

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4813746号  
(P4813746)

(45) 発行日 平成23年11月9日(2011.11.9)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/713</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/713
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/76</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76

請求項の数 55 (全 125 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-509374 (P2002-509374)	(73) 特許権者	500039463
(86) (22) 出願日	平成13年7月10日(2001.7.10)		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
(65) 公表番号	特表2004-502449 (P2004-502449A)		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(43) 公表日	平成16年1月29日(2004.1.29)		オースティン、ウエスト・セブンス・ストリート・201
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/021781		
(87) 国際公開番号	W02002/004511		
(87) 国際公開日	平成14年1月17日(2002.1.17)		
審査請求日	平成20年5月7日(2008.5.7)		
(31) 優先権主張番号	60/217,112		
(32) 優先日	平成12年7月10日(2000.7.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染色体 3 p 2 1 . 3 遺伝子は腫瘍サプレッサーである

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体における癌を診断するのを支援するための方法であって、以下の工程：

該被験体から得た生物学的サンプルにおいて、機能的な野生型 F u s 1 産物 ( G e n B a n k 番号 : A F 0 5 5 4 7 9 ) の発現を評価する工程、  
を包含する、方法。

## 【請求項 2】

前記サンプルが組織サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記組織サンプルが、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、小腸、血液細胞、膵臓、結腸、胃、子宮頸部、乳房、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、口腔組織、骨髄および血液組織からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記評価する工程が、野生型 F u s 1 ( G e n B a n k 番号 : A F 0 5 5 4 7 9 ) をコードする核酸を検出する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記検出する工程が、前記核酸を増幅する工程を包含する、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記検出する工程が、核酸ハイブリダイゼーションを包含する、請求項 4 に記載の方法

。

## 【請求項 7】

前記検出する工程が、配列決定する工程を包含する、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記評価する工程が、野生型 F u s 1 ポリペプチド ( G e n B a n k 番号 : A F 0 5 5 4 7 9 ) を検出する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

E L I S A をさらに包含する、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

免疫組織化学をさらに包含する、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記評価する工程が、野生型または変異体のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを包含し、そして該オリゴヌクレオチドが、チップまたはウエハ上にアレイ状に配置される、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 12】

正常サンプルにおける野生型 F u s 1 ( G e n B a n k 番号 : A F 0 5 5 4 7 9 ) の発現を比較する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記比較する工程が、野生型 F u s 1 ( G e n B a n k 番号 : A F 0 5 5 4 7 9 ) の発現のレベルを評価する工程を包含する、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

腫瘍細胞の増殖を抑制するための組成物であって、  
 ( a ) 野生型 F u s 1 ( G e n B a n k 番号 : A F 0 5 5 4 7 9 ) をコードする核酸 ;  
 および  
 ( b ) 該腫瘍細胞において活性化プロモーター、  
 を含む発現カセットを含有する、組成物。

20

## 【請求項 15】

前記腫瘍細胞が、脳腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍、腎臓腫瘍、リンパ節腫瘍、小腸腫瘍、血液細胞腫瘍、膵臓腫瘍、結腸腫瘍、胃腫瘍、子宮頸部腫瘍、乳房腫瘍、子宮内膜腫瘍、前立腺腫瘍、精巣腫瘍、卵巣腫瘍、皮膚腫瘍、頭頸部の腫瘍、食道腫瘍、口腔組織腫瘍、ならびに骨髓腫瘍からなる群より選択される腫瘍由来である、請求項 14 に記載

30

## 【請求項 16】

前記核酸がウイルスベクターに含まれている、請求項 14 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、またはヘルペスウイルスベクターである、請求項 16 に記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである、請求項 17 に記載の組成物。

40

## 【請求項 19】

前記核酸がリポソームに含まれている、請求項 14 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

腫瘍細胞の表現型を変更するための組成物であって、  
 ( a ) 野生型 F u s 1 ( G e n B a n k 番号 : A F 0 5 5 4 7 9 ) をコードする核酸 ;  
 および  
 ( b ) 該腫瘍細胞において活性化、プロモーター、  
 を含む発現カセットを含有する、組成物。

## 【請求項 21】

前記表現型が、増殖、移動、接触阻害、軟寒天増殖、細胞周期、浸潤性、腫瘍形成、お

50

よび転移可能性からなる群より選択される、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記プロモーターがサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターである、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 23】

癌に罹患している被験体において癌を阻害するための組成物であって、

(a) 野生型 Fus1 ポリペプチド (GenBank 番号: AF055479) をコードする核酸; および

(b) 該被験体の腫瘍細胞において活性化プロモーター、を含む発現カセット

10

を含み、該ポリペプチドの発現が該癌を阻害することを特徴とする、組成物。

【請求項 24】

前記被験体がヒトである、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記癌が、脳癌、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、腎臓癌、リンパ節癌、小腸癌、血液細胞癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、子宮頸部癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、皮膚癌、頭頸部の癌、食道癌、口腔組織癌、ならびに骨髄癌からなる群より選択される、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記発現カセットが、ウイルスベクターに含まれている、請求項 23 に記載の組成物。

20

【請求項 27】

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、またはヘルペスウイルスベクターである、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記発現カセットがリポソームに含まれている、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記発現カセットが、ポリ A 配列をさらに含む、請求項 23 に記載の組成物。

30

【請求項 31】

前記ポリ A 配列がウシ成長ホルモン (BGH) ポリ A 配列である、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記発現カセットが、腫瘍内に、腫瘍脈管構造内に、腫瘍に局在させて、腫瘍に局所的に、または全身に投与されることを特徴とする、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 33】

前記被験体に化学療法剤と組合わせて投与されることを特徴とする、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 34】

40

前記化学療法剤が、シスプラチン (CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトセシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ブレオマイシン、プリカマイシン (plicomycin)、マイトマイシン、エトポシド (VP16)、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲンレセプター結合因子、タキソール、ゲムシタピン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、トランスプラチナ、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびメトトレキサートを含む、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記被験体に放射線と組合わせて投与されることを特徴とする、請求項 23 に記載の組

50

成物。

【請求項 36】

前記放射線が、癌の部位に局所的に送達されることを特徴とする、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記放射線が全身放射線である、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記放射線が、線、X線、加速されたプロトン、マイクロ波放射線、UV放射線、または腫瘍細胞に指向された放射性同位体の送達を含む、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記被験体に第2の抗癌遺伝子と組合わせて投与されることを特徴とする、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記第2の抗癌遺伝子が、腫瘍サプレッサーである、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記第2の抗癌遺伝子が、アポトーシスのインヒビターである、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 42】

前記第2の抗癌遺伝子が、癌遺伝子アンチセンス構築物である、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 43】

癌を有する被験体を処置するための組成物であって、  
野生型 Fus1 ポリペプチド (GenBank 番号: AF055479)  
を含む、組成物。

【請求項 44】

前記癌が、脳癌、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、腎臓癌、リンパ節癌、小腸癌、血液細胞癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、子宮頸部癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、皮膚癌、頭頸部の癌、食道癌、口腔組織癌、ならびに骨髄癌からなる群より選択される、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 45】

前記ポリペプチドがリポソーム内に含まれる、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記リポソームが、N-(1-[2,3-ジオレオイルオキシ]プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウム (DOTAP) およびコレステロールから構成される、請求項 45 に記載の組成物。

【請求項 47】

前記被験体がヒトである、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 48】

抗腫瘍活性について候補物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- (i) 機能的な野生型 Fus1 ポリペプチド (GenBank 番号: AF055479) を欠く細胞を提供する工程；
  - (ii) 該細胞を、該候補物質と接触させる工程；および
  - (iii) 該細胞に対する該候補物質の影響を決定する工程、
- を包含し、ここで、該決定する工程は、該候補物質の存在下または非存在下での該細胞の野生型 Fus1 ポリペプチド (GenBank 番号: AF055479) の発現を比較する工程を包含する、方法。

【請求項 49】

前記細胞が腫瘍細胞である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記決定する工程が、前記候補物質の存在下での前記細胞の1つ以上の特徴を、該候補

10

20

30

40

50

物質の非存在下での類似の細胞の同じ1つ以上の特徴と比較する工程をさらに包含する、請求項48に記載の方法。

【請求項51】

前記特徴が、ホスファターゼ活性、増殖、転移、接触阻害、軟寒天増殖、細胞周期調節、腫瘍形成、腫瘍進行、転移および/または組織浸潤である、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記候補物質が、化学療法剤または放射線治療剤である、請求項48に記載の方法。

【請求項53】

前記候補物質が、低分子ライブラリーから選択される、請求項48に記載の方法。

【請求項54】

抗腫瘍活性について候補物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(i) 細胞を提供する工程；

(ii) 該細胞を、該候補物質と接触させる工程；および

(iii) 野生型Fus1ポリペプチド(GenBank番号：AF055479)の発現に対する、該候補物質の影響を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項55】

前記発現カセットが脂質ビヒクルまたはリポソームに含まれている、請求項20に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

本出願は、米国仮出願番号60/217,112号(2000年7月10日出願)の利益を主張する。

【0002】

合衆国政府は、P50-CA70907に基づき本発明における権利を有する。

【0003】

(I. 発明の分野)

本発明は、一般に、分子生物学および腫瘍学の分野に関連する。

【0004】

(II. 関連技術)

癌は、複数の因子の発生の結果である。変異は、細胞増殖が増大することを生じるプロトオンコジーンにおいて生じ得る。変異はまた、その正常な機能が細胞増殖を調節することである腫瘍抑制剤で生じ得る。DNA修復酵素における変異は、増殖する前に損傷を修復するこの細胞の能力を損なう。腫瘍抑制剤遺伝子は、その非存在(欠損または不活化)が癌に至り得る、正常な遺伝子である。腫瘍抑制剤遺伝子は、細胞増殖および細胞分裂を緩和するタンパク質をコードする。癌は、両方の対立遺伝子に変異が存在する場合に生じる。

【0005】

腫瘍抑制剤遺伝子(TSG)は、ヒトの肺癌および他の癌の病原において主要な役割を果たす。肺癌細胞は、複数の公知の優性および劣性の癌遺伝子における変異および欠失を保有する(Sekidoら, 1998, Virmaniら, 1998)。公知のTSG(例えば、Rb, p53, および推定TSG)が、染色体領域、3p、5q、6p、8p、9pおよび11pならびに他の部位に見出された(Sekidoら, 1998, Gazdarら, 1994, Minna, 1994)。新たな肺腫瘍および腫瘍細胞の細胞遺伝学的研究および対立遺伝子型決定研究は、複数の部位で腫瘍細胞対立遺伝子欠損を示し、これは、1つ以上のこのようなTSGの存在を示唆する(Sekidoら, 1998, Virmaniら, 1998, Gazdarら, 1994, Minnaら, 1997)。しかし、第三染色体のショートアーム(3p)における、細胞遺伝学的変化および対立遺伝子の欠損は、約90%の小細胞肺癌(SCLC)および50%を超える非小細胞肺癌(NSCLC)において最も頻繁に関与することが示された(Sekidoら, 1998、

10

20

30

40

50

Gazdarら、1994、Minnaら、1997、Dalyら、1993)。SCLCおよびNSCLCは、肺腫瘍の2つの処置群であり、そして、4つの組織学的型から構成される。扁平上皮細胞細胞癌腫、腺癌、および大細胞癌は、NSCLC群に入る。小細胞肺癌は、SCLC群に入る。約75%の肺腫瘍がNSCLCである。転移は、SCLCの場合よりNSCLCの方がより遅い。SCLCは、固形腫瘍のうち最も転移性のものの1つである(Mabryら、1998)。さらに、類似の3pの変化は、肺に加え、いくつかの他の癌において見出された(例えば、腎臓(Bernuesら、1998、Zbarら、1987)、胸部(Gazdarら、1998、Sekidoら、1998)、頭頸部(Buchhagenら、1996)、膵臓(Gorunovaら、1998)、腎臓(Hughsonら、1998)、口腔(Uzawaら、1998)、および子宮頸管癌(Kersemaekersら、1998)。さらに、肺癌におけるホモ接合性欠失で規定されるようなTSGの群は、450kb領域で3p21.3において位置付けられ、そして単離された(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Hungら、1995、Sekidoら、1996、Wistubaら、1999)。肺癌新生物形成前の研究は、3p21の対立遺伝子欠損が、肺癌においてこれまで検出された最も初期の遺伝的異常であり、過形成損傷を生じることが示す；これは、1以上の3p-劣性癌遺伝子が、多くのヒトの癌(肺癌を含む)の分子病原論において「ゲートキーパー」として機能することを示し、ここで、これは、全ての場合の50%を超えて関与する可能性がある(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Hungら、1995、Sekidoら、1996、Wistubaら、1999、Kohnら、1999、ら、1999、Wistubaら、1999)。

10

20

## 【0006】

最近、ヒト染色体バンド3p21.3は、いくつかのSCLC株およびNSCLC株において重複したホモ接合性欠損を被ることが示された；TSGの候補が、いくつかのヒト癌においてこの重要な領域に位置付けられ、さらにTSG領域を規定した(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Hungら、1995、van den Bergら、1997)。この証拠は、この3p21の重要な領域における遺伝子が、肺癌細胞、腎臓癌細胞、および乳癌細胞においてテロメラーゼ媒介細胞不死性経路の調節に関与することを示す(Shay、1997、Shay、1998)。3p欠失が、喫煙する患者の肺腫瘍組織においてより頻繁に生じることがまた示された。さらに、3p21.3における、発癌性ベンゾ[a]ピレンジオールエポキシドに対する感受性の増大は、肺癌の危険性の増大に関連し、3p21.3が肺癌における発癌物質の分子標的であることを示唆した(Wuら、1998)。それらの研究に関わらず、これらの遺伝子の機能をさらに同定し、これらの癌との関連性を実証する必要性が依然存在する。

30

## 【0007】

(発明の要旨)

3p21.3における腫瘍抑制遺伝子は、現在開示されている：Gene26(CACNA2D2)(Gaoら、2000)、PL6、Beta\*(BLU)、LUCA-1(HYAL1)、LUCA-2(HYAL2)、123F2(RASSF1)、Fus1、101F6、Gene21(NPRL2)、およびSEM A3。腫瘍増殖および腫瘍進行の抑制、アポトーシスの誘導、細胞周期動力学の変更、およびテロメラーゼ活性抑制における個々の3pの遺伝子の機能は、インビトロおよびインビボにおける3pの遺伝子のリボソーム媒介移入および組換えアデノウイルスベクター媒介移入によって特徴付けられた。これはまた、Beta\*遺伝子の最初の開示である。

40

## 【0008】

従って、3p21.3の染色体位置を有する腫瘍抑制遺伝子を使用する方法を提供することが本発明の目的である。腫瘍抑制遺伝子、Beta\*を提供することがまた、目的である。さらに、これらの腫瘍抑制遺伝子が挿入され得る組換えアデノウイルスを構築する方法を提供することが目的の方法である。

## 【0009】

50

本発明の実施形態は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドである。配列番号1の配列を有する核酸がまた提供される。配列番号2のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドがさらに提供される。別の実施形態は、配列番号1の15の連続した塩基対またはこれの相補体を含む15～約100塩基対の核酸である。さらなる実施形態は、配列番号1の約20、25、30、40、50または100の連続した塩基対、またはこれの相補体を含む。

【0010】

本発明の別の実施形態は、配列番号2の10と約50との間の連続した残基を有する単離されたペプチドである。さらに、このペプチドは、配列番号2の15、20、25、または30の連続した残基を含み得る。本願において、「約」は、±2アミノ酸の以内であるとして定義される。

10

【0011】

なお別の実施形態は、配列番号2を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットであり、ここで、このポリペプチドは真核生物細胞において作動可能なプロモーターの制御下にある。別の実施形態において、この発現カセットのプロモーターは、コード配列に対して異種である。このプロモーターは、組織特異的かつ誘導的なプロモーターであり得る。別の実施形態において、発現カセットは、ウイルスベクターに含まれ得る。このウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、またはヘルペスウイルスベクターであり得る。さらなる実施形態において、この発現カセットはポリアデニル化シグナルを含み得る。

20

【0012】

別の実施形態は、配列番号2の配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含む細胞であり、ここで、このポリヌクレオチドは、真核生物細胞において作動可能なプロモーターの制御下に存在し、このプロモーターは、このポリヌクレオチドに対して異種である。

【0013】

本発明のなお別の実施形態は、配列番号2の配列を含むポリペプチドまたはこれの免疫学的フラグメントに免疫学的に結合するモノクローナル抗体である。検出可能な標識を有するモノクローナル抗体がまた、提供される。この標識は、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、および酵素であり得る。本発明の別の実施形態は、配列番号2を含むポリペプチドまたはこれの免疫学的フラグメントを含むポリペプチドに免疫学的に結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞である。さらなる実施形態は、ポリクローナル抗血清であり、この抗血清の抗体は、配列番号2を含むポリペプチドまたはこれの免疫学的フラグメントに免疫学的に結合する。

30

【0014】

なお別の実施形態は、配列番号1を含むDNAセグメントまたはこの相補体に、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離されかつ精製された核酸である。さらなる実施形態において、この核酸は、約15、17、20または25の塩基長である。

【0015】

本発明の別の実施形態は、組換えアデノウイルスを構築する方法であって、この方法は、以下を包含する：(a)シャトルベクターを提供する工程であって、このシャトルベクターは、アデノウイルス逆方向末端反復(ITSR)配列、プロモーターおよびポリA配列を含む発現カセット、このプロモーターの制御下にある導入遺伝子、およびこのITSR-プロモーター-導入遺伝子-ポリAセグメントの5'末端および3'末端の独特の制限部位を含む、工程；(b)この制限酵素部位で切断する工程；(c)E1領域およびE3領域全体を欠くアデノウイルスベクターにこの放出されたセグメントを連結し、この得られたベクターで細菌性宿主細胞を形質転換する工程；(d)この細菌性宿主細胞からベクターを得て、そしてこのベクターを消化してE1/E3欠失アデノウイルスゲノムを放出する工程；および(e)このアデノウイルスゲノムをE1発現宿主細胞中にトランスフェク

40

50

トする工程。さらなる実施形態において、この導入遺伝子は Gene 26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene 21、またはSEM A3である。別の実施形態において、このプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターであり得、そしてこのポリA配列は、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリA配列であり得る。

【0016】

本発明のなお別の実施形態は、組換えアデノウイルスを構築するための方法であって、この工程は、以下を含む：(a)シャトルベクターを提供する工程であって、このシャトルベクターは、アデノウイルス逆方向末端反復(ITR)配列、プロモーターおよびポリAシグナル配列を含む発現カセット、このプロモーターの制御下にある導入遺伝子、テトラサイクリン耐性-off応答エレメントおよびこのIRT-プロモーター-導入遺伝子-ポリAセグメントの5'末端および3'末端の独特の制限部位を含む、工程；(b)この制限酵素部位で切断する工程；(c)テトラサイクリン耐性-offトランス活性化因子遺伝子を含み、E1領域およびE3領域全体を欠くアデノウイルスベクターにこの放出されたセグメントを連結し、この得られたベクターで細菌性宿主細胞を形質転換する工程；(d)この細菌性宿主細胞からベクターを得て、そしてこのベクターを消化してE1/E3欠失アデノウイルスゲノムを放出する工程；および(e)このアデノウイルスゲノムをE1発現宿主細胞中にトランスフェクトする工程。さらなる実施形態において、この導入遺伝子は、Gene 26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene 21、またはSEM A3である。別の実施形態において、このプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターであり得、そしてこのポリA配列は、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリA配列であり得る。

【0017】

なお別の実施形態において、シャトルベクターがまた提供され、このシャトルベクターは、アデノウイルス逆方向末端反復(ITR)配列、プロモーターおよびポリA配列を含む発現カセット、Tet-Off応答エレメントおよびこのIRT-プロモーター-ポリAセグメントの5'末端および3'末端の独特の制限部位を含む。本発明の別の実施形態において、このプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターであり、そしてこのポリA配列はウシ成長ホルモン(BGH)ポリA配列である。上記のセグメント中の複数目的のクローニング部位がまた提供され、この部位は、上記のプロモーターと上記のポリA配列との間に位置付けられる。

【0018】

なお別の実施形態は、テトラサイクリン耐性off活性化因子遺伝子を含み、そしてE1領域およびE3領域の全体を欠くアデノウイルスベクターである。

【0019】

本発明の別の実施形態は、被験体における癌を診断する方法であって、以下の工程を包含する：(i)この被験体から生物学的サンプルを得る工程；および(ii)サンプル中の機能的な、Gene 26産物、PL6産物、Beta\*産物、LUCA-1産物、LUCA-2産物、123F2産物、Fus1産物、101F6産物、Gene 21産物、またはSEM A3産物の発現を評価する工程。さらなる実施形態において、このサンプルは、組織サンプルである。この組織サンプルは、脳組織、肺組織、肝臓組織、脾臓組織、腎臓組織、リンパ節、小腸組織、血液細胞組織、膵臓組織、結腸組織、胃組織、子宮頸部組織、胸部組織、子宮内膜組織、前立腺組織、精巣組織、卵巣組織、皮膚組織、頭頸部組織、食道組織、口腔組織、骨髄組織または血液組織であり得る。別の実施形態において、この評価する工程は、Gene 26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene 21、またはSEM A3をコードする核酸を検出する工程を包含する。検出する工程は、この核酸の増幅、核酸ハイブリダイゼーション、または配列決定を含み得る。別の実施形態において、この評価する工程は、Gene 26ポリペプチド、PL6ポリペプチド、Beta\*ポリペプチド、LUCA-1ポリペプチド、LUCA-2ポリペプチド、123F2ポリペプチド、Fus1ポリペプチ

ド、101F6ポリペプチド、Gene21ポリペプチド、またはSEM A3ポリペプチドを検出する工程を含む。Gene26ポリペプチド、PL6ポリペプチド、Beta\*ポリペプチド、LUCA-1ポリペプチド、LUCA-2ポリペプチド、123F2ポリペプチド、Fus1ポリペプチド、101F6ポリペプチド、Gene21ポリペプチド、またはSEM A3ポリペプチドを検出する工程は、ELISAまたは免疫組織化学を含み得る。なお別の実施形態において、この評価する工程は、野生型オリゴヌクレオチドまたは変異型オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを含み、このオリゴヌクレオチドはチップまたはウエハ上に配置される。本発明の別の実施形態において、Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3の発現は、正常組織中の、Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3の発現と比較される。別の実施形態において、この比較は、Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3の発現のレベルを評価する工程を包含する。

