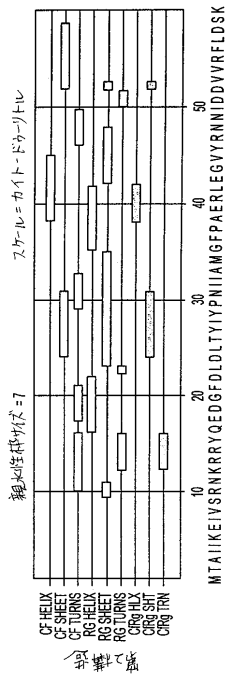


FIG. 12E



【 図 1 2 F 】

FIG. 12F



【 図 1 2 G H 】

FIG. 12G

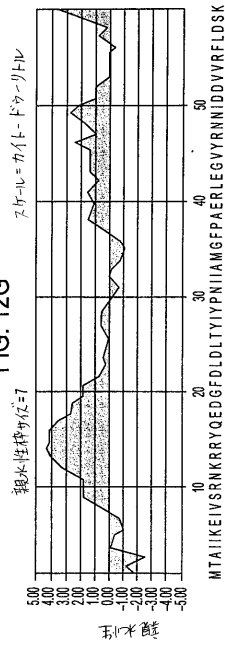
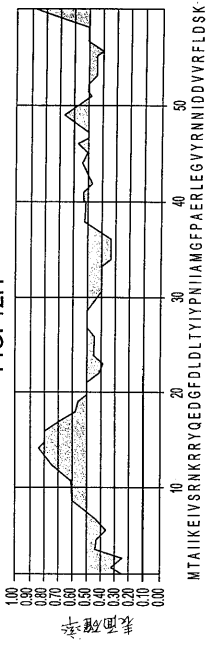