10

## 【0020】

別の実施形態は、Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3の機能的な対立遺伝子の1つまたは両方を欠失した非ヒトトランスジェニック動物である。類似の非ヒトトランスジェニック動物と比較して、Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3を過剰発現する非ヒトトランスジェニック動物が提供される。さらなる実施形態は、ゲノムが、誘導的プロモーターの制御下にある、Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3を含む発現カセットを含む、非ヒトトランスジェニック動物である。

20

## 【0021】

本発明の実施形態は、腫瘍細胞の増殖を抑制する方法であって、この方法は、以下の工程を包含する：この細胞を発現カセットに接触させる工程であって、この発現カセットは、以下：(a) Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3をコードする核酸；および(b) この腫瘍細胞で活性であるプロモーターを、この腫瘍細胞によるこの核酸の取り込みを可能にする条件下で含む工程。別の実施形態において、この腫瘍細胞は、以下に由来する：脳腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍、腎臓腫瘍、リンパ節腫瘍、小腸腫瘍、血球腫瘍、膵臓腫瘍、結腸腫瘍、胃腫瘍、子宮頸部腫瘍、乳房腫瘍、子宮内膜腫瘍、前立腺腫瘍、精巣腫瘍、卵巣腫瘍、皮膚腫瘍、頭頸部腫瘍、食道腫瘍、口腔組織腫瘍、または骨髄腫瘍。さらなる実施形態において、この核酸は、ウイルスベクターに含まれる。このウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクターであり得る。なお別の実施形態において、この核酸は、リポソームに含まれる。

30

## 【0022】

本発明の別の実施形態は、腫瘍細胞の表現型を変更する工程であって、この方法は、以下の工程を包含する：この細胞を発現カセットに接触させる工程であって、この発現カセットは、以下：(a) Gene26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene21、またはSEM A3をコードする核酸；および(b) この腫瘍細胞で活性であるプロモーターを、この腫瘍細胞によるこの核酸の取り込みを可能にする条件下で含む工程。別の実施形態において、この表現型は、以下からなる群より選択される：増殖、移動、接触、阻害、軟寒天増殖、細胞周期、浸潤性、腫瘍形成、および転移性潜在能力。なお別の実施形態において、このプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターである。

40

## 【0023】

50

別の実施形態は、癌に苦しむ被験体中の癌を阻害する方法であって、この方法は、以下の工程を包含する：(a) Gene 26 ポリペプチド、PL6 ポリペプチド、Beta\* ポリペプチド、LUCA-1 ポリペプチド、LUCA-2 ポリペプチド、123F2 ポリペプチド、Fus1 ポリペプチド、101F6 ポリペプチド、Gene 21 ポリペプチド、または SEM A3 ポリペプチドをコードする核酸；および(b) この被験体の腫瘍細胞で活性なプロモーターを含む発現カセットを被験体に投与する工程であって、これによってこのポリペプチドの発現が癌を阻害する、工程。さらなる実施形態において、この被験体は、ヒトである。他の実施形態において、この核酸は、Gene 26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene 21、または SEM A3 をコードする。別の実施形態において、この癌は、以下からなる群より選択される：脳癌、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、腎臓癌、リンパ節癌、小腸癌、血球癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、子宮頸部癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、皮膚癌、頭頸部癌、食道癌、口腔組織癌、および骨髄癌。なお別の実施形態において、この発現カセットは、ウイルスベクターに含まれる。このウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ならびにヘルペスウイルスベクターであり得る。別の実施形態において、この発現カセットは、リボソームに含まれる。別の実施形態において、この発現カセットは、ポリA配列をさらに含む。このポリA配列は、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリA配列であり得る。さらなる実施形態において、この発現カセットが、腫瘍内、腫瘍脈管構造内、腫瘍に対する局部、腫瘍の領域に、または全身的に投与される。

10

20

## 【0024】

この被験体に化学療法剤を投与することがまた、癌を阻害する方法において提供される。別の実施形態において、この化学療法は、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトセシン、イフォファミド(ifosfamide)、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア(nitrosurea)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン(pliocomycin)、マイトマイシン、エトボシド(VP16)、タモキシフェン、ラロキシフェン(raloxifen)、エストロゲンレセプター結合試薬、タキソール、ゲムシタビエン(gemcitabine)、ナベルピン(navelbine)、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター(frnesyl-protein transferase inhibitor)、トランスプラチナ(transplatinum)、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン(vincristin)、ビンブラスチンおよびメトトレキサート。被験体に放射線を与える工程がまた、提供される。別の実施形態において、この放射線は、癌部位に対して局所的に送達されるか、または全身照射である。この放射線は、線、X線、加速したプロトン、マイクロ波放射、UV放射、または、腫瘍細胞に対する指向された放射性同位体の送達を含み得る。なお別の実施形態において、第二の抗癌遺伝子が、被験体に投与され得る。この第二の抗癌遺伝子は腫瘍サプレッサーであり得る。この第二の抗癌遺伝子は、アポトーシスのインヒビターであり得る。別の実施形態において、この第二の抗癌遺伝子は、癌遺伝子アンチセンス構築物であり得る。

30

40

## 【0025】

本発明の実施形態は、癌を有する被験体を処置する方法であって、この方法は、以下の工程を包含する：Gene 26 ポリペプチド、PL6 ポリペプチド、Beta\* ポリペプチド、LUCA-1 ポリペプチド、LUCA-2 ポリペプチド、123F2 ポリペプチド、Fus1 ポリペプチド、101F6 ポリペプチド、Gene 21 ポリペプチド、SEM A3 ポリペプチドを被験体に投与する工程。別の実施形態において、この癌は、以下からなる群より選択される：脳癌、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、腎臓癌、リンパ節癌、小腸癌、血球癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、子宮頸部癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、皮膚癌、頭頸部癌、食道癌、口腔組織癌、および骨髄癌。さらなる実施形態において、このポリペプチドは、リボソームに含まれる。このリボソームは、N-(1-[2,3

50

- ジオレオイルオキシ ] プロピル) - N, N, N - トリメチルアンモニウム (DOTAP) およびコレステロールからなり得る。別の実施形態において、この被験体は、ヒトである。

【0026】

本発明の別の実施形態は、抗腫瘍活性のために候補物質をスクリーニングする方法であって、この方法は、以下の工程を包含する：(i) 機能的な、Gene 26 ポリペプチド、PL6 ポリペプチド、Beta\* LUCA-1 ポリペプチド、LUCA-2 ポリペプチド、123F2 ポリペプチド、Fusi ポリペプチド、101F'6 ポリペプチド、Gene 21 ポリペプチド、またはSEM A3 ポリペプチドを欠く細胞を提供する工程；(ii) この細胞を、この候補物質と接触させる工程；および(iii) この細胞におけるこの候補物質の効果を決定する工程。別の実施形態において、この細胞は、腫瘍細胞である。別の実施形態において、この決定する工程は、候補物質の存在下にあるこの細胞の1以上の特徴を、この候補物質の非存在下にある類似の細胞の同じ1以上の特徴と比較する工程を包含し得る。さらなる実施形態において、この特徴は、以下からな群より選択される：Gene 26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene 21、SEM A3の発現、ホスファターゼ活性、増殖、転移、接触障害、軟寒天増殖、細胞周期調節、腫瘍形成、腫瘍進行、転移、および組織浸潤。別の実施形態において、この候補物質は、化学療法剤または放射線療法剤である。低分子ライブラリーから選択される候補物質がまた、提供される。さらなる実施形態において、この細胞は、インビトロまたはインビボで接触される。

10

20

【0027】

本発明の実施形態は、抗腫瘍活性について候補物質をスクリーニングする方法であって、この方法は、以下の工程を包含する：(i) 細胞を提供する工程；(ii) この細胞を、この候補物質と接触させる工程；および(iii) Gene 26 ポリペプチド、PL6 ポリペプチド、Beta\* ポリペプチド、LUCA-1 ポリペプチド、LUCA-2 ポリペプチド、123F2 ポリペプチド、Fus1 ポリペプチド、101F6 ポリペプチド、Gene 21 ポリペプチド、またはSEM A3 ポリペプチドの発現における、この候補物質の効果を決定する工程。

【0028】

別の実施形態は、宿主細胞中にBeta\* ポリペプチドを生成する方法であって、この方法は、以下の工程を包含する：(a) この宿主細胞中で活性化プロモーターに作動可能に連結したBeta\* をコードする核酸を含む発現カセットを提供する工程；(b) この発現カセットをこの宿主細胞に移入する工程；および(c) このBeta\* ポリペプチドの発現を可能にする条件下でこの宿主細胞を培養する工程。

30

【0029】

本発明のな別の実施形態は、被験体の癌を診断する方法であって、この方法は、以下の工程を包含する：(i) この被験体から生物学的サンプルを得る工程；および(ii) Gene 26、PL6、Beta\*、LUCA-1、LUCA-2、123F2、Fus1、101F6、Gene 21、またはSEM A3のプロモーター領域の過剰メチル化を検出する工程。

40

【0030】

本発明の他の、目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかし、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、例示としてのみ与えられることが理解されるべきである。なぜならば、本発明の精神および範囲内の種々の変化および改変は、この詳細な説明から当業者にとって明らかとなるからである。

【0031】

(配列の要約)

配列番号1 = Beta\* (BLU)ヌクレオチド配列

配列番号2 = Beta\* (BLU)アミノ酸配列

50

(発明の詳細な説明)

腫瘍抑制遺伝子(TSG)は、ヒト肺癌および他の癌の病因において主要な役割を果たす。肺癌細胞は、複数の公知の優性および劣性の癌遺伝子における変異および欠失を有する(Sekidoら、1998、Virmaniら、1998)。肺癌において変化されていることが見出されている他のTSGは、p53、p16、Rb、およびFHIT-1(Mabryら、1998)である。公知のTSG(例えば、Rb、p53など)は、染色体領域3p、5q、6p、8p、9pおよび11p、ならびに他の部位に見出されている(Sekidoら、1998、Gazdarら、1994、Minnaら、1994)。新鮮な肺腫瘍および腫瘍細胞の細胞遺伝子学研究および対立遺伝子型決定研究は、複数の部位での腫瘍細胞対立遺伝子欠損を示し、これは、1以上のこのようなTSGの存在を示唆する(Sekidoら、1998、Virmaniら、1998、Gazdarら、1994、Minnaら、1997)。これらの遺伝子座は、喫煙者の肺癌に対する素因を理解するにおいて重要である(Mabryら、1998)。ヘテロ接合性の損失(LOH)は、他の固形腫瘍と同様に、肺癌において一般的である。肺癌においてヘテロ接合性の損失を受ける染色体遺伝子座のいくつかは、以下である: 9p21-p22、13q14、17p13.1、3p12-p14、3p21、3p25、5q21、11q12-q24および22q。肺癌に対する脆弱性は、複数の遺伝子座で生じる遺伝的差異に起因し得る。これらの遺伝子は、タバコの発癌物質の代謝において役割を果たし得る。第3染色体のショートアーム(3p)上の細胞遺伝的变化および対立遺伝子の損失は、最も頻繁には、小細胞肺癌(SCLS)の約90%において、および50%を超える非小細胞肺癌(NSCLC)において関与することが示されている(Sekidoら、1998、Gazdarら、1994、Minnaら、1997、Dalyら、1993)。さらに、より小さい3pの変化は、いくつかの他の癌(例えば、腎(Bernuesら、1998、Zbarら、1987)、胸部(Gazdarら、1998、Sekidoら、1998)、頭頸部(Buchhagenら、1996)、膵臓(Gorunovaら、1998)、腎臓(Hughsonら、1998)、口腔(Uzawaら、1998)、および子宮頸癌(Kersemaekerら、1998、Wistubaら、1997))において確認されている。

【0032】

近年、ヒト染色体帯3p21.3が、いくつかのSCLC株およびNSCLC株において重複するホモ接合性欠失を受けることが示された。TSGの候補は、いくつかのヒトの癌において、この重要な領域に位置付けられ、これは、さらにTSG領域を規定する(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Wistubaら、1999、vandenBergら、1997)。この証拠は、この3p21の重要な領域における遺伝子が、肺癌細胞、腎癌細胞および乳癌細胞におけるテロメラーゼ媒介性の細胞不死化経路の調節に関与することを示す(Shay、1997、Shay、1998)。細胞ハイブリッドおよび微小核体第3染色体移入研究は、ヒト肺癌細胞株、腎癌細胞株および卵巣癌細胞株において悪性を抑制するヒトの第3染色体遺伝子の能力を実証している(Sekidoら、1998、Sanchezら、1994)。3p欠失が、喫煙患者の肺腫瘍組織においてより頻繁に生じること示されている。さらに、3p21.3での発癌物質ベンゾ[a]ピレンジオールエポキシドに対する感受性の上昇が、肺癌の危険性の増加に関連付けられ、これは、3p21.3が、肺癌における発癌物質の分子標的であり得ることを示唆する(Wuら、1998)。

【0033】

本発明は、肺癌に関与する遺伝子座を同定する。肺癌におけるホモ接合性欠失によって定義されるような、TSGのグループ(Fus1、101F6、Gene21、Gene26、PL6、Luca1、Luca2、123F2、Beta\*およびSEM A3)は、3p21.3において450kb領域中に位置付けられそして単離されている(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Hungら、1997、Sekidoら、1996、Wistubaら、1999)。肺癌新生物発生前の研究は、3p21対立

10

20

30

40

50

遺伝子欠損が、これまでに検出された中で、肺癌において最も早期の遺伝子異常であることを示す。1以上の3p劣性癌遺伝子は、多くのヒトの癌（肺癌を含む）の分子性病因における「ゲートキーパー」として機能し、おそらく、全症例の50%を超えて関与している（Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Hungら、1997、Sekidoら、1996、Wistubaら、1999、Kohnら、1999、Wistubaら、1999）（図3）。

#### 【0034】

(1) 3p21.3において450kb領域中に位置付けられた3p遺伝子が、肺癌におけるホモ接合性欠失によって規定され；(2) 3p21対立遺伝子欠損が、肺癌および他の腫瘍において検出された最も早期の遺伝子異常のうちの1つであり；(3) これらの3p遺伝子のヘテロ接合性の欠損、ホモ接合性欠失および異常が、肺癌を含む多くのヒトの癌の病因に関連し（おそらく、前症例の50%を超えて関与している）；そして(4) 複数の3p遺伝子が、腫瘍サプレッサー遺伝子として機能するか、またはこの3p21.3領域が腫瘍サプレッサー領域として機能するので、これらの3p遺伝子の遺伝的/細胞遺伝的な状態および機能に基づいて開発された技術および分子ツールは、種々のヒトの癌の早期検出、診断、およびモニタリング、ならびに予防および治療的試行のために極めて価値がある。

#### 【0035】

(I. 腫瘍サプレッサー遺伝子領域としての3p遺伝子の機能)  
腫瘍サプレッサー遺伝子として遺伝子の機能を規定するための基準の1つは、それらの遺伝子の不活性化によって特徴付けられる腫瘍表現型が、これらの遺伝子の野生型対立遺伝子の置換によってレスキューされ得ることを実証することである。頻繁なヘテロ接合性の欠損(LOH)、ホモ接合性欠失、またはいくつかの場合において、遺伝子の異常な転写物および変異が、発癌物質の標的であり、そしてその遺伝子の機能の欠損が、ヒトの癌を導く場合、野生型遺伝子でのそれらの異常な遺伝子の置換が、Rbまたはp53腫瘍サプレッサー遺伝子によって示される腫瘍抑制と同様の腫瘍抑制(インビト口での腫瘍細胞増殖の阻害、腫瘍形成能および腫瘍増殖の抑制、ならびにインビボでの腫瘍細胞の浸潤および転移の阻害を含む)を生じる(Pellegrataら、1996、Polyaら、1996、Wangら、1996)。

#### 【0036】

腫瘍サプレッサー遺伝子としての3p遺伝子の同定は、複数の部位での腫瘍細胞対立遺伝子欠損およびこれらの領域におけるホモ接合性欠失を示す、新鮮な腫瘍および腫瘍細胞株の細胞遺伝学的研究および対立遺伝子型決定研究に基づいた。これらの3p遺伝子のいくつかは、現在利用可能なデータベース中のいくつかの公知の遺伝子に対して、DNAおよびその推定アミノ酸配列における種々の程度の相同性を共有するが；癌の病因および腫瘍形成能におけるこれらの3p遺伝子または3p21.3領域の機能は、以前は未知であった。細胞ハイブリッドおよび微小核体第3染色体移入研究は、ヒト肺癌細胞株、腎癌細胞株および卵巣癌細胞株、ならびにマウスA9線維肉腫細胞において悪性を抑制する、ヒトの第3染色体遺伝子の能力を実証しているが、A549ヒト肺癌細胞への第3染色体全体の導入に関連する1例のみが、報告されているだけである(Minnaら、1997、Sanchezら、1994、Killaryら、1992、Killaryら、1995、Satoら、1993)。

#### 【0037】

本発明において、腫瘍増殖および腫瘍進行の抑制、アポトーシスの誘導、細胞周期運動の改変、ならびにテロメラーゼ活性の抑制における個々の3p遺伝子の機能が、インビト口およびインビボでの3p遺伝子のリポソーム媒介移入および組換えアデノウイルスベクター媒介移入によって初めて特徴付けられ、そして腫瘍サプレッサー領域としての3p遺伝子の機能の概念が、この重要な3p21.3領域における複数の3p遺伝子に関する腫瘍サプレッサー活性に基づいて初めて展開された。これらの3p腫瘍サプレッサーの知見は、関連する癌を処置するための新しい治療剤の開発を可能にする。

10

20

30

40

50

## 【0038】

アデノウイルスベクターは、インビトロおよびインビボでの最も効率的な遺伝子送達系であることが見出されている (Adamsら、1996、Fangら、1999)。組換えアデノウイルスベクターは、基本研究の遺伝子移入および臨床適用のために広範に使用されている (Rothら、1998、Roth、1998、Chengalvalaら、1991)。しかし、アデノウイルスDNAのインビトロ操作は、その大きいゲノムサイズおよび限定された固有かつ有用な制限部位 (これらが、組換えアデノウイルスベクターの構築を、比較的時間のかかる労力を要するものにする) に起因して、非常に困難である。このような組換えアデノウイルスを構築するための以下の2つの従来の方法が、よく実証されている: インビトロ連結法 (Berkner, 1998) およびインビボ相同組換え法 (Bettら、1994)。インビトロ連結法は、導入遺伝子をプラスミドベクターにサブクロニングして、ウイルスゲノムの左末端および哺乳動物遺伝子発現カセットを含むセグメントを構築する第1の工程からなり、次いで、組換えベクターが、ウイルスゲノムへのそのセグメントのインビトロ連結によって生成され、次いで、再構築された組換えウイルス分子を許容性の293細胞にトランスフェクトする。HiruyukiおよびKayは、インビトロ連結法を開示する (Mizuguchiら、1998)。もう一方の方法は、重複するフラグメントを有する2つのプラスミドを使用して、293細胞における相同組換えによる相同組換えによって組換えウイルスを生成する。これらの方法についての主要な制限は、非組換えウイルスのバックグラウンドの生成、インビボ相同組換の低い頻度、および純粋な組換えベクターを単離するための繰り返しのブランクスクリーニングである。293細胞において同時トランスフェクトされた2つのプラスミドの相同組換え (Bettら、1994)、酵母細胞中の感染性酵母人工染色体 (YAC) におけるアデノウイルスゲノムの標的化された改変 (Ketnerら、1994)、コスミドパッケージング細菌におけるコスミドアデノウイルスベクター (Fuら、1997)、および *recA*<sup>+</sup> 細菌株におけるプラスミド (Chartierら、1996、Herら、1998) に基づく、組換えアデノウイルスベクターの構築のためのいくつかの代替手段が存在する。これらの方法は、より効率的であるが、より複雑であり、さらなる酵母宿主または特別な細菌株の使用を必要とし、これらの宿主における相同組換の低い効率および *recA*<sup>+</sup> 細菌株によって保持されるプラスミド中の組換えアデノウイルスゲノムの不安定性に直面する。

## 【0039】

比較すると、現在の Ad-RAP系は、遺伝子治療のための組換えアデノウイルスベクターの構築について、非常に簡単であり、効率的であり、そして迅速である。これらの系は、通常の分子生物学的試薬および通常使用される細胞株を使用する、簡単なインビトロ連結を必要とする。得られた組換えアデノウイルスゲノム含有プラスミドは、容易にスクリーニングされ得、かつ安定である。その後の、許容性の293細胞への、リボソーム (DOTAP) によって媒介される直線化した組換えアデノウイルスDNAのトランスフェクションは、非常に効率的であり、そして組換えアデノウイルスの均質な集団が、迅速に生成され得る。

## 【0040】

組換えアデノウイルスベクター Ad-3pを使用して、任意の他の利用可能な遺伝子送達系および遺伝子送達技術よりもはるかに高い効率で、インビトロおよびインビボによって3p遺伝子を送達し得る。アデノウイルスベクターによって媒介される種々の細胞型における形質導入の高い効率および導入遺伝子の高レベルの発現に起因して、Ad-3pベクターは、インビトロおよびインビボでこれらの腫瘍細胞サプレッサー遺伝子の生物学的機能および機構を研究するための効果的なツールとして使用され得る。Ad-3pは、Ad-3pベクターまたはプロタミン-Ad-3p複合体の静脈内注射または腫瘍内注射のいずれかによって、種々の腫瘍 (肺、結腸、乳房、胃、子宮頸部、ならびに頭頸部、前立腺、および膵臓) における腫瘍形成能、腫瘍抑制、および転移プロセスの制限を限定するために使用され得る。