FIG. 12H



【 図 1 3 D 】

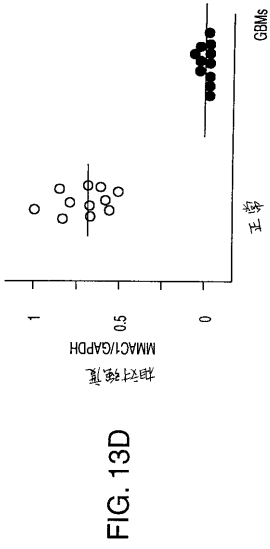


FIG. 13D

【 図 1 4 】

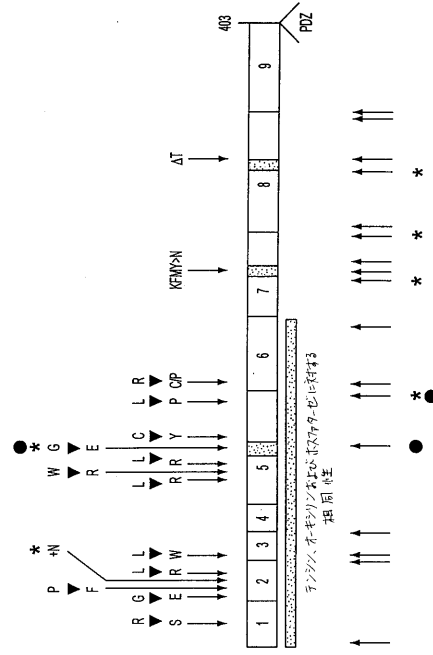


FIG. 14

【 図 1 5 】

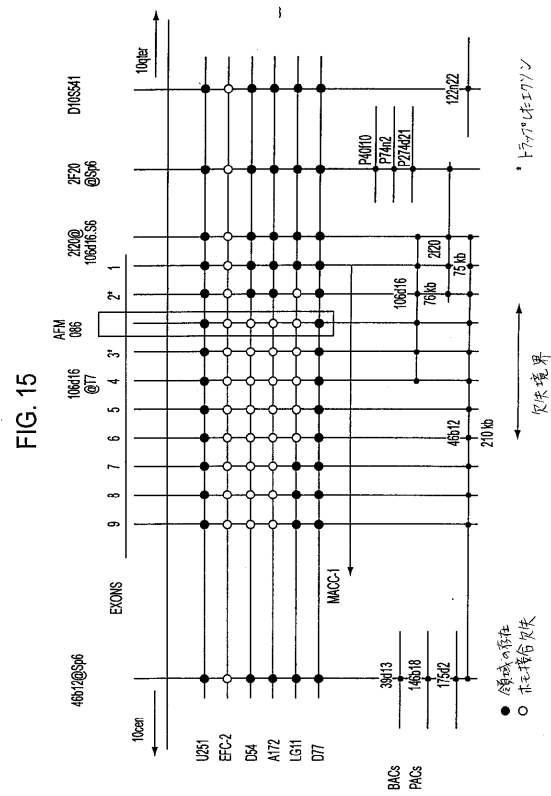


FIG. 15

【 図 1 6 】

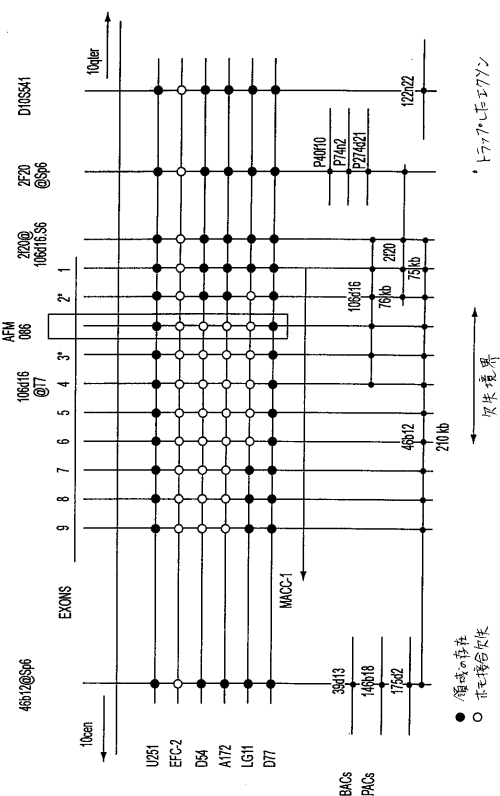
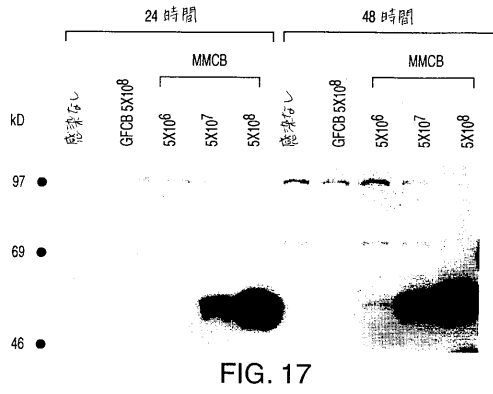
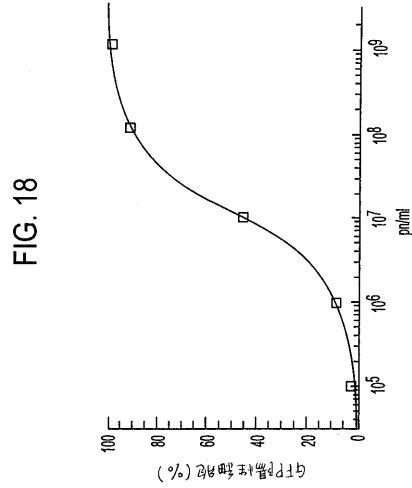


FIG. 16

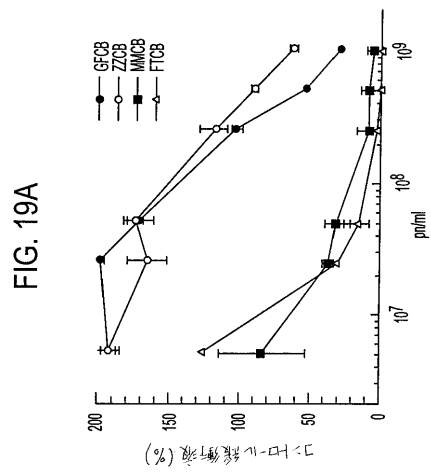
【 図 1 7 】



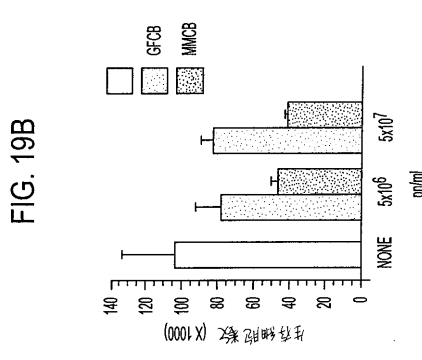
【 図 1 8 】



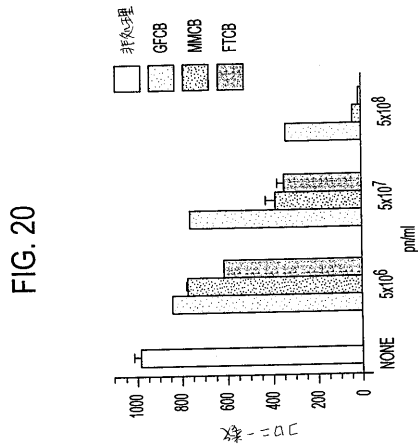
【 図 1 9 A 】



【 図 1 9 B 】



【図 20】



【配列表】

2008263988000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成20年6月2日(2008.6.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の1035乃至2246番目の核酸からなる核酸配列によりコードされるPTENポリペプチド、その対立遺伝子変異体またはそれらの一部に免疫学的に結合し、配列番号64の核酸配列によりコードされるポリペプチドまたはその一部に結合しない単離された抗体。

【請求項2】

下記からなる群から選ばれる核酸からなる単離された核酸：

(a) 配列番号64の核酸；

(b) 配列番号64の核酸配列からなる核酸に特異的にハイブリダイズし、配列番号1の核酸配列からなる核酸にハイブリダイズしない核酸；及び、

(c) 上記(a)または(b)に相補的な核酸。

【請求項3】

下記からなる群から選ばれる配列番号1における1または複数の位置の核酸を含む配列番号1における約15またはそれより長い連続する核酸からなる単離されたオリゴヌクレオチド：

(a)1036番目；(b)1123番目；(c)1236番目；(d)1276番目；(e)1282番目；(f)1292番目；

(g)1431番目；(h)1439番目；(i)1441番目；(j)1565番目；(k)1578番目；(l)1590番目；(m)1706番目；(n)1734番目；(o)1739番目；(p)1754番目；(q)1934番目；(r)1976番目；及び(s)それらに相補的な位置。

【請求項4】

高い緊縮条件下で配列番号1の核酸配列からなる核酸、その対立遺伝子変異体若しくはその突然変異体をコードする核酸、またはそれらに相補的な核酸にハイブリダイズし、高い緊縮条件下で配列番号64の核酸配列からなる核酸にハイブリダイズしない約15乃至約45の核酸からなる単離されたオリゴヌクレオチド。

【請求項5】

下記からなる群から選ばれる配列番号1における1または複数の位置の核酸を含む配列番号1における約15乃至約45の連続する核酸からなる請求項4に記載の単離されたオリゴヌクレオチド：

(a)1036番目；(b)1123番目；(c)1236番目；(d)1276番目；(e)1282番目；(f)1292番目；(g)1431番目；(h)1439番目；(i)1441番目；(j)1565番目；(k)1578番目；(l)1590番目；(m)1706番目；(n)1734番目；(o)1739番目；(p)1754番目；(q)1934番目；(r)1976番目；及び(s)それらに相補的な位置。