## 【0041】

多くの場合、いくつかの遺伝子（例えば、Bak、Bax、FasL）の発現は、宿主293細胞に対して高度に毒性であり、これは、上記のいずれかの方法および手順による、このような遺伝子を保有する組換えアデノウイルスの構築および生成を極めて困難なものにし、そして時折、不可能なものにする。現在のAd-RAP-TetR-Off系は、このような組換えアデノウイルスベクターを首尾よく構築および生成するために使用され得る。アデノウイルスベクターにおける導入遺伝子の発現は、細胞培養培地へのテトラサイクリンの添加によって停止され得、宿主細胞に対する遺伝子の毒性効果は、回避され得、そして組換えアデノウイルスは、通常どおり、293細胞において生成される。いくつかの他の系（例えば、二成分アデノウイルスベクター系（Kagawara、1999））が、このような組換えアデノウイルスベクターを首尾よく構築するために開発されている。しかし、一方のウイルスベクター中の導入遺伝子の発現が、もう一方のウイルスベクターのトランス活性化因子遺伝子の発現に依存し、つまり、2つのアデノウイルスベクターが、インビトロおよびインビボで導入遺伝子発現に必要とされ、これは、次いで、インビボでのこのような系の適用を制限してきた。比較すると、Ad-TetR-Offベクター系において、トランス活性化因子TetR-Off遺伝子およびTetR-Off応答エレメント（TRE）が、同じアデノウイルスベクターに共存し、そして従って、導入遺伝子の発現が、テトラサイクリンインデューサーの非存在下および存在下で1つのベクターにおいて開始または停止され得る。さらに、導入遺伝子は、TRE調節プロモーターの制御下にあるので、導入遺伝子の発現のレベルは、インビトロおよびインビボでのテトラサイクリン投与によって効率的に調節される。まとめると、Ad-RAP-Tet-Off系のこれらの新規な特徴は、この系を、細胞傷害性遺伝子を保持する組換えアデノウイルスベクターの迅速かつ首尾よい構築および生成のための有用な新しいツールにする。

## 【0042】

3p領域のヘテロ接合性欠失またはホモ接合性欠失のいずれかを含む肺癌細胞株への、リポソーム媒介またはアデノウイルス媒介の一過性のトランスフェクションによる、個々の野生型3p21.3遺伝子の導入は、ヌードマウスにおいて、腫瘍細胞増殖を制限し、アポトーシスを誘導し、そして細胞周期運動を改変し、腫瘍増殖および腫瘍進行を抑制した。種々のレベルの細胞増殖の阻害、アポトーシスの誘導、および細胞周期運動の改変が、Ad-Fus1、Ad101F6およびAd-Gene21形質導入ヒト肺癌細胞H1299、A549およびH460（これらは、3p遺伝子を欠失しているか、または異常な3p遺伝子を有する）において観察された。しかし、Ad-Fus1、Ad101F6およびAd-Gene21形質導入正常HBE細胞およびH358細胞（これらは、野生型3p遺伝子を含む）においては、細胞増殖に対する有意な阻害効果は観察されなかった。従って、観察された細胞増殖阻害は、これらの遺伝子の通常の細胞傷害性に起因しなかった。これらのAd-3pトランスフェクト体における3p遺伝子の過剰発現は、定量的リアルタイムRT-PCRによって確かめられた。腫瘍増殖は、ヌードマウスにおけるH1299およびA549異種移植片中のAd-101F6、Ad-Fus1およびAd-Gene21ベクターの腫瘍内注射を介する、101F6、Fus1およびGene21の過剰発現によって、有意に抑制された。さらに、肺転移性腫瘍増殖もまた、実験的A549転移を保有するヌードマウスにおけるプロタミン-複合体化Ad-101F6、Ad-Fus1およびAd-Gene21の全身注射によって、有意に阻害された。まとめると、これらの結果は、複数の3p遺伝子が、腫瘍サプレッサー遺伝子としてかまたは腫瘍サプレッサー領域として、インビトロおよびインビボで機能すること、およびこれらの新しく同定され特徴付けられた3p腫瘍サプレッサー遺伝子またはこの3p腫瘍サプレッサー領域が、リポソーム-3p複合体、3p遺伝子を含む組換えアデノウイルスベクター、および本発明において開発された局所的または全身的遺伝子送達系のような、分子ツールを使用して、癌遺伝子治療のために使用され得ることを示す。肺癌および他の癌における野生型3p21.3遺伝子およびそれらの変異形態の同定および機能的特徴付けは、肺癌および他の腫瘍のための治療の開発における重要な段階を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0043】

(A. 3p21.3の背景)

肺癌におけるホモ接合性欠失によって定義されるような、TSGのグループは、3p21.3において450kb領域中に位置付けられそして単離されている(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Hungら、1995、Sekidoら、1996、Wistubaraら、1999)。肺癌新生物発生前の研究は、3p21対立遺伝子欠損が、これまでに検出された中で、肺癌において最も早期の遺伝子異常であることを示し、これは、過形成病変を生じる。1以上の3p劣性癌遺伝子は、多くのヒトの癌(肺癌を含む)の分子性病因における「ゲートキーパー」として機能し、おそらく、全症例の50%を超えて関与している(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Hungら、1995、Sekidoら、1996、Wistubaraら、1999、Kohnoraら、1999、Wistubaraら、1999)。

10

## 【0044】

近年、ヒト染色体帯3p21.3が、いくつかのSCLC株およびNSCLC株において重複するホモ接合性欠失を受けることが示された。TSGの候補は、いくつかのヒトの癌において、この重要な領域に位置付けられ、これは、さらにTSG領域を規定する(Sekidoら、1998、Minnaら、1997、Wistubaraら、1999、Kohnoraら、1999、Wistubaraら、1999、van den Bergら、1997)。この3p21の重要な領域における遺伝子は、肺癌細胞、腎癌細胞および乳癌細胞におけるテロメラーゼ媒介性の細胞不死化経路の調節に関与する(Shay、1997、Shay、1998)。3p欠失が、喫煙患者の肺腫瘍組織においてより頻繁に生じることも示されている。さらに、3p21.3での発癌物質ベンゾ[a]ピレンジオールエポキシドに対する感受性の上昇が、肺癌の危険性の増加に関連付けられ、これは、3p21.3が、肺癌における発癌物質の分子標的であり得ることを示唆する(Wuら、1998)。

20

## 【0045】

(B. 3p21.3タンパク質)

Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、およびSEM A3分子全体に加えて、本発明はまた、これらのポリペプチドのフラグメントに関し、これらのフラグメントは、腫瘍抑制活性を維持してもしなくてもよい。各タンパク質の全長は、Fus1=161アミノ酸、101F6=222アミノ酸、Gene21=203アミノ酸、Gene26=1205アミノ酸、Beta\*=440アミノ酸、Luca1=435アミノ酸、Luca2=473アミノ酸、PL6=351アミノ酸、123F2=431アミノ酸、およびSEM A3=749アミノ酸である。その分子のN末端を含むフラグメントは、コード領域内の翻訳終止部位の遺伝子操作によって生成され得る(以下に議論する)。あるいは、プロテアーゼとして公知のタンパク質分解酵素でのFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、およびSEM A3分子の処理は、種々のN末端フラグメント、C末端フラグメントおよび内部フラグメントを生成する。フラグメントの例としては、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またはそれ以上のアミノ酸長のBeta\*配列の連続する残基が挙げられ得る。これらのフラグメントは、公知の方法(例えば、沈殿(例えば、硫酸アンモニウム)、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(免疫アフィニティークロマトグラフィーを含む)または種々のサイズ分離(沈降、ゲル電気泳動、ゲル濾過))に従って精製され得る。

30

40

## 【0046】

(1.3p.21.3タンパク質の精製)

Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luc

50

a 2、P L 6、1 2 3 F 2、およびS E M A 3またはそれらの改変体を精製することが望ましくあり得る。タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、1つのレベルでの、ポリペプチド画分および非ポリペプチド画分への細胞環境の粗分画を含む。他のタンパク質からポリペプチドを分離して、目的のポリペプチドは、部分精製または完全精製（または均質なまでの精製）を達成するために、クロマトグラフィー技術および電気泳動技術を使用してさらに精製され得る。純粋なペプチドの調製に特に適切な分析方法としては、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；ドデシル硫酸ナトリウム/ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S / P A G E）；等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に有効な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（F P L C）またはH P L Cである。

10

**【 0 0 4 7 】**

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量するための種々の方法は、本開示を考慮して当業者に公知である。これらには、例えば、活性画分の比活性の決定、またはS D S / P A G E分析により画分内のポリペプチドの量の評価が挙げられる。

**【 0 0 4 8 】**

タンパク質精製における使用に適切な種々の技術が、当業者に周知である。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、P E G、抗体などを用いる沈殿、または熱変性とその後の遠心分離；クロマトグラフィー工程（例えば、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）；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；ならびにこのような技術および他の技術の組み合わせが挙げられる。当該分野で一般に知られるように、種々の精製工程を実施する順序が変更され得るか、または特定の工程が省略され得、そしてこれらは、実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製のための適切な方法をなお生じると考えられる。

20

**【 0 0 4 9 】**

S D S / P A G Eの異なる条件によって、ポリペプチドの移動が（時には有意に）変動し得ることが公知である（C a p a l d iら、1977）。従って、異なる電気泳動条件下では、精製または部分精製された発現産物の見かけの分子量が変動し得ることが理解される。

**【 0 0 5 0 】**

高速液体クロマトグラフィー（H P L C）は、並外れたピーク分解能を有する非常に迅速な分離によって特徴付けられる。これは、非常に微細な粒子および高い圧力の使用を使用して、十分な流速を維持することによって達成される。分離は、約数分またはせいぜい1時間で完了され得る。さらに、非常に少ない容量のサンプルのみが必要とされるだけである。なぜなら、ポイド容量がベッド容量の非常に少ない割合であるほどに、粒子は、非常に小さくかつ密集されているからである。また、サンプルの濃度は、低くあり得る。なぜなら、バンドは、サンプルの非常にわずかな希釈物が存在するほどに狭いからである。

30

**【 0 0 5 1 】**

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、分子サイズに基づく特別のタイプの分配クロマトグラフィーである。ゲルクロマトグラフィーを支持する理論は、そのカラム（これは、小さな孔を含む不活性物質の小さな粒子で調製される）が、より小さな分子からより大きな分子を、それらが孔の中または周辺を通り抜ける際に、それらのサイズに依存して分離することである。粒子が作製される材料がこれらの分子を吸着しない限り、流れの速度を決定する唯一の因子は、そのサイズである。従って、形状が比較的一定である限り、分子は、減少サイズ様式でカラムから溶出される。ゲルクロマトグラフィーは、異なるサイズの分子を分離することについて卓越している。なぜなら、分離は、p H、イオン強度、温度などのような全ての他の因子に依存しないからである。また、実質的に吸着は存在せず、ゾーンの広がりも小さく、そして溶出容積は、単純に分子量に関連する。

40

**【 0 0 5 2 】**

50

アフィニティークロマトグラフィーは、単離されるべき物質とそれが特異的に結合し得る分子との間の特異的な親和性に依存するクロマトグラフィー手順である。これは、レセプター-リガンド型の相互作用である。カラム材料は、不溶性マトリクスに結合パートナーの1つを共有結合カップリングさせることにより合成される。次いで、カラム材料は、溶液から物質を特異的に吸着させ得る。溶出は、結合が生じない条件に、条件を変える（pH、イオン強度、温度などを変更する）ことによって生じる。

【0053】

マトリクスは、それ自体で有意な程度で分子を吸着せず、かつ広範囲の化学的、物理的および熱安定性を有する物質であるべきである。そのリガンドは、その結合特性に影響しないようにカップリングされるべきである。そのリガンドはまた、比較的強固な結合を提供すべきである。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可能であるべきである。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、免疫アフィニティークロマトグラフィーである。本発明に従う使用に適切な抗体の生成を、以下に議論する。

【0054】

本発明はまた、本発明の種々の実施形態における使用のための、より小さいFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、およびSEM A3関連ペプチドを記載する。これらの比較的小さいサイズに起因して、本発明のペプチドは、従来技術に従って、溶液中または固体支持体上で合成され得る。種々の自動合成機が、市販されており、公知のプロトコルに従って使用され得る。例えば、StewartおよびYoung, (1984); Tamら, (1983); Merrifield, (1986); ならびにBaranyおよびMerrifield (1979) (これらの各々は、参考として本明細書中に援用される)を参照のこと。本明細書中に記載の選択された領域に対応する、短いペプチド配列、または重複ペプチドのライブラリー（通常約6アミノ酸から約35~50アミノ酸まで）は、容易に合成され得、次いで、反応性のペプチドを同定するために設計されたスクリーニングアッセイにおいてスクリーニングされ得る。あるいは、組換えDNA技術を使用し得る。ここでは、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列が、発現ベクターに挿入され、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトされ、そして発現に適切な条件下で培養される。

【0055】

本発明はまた、抗体の産生に関連する動物の免疫のための抗原としての、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、およびSEM A3のタンパク質またはペプチドの使用を提供する。生体特異的(biospecific)または多価組成物あるいはワクチンが生成される。これらの組成物の調製において使用される方法は、当業者に知られており、そして動物への投与に適切(すなわち、薬学的に受容可能)であることが想定される。

【0056】

(2.Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、およびSEM A3の改変体)  
これらのポリペプチドのアミノ酸配列改変体は、置換改変体、挿入改変体または欠失改変体であり得る。欠失変異体は、機能または免疫学的活性に必須でない、ネイティブタンパク質の1以上の残基を欠失する。別の一般的なタイプの欠失改変体は、分泌シグナル配列またはタンパク質が細胞の特定の部分に結合するのを指向するシグナル配列を欠失する欠失改変体である。挿入変異体は、代表的に、ポリペプチドの非末端点での物質の付加を包含する。これには、免疫反応性エピトープの挿入または単なる一残基の挿入が挙げられ得る。末端付加は、融合タンパク質と呼ばれる。

【0057】

置換改変体は、代表的には、タンパク質内の1以上の部位でのあるアミノ酸の別のアミノ酸での交換を含み、そしてこれは、ポリペプチドの1以上の特性(例えば、タンパク質分

10

20

30

40

50

解性切断に対する安定性)を、他の機能または特性の損失を伴うことなく調節するように設計され得る。この種の置換は、好ましくは、保存的であり、すなわち、あるアミノ酸が、類似の形状および電荷のアミノ酸と置換される。保存的置換は、当業者に周知であり、そしてこれらには、以下の変化が含まれる：アラニンからセリン；アルギニンからリジン；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジン；アスパラギン酸からグルタミン酸；システインからセリン；グルタミンからアスパラギン；グルタミン酸からアスパラギン酸；グリシンからプロリン；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミン；イソロイシンからロイシンまたはバリン；ロイシンからバリンまたはイソロイシン；リジンからアルギニン；メチオニンからロイシンまたはイソロイシン；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；セリンからスレオニン；スレオニンからセリン；トリプトファンからチロシン；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニン；およびバリンからイソロイシンまたはロイシン。

【0058】

以下は、等価的またはさらには改善された第2世代の分子を作製するためのタンパク質のアミノ酸変化に基づく議論である。例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位のような構造との相互作用結合能力の顕著な損失を伴うことなく、特定のアミノ酸が、他のアミノ酸で置換され得る。タンパク質の生物学的機能を規定するのはタンパク質の相互作用性の能力および性質であるので、特定のアミノ酸の置換は、タンパク質配列およびその基本となるDNAコード配列において作製され、そしてそれにも拘らず、同様の特性を有するタンパク質を獲得し得る。従って、以下に議論されるように、それらの生物学的有用性または活性の顕著な損失を伴うことなく、種々の変化が、遺伝子のDNA配列において作製され得ることが、本発明者によって意図される。表1は、特定のアミノ酸をコードするコドンを示す。

【0059】

アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。種々の前述の特性を考慮する例示的置換は、当業者に周知であり、そしてこれらには、以下が挙げられる：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；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシン。

【0060】

(C. 核酸)

Fus 1、101F6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL6、123F2、およびSEM A3は、450 kbの重要な領域における、3p21.3の染色体位置で見出される。これらは、3p21.3において以下の順序で見出される：Gene 26、PL6、101F6、Gene 21、Beta\*、123F2、Fus 1、Luca 2、Luca 1、およびSEM A3。各々の長さは、Fus 1 = 1696 核酸、101F6 = 1117 核酸、Gene 21 = 1696 核酸、Gene 26 = 5482 核酸、Beta\* = 1746 核酸、Luca 1 = 2565 核酸、Luca 2 = 1783 核酸、PL6 = 1860 核酸、123F2 = 1502 核酸、およびSEM A3 = 2919 核酸である(図5)。

【0061】

さらに、本発明は本明細書中に開示される特定の核酸に限定されないことが明らかであるはずである。以下に議論されるように、「Fus 1、101F6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL6、123F2、またはSEM A3 遺伝子」は、種々の異なる塩基を含み得、そしてなお、本明細書中に開示された遺伝子と機能的に識別不能な(いくつかの場合において構造的に識別不能な)対応するポリペプチドを生成する。

【0062】

本発明に従う核酸は、本明細書中に開示される、Fus 1、101F6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL6、123F2、およびSE

10

20

30

40

50

M A 3の遺伝子全体、F u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2、およびS E M A 3のドメイン、またはF u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2、およびS E M A 3の配列の任意の他のフラグメントをコードし得る。核酸は、ゲノムDNAに由来し得る（すなわち、特定の生物のゲノムから直接的にクローニングされ得る）。しかし、他の実施形態において、この核酸は、相補的DNA（cDNA）を含む。

【0063】

用語「cDNA」は、テンプレートとしてメッセンジャーRNA（mRNA）を使用して調製されるDNAをいうことが意図される。ゲノムDNAあるいはゲノムのテンプレート、プロセシングされていないRNAテンプレート、または部分的にプロセシングされたRNAテンプレートから重合されるDNAに対して、cDNAを使用する利点は、cDNAは、対応するタンパク質のコード配列を主に含むということである。非コード領域が最適な発現に必要とされる場合、またはイントロンのような非コード領域がアンチセンス手法で標的化される場合のように、全長ゲノム配列または部分ゲノム配列が好ましい場合はあり得る。

10

【0064】

所定の種由来の所定のF u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2、またはS E M A 3が、わずかに異なる核酸配列を有するが、それでもなお同じタンパク質をコードする天然の改変体（表1）によって表され得ることがまた意図される。

20

【0065】

本願において使用される場合、用語「配列番号1の核酸配列を有するポリヌクレオチド」は、全ての細胞性核酸を含まない単離された核酸分子をいう。機能的に等価なコドンは、同じアミノ酸をコードするコドン（例えば、アルギニンまたはセリンについての6つのコドン（表1））であり、そして生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンもまたいう。

【0066】

【表1】

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				10
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			
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					20
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				

本発明のDNAセグメントは、上記のように、生物学的に機能的に等価な Fus 1、10 40  
 1 F 6、Gene 2 1、Gene 2 6、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、  
 1 2 3 F 2、および SEM A 3 のタンパク質およびペプチドをコードするものを含む。  
 このような配列は、核酸配列およびそれによりコードされるタンパク質内に天然に存在す  
 ることが公知である、コドン縮重およびアミノ酸の機能的等価性の結果として生じ得る。  
 あるいは、機能的に等価なタンパク質またはペプチドは、組換えDNA技術の適用を介し  
 て作製され得、ここで、タンパク質構造における変化は、交換されるアミノ酸の特性の考  
 慮に基づいて、操作され得る。ヒトによって設計された変化は、以下に記載のように、部  
 位指向型変異誘発技術の適用を介して導入され得るか、またはランダムに導入されそして  
 所望の機能について後にスクリーニングされ得る。

【 0 0 6 7 】

## (D. ハイブリダイゼーション)

当然、本発明はまた、Fus 1、101F6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL6、123F2、およびSEM A3をコードする配列に相補的であるかまたは本質的に相補的であるDNAセグメントを包含する。「相補的」である核酸配列は、標準的なワトソン-クリック相補性規則に従って塩基対形成し得る核酸配列である。本明細書中で使用される場合、用語「相補的(な)」は、上に示されるヌクレオチド比較によって評価され得るように規定されるような、または本明細書中に記載されるような比較的ストリンジェントな条件下で上述の核酸セグメントにハイブリダイズし得るような、実質的に相補的である核酸配列を意味する。このような配列は、Fus 1、101F6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL6、123F2、およびSEM A3のタンパク質全体、またはそれらの機能的もしくは非機能的なフラグメントをコードし得る。

10

## 【0068】

あるいは、ハイブリダイズするセグメントは、より短いオリゴヌクレオチドであり得る。17塩基長の配列は、ヒトゲノム中に一度のみ生じるはずであり、従って、固有の標的配列を特定するのに十分である。より短いオリゴマーがインピボでの接近性を作製および増加するのにより容易であるが、多数の他の要因が、ハイブリダイゼーションの特異性を決定することに関与している。オリゴヌクレオチドのその相補的な標的に対する結合親和性および配列特異性の両方は、長さの増加と共に増加する。他のオリゴヌクレオチドも意図されるが、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれより大きい塩基対の例示的なオリゴヌクレオチドが使用されることが意図される。250、500、または1000塩基およびそれより大きいものをコードするより長いポリヌクレオチドも同様に意図される。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、サザンプロットおよびノーザンプロット、インサイチュ組織ハイブリダイゼーションにおけるプローブとして、そして増幅反応におけるプライマーとしての用途が見出される。

20

## 【0069】

従って、本発明のヌクレオチド配列は、DNAおよび/またはRNAの相補的なストレッチと二重鎖分子を選択的に形成するこれらの能力について、またはサンプル由来のDNAまたはRNAの増幅のためのプライマーを提供するために、使用され得る。想定される適用に依存して、標的配列についてのプローブまたはプライマーの種々の程度の選択性を達成するために、種々のハイブリダイゼーション条件を使用することが所望される。

30

## 【0070】

特定の適用(例えば、部位指向型変異誘発によるアミノ酸の置換)において、より低いストリンジェンシー条件が必要とされることが理解される。これらの条件下で、プローブおよび標的鎖の配列が完全に相補的でなくても、ハイブリダイゼーションは生じ得るが、1つ以上の位置において不一致である。条件は、塩濃度を増加させそして温度を低下させることによって、よりストリンジェントでない条件となり得る。例えば、培地ストリンジェンシー条件は、約37~約55の温度で約0.1~0.25M NaClによって提供され得るが、低ストリンジェンシー条件は、約20~約55の範囲の温度で約0.15M~約0.9M塩によって提供され得る。従って、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作され得、従って、一般的に所望の結果に依存して選択される方法である。

40

## 【0071】

他の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、例えば、約20~約37の間の温度で、50mM Tris-HCl(pH8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトールの条件下で達成され得る。利用される他のハイブリダイゼーション条件は、約40~約72の範囲の温度で、約10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>を含み得る。ホルムアミドおよびSDSはまた、ハイブリダイゼーション条件を変更するために使用され得る

50

## 【 0 0 7 2 】

( E . プライマーおよびプローブ )

本明細書中で定義される場合、用語プライマーは、テンプレート依存性のプロセスにおいて新生核酸の合成を開始し得る任意の核酸を包含することを意味する。代表的に、プライマーは、10 ~ 20塩基対長のオリゴヌクレオチドであるが、より長い配列が使用され得る。プライマーは、二本鎖形態または一本鎖形態で提供され得るが、一本鎖形態が好ましい。プローブは異なって定義されるが、これらはプライマーとして作用し得る。プローブは(おそらくプライミングし得る間に)、標的DNAまたはRNAに結合するように設計され、そして増幅プロセスにおいて使用される必要はない。