【請求項6】

10 mM トリス-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5 μ M MgCl₂及び温度約40 乃至約72 の条件下で、下記からなる群から選ばれる配列番号1における1または複数の位置の核酸を含む約15乃至約45の連続する配列番号1における領域に特異的にハイブリダイズする請求項4に記載の単離されたオリゴヌクレオチド：

(a)1036番目；(b)1123番目；(c)1236番目；(d)1276番目；(e)1282番目；(f)1292番目；(g)1431番目；(h)1439番目；(i)1441番目；(j)1565番目；(k)1578番目；(l)1590番目；(m)1706番目；(n)1734番目；(o)1739番目；(p)1754番目；(q)1934番目；(r)1976番目；及び(s)それらに相補的な位置。

【請求項7】

配列番号64の核酸配列からなるPTEN偽遺伝子の核酸またはその一部を検出可能なレベルに増幅せず、配列番号2のアミノ酸配列からなるPTENポリペプチド、対立遺伝子変異体、その突然変異体またはそれらの一部をコードする核酸の増幅のための核酸プライマーペア。

【請求項8】

試料を請求項3に記載のオリゴヌクレオチドと接触させることからなるPTENの発現レベルを決定する方法。

【請求項9】

試料を請求項4に記載のオリゴヌクレオチドと接触させることからなるPTENの発現レベルを決定する方法。

【請求項10】

試料を請求項5に記載のオリゴヌクレオチドと接触させることからなるPTENの発現レベルを決定する方法。

【請求項11】

試料を請求項6に記載のオリゴヌクレオチドと接触させることからなるPTENの発現レベルを決定する方法。

【請求項12】

請求項7に記載の核酸プライマーペアを用いて、配列番号64の核酸配列からなるPTEN偽遺伝子の核酸またはその一部を検出可能なレベルに増幅せずに、配列番号2のアミノ酸配列からなるPTENポリペプチドをコードする核酸、その対立遺伝子変異体若しくはその突然変異体をコードする核酸またはそれらの一部を増幅することからなるPTENの発現レベルを決定する方法。

【請求項13】

(1)試料から、検出可能な量の配列番号64の核酸配列からなるPTEN偽遺伝子の核酸また

はその一部を単離することなく、核酸を単離し、及び

(2)工程(1)で単離された核酸において、配列番号2のアミノ酸配列からなるPTENポリペプチドをコードする核酸またはその一部を検出する、ことからなる試料中のPTENポリペプチドをコードする核酸を検出する方法。

【請求項14】

さらに、下記からなる群から選ばれる1または複数の遺伝子を検出することからなる請求項13の方法：

p21、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、BCRA2、p16、FHIT、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、FCC、MCC、ras、myc、neu、EGFレセプター遺伝子、raf、erb、src、fms、jun、trk、ret、gsp、hst、bcl、及びabl。

【請求項15】

PTENポリペプチドをコードする核酸における1または複数の推定の変異の存否を決定するために、配列番号2のアミノ酸配列からなるPTENポリペプチドをコードする核酸、その対立遺伝子変異体をコードする核酸またはそれらの一部の核酸配列を分析することからなり、

ここで、該1または複数の推定の変異の少なくとも1つが、配列番号1の1035乃至2246番目の核酸及び配列番号64との間の相違と合致しない場合には、PTENポリペプチドをコードする核酸に変異が検出されたものである、PTENポリペプチドをコードする核酸が変異を有しているか否かを決定する方法。

【請求項16】

(1)試料中において、配列番号64の核酸配列からなるPTEN偽遺伝子の核酸またはその一部とは区別される、配列番号2のアミノ酸配列からなるPTENポリペプチドをコードする核酸、その対立遺伝子変異体若しくはその突然変異体をコードする核酸またはそれらの一部の存否を検出し；及び