10

## 【 0 0 7 3 】

他の実施形態において、プローブまたはプライマーは、放射性種(  $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、または他の標識)、発蛍光団(ローダミン、フルオレセイン)または化学発光(ルシフェラーゼ)で標識される。

## 【 0 0 7 4 】

本発明のプローブおよびプライマーを使用する1つの方法は、Fus 1、101F6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL6、123F2、およびSEM A3に関連する遺伝子、またはより詳細には、他の種由来のFus 1、101F6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL6、123F2、およびSEM A3のオルソログ(ortholog)についての検索における方法である。通常、標的DNAは、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーであるが、スクリーニングは、RNA分子の分析を含み得る。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー、およびプローブの領域を変化させることによって、種々の程度の相同性が発見され得る。

20

## 【 0 0 7 5 】

特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションを決定するための適切な手段(例えば、標識)と組み合わせると、本発明の規定の配列の核酸を使用することは、有利である。蛍光リガンド、放射性リガンド、酵素学的リガンドまたは他のリガンド(例えば、アビジン/ビオチン)(これらは、検出され得る)を含む、広範な種々の適切な指示手段が、当該分野で公知である。他の実施形態において、放射性試薬または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識、またはウレアーゼ、アルカリホスファターゼもしくはペルオキシダーゼのような酵素タグを使用することが所望であり得る。酵素タグの場合、相補的な核酸を含有するサンプルとの特異的なハイブリダイゼーションを同定するための、可視検出可能であるかまたは分光光度的に検出可能である検出手段を提供するために使用され得る比色指示基質が、公知である。

30

## 【 0 0 7 6 】

本発明のプローブおよびプライマーを活用する別の方法は、部位指向型変異誘発または部位特異的変異誘発における方法である。部位特異的変異誘発は、基礎をなすDNAの特異的変異誘発を介する、個々のペプチド、または生物学的に機能的な等価なタンパク質もしくはペプチドの調製において有用な技術である。この技術はさらに、1つ以上のヌクレオチド配列変化をDNAに導入することによって、前述の1つ以上の考慮を組み込んで、配列改変体を迅速に調製および試験する能力を提供する。部位特異的変異誘発は、所望の変異のDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列ならびに十分な数の隣接ヌクレオチドの使用を介する変異体の生成を可能にし、妨害されている欠失結合部の両側で安定な二重鎖を形成するのに十分なサイズかつ十分な配列複雑性のプライマー配列を提供する。代表的に、配列の結合部の両側の約5 ~ 10残基が変更された、約17 ~ 25ヌクレオチド長のプライマーが好ましい。

40

## 【 0 0 7 7 】

一般に、本明細書中で記載されるプローブまたはプライマーは、溶液ハイブリダイゼーションにおいて、PCR<sup>T M</sup>において、対応する遺伝子の発現の検出のために、ならびに固

50

相を使用する実施形態において、試薬として有用であることが想定される。代表的な固相ハイブリダイゼーション方法は、米国特許第5,843,663号、同第5,900,481号、および同第5,919,626号において開示されている。本発明の実施において使用され得るハイブリダイゼーションの他の方法は、米国特許第5,849,481号、同第5,849,486号、および同第5,851,772号において開示されている。明細書中の本節において同定されるこれらおよび他の参考文献の関連部分は、参考として本明細書中に援用される。

#### 【0078】

(F. テンプレート依存性増幅方法)

多数のテンプレート依存性プロセスが、所定のテンプレートサンプル中に存在するマーカ配列を増幅するために利用可能である。最も知られた増幅方法の1つは、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号、ならびにInnisら、1990(これらの各々は、その全体が参考として本明細書中に援用される)において詳細に記載される、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR<sup>T M</sup>と称される)である。他の増幅方法は、リガーゼ鎖反応(LCR)、Qbetaレプリカーゼ、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、捕捉部分または検出部分を有するプライマーを使用するPCR<sup>T M</sup>様テンプレート依存性合成ならびにPCR<sup>T M</sup>様酵素依存性合成、転写ベースの増幅システム(TAS)、一本鎖および二本鎖DNAの循環的(cyclical)合成、「RACE」、片側PCR<sup>T M</sup>、ならびに2オリゴヌクレオチド増幅である。

#### 【0079】

手短に言うと、PCR<sup>T M</sup>において、マーカ配列の反対側の相補鎖上の領域に相補的である2つのプライマー配列が調製される。過剰のデオキシヌクレオシドトリホスフェートが、DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)と共に反応混合物に添加される。マーカ配列がサンプル中に存在する場合、プライマーはマーカに結合し、そしてポリメラーゼは、ヌクレオチドの付加によって、プライマーをマーカ配列に沿って伸長させる。反応混合物の温度を上昇および低下させることによって、伸長したプライマーは、マーカから解離して反応産物を形成し、過剰のプライマーは、マーカおよび反応産物に結合し、そしてプロセスが繰り返される。

#### 【0080】

逆転写酵素PCR<sup>T M</sup>増幅手順は、増幅されたmRNAの量を定量するために行なわれ得る。RNAをcDNAへ逆転写する方法は周知であり、そしてSambrookら、1989において記載される。逆転写のための代替的な方法は、耐熱性のRNA依存性DNAポリメラーゼを利用する。これらの方法は、1990年12月21に出願されたWO90/07641において記載される。ポリメラーゼ連鎖反応方法論は、当該分野で周知である。

#### 【0081】

(G. ベクター)

用語「ベクター」は、核酸配列が細胞(ここで、核酸配列が複製され得る)への導入のために挿入され得る、キャリア核酸分子をいうために使用される。核酸配列は、「外因性」であり得、これは、核酸配列が、ベクターが導入される細胞に対して外来であること、またはこの配列が細胞中の配列に対して相同であるが、この配列が通常見出されない宿主細胞の核酸中の位置に存在することを意味する。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ウイルス(バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス)、および人工染色体(例えば、YAC)が挙げられる。当業者は、標準的な組換え技術を介してベクターを構築するように十分に備えており、これらの技術は、Maniatisら、1988およびAusubelら、1994(両方とも参考として本明細書中に援用される)において記載される。

#### 【0082】

用語「発現カセット」は、転写され得る遺伝子産物の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むベクターをいう。いくつかの場合において、RNA分子は、次いで、タンパク

10

20

30

40

50

質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。他の場合において、これらの配列は、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの生成の際に、翻訳されない。発現ベクターは、種々の「制御配列」を含み得、これは、特定の宿主生物における作動可能に連結したコード配列の転写およびおそらく翻訳に必要な核酸配列をいう。転写および翻訳を管理する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能も同様に果たす核酸配列を含み得、そして以下に記載される。

【 0 0 8 3 】

( H . プロモーターおよびエンハンサー )

「プロモーター」は、転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。これは、調節タンパク質および分子が、例えば、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子に結合し得る遺伝子エレメントを含み得る。成句「作動可能に位置する」、「作動可能に連結した」、「制御下」、および「転写制御下」は、プロモーターが、核酸配列に関して、その配列の転写開始および/または発現を制御するために、正確な機能的な位置および/または配向であることを意味する。プロモーターは、「エンハンサー」と組み合わせて使用されてもよいし使用されなくてもよく、エンハンサーは、核酸配列の転写活性化に關与するシス作用性調節配列をいう。

10

【 0 0 8 4 】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって獲得され得るように、遺伝子または配列に天然に関連するものであり得る。このようなプロモーターは、「内因性」として称され得る。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する核酸配列と天然に関連し得るものであり得る。あるいは、特定の利点は、組換えプロモーターまたは異種プロモーター（これらは、その天然の環境において核酸配列と通常関連しないプロモーターをいう）の制御下にコード核酸セグメントを位置付けることによって得られる。組換えエンハンサーまたは異種エンハンサーはまた、その天然の環境において核酸配列と通常関連しないエンハンサーをいう。このようなプロモーターまたはエンハンサーとしては、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他の原核生物細胞、ウイルス細胞、または真核生物細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在」しないプロモーターまたはエンハンサー（すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメントおよび/または発現を変更する変異を含む）が挙げられ得る。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列合成的に生成することに加えて、配列は、本明細書中に開示される組成物と組み合わせて、PCR<sup>TM</sup>を含む、組換えクローニング技術および/または核酸増幅技術を使用して生成され得る（米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号（各々が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと）。このようなプロモーターは、レポーター遺伝子としての使用のために - ガラクトシダーゼ発現を駆動するために使用され得る。さらに、ミトコンドリア、クロロプラストなどのような非核細胞小器官中で配列の転写および/または発現を指向する制御配列もまた同様に使用され得ることが意図される。

20

30

【 0 0 8 5 】

もちろん、発現のために選択された細胞型、細胞小器官、および生物におけるDNAセグメントの発現を効率的に指向するプロモーターおよび/またはエンハンサーを使用することが重要である。分子生物学の当業者は、一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組み合わせの使用を知っている（例えば、Sambrookら（1989）（参考として本明細書中に援用される）を参照のこと）。使用されるプロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、誘導性プロモーター、そして/または導入されたDNAセグメントの高レベルの発現を指向する適切な条件下で有用であり得る（組換えタンパク質および/またはペプチドの大規模生成における利点のような）。プロモーターは、異種であってもよいし内因性であってもよい。

40

【 0 0 8 6 】

表2は、遺伝子の発現を調節するために、本発明の文脈中で使用され得るいくつかのエレ

50

メント/プロモーターを列挙する。この列挙は、発現の促進に関与する全てのあり得るエレメントを網羅することを意図するのではなく、単にそれらの例示的な列挙である。表3は、誘導性エレメントの例を提供し、これらは、特定の刺激に応答して活性化され得る核酸配列の領域である。

【0087】

【表2】

表2 プロモーターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞レセプター	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ $\alpha$ および/または DQ $\beta$	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
$\beta$ -インターフェロン	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
インターロイキン-2 レセプター	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHCクラスII5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスII HLA-DRa	Sherman <i>et al.</i> , 1989
$\beta$ -アクリン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989

10

20

30

(表2の続き)

表2 プロモーター/エンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
筋肉クレアチンキナーゼ (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
トランスチレチン (Transferrin)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼI	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
マトリクソネイン (MTI)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
コラゲナーゼ	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
アルブミン	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α-フェトプロテイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
α-グロブリン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β-グロブリン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985
神経細胞接着分子 (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
α <sub>1</sub> -Antitrypsin	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) ヒストン	Hwang <i>et al.</i> , 1990
マウスおよび/またはI型コラーゲン	Ripe <i>et al.</i> , 1989
グルコース調節タンパク質 (GRP94 および GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
ラット成長ホルモン	Larsen <i>et al.</i> , 1986
ヒト血清アミロイド A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
トロボニン (TNF)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989

10

20

30

40

(表2の続き)

表2 プロモーターおよび/または エンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
血小板由来増殖因子 (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
デフェューズ筋ジストロフィー	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
ポリオーマ	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
レトロウイルス	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicsek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Chol <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
パピローマウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987; Glue <i>et al.</i> , 1988
B型肝炎ウイルス	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
ヒト免疫不全ウイルス	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
サイトメガロウイルス(CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
テナガサカシ白血球ウイルス	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

【 表 3 】

表3  
誘導性エレメント

エレメント	イニチエーター	参考文献
MT II	ホルボールエステル(TFA) 重金属	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV(マウス乳腺癌 ウイルス)	糖質コルチコイド	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
$\beta$ -インターフェロン	ポリ (rI)x ポリ (rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
アデノウイルス <sup>5</sup> E2	EIA	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
コラゲナーゼ	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
ストロメライシン	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
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	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 遺伝子	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
$\alpha$ -2-マクログロブリン	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
ビメンタン	血清	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC クラス I 遺伝子 H-2kb	インターフェロン	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	EIA, SV40 ラージT 抗原	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b

10

20

30

(表3の続き)

表3 誘導性エレメント		
エレメント	インデューサー	参考文献
Proliferin	ホルホルエステルTPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
腫瘍壊死因子	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
甲状腺刺激 ホルモンの遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

10

組織特異的プロモーターまたは組織特異的エレメントの同定、ならびにこれらの活性を特徴付けるアッセイは、当業者に周知である。このような領域の例としては、ヒトLIMK2遺伝子(Nomotoら、1999)、ソマトスタチンレセプター2遺伝子(Krausら、1998)、マウス精巣上体レチノイン酸結合遺伝子(Lareyreら、1999)、ヒトCD4(Zhao-Emonetら、1998)、マウス2(XI)コラーゲン(Tsumakiら、1998)、D1Aドーパミンレセプター遺伝子(Leeら、1997)、インスリン様増殖因子II(Wuら、1997)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1(Almendroら、1996)が挙げられる。

20

【0089】

(I. 開始シグナル)

特定の開始シグナルはまた、コード配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接する配列を含む。外因性の翻訳制御シグナル(ATG開始コドンを含む)が、さらに提供される必要があり得る。当業者は、容易にこのことを決定し得、そして必要なシグナルを提供し得る。開始コドンは、完全な挿入物の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと「インフレーム」でなければならないことが周知である。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成のいずれかであり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含むことによって高められ得る。

30

【0090】

(J. スプライシング部位)

ほとんどの転写された真核生物RNA分子は、第1の転写物からイントロンを除去するためにRNAスプライシングを起こす。ゲノムの真核生物配列を含むベクターは、タンパク質発現のための転写物の適切なプロセッシングを確実にするための、ドナースプライシング部位および/またはアクセプタースプライシング部位を必要とし得る。(Chandlerら、1997(参考として本明細書中に援用される)を参照のこと。)

(K. ポリアデニル化シグナル)

発現において、転写物の適切なポリアデニル化を行なうためのポリアデニル化シグナルが代表的に含まれる。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の首尾良い実施に重要はないと考えられ、そして/または任意のこのような配列が使用され得る。特定の実施形態は、簡便でありそして/もしくは種々の標的細胞において十分に機能することが公知のSV40ポリアデニル化シグナルおよび/またはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを含む。転写終止部位もまた、発現カセットのエレメントとして意図される。これらのエレメントは、メッセージレベルを増強するように、そして/またはカセットから他の配列への読み過ごし(read through)を最小にするように機能し得る。

40

【0091】

(L. 複製の起点)

50

宿主細胞においてベクターを増殖するために、ベクターは、複製部位の1つ以上の起点（しばしば「ori」と称される）を含み得、これは、複製が開始される特定の核酸配列である。あるいは、宿主細胞が酵母である場合、自律的複製配列（ARS）が使用され得る。

【0092】

（M．検出マーカ－およびスクリーニングマーカ－）

本発明の特定の実施形態において、細胞は、本発明の核酸構築物を含み、細胞は、発現ベクター中にマーカ－を含むことによって、インビトロまたはインビボで同定され得る。このようなマーカ－は、細胞に同定可能な変化を付与し、発現ベクターを含む細胞の簡単な同定を可能にする。一般に、選択マーカ－は、選択を可能にする特性を付与するマーカ－である。陽性選択マーカ－は、マーカ－の存在がその選択を可能にするマーカ－であるが、陰性選択マーカ－は、その存在がその選択を止めさせるマーカ－である。陽性選択マーカ－の例は、薬物耐性マーカ－である。選択マーカ－およびスクリーニングマーカ－の例は、当業者に周知である。

10

【0093】

（N．宿主細胞）

異種核酸配列を発現させる状況において、「宿主細胞」は、原核生物細胞または真核生物細胞をいい、そしてこれは、ベクターを複製し得るそして/またはベクターによってコードされる異種遺伝子を発現し得る任意の形質転換可能な生物を含む。宿主細胞は、ベクターのレシピエントとして使用され得、そしてそのように使用されてきた。宿主細胞は、「トランスフェクト」されてもよいし「形質転換」されてもよく、これは、異種核酸が宿主細胞に移入されるかまたは導入されるプロセスをいう。形質転換された細胞は、最初の被験体細胞およびその子孫を含む。

20

【0094】

宿主細胞は、所望の結果が、ベクターの複製であるかまたはベクターにコードされた核酸配列の一部または全ての発現であるかに依存して、原核生物細胞または真核生物細胞から誘導され得る。多数の細胞株および培養物が、宿主細胞としての使用のために利用可能であり、そしてこれらは、American Type Culture Collection（ATCC）（これは、生きている培養物および遺伝物質についての保管所として機能する組織である（www.atcc.org））から獲得され得る。適切な宿主は、ベクター骨格および所望の結果に基づいて、当業者によって決定され得る。例えば、プラスミドまたはコスミドは、多数のベクターの複製のための原核生物宿主細胞に導入される。ベクターの複製および/または発現のための宿主細胞として使用される細菌細胞としては、DH5、JM109、およびKC8、ならびにSURE（登録商標）コンピテント細胞およびSOLOPACK<sup>TM</sup> Gold細胞（STRATAGENE（登録商標）、La Jolla）のような多数の市販の細菌宿主が挙げられる。あるいは、E.coli LE392のような細菌細胞は、ファージウイルスのための宿主細胞として使用され得る。

30

【0095】

ベクターの複製および/または発現のための真核生物宿主細胞の例としては、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos、およびPC12が挙げられる。種々の細胞型および生物由来の多数の宿主細胞が利用可能であり、そして当業者に公知である。同様に、ウイルスベクターは、真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞（特に、ベクターの複製または発現に許容的な宿主細胞）のいずれかと組み合わせて使用され得る。

40

【0096】

いくつかのベクターは、原核生物細胞および真核生物細胞の両方において複製および/または発現されるのを可能にする制御配列を使用し得る。当業者はさらに、上記宿主細胞全てを維持しそしてベクターの複製を可能にするためにこれらをインキュベートする条件を理解する。ベクターの大規模生成、ならびにベクターによってコードされた核酸およびこ

50

これらの同族のポリペプチド、タンパク質、またはペプチドの生成を可能にする技術および条件もまた、理解されそして公知である。

【0097】

(O. 発現系)

上で議論された組成物の少なくとも一部または全てを含む多数の系が存在する。原核生物および/または真核生物に基づく系が、核酸配列、またはこれらの同族のポリペプチド、タンパク質およびペプチドを生成するために、本発明を用いる使用のために利用され得る。多数のこのような系が、市販されておりそして広範に利用可能である。

【0098】

昆虫細胞系/バキュロウイルス系は、米国特許第5,871,986号、同第4,879,236号(共に参考として本明細書中に援用される)において記載されるように、異種核酸セグメントの高レベルのタンパク質発現を生成し得、そしてこれらは、例えば、INVITROGEN(登録商標)からのMAXBAC(登録商標)2.0およびCLONTECH(登録商標)からのBACPACK<sup>TM</sup>バキュロウイルス発現系の名称で購入され得る。

10

【0099】

発現系の他の例としては、STRATAGENE(登録商標)のCOMPLETE CONTROL<sup>TM</sup>誘導性哺乳動物発現系(これは、合成エクジソン誘導性レセプターを含む)、またはそのpET発現系(E.coli発現系)が挙げられる。誘導性発現系の別の例は、INVITROGEN(登録商標)から入手可能であり、これは、T-REX<sup>TM</sup>(テトラサイクリン調節発現)系(全長CMVプロモーターを使用する誘導性哺乳動物発現系)を保有する。INVITROGEN(登録商標)はまた、Pichia methanolica発現系(これは、メチロトロフの酵母Pichia methanolicaにおける組換えタンパク質の高レベル生成のために設計される)と呼ばれる酵母発現系を提供する。当業者は、核酸配列またはその同族のポリペプチド、タンパク質またはペプチドを生成するための、ベクター(例えば、発現構築物)を発現する方法を知っている。

20

【0100】

(P. 発現ベクターの送達)

発現ベクターを細胞に導入し得る多くの方法が存在する。本発明の特定の実施形態において、この発現構築物は、ウイルスまたはウイルスゲノム由来の操作された構築物を含む。特定のウイルスが、レセプター媒介エンドサイトーシスを介して細胞に進入して、宿主細胞ゲノムに入りそしてウイルス遺伝子を安定かつ効率的に発現する能力によって、それらのウイルスは、外来遺伝子を哺乳動物細胞に移入するための魅力的な候補物となる(Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988; BaichwalおよびSugden, 1986; Temin, 1986)。遺伝子ベクターとして用いた最初のウイルスは、パポバウイルス(シミアンウイルス40、ウシ乳頭しゅウイルス、およびポリオーマ)(Ridgeway, 1988; BaichwalおよびSugden, 1986)、およびアデノウイルス(Ridgeway, 1988; BaichwalおよびSugden, 1986)を含めたDNAウイルスであった。これらは、外来DNA配列については比較的低い能力を有し、そして限定された宿主スペクトルを有する。さらに、許容性細胞におけるその腫瘍形成性能力および細胞変性効果によって安全性の懸念が生じる。それらのウイルスは、外来の遺伝物質を8kbまでしか受け入れられないが、種々の細胞株および実験動物に容易に導入され得る(NicolasおよびRubenstein, 1988; Temin, 1986)。

30

40

【0101】

インピボ送達のための方法の1つとして、アデノウイルス発現ベクターの使用が挙げられる。「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支持するため、そして(b)そのなかにクローニングされているアンチセンスポリヌクレオチドを発現するため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。この文

50

脈では、発現には遺伝子産物が合成されることを必要としない。

【0102】

(1. アデノウイルス発現ベクター)

この発現ベクターは、遺伝子操作型のアデノウイルスを含む。アデノウイルス(36kb、直線状、二本鎖DNAウイルス)の遺伝的組織の知識によれば、アデノウイルスDNAの大きい断片の、7kbまでの外来配列による置換が可能である(GrunhausおよびHorwitz, 1992)。レトロウイルスと対照的に、宿主細胞のアデノウイルス感染は、染色体組み換えを生じない。なぜならアデノウイルスDNAは、潜在的な遺伝毒性なしにエピソーム様式で複製し得るからである。また、アデノウイルスは構造的に安定であり、そしてゲノム再配列は大規模な増幅後に検出されていない。アデノウイルスは、細胞周期段階にかかわらず、実質的に全ての上皮細胞に感染し得る。

10

【0103】

1つの系(システム)では、組み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との間の相同組み換えから生成される。2つのプロウイルスベクターの間の可能性のある組み換えに起因して、野生型アデノウイルスは、このプロセスから生成され得る。従って、個々のプラークから単一クローンのウイルスを単離し、そしてそのゲノム構造を試験することが重要である。

【0104】

現在のアデノウイルスベクター(複製欠損である)の生成および増殖は、特有のヘルパー細胞株(293と名付けられた)に依存する。この細胞株は、Ad5 DNAフラグメントによってヒト胚性腎細胞からトランスフォームされ、そしてE1タンパク質を構成的に発現する(Grahamら、1977)。

20

【0105】

ヘルパー細胞株は、ヒト胚性腎細胞、筋細胞、造血細胞、または他のヒト胚性間葉細胞または上皮細胞のようなヒト細胞に由来し得る。あるいは、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスを許容する他の哺乳動物種の細胞に由来し得る。このような細胞としては、例えば、Verocellまたは他のサル胚性間葉細胞または上皮細胞が挙げられる。上記のように、好ましいヘルパー細胞株は293である。

【0106】

アデノウイルスベクターが複製欠損であるか、または少なくとも条件付で欠損であるという要件以外、アデノウイルスベクターの性質は、本発明の首尾よい実施のために重要であるとは考えられない。このアデノウイルスは、42の異なる既知の血清型またはサブグループA~Fのいずれかであり得る。サブグループCの5型アデノウイルスは、本発明の使用のための条件付き複製欠損アデノウイルスベクターを得るための好ましい出発物質である。この理由は5型アデノウイルスがヒトアデノウイルスであり、それについて多量の生化学的情報および遺伝子情報が既知であるからであり、そしてこれはベクターとしてアデノウイルスを使用するほとんどの構築物について伝統的に用いられてきた。

30

【0107】

アデノウイルスベクターは、真核生物遺伝子発現研究(Levreroら、1991; Gomez-Foixら、1992)およびワクチン開発(GrunhausおよびHorwitz, 1992; GrahamおよびPrevec, 1991)において使用されてきた。最近、動物研究によって、組換えアデノウイルスが遺伝子治療に使用され得ることが示唆された(Stratford-PerricaudetおよびPerricaudet, 1991; Stratford-Perricaudetら、1990; Richら、1993)。異なる組織への組換えアデノウイルスの投与における研究としては、以下が挙げられる: 気管点滴注入(Rosenfeldら、1991; Rosenfeldら、1992)、筋肉注射(Ragotら、1993)、末梢静脈注射(HerzおよびGerard, 1993)、および脳への定位的な接種(Le Gal La Salleら、1993)。

40

【0108】

50

## ( 2 . レトロウイルス発現ベクター )

レトロウイルスは、逆転写プロセスによって感染細胞においてそれらのRNAを二本鎖DNAに変換する能力で特徴付けられる、一本鎖RNAウイルスの群である ( Coffin、1990)。次いで、生じたDNAは、プロウイルスとして細胞の染色体に安定に組み込まれ、そしてウイルスタンパク質の合成を指向する。この組み込みは、レシピエント細胞およびその子孫におけるウイルス遺伝子配列の保持を生じる。このレトロウイルスゲノムは、3つの遺伝子 ( gag、pol、およびenv) を含有し、これらはそれぞれ、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コードする。gag遺伝子の5'末端に見出される配列は、ビリオンへのゲノムのパッケージングについてのシグナルを含む。2つの長末端反復 ( LTR) 配列が、このウイルスゲノムの5'末端および3'末端に存在する。これらは、強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含み、そしてまた、宿主細胞ゲノムにおける組み込みに必要とされる ( Coffin、1990)。

10

## 【 0 1 0 9 】

レトロウイルスベクターを構築するために、目的の遺伝子をコードする核酸が、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入されて、複製欠損であるウイルスを産生する。ビリオンを産生するために、gag遺伝子、pol遺伝子、およびenv遺伝子を含むが、LTRおよびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株を構築する ( Mannら、1983)。cDNAを含む組換えプラスミドが、レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共に (例えば、リン酸カルシウム沈降により) この細胞株に導入される場合、このパッケージング配列は、この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ングされるのを可能にし、次いでこのウイルス粒子が培養培地中に分泌される ( NicolasおよびRubenstein、1988; Temin、1986; Mannら、1983)。次いで、この組換えレトロウイルスを含む培地は、回収され、必要に応じて濃縮され、そして遺伝子移入に使用される。レトロウイルスベクターは、広範な種々の細胞型に感染し得る。しかし、組み込みおよび安定な発現は、宿主細胞の分裂を必要とする ( Paskindら、1975)。

20

## 【 0 1 1 0 】

## ( 3 . 他のウイルスベクター )

他のウイルスベクターが、本発明における発現構築物として使用され得る。ワクシニアウイルス ( Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; Couparら、1988)、アデノ随伴ウイルス ( AAV) ( Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; HermonatおよびMuzycska、1984) およびヘルペスウイルスのようなウイルス由来のベクターが使用され得る。これらは、種々の哺乳動物細胞についていくつかの魅力的な特徴を提供する ( Friedmann、1989; Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; Couparら、1988; Horwichら、1990)。

30

## 【 0 1 1 1 】

センスまたはアンチセンスの遺伝子構築物の発現をもたらすため、この発現構築物を細胞に送達しなければならない。この送達は、細胞株を形質転換 (トランスフォーム) するための実験手順においてのように、インビトロで、または特定の疾患状態の処置においてのようにインビボもしくはエキソビボで達成され得る。送達の1つの機構は、ウイルス感染を介しており、ここで発現構築物は、感染性ウイルス粒子にキャプシド形成される。

40

## 【 0 1 1 2 】

## ( 4 . 発現構築物の移入のための非ウイルス方法 )

培養された哺乳動物細胞への発現構築物の移入のためのいくつかの非ウイルス方法がまた本発明によって意図される。これらとしては、リン酸カルシウム沈殿 ( GrahamおよびVan Der Eb、1973; ChenおよびOkayama、1987; Rippeら、1990)、DEAEデキストラン法 ( Gopal、1985)、エレクトロポ

50

レーション (Tur - Kaspars, 1986; Potterら, 1984)、直接マイクロインジェクション (HarlandおよびWeintraub, 1985)、DNA充填化リポソーム (NicolaouおよびSene, 1982; Fraleyら, 1979) およびリポフェクタミン - DNA複合体、細胞超音波処理 (Fechheimerら, 1987)、高速微粒子銃を使用する遺伝子ボンバードメント (Yangら, 1990)、およびレセプター媒介トランスフェクション (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、インピボまたはエキソピボでの使用に首尾よく適用され得る。

#### 【0113】

一旦、発現構築物が細胞に送達されれば、目的の遺伝子をコードする核酸は、異なる部位に配置されそして発現され得る。特定の実施形態において、この遺伝子をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定に組み込まれ得る。この組み込みは、相同組み換え (遺伝子置換) を介した同系の位置および方向であり得るか、または無作為の非特異的位置に組み込まれ得る (遺伝子増大)。なおさらなる実施形態において、核酸は、DNAの別々のエピソームセグメントとして細胞中に安定に維持され得る。このような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞の周期と独立してまたは同調して維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物がどのように細胞に送達されるか、そしてこの核酸が細胞のどこに保持されるかは、使用される発現構築物のタイプに依存する。

10

#### 【0114】

本発明のなお別の実施形態において、その発現構築物は、単に、裸の組換えDNAまたはプラスミドからなり得る。その構築物の移入は、細胞膜を物理的または化学的に透過性にする上記の任意の方法によって行われ得る。これは、特に、インピトロでの移入に適用可能であるが、インピボでの使用にも適用され得る。Dubenskyら (1984) は、リン酸カルシウム沈降物の形態で、成体および新生仔マウスの肝臓および脾臓へとポリオマウイルスDNAを首尾良く注入し、活性なウイルス複製および急性の感染を実証した。BenvenistyおよびNeshif (1986) はまた、リン酸カルシウム沈降したプラスミドの直接腹腔内注入が、トランスフェクトした遺伝子の発現をもたらしたことを実証した。これによって、目的の遺伝子をコードするDNAがまた、インピボで同様の様式で移入されて遺伝子産物を発現し得ることが予想される。

20

#### 【0115】

なお別の実施形態において、裸のDNA発現構築物の細胞への移入は、微粒子銃 (ボンバードメント) を含み得る。この方法は、DNAで被覆された微量子銃 (マイクロプロジェクトイル) を高速に加速する能力に依存し、それらが細胞を死滅させずに細胞膜を貫通し、そして細胞に侵入することを可能にする (Kleinら, 1987)。小粒子を加速するためのいくつかのデバイスが開発されている。1つのこのようなデバイスは、電流を生成するための高電圧放電に依存し、これは、次いで推進力を提供する (Yangら, 1990)。使用される微粒子銃は、タングステンまたは金ビーズのような生物学的に不活性な物質からなっている。

30

#### 【0116】

ラットおよびマウスの肝臓、皮膚、および筋肉組織を含む選択された器官は、インピボでボンバードされている (Yangら, 1990; Zeleninら, 1991)。銃と標的器官との間のなんらかの介在組織を排除するため (すなわち、エキソピボ処置)、この方法には、組織または細胞の外科的曝露を必要とし得る。再度、特定の遺伝子をコードするDNAは、この方法を介して送達され得、そして本発明によってなお組み込まれ得る。

40

#### 【0117】

本発明のさらなる実施形態において、その発現構築物は、リポソームに捕捉され得る。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部の水性媒体によって特徴づけられる小胞構造である。多層リポソームは、水性媒体によって分離された多数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁された場合に自発的に形成する。その脂質成分は、閉鎖された構造を形成する前に、自己再配置を経て、そして水および溶解した溶質を脂質二重

50

層の間に捕捉する (Ghosh および Bachhawat, 1991)。リポフェクタミン DNA 複合体もまた意図される。

【0118】

リポソーム媒介核酸送達およびインビトロでの外来 DNA の発現は非常に成功している。Wong ら (1980) は、培養ニワトリ胚、HeLa 細胞、および肝癌細胞において、外来 DNA のリポソーム媒介送達および発現の可能性を実証した。Nicolaou ら (1987) は、静脈内注射後のラットにおいて首尾よいリポソーム媒介遺伝子移入を達成した。

【0119】

本発明の特定の実施例において、そのリポソームは、センダイウイルス (HVJ) と複合体化され得る。これは、細胞膜との融合を容易にすること、およびリポソームカプセル化 DNA の細胞への侵入を促進することが示されている (Kaneda ら、1989)。他の実施形態において、そのリポソームは、核非ヒストン染色体タンパク質 (HMG-1) と複合体化され得るか、または組み合わせて利用され得る (Kato ら、1991)。なおさらなる実施形態において、そのリポソームは、HVJ および HMG-1 の両方と複合体化され得るか、または組み合わせて利用され得る。このような発現構築物がインビトロおよびインビボにおいて核酸の移入および発現において首尾よく使用されたという点で、それらは本発明に適用可能である。細菌のプロモーターが DNA 構築物中で利用される場合、それはまた、適切な細菌ポリメラーゼをリポソーム内に含めることが所望される。

【0120】

特定の遺伝子をコードする核酸を細胞に送達するために利用され得る他の発現構築物は、レセプター媒介送達ビヒクルである。これらは、ほとんど全ての真核生物細胞におけるレセプター媒介エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的取り込みを利用する。種々のレセプターの細胞型特異的分布のために、その送達は、高度に特異的であり得る (Wu および Wu、1993)。

【0121】

レセプター媒介遺伝子標的化ビヒクルは、一般的に以下の2つの成分からなる：細胞レセプター特異的リガンドおよび DNA 結合剤。いくつかのリガンドが、レセプター媒介遺伝子移入のために使用されている。最も広汎に特徴づけられているリガンドは、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) である。最近、ASOR と同じレセプターを認識する合成ネオ糖タンパク質が、遺伝子送達ビヒクルとして使用されており (Ferkol ら、1993; Perales ら、1994)、そして上皮増殖因子 (EGF) はまた、扁平上皮癌細胞に対して遺伝子を送達するために用いられている (Myers, EPO 0273085)。

【0122】

他の実施形態において、送達ビヒクルは、リガンドおよびリポソームを含み得る。例えば、Nicolaou ら (1987) は、ラクトシル - セラミド、ガラクトース - 末端アシアロガングリオシド (リポソームに組み込まれた) を使用し、そして肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増大を観察した。従って、特定の遺伝子をコードする核酸はまた、リポソームを伴うかまたは当該分野もなわなない多数のレセプター - リガンド系によって、肺細胞、上皮細胞または腫瘍細胞のような細胞型に特異的に送達されることが可能である。例えば、上皮増殖因子 (EGF) は、EGF レセプターの上方制御 (アップレギュレーション) を示す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送達のためのレセプターとして用いられ得る。マンノースは、肝臓細胞上のマンノースレセプターを標的化するために使用され得る。また、CD5 (CLL)、CD22 (リンパ腫)、CD25 (T細胞白血病) および MAA (黒色腫) に対する抗体は、同様に、標的化部分として使用され得る。

【0123】

特定の実施形態において、遺伝子移入は、エキソビボ条件下でさらに容易に実施され得る

10

20

30

40

50

。エキソピボ遺伝子治療とは、動物からの細胞の単離、インビトロでのこの細胞への核酸の送達、次いで動物へのこの改変した細胞の戻しをいう。これは、動物からの組織/器官の外科的取り出し、または細胞および組織の初代培養を包含し得る。

【 0 1 2 4 】

初代哺乳動物細胞培養物は、種々の方法において調製され得る。細胞がインビトロでかつ発現構築物と接触していながら生存しているためには、その細胞が、酸素と二酸化炭素と栄養素と正確な比率で接触して維持されるが、微生物の汚染からは保護されていることを確実にすることが必要である。細胞培養技術は、十分に文献に報告されており、そして本明細書において参考文献として開示されている ( F r e s h n e r , 1 9 9 2 ) 。

【 0 1 2 5 】

前記の1つの実施形態は、タンパク質の産生のための細胞を不死化するために遺伝子移入の使用を包含する。目的のタンパク質の遺伝子は、上記のように適切な宿主細胞に移入され得、その後、適切な条件下で細胞培養される。実質的に任意のポリペプチドについてのその遺伝子は、このようにして利用され得る。組換え発現ベクターおよびその中に含まれる要素の生成は、上記で議論した。あるいは、産生されるべきタンパク質は、問題の細胞によって通常合成される内因性のタンパク質であり得る。

【 0 1 2 6 】

有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、V e r o および H e L a 細胞およびチャイニーズハムスター卵巣の細胞株、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 細胞である。さらに、挿入された配列の発現を調節するか、または所望の様式でその遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に重要であり得る。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシングおよびタンパク質の修飾のための特徴的かつ特異的な機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現される外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするために選択され得る。

【 0 1 2 7 】

多数の選択系が使用され得、それらには、それぞれ t k -、h g p r t -、または a p r t - 細胞における、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が含まれるが、これらに限定されない。また、抗代謝物抵抗性は、以下に対する選択性を基礎として使用され得る: 抵抗性を付与する d h f r ; ミコフェノール酸に対する抵抗性を付与する g p t ; アミノグリコシド G 4 1 8 に対する抵抗性を付与する n e o ; およびハイグロマイシンに対する抵抗性を付与する h y g r o 。

【 0 1 2 8 】

動物細胞は、以下の2つの態様でインビトロで増殖され得る: 培養のバルクを通じて懸濁液中において増殖する非足場依存性細胞として、またはそれらの増殖のための固相基質への付着を必要とする足場依存性細胞(すなわち、細胞増殖の単層型)として。

【 0 1 2 9 】

( Q . 抗体 )

本発明の抗体は、免疫沈降による抗原の単離に有用である。免疫沈降は、複合混合物からの標的抗原成分の分離を含み、そして少量のタンパク質の識別または単離のために用いられる。膜タンパク質の単離のため、細胞を界面活性剤ミセルに溶解しなければならない。胆汁塩のような他の因子が酸性のp H かまたは二価カチオンの存在下で沈殿するので、非イオン性塩が好ましい。抗体およびその用途を以下にさらに考察する。

【 0 1 3 0 】

別の局面において、本発明は、本発明の F u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2、もしくはS E M A 3 分子と免疫反応性である抗体、またはその任意の部分を意図する。抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。1つの実施形態において、抗体はモノクロー

10

20

30

40

50

ーナル抗体である。抗体を調製および特徴付けるための手段は当該分野で周知である（例えば、HowellおよびLane, 1988を参照のこと）。

【0131】

要するに、ポリクローナル抗体は、本発明のポリペプチドを含む免疫原を用いて動物を免疫すること、およびその免疫された動物から抗血清を収集することによって調製される。広範な動物種が、抗血清の生成のために用いられ得る。代表的には、抗-抗血清の生成のために用いた動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、またはウマを含む非ヒト動物である。ウサギの比較的大量の血液のおかげで、ウサギはポリクローナル抗体の生成のために好ましい選択である。

【0132】

抗原のアイソフォームに特異的な抗体（ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方）は、当業者に一般に公知であるように、従来免疫技術を用いて調製され得る。本発明の化合物の抗原性エピトープを含む組成物は、1つ以上の実験動物（例えば、ウサギまたはマウス）を免疫するために用いられ得る。次いで、これらの動物は本発明の化合物に対して特異的な抗体を生成するように進行する。ポリクローナル抗血清は、抗体生成のための時間経過後、単にこの動物を放血して全血から血清サンプルを調製することによって、入手され得る。

【0133】

本発明のモノクローナル抗体は、標準的な免疫化学手順（例えば、ELISAおよびウエスタンブロット方法）において、および免疫組織化学手順（例えば、組織染色）において、ならびに異なる種の特定のFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3に関連する抗原性エピトープに特異的な抗体を利用し得る他の手順において、有用な用途を見出すことが提唱される。さらに、異なる種の特定のFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3に特異的なモノクローナル抗体が、他の有用な用途において利用され得ることが提唱される。

【0134】

一般に、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方とも、種々の実施形態において用いられ得る。例えば、これらの抗体は、他のFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3をコードするcDNAまたは遺伝子を得るための抗体クローニングプロトコールにおいて使用され得る。それらの抗体はまた、細胞または動物におけるFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3が関連するペプチドの効果を分析するための阻害試験において用いられ得る。抗-Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3の抗体はまた、種々の細胞事象の間、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3の分布を分析するための免疫学的局在決定試験において、例えば、細胞周期における異なる時点でのFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、およびSEM A3のポリペプチドの細胞特異的または組織特異的な分布を決定するために有用である。このような抗体の特に有用な用途は、例えば、抗体親和性カラムを用いて、ネイティブまたは組み換えのFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3を精製することである。このような免疫学的技術の全ての操作は、本開示に照らして当業者に公知である。

【0135】

10

20

30

40

50

抗体を調製および特徴付けるための手段が当該分野で周知である（例えば、Harlow および Lane, 1988（本明細書において参考として援用されている）を参照のこと）。モノクローナル抗体調製のさらに具体的な例は、以下の実施例に記載している。

【0136】

当該分野で周知のように、所定の組成物はその免疫原性において変化し得る。従って、キャリアに対してペプチドまたはポリペプチド免疫原を結合することによって達成され得るように、宿主免疫系をブーストすることがしばしば必要である。例示的かつ好ましいキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびウシ血清アルブミン（BSA）である。他のアルブミン（例えば、オポアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミン）もまた、キャリアとして使用され得る。キャリアタンパク質にポリペプチドを結合体化させるための手段は、当該分野において周知であり、そしてこれには、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（*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester）、カルボジイミド、およびビス-ピアゾ化ベンジジン（bis-biazotized benzidine）が挙げられる。

10

【0137】

また当該分野において周知のように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、免疫応答の非特異的刺激物質（アジュバントとして公知）を使用することによって増強され得る。例示的かつ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（殺傷された *Mycobacterium tuberculosis* 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が挙げられる。

20

【0138】

ポリクローナル抗体の産生において使用される免疫原組成物の量は、免疫原および免疫に使用される動物の性質に応じて変動する。種々の経路を使用して、免疫原を投与し得る（皮下、筋内、皮内、静脈内、および腹腔内）。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後の種々の時点で、免疫された動物の血液をサンプリングすることによってモニターされ得る。第2のブースター注射もまた、与えられ得る。追加免疫（ブースト）および力価測定のプロセスを、適切な力価が達成されるまで繰り返す。所望されるレベルの免疫原性が獲得された場合に、この免疫された動物を採血し得、そして血清を単離および保存し得、そして

30

【0139】

*mAb* は、米国特許第4,196,265号（これは、本明細書中で参考として援用される）に例示される技術のような、周知技術の使用を通して容易に調製され得る。代表的に、この技術は、選択された免疫原組成物（例えば、精製されたまたは部分的に精製された、*Fus 1*、*101F6*、*Gene 21*、*Gene 26*、*Beta\**、*Luca 1*、*Luca 2*、*PL6*、*123F2*、または *SEM A3* のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド、あるいは高レベルの *Fus 1*、*101F6*、*Gene 21*、*Gene 26*、*Beta\**、*Luca 1*、*Luca 2*、*PL6*、*123F2*、または *SEM A3* を発現する細胞）を用いて適切な動物を免疫することを含む。免疫する組成物は、抗体産生細胞を刺激するのに有効な様式で投与される。マウスおよびラットのような齧歯類は好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、およびカエルの細胞の使用もまた可能である。ラットの使用は、特定の利点を与え得る（*Goding*、1986）が、マウスが好ましい。*BALB/c* マウスは、最も慣用的に使用され、そして一般により高率で安定な融合物を与えるので最も好ましい。

40

【0140】

免疫後に、抗体を産生する潜在能を有する体細胞（詳細には、Bリンパ球（B細胞））が、*mAb* 産生プロトコルにおける使用のために選択される。これらの細胞は、生検された脾臓、扁桃、もしくはリンパ節から、または末梢血サンプルから獲得され得る。脾臓細胞および末梢血細胞が好ましい。前者は、脾臓細胞が分裂形質芽球段階にある抗体産生細胞

50

の豊富な供給源であるからであり、後者は、末梢血が容易に利用可能であるからである。しばしば、一団の動物が免疫され、そして最高の抗体力価を有する動物の脾臓が取り出され、そして注射器でこの脾臓をホモジネートすることによって脾臓リンパ球が得られる。代表的に、免疫したマウス由来の脾臓は、約  $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$  のリンパ球を含む。

【0141】

次いで、免疫した動物由来の抗体産生Bリンパ球は、不死化骨髄腫細胞の細胞（一般的には、免疫された動物と同じ種の細胞）と融合される。ハイブリドーマ産生融合手順における使用に適切な骨髄腫細胞株は、好ましくは非抗体産生であり、高い融合効率を有し、そして、所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択培地中でその細胞株を増殖し得なくさせる酵素欠損を有する。