(2)(a)該PTENポリペプチドをコードする核酸における1または複数の変異の存否を決定し、及び/または、

(b)該PTENポリペプチドをコードする核酸の量の決定するために、工程(1)において検出されたPTENポリペプチドをコードする核酸を分析することからなり、

ここで、工程(2)の(a)において決定された1または複数の変異が存在する場合、及び/または工程(2)の(b)において決定された核酸の量が正常な場合より減少している場合には、癌または癌へのなりやすさが存在するものである、癌または癌になりやすさの存否を決定するための方法。

【請求項17】

工程(2)においてその存在が決定された1または複数の変異の少なくとも1つが、下記の群からなる変異ではない請求項16に記載の方法：

- (a)配列番号1の1036番目のg；
- (b)配列番号1の1123番目のt；
- (c)配列番号1の1236番目のc；
- (d)配列番号1の1276番目のc；
- (e)配列番号1の1282番目のa；
- (f)配列番号1の1292番目のg；
- (g)配列番号1の1431番目のa；
- (h)配列番号1の1439番目のt；
- (i)配列番号1の1441番目のa；
- (j)配列番号1の1565番目のc；
- (k)配列番号1の1578番目のg；
- (l)配列番号1の1590番目のg；
- (m)配列番号1の1706番目のg；
- (n)配列番号1の1734番目のt；
- (o)配列番号1の1739番目のg；

- (p) 配列番号 1 の1754番目の t ;
- (q) 配列番号 1 の1934番目の t ; 及び
- (r) 配列番号 1 の1976番目の g ; 。

【請求項 18】

(1) ヒトから採取した試料から、配列番号64の核酸配列からなるPTEN偽遺伝子の核酸またはその一部を単離することなく、核酸を単離し、及び；

(2)(a) 該PTENポリペプチドをコードする核酸における 1 または複数の変異の存否を決定し、及び/または、

(b) 該PTENポリペプチドをコードする核酸の量の決定するために、工程(1)において単離されたPTENポリペプチドをコードする核酸、その対立遺伝子変異体若しくはその突然変異体をコードする核酸またはそれらの一部を分析することからなり、

ここで、工程(2)の(a)において決定された 1 または複数の変異が存在する場合、及び/または工程(2)の(b)において決定された核酸の量が正常な場合より減少している場合には、癌または癌へのなりやすさが存在するものである、癌または癌へのなりやすさの存否を決定するための方法。

【請求項 19】

請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチドからなる、PTENポリペプチドをコードする核酸を特異的に検出するためのキット。

【請求項 20】

請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチドからなる、癌の存在または癌へのなりやすさを決定するための診断用キット。

【請求項 21】

請求項 7 に記載の核酸プライマーペアからなる、PTENポリペプチドをコードする核酸を特異的に検出するためのキット。

【請求項 22】

請求項 7 に記載の核酸プライマーペアからなる、癌の存在または癌へのなりやすさを決定するための診断用キット。

【請求項 23】

高い緊縮条件下で配列番号 2 のアミノ酸配列からなるPTENポリペプチドをコードする核酸、その対立遺伝子変異体をコードする核酸またはそれらに相補的な核酸にハイブリダイズし、配列番号64の核酸配列からなるPTEN腫瘍抑制因子偽遺伝子の核酸にハイブリダイズしない、約15乃至約100の核酸からなり、PTENポリペプチドをコードする核酸とPTEN偽遺伝子の核酸との区別するための単離されたオリゴヌクレオチド。