10

【0142】

当業者に公知のように、多くの骨髄腫細胞のうちの任意の細胞が使用され得る（Goding、1986；Campbell、1984）。例えば、免疫した動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7、およびS194/5XX0 Bulが使用され得；ラットについて、R210.RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983F、4B210が使用され得；そしてU-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2、およびUC729-6はすべて、細胞融合に関連して有用である。

【0143】

抗体産生脾臓細胞または抗体産生リンパ節細胞、および骨髄腫細胞のハイブリッドを生成するための方法は、通常、細胞膜の融合を促進する因子（化学的または電氣的）の存在下で、2：1の比率で体細胞を骨髄腫細胞と混合する工程を包含するが、この比率はそれぞれ約20：1～約1：1まで変動し得る。センダイウイルスを使用する融合方法は、記載されており（KohlerおよびMilstein；1975；1976）、そしてポリエチレングリコール（PEG）（例えば、37%（v/v）PEG）を使用する融合方法は、Gefterra（1977）に記載されている。電氣的に誘導された融合方法の使用もまた適切である（Goding、1986）。

20

【0144】

融合手順は通常、低い頻度（約  $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-8}$ ）で生存可能なハイブリッドを生成する。しかし、これは問題を提起しない。なぜなら、生存可能な融合ハイブリッドは、選択培地中で培養することによって、親の非融合細胞（特に、通常は無限に分裂しつづける、非融合骨髄腫細胞）から識別されるからである。選択培地は、一般に、組織培養培地中でのヌクレオチドのデノボ合成をブロックする薬剤を含む培地である。例示的かつ好ましい薬剤は、アミノプテリン、メトトレキサート、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サートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成をブロックし、一方、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキサートが使用される場合、ヌクレオチドの供給源としてヒポキサンチンおよびチミジンを培地に補充する（HAT培地）。アザセリンが使用される場合、ヒポキサンチンを培地に補充する。

30

40

【0145】

好ましい選択培地は、HATである。ヌクレオチドサルベージ経路を機能し得る細胞のみが、HAT培地中で生存し得る。骨髄腫細胞は、サルベージ経路の重要な酵素（例えば、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T））を欠損し、そしてそれらは生存し得ない。B細胞はこの経路を機能し得るが、それらは培養中で限られた寿命を有し、そして一般に約2週間以内に死滅する。従って、選択培地中で生存し得る唯一の細胞は、骨髄腫細胞およびB細胞から形成されたハイブリッドである。

【0146】

この培養は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。代表的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート中での単一クローン希釈によ

50

って細胞を培養し、次いで所望の反応性について個々のクローンの上清を試験すること(約2~3週間後)によって、実施される。このアッセイは、高感度で、単純で、そして迅速であるべきである(例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫検定法、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイ(dot immunobinding assay)など)。

#### 【0147】

次いで、選択されたハイブリドーマを段階希釈し、そして個々の抗体産生細胞株にクローン化する。次いで、このクローンは無限に増殖されて、mAbを提供し得る。細胞株は、2つの基本的様式でmAb産生のために利用され得る。ハイブリドーマのサンプルは、もともとの融合物のために体細胞および骨髄腫細胞を提供するために使用された型の組織適合性動物に注射(しばしば、腹腔腔内へ)され得る。この注射された動物は、融合された細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発症する。次いで、この動物の体液(例えば、血清または腹水)を穿刺により採取して、高濃度でmAbを提供し得る。個々の細胞株はまた、インビトロで培養され得る。ここで、mAbは培養培地中に自然に分泌され、ここからmAbは高濃度で容易に獲得され得る。いずれの方法によって産生されたmAbも、所望であれば、濾過、遠心分離および種々のクロマトグラフィー方法(例えば、HPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー)を使用して、さらに精製され得る。

#### 【0148】

(R. Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3に関わる癌を診断すること) Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2およびSEM A3、ならびにそれらの対応する遺伝子は、癌の診断指標または予後指標として使用され得る。より詳細には、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2およびSEM A3に関連する、点変異、欠失、挿入、または調節の混乱(perturbation)は、癌を引き起こし得るかまたは癌の発達を促進し得、原発部位において腫瘍の進行を引き起こすかまたは促進し得、そして/または転移を引き起こすかまたは促進し得る。Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2およびSEM A3の発現によって影響され得る悪性疾患に関連する他の現象としては、新脈管形成および組織侵襲が挙げられる。

#### 【0149】

##### (1. 遺伝子診断)

本発明の1つの実施形態は、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3の発現における変動を検出するための方法を包含する。これは、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、もしくはSEM A3のレベルを決定する工程、または発現される産物における特定の変化を決定する工程を包含し得る。明らかに、この種類のアッセイは、関連する癌の診断において重要性を有する。このような癌としては、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、小腸、血球、膵臓、結腸、胃、子宮頸部、乳房、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、口組織、骨髄および血液組織の癌が挙げられ得る。

#### 【0150】

生物学的サンプルは、任意の組織または流体であり得る。種々の実施形態は、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、小腸、血球、膵臓、結腸、胃、子宮頸部、乳房、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、口組織、骨髄および血液組織の細胞を含む。他の実施形態は、末梢血液、リンパ液、腹水、漿液、胸水、痰、脳脊髄液、涙液、糞便または尿のような流体サンプルを含む。

#### 【0151】

使用される核酸は、標準的な方法論(Sambrookら、1989)に従って、生物学

10

20

30

40

50

的サンプルに含まれる細胞から単離される。核酸は、ゲノムDNAまたは分画された細胞RNAもしくは全細胞RNAであり得る。RNAが使用される場合には、このRNAを相補DNAに転換することが、所望であり得る。1つの実施形態においては、このRNAは、全細胞RNAであり；別の実施形態では、RNAは、ポリA RNAである。通常、核酸は、増幅される。

#### 【0152】

形式に依存して、目的の特異的核酸は、増幅を使用して直接的に、または増幅に続いて第2の公知の核酸を用いてサンプル中で同定される。次に、同定された産物が検出される。特定の適用においては、この検出は、可視的な手段（例えば、ゲルのエチジウムブロミド染色）によって実施され得る。あるいは、この検出は、化学発光によるか、放射性標識または蛍光標識の放射性シンチグラフィによるか、あるいは電子的化または熱的なインパルスシグナルを使用するシステム（Affymax Technology; Bellus, 1994）によってさえ、産物の間接的な同定を包含し得る。

10

#### 【0153】

検出に続いて、所定の患者において見られる結果を、正常な患者およびFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3関連の病理を有する患者の統計的に有意な参照群と、比較し得る。この様式で、検出されるFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3の量または種類と、種々の臨床状態とを相関付けることが可能である。

20

#### 【0154】

遺伝子の変異は、欠失、挿入、点変異および重複を含む。点変異は、終止コドン、フレームシフト変異またはアミノ酸置換を生じる。体細胞変異は、非生殖系列組織において生じる変異である。生殖系列組織は、任意の組織において生じ、そして遺伝する。コード領域内および外側の変異はまた、ともに、遺伝子の転写を変えるか、または不安定化するか、またはそうでなければ転写物(mRNA)もしくはタンパク質のいずれかのプロセッシングを変えることによって、産生されるFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3の量に影響し得る。

#### 【0155】

種々の異なるアッセイがこれに関して意図され、これには、限定しないが、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)、直接的DNA配列決定、PFG E分析、サザンまたはノーザンプロットティング、一本鎖コンフォメーション分析(SSCA)、RNAse保護アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)、ドットプロット分析、変性勾配ゲル電気泳動、RFLPおよびPCR<sup>T</sup>M-SSCPが挙げられる。

30

#### 【0156】

##### (2. サザン/ノーザンプロットティング)

プロットティング技術は、当業者に周知である。サザンプロットティングは、標的としてDNAの使用に関し、一方、ノーザンプロットティングは、標的としてRNAの使用に関する。それぞれが、異なる型の情報を提供するが、多くの局面において、cDNAプロットティングは、プロットティングまたはRNA種に類似する。

40

#### 【0157】

簡単に述べると、適切なマトリクス（しばしば、ニトロセルロースのフィルター）に固定されたDNA種またはRNA種を標的化するためにプローブが使用される。異なる種は、分析を促進するために空間的に分離されるべきである。これは、しばしば、核酸種のゲル電気泳動、続くフィルター上での「プロットティング」によって達成される。

#### 【0158】

引き続き、プロットされた標的が、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でプローブ（通常、標識される）とともにインキュベートされる。プローブが標的との塩基対を形成するように設計されるので、プローブは、再生条件下で標的配列の部分に

50

結合する。次いで、結合していないプローブは、除去され、そして検出が上記のように達成される。

【0159】

(3. 分離方法)

通常、1つの段階でまたは別の段階で、特異的な増幅が行われたか否かを決定するために、テンプレートおよび過剰なプライマーから増幅産物を分離することが所望される。1つの実施形態において、増幅産物を標準的な方法を用いて、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分離する。Sambrookら、1989を参照のこと。

【0160】

あるいは、クロマトグラフィー技術を使用して、分離を達成し得る。本発明において用いられ得る、多くの種類のクロマトグラフィーが存在する：吸着、分配、イオン交換、およびモレキュラーシーブ、ならびにカラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、およびガスクロマトグラフィーを含むクロマトグラフィーを用いるための多くの専門的技術(Freifelder、1982)。

【0161】

(4. 検出方法)

マーカー配列の増幅を確認するために、産物を、可視化し得る。代表的な可視化方法の1つは、臭化エチジウムを用いたゲルの染色およびUV光下の可視化を含む。あるいは、増幅産物が、放射線標識ヌクレオチドまたは蛍光定量的に標識されたヌクレオチドを用いて完全に標識されれば、増幅産物は、分離後、X線フィルムに曝露されるか、または適切な刺激スペクトルの下で可視化され得る。

【0162】

(5. キット構成要素)

Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3およびその改変体を検出および配列決定するのに必要な全ての基本的な物質および試薬を、キットの中に一緒に組合せ得る。これは、一般に、事前選択プライマーおよびプローブを含む。核酸を増幅するのに適切な酵素もまた含まれ得、これは増幅のために必要な反応混合物を提供するための種々のポリメラーゼ(RT、Taq Sequenase TMなど)、デオキシヌクレオチド、および緩衝液を含む。このようなキットは、一般的に、適切な手段で、それぞれの個々の試薬および酵素ならびにそれぞれのプライマーまたはプローブに対して異なる容器を含む。

【0163】

(6. RT-PCR<sup>TM</sup> (相対的定量的))

cDNAへのRNAの逆転写(RT)およびそれに続く相対的な定量PCR<sup>TM</sup> (RT-PCR<sup>TM</sup>)を使用して、患者から単離された特定のmRNA種の相対的な濃度を測定し得る。特定のmRNA種の濃度が変化することを決定することによって、この特定のmRNA種をコードする遺伝子が、示差的に発現されることが示される。

【0164】

PCR<sup>TM</sup>において、ある試薬が限界になるまで、増幅される標的DNAの分子数は、反応のサイクル毎にほぼ2倍に増加する。その後、サイクル間で増幅される標的の増加がなくなるまで、増幅速度は、次第に減少する。サイクル数をX軸に、そして増幅される標的DNAの濃度のlogをY軸にして、グラフをプロットすると、このプロットした点を繋ぐことによって、特徴的な形の曲線が形成される。1回目のサイクルによる開始時では、この曲線の傾きは、正でありかつ一定である。これは、この曲線の直線部分といわれる。ある試薬が限界になった後、この曲線の傾きは、減少し始めそして最終的に0になる。この時点で、増幅された標的DNAの濃度は、ある固定値に漸近する。これは、この曲線のプラトー部分といわれる。

【0165】

このPCR<sup>TM</sup>増幅の直線部分における標的DNAの濃度は、反応を開始する前の標的の

10

20

30

40

50

開始濃度に、正比例する。同じサイクル数を完了しそして直線範囲にあるPCR<sup>T M</sup>反応において、標的DNAの増幅産物の濃度を決定することによって、元のDNA混合物中の特定の標的配列の相対的な濃度を決定することが可能である。これらのDNA混合物が、異なる組織または細胞から単離されたRNAから合成されたcDNAである場合、この標的配列が由来する特定のmRNAの相対的な存在量が、それぞれの組織または細胞について決定され得る。このPCR<sup>T M</sup>産物の濃度と相対的なmRNAの存在量との正比例は、このPCR<sup>T M</sup>反応の直線範囲にのみ当てはまる。

#### 【0166】

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能によって決定され、そして標的DNAの元の濃度に非依存的である。従って、mRNA種の相対的な存在量が、RNA集団の収集物についてRT-PCR<sup>T M</sup>によって決定され得る前に、満たされなければならない第1の条件は、このPCR<sup>T M</sup>反応がこのPCR<sup>T M</sup>反応曲線の直線部分にあるときに、増幅されたPCR<sup>T M</sup>産物の濃度がサンプリングされなければならないということである。

10

#### 【0167】

特定のmRNA種の相対的な存在量を首尾よく決定するためのRT-PCR<sup>T M</sup>実験について満たされなければならない第2の条件は、増幅可能なcDNAの相対的な濃度が、ある独立した標準に対して正規化されなければならないということである。RT-PCR<sup>T M</sup>実験の目標は、サンプル中の全mRNA種の平均存在量に対する、特定のmRNA種の存在量を決定することである。以下に記載の実験において、 $\alpha$ -アクチン、アスパラギンシンターゼおよびリポコルチンIIのmRNAを、外部標準および内部標準として使用し、これらに対して、他のmRNAの相対的な存在量を比較する。

20

#### 【0168】

競合的PCR<sup>T M</sup>についてのほとんどのプロトコルは、標的とほぼ同量の内部PCR<sup>T M</sup>標準を利用する。これらの戦略は、PCR<sup>T M</sup>増幅産物がPCR<sup>T M</sup>の直線期にサンプリングされる場合に、効果的である。反応がプラトー期に近づいている時に産物をサンプリングする場合、低量の産物が比較的過度に現われる。多くの異なるRNAサンプルについて行われる相対的な存在量の比較（例えば、示差的発現についてRNAサンプルを試験する場合）は、RNAの相対的な存在量において差異を生じるよう歪められ、その存在量は、実際に存在するよりも少なく現われる。これは、内部標準が標的よりもはるかに豊富に存在する場合には、重要な問題ではない。内部標準が標的よりも豊富に存在する場合、直接的な直線比較が、RNAサンプル間でなされ得る。

30

#### 【0169】

上記の議論は、臨床的に由来する物質についてのRT-PCR<sup>T M</sup>アッセイについての理論的考察を記載する。臨床サンプルに固有の問題は、それらの量が可変的である（正規化に問題を生じる）こと、そしてそれらの質が可変的である（信頼できる内部コントロール（好ましくは、標的よりも大きいサイズの）の同時増幅を必要とする）ことである。これらの両方の問題は、RT-PCR<sup>T M</sup>が、内部標準を用いる相対的な定量RT-PCR<sup>T M</sup>として行われ、この内部標準が、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、そしてこの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よりもほぼ5~100倍高い場合に、克服される。このアッセイは、それぞれのmRNA種の絶対的存在量ではなく、相対的な存在量を測定する。

40

#### 【0170】

他の研究は、外部標準プロトコルを用いる、より通常相対的な定量RT-PCR<sup>T M</sup>アッセイを使用して行われ得る。これらのアッセイは、増幅曲線の直線部分におけるPCR<sup>T M</sup>産物をサンプリングする。サンプリングに最適なPCR<sup>T M</sup>サイクル数は、各標的cDNAフラグメントについて経験的に決定されなければならない。さらに、種々の組織サンプルから単離された各RNA集団の逆転写酵素産物は、等濃度の増幅可能なcDNAに対して注意深く正規化されなければならない。この考慮は非常に重要である。なぜなら、このアッセイは、絶対的なmRNAの存在量を測定するからである。絶対的なmRNAの

50

存在量は、正規化されたサンプルのみにおける、示差的な遺伝子発現の尺度として使用され得る。増幅曲線の直線範囲の経験的な決定およびcDNA調製物の正規化は、退屈な時間のかかるプロセスであるが、このRT-PCR<sup>T M</sup>アッセイの結果は、内部標準を用いる相対的な定量RT-PCR<sup>T M</sup>アッセイからの結果よりも優れたものであり得る。

【0171】

この利点についての1つの理由は、内部標準/競合因子を用いないので、全ての試薬が、増幅曲線の直線範囲において、単一のPCR<sup>T M</sup>産物に変換され得、従って、これが、アッセイの感度を増加するということである。別の理由は、1つのPCR<sup>T M</sup>産物のみを用いるので、電気泳動ゲル上での産物の提示または他の提示方法の複雑性が低下し、バックグラウンドが少なくなり、より容易に理解されることである。

10

【0172】

なお他の研究は、「リアルタイム」RT-PCR<sup>T M</sup>(Higuchiら、1993)を使用して実行され得る。これらのアッセイは、PCR<sup>T M</sup>産物が、固定された数のサイクルの後に蓄積するPCR<sup>T M</sup>産物の量を検出する代わりに、それらが蓄積する時、そのPCR<sup>T M</sup>産物を検出する。それぞれのPCR<sup>T M</sup>サイクルの後に、蛍光検出する方法が必要とされる。蛍光シグナルは、サイクル数に対してプロットされる。サイクル数は、閾値サイクル(C<sub>T</sub>)として表現される。最初の蛍光は、プロットのベースラインを規定し、そして蓄積されたPCR<sup>T M</sup>産物は、ベースラインの上の蛍光の増加によって示される。サンプル中の標的の量の定量は、開始コピー数を決定するために、C<sub>T</sub>を測定し、検量線と比較することによって決定される。

20

【0173】

「リアルタイム」RT-PCR<sup>T M</sup>(Higuchiら、1993)は、終点よりもむしろ、PCR<sup>T M</sup>の対数期の間決定されるので、標的の量のより正確な定量を提供する。C<sub>T</sub>値の使用によって、より大きな動的範囲が可能になるので、これはまたより高いスループットを可能にする。それぞれのサンプルの希釈は、もはや必要ではない。

【0174】

(7. 免疫診断)

本発明の抗体は、ELISAおよびウェスタンブロットティングのような技術によって、健康な組織および疾患状態の組織のFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2、またはSEM A3の量

30

【0175】

本発明の抗体の使用が、ELISAアッセイにおいて、考慮される。例えば、抗Fus1抗体、抗101F6抗体、抗Gene21抗体、抗Gene26抗体、抗Beta\*抗体、抗Luca1抗体、抗Luca2抗体、抗PL6抗体、抗123F2抗体、または抗SEM A3抗体は、選択された表面(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のようなタンパク質親和性を示す表面)に固定される。不完全に吸着された材料を除くために洗浄された後、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、または粉ミルクの溶液のような試験抗血清に関して抗原的に中性であることが公知の非特異的タンパク

40

【0176】

ウェルへ抗体を結合し、バックグラウンドを減少させるために非反応性物質でコーティングし、そして非結合物質を洗浄により除去した後に、固定表面を、免疫複合体(抗原/抗体)形成を導く様式で、試験されるサンプルと接触させる。

【0177】

試験サンプルと結合抗体との間の特異的な免疫複合体の形成、引き続き洗浄に続いて、免疫複合体形成の存在および量さえも、これを、一次抗体とは異なるFus1、101F6

50

、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123 F 2、またはSEM A 3に対する特異性を有する二次抗体に供することによって決定され得る。適切な条件は、好ましくは、サンプルを希釈剤（例えば、BSA、ウシガンマグロブリン（BGG）ならびにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）/Tween（登録商標））で希釈することを含む。これらの加えられる薬剤はまた、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、層状の抗血清を、約2～約4時間、好ましくは約25～約27のオーダーの温度でインキュベートし得る。インキュベーションに続いて、抗血清接触表面を、非免疫複合材料を除去するために洗浄する。好ましい洗浄手順は、PBS/Tween（登録商標）またはホウ酸塩緩衝液のような溶液で洗浄することを含む。

10

#### 【0178】

検出手段を提供するために、二次抗体は、好ましくは、適切な色素原性基質を用いるインキュベーションの際に色の発色を生成する関連酵素を有する。従って、例えば、免疫複合体形成の発生を支持する時間の間および条件下（例えば、PBS/Tween（登録商標）のようなPBS含有溶液中、室温での2時間のインキュベーション）でのウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼまたは（西洋ワサビ）ペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgGとの二次抗体結合表面の接触およびインキュベーションが望まれる。

#### 【0179】

二次酵素タグ化抗体を用いるインキュベーションの後、そして未結合材料を除去するための洗浄に続いて、標識の量は、酵素標識のようなペルオキシダーゼの場合において、尿素およびプロモクレゾールパープルまたは2,2'-アジノ（azino）-ジ-（3-エチル-ベンズチアゾリン）-6-スルホン酸（ABTS）およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のような色素原性基質とのインキュベーションによって定量される。次いで、定量は、色生成の程度を測定すること（例えば、可視スペクトル分光光度計を使用すること）によって達成される。

20

#### 【0180】

先の形式は、サンプルをアッセイプレートに最初に結合することによって変更され得る。次いで、一次抗体が、このアッセイプレートとともにインキュベートされ、続いて、一次抗体に対する特異性を有する標識された二次抗体を使用して結合した一次抗体を検出する。

#### 【0181】

本発明の抗体組成物は、免疫プロット分析またはウェスタンプロット分析において大きな用途を見出す。抗体は、固体支持マトリクス（例えば、ニトロセルロース、ナイロンまたはその組み合わせ）上に固定されたタンパク質の同定のための高親和性の一次試薬として使用され得る。免疫沈降、続くゲル電気泳動とともに、これらは、抗原の検出に使用される二次試薬が有害なバックグラウンドを引き起こす抗原を検出する際に使用するための単一工程試薬として使用され得る。ウェスタンプロットとともに使用される免疫学に基づいた検出法は、これに関して特定の使用であると考慮される、毒素部分に対する酵素タグ化二次抗体、放射線標識二次抗体または蛍光タグ化二次抗体を含む。

30

#### 【0182】

（8.他のマーカーとの腫瘍サブレッサーの組み合わせ）  
腫瘍は、特に腫瘍進行の進んだ段階において、不均一であることが周知である（Mortonら、1993；FidlerおよびHart、1982；Nowell、1982；Elderら、1989；Bystrynら、1985）。原発性腫瘍または転移内の腫瘍細胞は全て、同じマーカー遺伝子を発現し得るが、特定のmRNAの発現レベルは、かなり異なる（Elderら、1989）。特定の例において、一連の不均質なマーカーの整列を処理し得る検出システムを使用することが必要である。

40

#### 【0183】

従って、本発明は、マーカーとして種々の腫瘍サブレッサーを例示するが、癌の存在または非存在に相関する任意のマーカーが、腫瘍の検出および処置の効力を改善するために、これらのマーカーと組み合わせ使用され得る。本明細書中で使用される場合、マーカー

50

は、その産生または産生の欠如が癌細胞の特徴である任意のタンパク質分子（または対応する遺伝子）である。所定の分析において使用されるマーカーの特定のセットに依存して、統計学的分析は異なる。例えば、特定の組み合わせのマーカーが、黒色腫または乳癌に非常に特異的である場合、陽性結果の特形学的有意性は高い。しかし、このような特異性は、感受性を犠牲にして達成される。すなわち、陰性の結果は、黒色腫または乳癌の存在下でさえ生じ得る。同様に、異なる組み合わせは、非常に敏感であり得る。すなわち、陰性になることはほとんどないが、低い特異性を有する。

【0184】

新規マーカーが同定されると、異なる民族集団もしくは性別、異なる地理的分布、異なる疾患段階、異なる程度の特異性または異なる程度の感受性で最適な機能を示す異なる組み合わせが、開発され得る。疾患の進行に対する治療レジメンの効果に対して特に敏感なマーカーの組み合わせもまた、開発され得る。患者は、手術、遺伝子治療、高熱、免疫療法、サイトカイン治療、遺伝子治療、放射線療法または化学療法後に、特定の治療が有効であるか否か決定するためにモニターされ得る。

10

【0185】

黒色腫のための特に有用なマーカーの組み合わせの1つは、チロシナーゼおよびMAGEファミリーのメンバー（特にMAGE-1またはMAGE-3）である。ヒトチロシナーゼは、ヒトの皮膚および眼の褐色または黒色の色素の群である、メラニンの産生を調節する、必須の酵素である（Nordlundら、1989；Hoonら、1993）。より詳細には、チロシナーゼは、チロシンのDopaへの変換およびDopaのドーパキノンへの変換を触媒する。

20

【0186】

これらおよび他のマーカーと組み合わせて使用され得る、多くの他のマーカーが存在する。例えば、b-ヒト絨毛性ゴナドトロピン（b-HCG）。b-HCGは、妊婦の胎盤の栄養膜細胞によって産生され、そして、初期段階での妊娠の維持に必須である（Pierceら、1981；Talmadgeら、1984）。b-HCGは、栄養膜または生殖系列起源の腫瘍（例えば、絨毛癌または精巣癌腫細胞）によって産生されることが公知である（Madersbacherら、1994；Coleら、1983）。b-HCGの異所的発現もまた、種々の非生殖腺の腫瘍（例えば、乳癌、肺癌、胃癌、結腸癌および膵臓癌など）において、多くの異なるイムノアッセイによって検出されている（McManusら、1976；Yoshimuraら、1994；Yamaguchiら、1989；Marcillacら、1992；Alfthanら、1992）。これらの腫瘍におけるb-HCG産生の機能は、未だ未知であるが、癌細胞によるが、非生殖腺起源の正常細胞にはよらないb-HCGの隔世遺伝的発現は、b-HCGが、黒色腫および乳癌の検出において潜在的に優れたマーカーであることを示唆する（Hoonら、1996；Sarantouら、1997）。

30

【0187】

マーカーの別の例示的な例は、グリコシルトランスフェラーゼb-1、4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ（GalNAc）である。GalNAcは、それぞれ、GM2およびGD2を生成するための、b1(r)4結合によるN-アセチルガラクトサミンの、ガングリオシドGM3およびGD3の両方への転移を触媒する（Nagataら、1992；Furukawaraら、1993）。これはまた、N-アセチルガラクトサミンの他の炭水化物分子（例えば、ムチン）への転移も触媒する。ガングリオシドは、細胞分化、接着および悪性形質転換において重要な役割を果たす、シアル酸含有グリコスフィンゴリピドである。黒色腫において、ガングリオシドGM2およびGD2の発現は、しばしば、非常に高いレベルに増強され、そして転移腫瘍を含む腫瘍進行に関連する（Hoonら、1989；Andoら、1987；Carubiaら、1984；Tsuchidaら、1987a）。ガングリオシドはまた、黒色腫、腎臓癌腫、肺癌腫、乳癌腫の細胞において発現される。ガングリオシドGM2およびGD2は、ヒトにおいて免疫原性であり、そして特定の免疫療法（例えば、ヒトモノクローナル抗体または癌ワクチン）の

40

50

ための標的として使用され得る (Tsuchidaら、1987b; Irie、1985)。

【0188】

Ga1NAc mRNAは、GM2およびGD2の発現マーカーとして使用され得、そして結果的に、黒色腫または乳癌細胞のいずれかのマーカーとして使用され得る。Ga1NAcは、一般に、正常なリンパ球、上皮細胞、メラノサイト、結合組織またはリンパ節の細胞においては発現されない。検出されるとしても、非常に低レベルである。前立腺特異的抗原は、前立腺癌に十分特徴付けられたマーカーである (Gomellaら、1997)。白血病についてのbrc/abl遺伝子は、HOJ-1と組み合わせて有用であることが意図される、さらに十分に特徴付けられたマーカーである。

10

【0189】

本発明によって意図される他のマーカーとしては、細胞溶解性Tリンパ球(CTL)標的が挙げられる。MAGE-3は、黒色腫細胞および乳癌細胞において同定されたマーカーである。MAGE-3は、多くの黒色腫および他の腫瘍において発現され、そして(CTL)標的である (Gauglerら、1994)。MAGE-1、MAGE-2、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-12、MAGE-Xpは、MAGE遺伝子ファミリーの他のメンバーである。MAGE-1遺伝子の配列は、MAGE-3と73%の同一性を示し、そしてCTLによっても認識される抗原を発現する (Gauglerら、1994)。MART-1は、別の潜在的なCTL標的であり (Robbinsら、1994)、そしてまた、本発明において含まれ得る。

20

【0190】

MUC18は、黒色腫細胞の同定において有用である、別のマーカーである (Lehmanら、1989; Lehmanら、1987)。MUC18は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである、細胞表面糖タンパク質であり、そして神経細胞接着分子(NCAM)に対して配列相同性を有する。他のムチンファミリーのメンバーとしては、MUC1、MUC2、MUC3およびMUC4が挙げられる。これらは、特定の腫瘍細胞株で高レベルで発現されることが見出され (Hollingsworthら、1994)、そしてまた、本発明の新規HOJ-1マーカーと組み合わせてマーカーとして使用され得る。

【0191】

黒色腫転移の発生に関連する接着分子の免疫グロブリンスーパーファミリーの他のメンバー (Dentonら、1992)は、本発明において使用され得る。例としては、細胞間接着分子-1(ICAM-1)、NCAM、VCAM-1およびELAMが挙げられる。別の実施形態としては、癌腫細胞関連分子および他の転位性疾患に関連する分子 (例えば、癌胎児抗原(CEA; LinおよびGuidotti、1989))が挙げられる。

30

【0192】

他の癌腫または皮膚癌に関連するタンパク質およびその対応する核酸もまた、本発明において使用され得る。好ましい例としては、黒色腫抗原gp75 (Vijayasarda hiら、1990)、ヒトサイトケラチン20、高分子量黒色腫抗原 (Nataliら、1987)およびサイトケラチン19(K19) (Dattaら、1994)が挙げられる。本明細書中で有用であり得る他のマーカーとしては、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)のインヒビターが挙げられる。例えば、CDK4は、細胞周期のG1期を通じて進行を調節する。CDK4の活性は、活性化サブユニット(D型サイクリン)および阻害サブユニットによって制御され、p16INK4は、CDK4に特異的に結合して阻害するタンパク質として、生化学的に特徴付けられている (Serranoら、1993; Serranoら、1995)。他のCDK阻害タンパク質としてはまた、p16、p21WAF1およびp27KIP1が挙げられる。この列挙は、本発明において使用され得る潜在的なマーカーの型および数について、網羅的であることを意図せず、例示のみである。

40

【0193】

メラニン合成経路に関する他のタンパク質およびその対応する核酸は、マーカーとして使

50

用され得る（例えば、チロシナーゼ関連タンパク質1および2、ならびにpMe117遺伝子ファミリーのメンバー）（Kwonら、1993）。

【0194】

本発明の好ましい実施形態は、癌細胞の検出のための、多くの異なる組み合わせのマーカ-を含む。細胞中の新生物を示す任意のマーカ-が、本発明において含まれ得る。

【0195】

（S・トランスジェニック動物/ノックアウト動物）

本発明の1つの実施形態において、機能的なFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3ポリペプチドあるいはこれらの改変体をコードする機能的導入遺伝子を含むトランスジェニック動物が、作製される。Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3導入遺伝子を発現するトランスジェニック動物、このような動物に由来する組換え細胞株およびトランスジェニック胚は、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3の機能を誘導または抑制する薬剤を、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、癌のような指標を研究するためのモデルとして使用され得る。

【0196】

本発明の1つの実施形態において、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3導入遺伝子を非ヒト宿主に導入して、ヒトまたはマウスのFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作製する。このトランスジェニック動物は、導入遺伝子の発現を可能にする様式でゲノムに導入遺伝子を組み込むことにより作製される。トランスジェニック動物を作製する方法は、一般に、Wagner and Hoppe（米国特許第4,873,191号；本明細書中に参考として援用される）、Brinster et al. 1985；本明細書中にその全体が参考として援用される）、および「Manipulating the Mouse Embryo；A Laboratory Manual」2nd edition（eds., Hogan, Beddington, Constantini and Long, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994；本明細書中にその全体が参考として援用される）に記載される。

【0197】

導入遺伝子と内因性遺伝子との間での相同組換えにより内因性Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3を置き換えることが望ましい；またはこの内因性遺伝子を、「ノックアウト」動物の作出において欠失により除去し得る。代表的には、ゲノム配列に隣接するFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3遺伝子は、マイクロインジェクションにより受精卵へと移入される。マイクロインジェクションを受けた卵は、宿主雌性動物に移植され、そして導入遺伝子の発現について子孫がスクリーニングされる。トランスジェニック動物は、受精卵から作製され得、これらとしては、爬虫類、両生類、鳥類、哺乳動物および魚類が挙げられるが、これらに限定されない動物から作製され得る。特定の好ましい実施形態において、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3を過剰発現するか、または変異形態のポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスが作製される。あるいは、ノックアウトマウスにFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3が存在しないことにより、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca

10

20

30

40

50

1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3タンパク質の喪失がインビボで細胞に与える影響の研究が可能になる。ノックアウトマウスはまた、Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3関連の癌の発生についてのモデルを提供する。

【0198】

上記のように、トランスジェニック動物およびこのような動物に由来する細胞株は、特定の試験実験における用途を見出し得る。これに関して、野生型または変異体のFus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3を発現し得るトランスジェニック動物および細胞株は、試験物質に曝され得る。これらの試験物質は、野生型Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3発現を増強する能力/および/またはFus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3の発現もしくは機能を機能させるかもしくは損なう能力についてスクリーニングされ得る。

10

【0199】

本明細書中で言及されるプロモーター配列は、-ガラクトシダーゼ発現を駆動するために使用され得る。トランスジェニックマウスにおける-ガラクトシダーゼレポーター構築物の使用は、Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3の発現を調節する因子を同定するために使用され得る。

20

【0200】

(T.Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3を使用する癌を処置するための方法)

別の実施形態において、本発明はまた、癌の処置を包含する。本発明に従って処置され得る癌の型は、Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3の関与によるのみで制限される。関与によって、Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3が変異されることも異常であることさえも必要とせず、Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3の過剰発現が、細胞内の他の病変を実際に克服し得る。従って、広範な種々の癌細胞が、Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123F 2またはSEM A 3治療を使用して処置され得、これらには、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、小腸、血液細胞、膵臓、結腸、胃、子宮頸部、胸部、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、口腔組織、骨髄および血液組織が挙げられる。

30

【0201】

多くの状況下で、癌細胞は、殺傷されることも、正常な細胞死または「アポトーシス」を受けよう誘導されることも必要ではない。むしろ、意味のある処置を達成するために、必要なことは、腫瘍増殖をある程度に遅くさせることである。腫瘍増殖は、部分的または完全にブロックされてもよいが、いくらかの腫瘍退行が達成されてもよい。腫瘍負荷の「寛解」および「減少」のような臨床用語はまた、それらの通常用語法を考慮して意図される。

40

【0202】

(1. 遺伝子ベースの治療)

本発明者らによって意図される治療実施形態の1つは、いくつかの癌の腫瘍形成に関連する事象への分子レベルでの介入である。詳細には、本発明者らは、Fus 1、101F 6、Gene 21、Gene 26、Beta\*、Luca 1、Luca 2、PL 6、123

50

F 2 または S E M A 3 を癌細胞に提供し得る発現カセットを、それらの癌細胞に提供することを意図する。発現ベクターおよびそれに使用される遺伝子エレメントの長期にわたる考察が、参考としてこの節において援用される。特に好ましい発現ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、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のようなウイルスベクターである。リポソームにカプセル化した発現ベクターもまた、好ましい。

#### 【 0 2 0 3 】

種々の経路が、種々の腫瘍型について意図される。経路についての以下の節は、可能な経路の広範なリストを含む。実質的に任意の腫瘍について、全身送達が意図される。これは、微視的な癌または転移性の癌を攻撃するために特に重要であることを示す。別々の腫瘍塊が同定され得る場合、種々の直接的、局所的小および領域的なアプローチが採用され得る。例えば、腫瘍に、発現ベクターを直接注射し得る。腫瘍床は、切除前、切除中または切除後に処置され得る。切除後は、一般に、手術後に設置されたカテーテルによってベクターを送達する。腫瘍の血管系を利用して、支持する動脈または動脈に注射することによって腫瘍内にベクターを導入し得る。より遠位な血液供給経路もまた、利用され得る。

10

#### 【 0 2 0 4 】

異なる実施形態において、エキソビボ遺伝子治療が意図される。このアプローチは、骨髄に関連する癌の処置に特に適切であるが、これらに限定されない。エキソビボの実施形態において、患者由来の細胞を取り出し、そして少なくとももいくらかの時間体外で維持する。この期間の間、治療が送達され、その後、細胞を患者に再導入し；望ましくは、サンプル中の任意の腫瘍細胞は、殺傷されている。

20

#### 【 0 2 0 5 】

##### ( 2 . タンパク質治療 )

別の治療アプローチは、F u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2 または S E M A 3 のポリペプチド、活性フラグメント、合成ペプチド、模倣物またはそれらの他のアナログを被験体に提供することである。タンパク質は、組換え発現手段によって生成され得るか、また十分に小さい場合、自動ペプチド合成機によって生成され得る。処方物は、投与経路および目的に基づいて選択され得、これらには、リポソーム処方物および古典的な薬学的調製物が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【 0 2 0 6 】

##### ( 3 . 免疫療法、従来の化学療法または放射線療法との組み合わせ治療 )

D N A 損傷剤に対して耐性のある腫瘍細胞は、臨床腫瘍学における主要な問題を提示する。現在の癌研究の1つの目標は、化学療法および放射線療法の効力を改善する方法を見出すことである。1つの方法は、このような従来の治療法を遺伝子治療と組み合わせることによる。例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ ( H S - t k ) 遺伝子は、レトロウイルスベクター系によって脳腫瘍に送達された場合、抗ウイルス剤ガンシクロビルに対する感受性を首尾よく誘導した ( C u l v e r ら、1992 )。本発明の状況下で、F u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2 または S E M A 3 置換療法は、化学療法または放射線療法の介入と組み合わせると同様に使用され得ることが意図される。上記のように、F u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2 または S E M A 3 遺伝子治療と免疫療法とを組み合わせることもまた効果的であることが示され得る。

40

#### 【 0 2 0 7 】

本発明の方法および組成物を使用して、細胞を殺傷するため、細胞増殖を阻害するため、転移を阻害するため、脈管形成を阻害するため、あるいは腫瘍細胞の悪性表現型を逆転または減少するために、一般に、「標的」細胞にF u s 1、1 0 1 F 6、G e n e 2 1、G e n e 2 6、B e t a \*、L u c a 1、L u c a 2、P L 6、1 2 3 F 2 または S E M A 3 発現構築物および少なくとも1つの他の薬剤を接触させる。これらの組成物は、細胞

50

の増殖を殺傷または阻害するのに効果的な組み合わせの量で提供される。このプロセスは、細胞に、発現構築物およびこれらの薬剤または因子を同時に接触させることを包含し得る。これは、細胞に、両方の薬剤を含む単一の組成物または薬理的処方物を接触させることによってか、または細胞に、2つの別々の組成物または処方物（ここで、一方の組成物が、発現構築物を含み、そして他方が、薬剤を含む）を接触させることによって達成され得る。

【0208】

あるいは、遺伝子治療処置は、数分から数週間の範囲の間隔で、他の薬剤処置に先行または後続し得る。他の薬剤および発現構築物を細胞に別々に適用する実施形態において、一般に、その薬剤および発現構築物が、細胞に対して有利な組み合わせの効果をなお発揮し得るように、各送達の時点間で有意な期間が経過しないことを確保する。このような例において、互いに約12~24時間内、より好ましくは、互いに約6~12時間以内に、その両方の様式を細胞に接触させることが意図され、約12時間のみの遅延時間が、最も好ましい。いくつかの状況において、処置期間を有意に延長することが望ましくあり得るが、その場合、それぞれの投与間で、数日（2、3、4、5、6または7日）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8週間）経過させる。

10

【0209】

Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3あるいは他の薬剤のいずれかの1回以上の投与が望ましいこともまた、想定される。以下に例示するような種々の組み合わせが使用され、ここでは、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3が「A」であり、そして他の薬剤が「B」である：

20

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/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 B/A/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B.

他の組み合わせが、意図される。また、細胞殺傷を達成するために、両方の薬剤が、細胞を殺傷するのに効果的な組み合わせの量で細胞に送達される。

30

【0210】

組み合わせ治療における使用に適切な薬剤または因子は、細胞に適用された場合にDNA損傷を誘導する任意の化学化合物または治療方法である。このような薬剤および因子としては、DNA損傷を誘導する放射線および波動（例えば、 $\gamma$ -照射、X線、加速プロトン、UV照射、マイクロ波、電子放出など）が挙げられる。「化学療法剤」としても記載される、種々の化学化合物は、DNA損傷を誘導するよう機能し、これら全ては、本明細書中に開示される組み合わせの処置方法における使用に意図される。使用されることが意図される化学療法剤としては、例えば、以下が挙げられる：シスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトセシン、イホスファミド、メルファラン、クロランブシル、ブルスファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリコマイシン（plicomycin）、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、エストロゲンレセプター結合因子、タキソール、ゲンタマイシン、ナベルピン（navelbine）、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター、トランスプラチン（transplatinum）、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびメトトレキセート、ならびに過酸化水素。本発明はまた、1以上のDNA損傷剤（放射線ベースまたは実際の化合物のいずれでも）の組み合わせの使用（例えば、シスプラチンとのX線の使用またはエトポシドとnシスプラチンの使用）を包含する。特定の実施形態において、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3発現構築物と組み

40

50

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。

【0211】

本発明に従う癌の処置において、腫瘍細胞に、発現構築物に加えて、薬剤を接触させる。これは、局在化した腫瘍部位に放射線（例えば、X線、加速プロトン、UV光、線、またはマイクロ波でさえ）を照射することによって達成され得る。あるいは、腫瘍細胞に、アドリマイシン、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、マイトマイシンC、より好ましくは、シスプラチンのような化合物を含む治療有効量の薬学的組成物を被験体に投与することによって、薬剤を接触させ得る。上記のように、薬剤は、それをFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3発現構築物と組み合わせることによって、組み合わせ治療組成物またはキットとして調製および使用され得る。

10

【0212】

核酸（特に、DNA）を直接架橋する薬剤は、DNA損傷を促進することが想定され、これは、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3との相乗的な抗腫瘍性の組み合わせを導く。シスプラチンのような薬剤および他のDNAアルキル化剤が、使用され得る。シスプラチンは、癌を処置するために広範に使用されており、その有効用量は、計3つの過程で3週間毎に5日間、 $20\text{ mg/m}^2$ の臨床的適用において使用される。シスプラチンは、経口的には吸収されず、従って、静脈内、皮下、腫瘍内または腹腔内の注射を介して送達されるべきである。

20

【0213】

DNAを損傷する薬剤としてはまた、DNA複製、有糸分裂および染色体分離に干渉する化合物が挙げられる。このような化学療法化合物としては、アドリマイシン（ドキソルピシンとしても公知）、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどが挙げられる。これらの化合物は、新生物の処置のための臨床設定において広範に使用され、アドリマイシンについては21日間隔で $25\sim 75\text{ mg/m}^2$ の範囲の用量で静脈内にボラス注射を介して投与され、エトポシドについては $35\sim 50\text{ mg/m}^2$ で静脈内またはその2倍の静脈内用量を経口的に投与される。

【0214】

核酸の前駆体およびサブユニットの合成および忠実度を破壊する薬剤もまた、DNA損傷を導く。そのような多くの核酸前駆体が、開発されている。広範な試験を受けそして容易に利用可能な薬剤が、特に有用である。それ自体で、5-フルオロウラシル（5-FU）のような薬剤は、新生物組織によって優先的に使用され、このことが、この薬剤を、新生物細胞に標的化するために特に有用なものとする。非常に毒性であるが、5-FUは、広範なキャリア中で適用可能あり、 $3\sim 15\text{ mg/kg/day}$ の範囲の用量での局所的ではあるが静脈内投与で通常使用される。

30

【0215】

DNA損傷を引き起こし、そして広範に使用されている他の因子としては、線、X線、加速プロトン、として一般的に公知のもの、および/または腫瘍細胞への放射性同位体の直接送達も挙げられる。DNA損傷因子の他の形態（例えば、マイクロ波およびUV照射）も意図される。ほぼおそらく、これらの因子の全ては、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の構築および維持に対して、広範なDNA損傷をもたらす。X線についての投与量範囲は、長期期間（3~4週間）についての $50\sim 200$ レントゲンの日量から、 $2000\sim 6000$ レントゲンの単回用量にまでわたる。放射性同位体についての投与量範囲は、広範に変化し、そしてその同位体の半減期、放出される照射の強度およびタイプ、ならびに新生物細胞による取り込みに依存する。

40

【0216】

当業者は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、第33章（特に、624~652頁）に従う。投薬におけるいくつかのバ