フロントページの続き

- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (72)発明者 ピーター・ステック
アメリカ合衆国 7 7 4 0 1 テキサス州ベレアー、ホリー・ストリート 5 4 2 1 番
- (72)発明者 マーク・エイ・パーズハウス
アメリカ合衆国 7 7 0 2 5 テキサス州ヒューストン、マクダームド・ドライブ 4 0 6 5 番
- (72)発明者 サーマー・エイ・ジャサー
アメリカ合衆国 7 7 0 3 1 テキサス州ヒューストン、クリスティン・ドライブ 9 4 1 1 番
- (72)発明者 ダブリュー・ケイ・アルフレッド・ヤング
アメリカ合衆国 7 7 0 0 5 テキサス州ヒューストン、パイロン・ストリート 4 1 4 1 番
- (72)発明者 ショーン・ブイ・タブティジャン
アメリカ合衆国 8 4 1 0 3 ユタ州ソルト・レイク・シティ、イースト・ファースト・アベニュー・
ナンバー 3、5 5 7 番
- F ターム(参考) 4B024 AA12 CA04 CA09 HA12
4B063 QA19 QQ43 QR55 QR62 QS25 QS34
4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 EA51 FA72

专利名称(译)	肿瘤抑制因子ts10q23.3		
公开(公告)号	JP2008263988A	公开(公告)日	2008-11-06
申请号	JP2008131832	申请日	2008-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	美瑞德生物工程公司		
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称 无数的遗传学公司		
[标]发明人	ピーターステック マークエイパーズハウス サーマーエイジャサー ダブリューケイアルフレッドヤング シヨーンブイタブティジャン		
发明人	ピーター・ステック マーク・エイ・パーズハウス サーマー・エイ・ジャサー ダブリューケイアルフレッド・ヤング シヨーン・ブイ・タブティジャン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/53 A61K38/00 C07K14/47 C12N7/00 G01N37/00		
CPC分类号	C07K14/4703 A61K38/00 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/136 C12Q2600/16 C12Q2600/172		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/574.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z G01N33/50.P G01N33/50.T		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA51 4H045/FA72 2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA12 2G045/FB02 2G045/FB05		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	60/057750 1997-08-26 US 60/083563 1998-04-30 US		
其他公开文献	JP4454670B2 JP2008263988A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了可用于诊断和治疗癌症的肿瘤抑制基因。已确定10号染色体的特定区域(10q23.3)包含抑癌基因,该基因的相应编码区代表一种新型的47kD蛋白。该产物的结构域与蛋白酪氨酸磷酸酶的保守催化结构域恰好重合,提示在磷酸化事件中可能的功能作用。序列分析表明,用于定义10q23.3区域的肿瘤细胞系缺少该基因的许多外显子,被归类为肿瘤抑制基因。此外,在神经胶质瘤细胞和前列腺癌细胞中均显示了基因中多个缺失的存在。还公开了诊断和治疗与该肿瘤抑制物有关的癌症的方法(称为TS10q23.3)。[选择图]无

候補遺伝子において同定された変異

細胞	細胞タイプ	変異	予測される効果
1 U87	神経膠腫	スプライシングジャンクション エクソンc;G+1>T	スプライシング 変異体
2 U138	神経膠腫	スプライシング重複 エクソンh;G+1>T	スプライシング 変異体
3 U251	神経膠腫	2bp 付加[EエクソンC]98 ins TT	
4 U373	神経膠腫	フレームシフトエクソンG	
5 EFC-2	神経膠腫	一オメガでのエクソン	生成物なし
6 D54	神経膠腫	一エクソンC-1	生成物なし
7 A172	神経膠腫	一エクソンC-1	生成物なし
8 LG11	神経膠腫	一エクソンB-1	生成物なし
9 T98C	神経膠腫	ミスセンスエクソンB;T16->G	leu->arg
10 KE	神経膠腫	ミスセンスエクソンB;C28->A	gly->glu
11 F80	神経膠腫	終止変異エクソンHC202->T	終止停止
12 D77	神経膠腫	変異なし(C10q)に付いて不均質D	
13 FC-3	低分度	変異なし	
14 PH-2	低分度	変異なし	
15 nLnC3p	前立腺	欠失エクソンA, 16-17delAA; 変異 B,C53->T	サイレント