50

リエーションは、処置される被験体の状態に依存して必然的に生じる。いずれにしる、投与を担う人は、個々の被験体についての適切な用量を決定する。さらに、ヒト投与については、調製物は、FDA Office of Biologics Standardsに要求される、滅菌基準、発熱基準、一般的な安全基準および純度基準を満たすべきである。

【0217】

本発明者らは、3p21.3に関連する癌を有する患者へのFus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3発現構築物の局所的送達、この臨床疾患を相殺するための治療効果的な遺伝子を送達するための非常に有効な方法であることを提唱する。同様に、化学療法または放射線療法は、被験体の身体の特定の罹患した領域に指向され得る。あるいは、発現構築物および/または薬剤の全身送達は、特定の状況下（例えば、広範な転移が生じている場合）で適切であり得る。

10

【0218】

Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3標的化治療と化学療法および放射線治療との組み合わせに加えて、他の遺伝子治療との組み合わせが有益であることもまた考えられる。例えば、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3およびp53変異またはp16変異を同時に標的化することにより、改良された抗癌処置を行い得る。おそらく、任意の他の腫瘍関連遺伝子（例えば、p21、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、BCRA2、p16、FHIT、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、FCC、MCC、ras、myc、neu、raf、erb、src、fms、jun、trk、ret、gsp、hst、bclおよびabl）は、この様式で標的化され得る。

20

【0219】

前記の治療のいずれも、Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3関連障害を処置する際にそれら自体で有用であると証明され得ることもまた示されるべきである。この点に関して、化学療法および非Fus1、101F6、Gene21、Gene26、Beta\*、Luca1、Luca2、PL6、123F2またはSEM A3の遺伝子療法の組み合わせへの言及はまた、これらのアプローチが別々に用いられ得ることを考慮して解釈されるべきである。

30

【0220】

（4．患者に投与するための処方および経路）

臨床適用が企図される場合、薬学的組成物（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）を意図された適用に適切な形態で調製することが必要である。一般的に、これは、本質的に発熱物質、およびヒトまたは動物に有害であり得る他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することを必要とする。

【0221】

一般的に、送達ベクターを安定にし、かつ標的細胞による取り込みを可能にする、適切な塩および緩衝液を用いることが望ましい。緩衝液はまた、組換え細胞が患者に導入される場合に用いられる。本発明の水溶性組成物は、薬学的に受容可能なキャリアまたは水性培地に溶解または分散された、細胞に対して有効量のベクターを含む。このような組成物はまた、接種材料としても好ましい。句「薬学的にまたは薬理的に受容可能な」とは、動物またはヒトに投与される場合、有害反応、アレルギー反応または他の都合の悪い反応を生じない分子実体および組成物をいう。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、任意のおよび全ての、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤および等張剤および吸収遅延剤などを包含する。薬学的に活性な物質のための、このような媒体および薬剤の使用は、当該分野において周知である。少しでも従来の媒体または

40

50

薬剤が、本発明のベクターまたは細胞と不適合である場合を除いて、治療的組成物中でのその使用が企図される。補助的な活性成分もまた、組成物中に組込まれ得る。

【0222】

本発明の活性組成物は、古典的な薬学的調製物を包含し得る。本発明に従うこれらの組成物の投与は、その標的組織がその経路を介して利用可能な限り、任意の一般的な経路を介する。この経路としては、経口、鼻、口腔、直腸、腔内または局所が挙げられる。あるいは、正常注射 (orthotopic)、皮内注射、皮下注射、筋内注射、腹腔内注射または静脈内注射によって投与され得る。このような組成物は、標準的には、薬学的に受容可能な組成物として投与される。処方の際に、溶液は投薬処方に適合した様式、および治療的に有効であるような量で投与される。

10

【0223】

(実施例)

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技術は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者らによって発見された技術を表し、従って、その実施のために好ましい形態を構成するとみなされ得ることが、当業者によって理解されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示を考慮して、多数の変化が、開示される特定の実施形態においてなされ得、なお本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られ得ることを認識すべきである。より詳細には、化学的および生理学的の両方で関連した特定の試薬が、本明細書中に記載される試薬と置換され得るが、同じかまたは類似の結果が得られることは、明らかである。当業者に明らかな、全てのこのような類似の置換および改変は、添付の特許請求の範囲によって規定されるような本発明の精神、範囲および概念の中にあるとみなされる。

20

【0224】

(実施例1 . 3 p 2 1 . 3 クリティカル領域における 3 p 遺伝子の同定および 3 p 遺伝子の cDNA の単離)

3 p 腫瘍サプレッサー領域を、適合した腫瘍 / 正常組織対における LOH 領域を調査し、かつホモ接合欠失の異常な例を試験するために設計された対立形質によって同定した (図 4)。肺癌において対立遺伝子欠失を示す、最も頻繁に関与した領域を 3 p 2 1 . 3 領域にマッピングした。さらに、複数の重複したホモ接合欠失は、SCLC 株 H 7 4 0 および SCLC 株 H 1 4 5 0 における 3 p 2 1 . 3 染色体領域において見出され、これにより 3 p 2 1 . 3 領域における約 7 5 0 k b に隣接する腫瘍サプレッサー遺伝子に調査が絞られた。9 つの遺伝子 (Fus 1、1 0 1 F 6、N P R L 2 (Gene 2 1)、C A C N A 2 D 2 (Gene 2 6)、H Y A L 1 (Luca 1)、H Y A L 2 (Luca 2)、P L 6、1 2 3 F 2 および B e t a \*) は、分裂されるか、または 3 p 2 1 . 3 領域において見出される約 3 5 k b のホモ接合欠失に直接隣接していた。S E M A 3 もまた、3 p 2 1 . 3 領域に存在する。これらの遺伝子の cDNA は、単離およびクローン化され、そしてこれらの遺伝子における変異を、種々の腫瘍ならびに一本鎖コンホメーション多型 (SSCP) および DNA 配列決定分析による腫瘍細胞株において決定した (表 4)。cDNA クローンの一部は、GenBank において公知の遺伝子に対して約 5 0 % のアミノ酸相同性を示し、いくらかは、GenBank においてランダム配列タグ化部位に対する完全な DNA 配列の相同性が実証され、そして、1 つの遺伝子、B e t a \* は、以前は未知であった (表 4)。

30

40

【0225】

(表 4 . 1 2 5 k b の 3 p 2 1 . 3 クリティカル領域において同定された遺伝子およびそれらの cDNA 配列決定および変異分析の状態)

【0226】

【表 4】

遺伝子*	GenBank 番号	CDNA 配列 (aa)	(bp)	変異 分析 (数)	変異 **
CACNA2D2 (Gene 26)	AF040709	5,482 bp (1,205 aa)		はい (60)	なし
PL6	U09584	1,860 bp (351 aa)		はい (38)	なし
101F6	AF040709	1,117 bp (222 aa)		はい (38)	なし
NPRL2 (Gene 21)	AF040707, AF040708	1,696 bp (203 aa)		はい (38)	1 停止
Beta* (BLU)	なし	1,739 bp (440 aa)		はい (61)	3ミスセンス
123F2 (RASSF1)	AF040703	1,502 bp (431 aa)		はい (37)	なし
FUS-1	AF055479	1,696 bp (161 aa)		はい (79)	2 停止
HYAL2 (LUCA-2)	U09577	1,783 bp (473 aa)		はい (40)	なし
HYAL1 (LUCA-1)	U03056	2,565 bp (435 aa)		はい (40)	2 ミスセンス

\* 他の公知の遺伝子に対する、予測されるアミノ酸配列の相同性としては、以下が挙げられる：CACNA2D2 (Gene 26)、電位型Ca<sup>2+</sup>チャネル 2 調節サブユニット；NPRL2 (Gene 21)、窒素パーミターゼ制御因子；123F2、Ras 結 20  
 合タンパク質のMaxp1/Norel ホモログ；HYAL2 (LUCA-2) および  
 HYAL1 (LUCA-1)、ヒアルロニダーゼのファミリー。

\*\* アミノ酸配列を変更した変異のみが示される。さらに、1つより多くの腫瘍において  
 見出され、かつアミノ酸配列を変更しなかった多型は、示されない。

#### 【0227】

(実施例 2 . 3 p 遺伝子の組換えアデノウイルスベクターの構築)

アデノウイルスベクターは、インビトロ、動物モデル、臨床前調査、およびヒト臨床遺伝  
 子治療試行において、遺伝子送達のために広く使用されている。形質導入の高い有効性お  
 よび種々の細胞型におけるアデノウイルスベクターによって媒介される導入遺伝子の高レ  
 ベルの発現のために、3 p 遺伝子を発現する組換えアデノウイルスベクター (Ad-3 p 30  
 s) は、機能的な野生型 3 p 遺伝子を、3 p または 3 p 遺伝子の異常性を伴う腫瘍または  
 腫瘍細胞株に導入するための有効なツールとなる。

#### 【0228】

3 p 2 1 遺伝子の組換えアデノウイルスベクターとしては、Gene 21、Fus 1、1  
 01F6、Gene 26、123F2S、Luca 1、およびBeta\* が挙げられ、こ  
 のアデノウイルスベクターは、本発明者らが近年開発したライゲーション媒介プラスミド  
 - アデノウイルスベクター構築系、pAd-RAP および pAd-RAP-Shuttle  
 を使用して、構築された。本発明者らは、この系を使用して、首尾良くかつ迅速に、3  
 p 2 1 . 3 領域における 10 個全ての遺伝子について組換えアデノウイルスベクターおよ  
 び多数の他の組換えベクターを構築した。組換え Ad-3 p s は、インビトロで標的細胞 40  
 を直接感染させることによって、およびインビボでベクターの静脈内注射または局所注射  
 によって、効果的に 3 p 遺伝子を種々の細胞型に送達し、そしてこれら種々の細胞型に  
 おいて 3 p 遺伝子を発現し得る。染色体 3 p における腫瘍抑制剤 3 p 2 1 . 3 遺伝子  
 の相対的なゲノム位置、および 3 p 遺伝子の組み換えアデノウイルスベクターの構造は、  
 概略的に実証される (図 5)。

#### 【0229】

本発明者らは、pAd-RAP および pAd-RAP-Shuttle と命名した、新規  
 のライゲーション媒介プラスミド - アデノウイルスベクター構築系を開発した。この系を  
 使用して、細菌 *Escherichia coli* において組換えアデノウイルス含有プ  
 ラスミドを迅速に構築し得、次いで、首尾良く、哺乳動物宿主 2 9 3 細胞において同種ア 50

デノウイルスを産生し得る(図1)。この系において、導入遺伝子(X)を、まず、プラスミドシャトルベクター(pAd-RAP-Shuttle)中に配置する。このベクターは、アデノウイルス逆方向反復末端(IRT)配列、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターおよびウシ成長ホルモン(BGH)ポリ(A)シグナル配列の発現カセット、ならびに、IRT-CMV複数クロニング部位BGH配列の5'末端および3'末端において、それぞれ、2つの特有用な制限部位BstBIおよびClaIを含む。次いで、IRT-CMV-X-BGHを含むBstBI/ClaI放出DNAフラグメントをアデノウイルスプラスミドベクター(pAd-RAP)に挿入する。このベクターは、BstBI部位およびClaI部位を用いたインビトロでのライゲーションにより、完全なE1およびE3欠失アデノウイルス5型ゲノムおよび3つの特有用な制限部位(PacI、BstBIおよびClaI)を含む。Escherichia coliへの形質転換の後、90%の形質転換体が正確な挿入を有する。最終的に、得られたプラスミドのPacI/BstBI消化によって、3p遺伝子を含む全体のアデノウイルスゲノムの放出が可能になる。次いで、組換えAd-X DNAを293細胞にトランスフェクトし、組換えAd-Xの同種集団を得る。他のプロモーター、ポリA配列および制限部位を使用し得る。この系を使用して、2~4週間以内に組換えアデノウイルスを迅速に構築し得る。比較した場合、哺乳動物細胞において同種組換えを使用するような従来の方法は、通常、3~12ヶ月かかる。

#### 【0230】

宿主293細胞における導入遺伝子の可能な細胞傷害性に起因して、特定の組換えアデノウイルスを産生するのに失敗した場合、図2に実証されるような、テトラサイクリンの存在下で導入遺伝子発現を遮断し得るテトラサイクリン調節エレメント(TRE)を用いる、pAd-RAP-TetR-OffおよびpAd-RAP-TRE-CMV-Shuttleと命名した類似システムが開発されており、このようなベクターの産生のために使用され得る。

#### 【0231】

Ad-CMV-GFP(Ad-GFP)およびAd-CMV-LacZベクターを、ウイルスベクターによる形質導入の有効性をモニタリングするため、そして非特異的導入遺伝子発現コントロールとして使用した。Ad-E1-(Ad-EV)(空のE1ベクター)を、陰性コントロールとして使用する。ウイルスタイターを、光学密度測定およびプラークアッセイの両方によって決定した。野生型ウイルスによるウイルス調製物の潜在的な汚染を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析によってモニタリングした。ウイルスベクターにおける3p遺伝子の配列を、自動化DNA配列決定によって確認した。得られたAd-3psを、それぞれ、Ad-101F6、Ad-Gene26、Ad-Gene21、Ad-Fus1、Ad-PL6、Ad-Luca1、Ad-Luca2、Ad-123F2S、Ad-Beta\*、およびAd-SEM A3と命名した。

#### 【0232】

(実施例3 . PAD3psの調製)

プロタミン-アデノウイルス(PAD)複合体の調製ならびにインビトロおよびインビボでのPADによる形質導入の有効性の増大が報告されている(Clarkら、1999、Lanuttiら、1999)。プロタミン-アデノウイルス複合体を、 $1 \times 10^{10}$ ウイルス粒子を50 $\mu$ gの硫酸プロタミン(10mg/ml)と単純に混合することによって調製した。この複合体を10分間室温でインキュベートして、次いでこの複合体化アデノウイルスを、指定のインビトロまたはインビボ実験のために、適切な容量のPBS中に希釈した。

#### 【0233】

(実施例4 . LDC3psおよびLPD3psの調製)

リポソーム(DOTAP:コレステロール)(LDC)、プラスミドDNAおよびLDC-3p DNA複合体(LDC3ps)をTemplet enら(Templet onら、1997)によって記載されるように調製した。LDC3psを、1匹のマウスに対す

10

20

30

40

50

る静脈注射用に80 nmolのリポソーム：100 μlの全容量において5% Dextral水(D5W)中の50 μgのDNAとして処方した。リポソーム(DOTAP:Cholesterol):プロタミン:DNA(LPD)をHung(ら、1998)の方法に基づいて調製した。

【0234】

(実施例5. 腫瘍細胞増殖に対する3p遺伝子の過剰発現の影響)

新規な腫瘍サプレッサー遺伝子の生物学的機能を研究するために、野生型遺伝子発現プラスミドによって過渡的にまたは安定にトランスフェクトされた腫瘍細胞株において、実験を通常通りに行った。Ad-3pベクターは、インビトロおよびインビボでの3p遺伝子送達に関するプラスミドに対して、いくつかの利点を提供し得る。1)形質導入の高い有効性(>80%)および高レベルの3p遺伝子発現は、標的細胞に対するウイルス粒子の感染多重度(MOI)を単純に調節することによって、細胞型の広いスペクトルにおいて容易に達成され得る。従って、Ad-3psを使用して、個々の領域または全領域として3p遺伝子の有効性を評価し得る;2)Ad-3ps形質導入を、腫瘍細胞に直接適用して、安定に形質導入されたコロニーの選択なしに動物において腫瘍形成能に対するそれらの影響を研究し得、これによって、コロニー選択プロセスに関連した問題および得られた細胞コロニーにおいて生じる未知のエフェクターまたは因子を回避し得る;そして、3)Ad-3psを直接使用して、個々のAd-3pベクターまたは組み合わせたAd-3pベクターを用いて動物に静脈内注射または腫瘍内注射することによってインビボでの腫瘍サプレッサー遺伝子領域としての3p遺伝子の役割を評価し得る。

【0235】

これらの新規に単離された3p遺伝子の生物学的機能は、インビトロおよびインビボの両方で、リポソーム媒介遺伝子移入および組換えアデノウイルスベクター媒介遺伝子移入によって、本発明において特徴付けられる。ヒト肺癌細胞株(H1299、H358、H460およびA549)は、様々な状態の染色体3pまたは個々の3p遺伝子および正常なヒト気管支上皮細胞(HBEC)株を伴い、これらを、細胞増殖阻止、増幅、アポトーシスおよびインビトロでの細胞周期動力学に対する3p遺伝子の効果、ならびに動物モデルにおける一次腫瘍および転移性腫瘍の増殖に対する効果を評価するために使用した。

【0236】

3p遺伝子がインビトロで腫瘍サプレッサーとして機能するという仮説を試験するために、本発明者らは、種々のヒト非小細胞肺癌細胞、ならびにリポソーム媒介3p遺伝子移入もしくはアデノウイルスベクター媒介3p遺伝子移入により様々な状態の3p染色体構造または遺伝子および遺伝子産物(表5)を有する正常ヒト気管支上皮細胞株(HBEC)において、細胞増殖に対する3p遺伝子の過剰発現の効果を研究するために、一連の実験を行った。これらの株の1つは、H1299(p53の内部ホモ接合欠失を含むNSCLC細胞株)であり、3p対立遺伝子のLOHを有する染色体3の正常なコピーを有さず、非常に高レベルのテロメラーゼ発現および活性を有する。A549は、異常な3p対立遺伝子を有する野生型p53を含む肺癌細胞株であり;H358は、2つの3p対立遺伝子を有する野生型p53を含む肺癌細胞株であり;そして、H460は、3p21.3領域のnoe対立遺伝子欠失を有する野生型p53を含む肺癌細胞株である(表5)。正常なHBECまたは繊維芽細胞(Clonetics Inc., Walkersville, MD)をまた使用して、3p遺伝子およびAd-3pの一般的な細胞傷害性を評価し得る。293細胞株をアデノウイルスベクターの構築、増幅および滴定に使用し得る。細胞を、10%FBSを有する4.5g/lのグルコースを含むDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)中に維持した。

【0237】

(表5. ヒト肺癌細胞株および正常HBEC\*における3p遺伝子の状態)

【0238】

【表5】

細胞株	起源	3p遺伝子	P53	hTERT
H1299	肺、大きい	LOH	欠失	高い活性
A549	NSCL	LOH	WT	活性
H460	肺、大きい	LOH	WT	活性
H358	NSCL	WT	欠失	活性
HBEC	気管支上皮	正常	正常	非検出

\* 略語：HBEC、ヒト気管支内皮細胞、NSCL、非小細胞肺癌、LOH、ホモ接合欠損、WT、野生型。

10

## 【0239】

本発明において開発されたAd-3pベクター、プロタミン-Ad-3p複合体(PAD3p)またはリポソーム(DOTAP)-3pプラスミドDNA複合体(LPD3p)を使用して、効率的に3p遺伝子を、インビトロでの直接形質導入によって腫瘍細胞に、およびインビボでの全身投与によって原発性腫瘍部位および遠位の肺腫瘍部位または他の転位性腫瘍部位に送達し得る。ヒト肺癌H1299およびA549ならびに他の癌の自発性または実験的な肺転位性モデルを使用して、腫瘍進行に対する3p遺伝子の効果、ならびにPAD3pまたはLPD3p複合体の静脈内注射を介してマウスの肺転移性腫瘍の全身処置による転位を研究し得る。

20

## 【0240】

H1299細胞におけるリポソーム媒介3p遺伝子移入の実験において、9個の遺伝子からの6個の遺伝子(Fus1、101F6、Luca1、123F2S、Beta\*、およびGene21)が、非トランスフェクトおよび空のCMVベクターでトランスフェクトされたコントロールと比較して、トランスフェクションの48時間後に、H1299形質転換体において細胞増殖阻害の様々な程度(20~65%)を実証した。3つの他の遺伝子(Gene26、PL6およびLuca2)は、同じ実験条件下でH1299細胞増殖に対して有意な効果を示さなかった(表6)。H1299細胞増殖に対するFus1、Beta\*、123F2SおよびGene21の観察された阻害効果は、同じ実験条件下で、高度に細胞傷害性の遺伝子Bakの阻害効果と比較可能であった(表6)。3つの他の遺伝子(Gene26、PL6およびLuca2)は、同じ実験条件下でH1299細胞増殖に対する有意な効果を示さなかった。アポトーシス誘導の変化した程度(10~40%)、および変更した細胞周期動力学(G0、G1およびS相で細胞集団の変化)を、TUNEL反応およびPI染色を用いるFACS分析によって遺伝子Fus1、101F6、123F2S、LucaおよびBeta\*を含むプラスミドでトランスフェクトしたH1299細胞において観察した。

30

## 【0241】

(表6 . H1299細胞に対するDOTAP媒介3p遺伝子発現の効果(48時間))

## 【0242】

【表6】

40

	MDACCからのデータ (トランスフェクション) (%細胞生存度±STDEV)	UTSMCからのデータ (コロニー形成) <sup>†</sup> (%細胞生存度±STDEV)	
PBS	100	ND	
CMV-EV	85±9.5	100	
GFP	84±7.2	ND	
Bak	54±5.1	ND	
101F6	76±3.5	52±10.0	10
Fus1	78±2.1	49±14.0	
Gene 21	45±6.5	83.7±17.7	
Gene 26	88±12.5	40±0.00	
Luca 1	81±2.8	66±27.2	
Luca 2	100±9.8	80±27.6	
PL6	100±13.6	95±53.8	
123F2S	67±3.8	58±0.0	20
Beta*	35±2.3	51±8.5	

<sup>†</sup> 空のプラスミドトランスフェクト細胞のものに対する、3 p 遺伝子発現プラスミド DNA トランスフェクト細胞におけるコロニー形成アッセイからのデータ。ND、未決定；STDEV、反復実験の平均からの標準偏差。

#### 【0243】

腫瘍細胞増殖に対する3 p 遺伝子の効果を、種々の肺癌細胞株および正常なHBE C株における組換えアデノウイルスベクター媒介3 p 遺伝子移入によってさらに特徴付けた。腫瘍細胞増殖に対する101F6、Fus1およびGene 21過剰発現の観察された阻害効果の特異性、ならびに過剰に発現された3 p 遺伝子の潜在的な細胞傷害性を試験するために、本発明者らは、Ad-3 p形質導入された野生型3 p含有H358細胞および正常なHBE C細胞における細胞増幅に対するこれらの3 p 遺伝子の影響を分析した(図6)。各株における細胞を、ウイルス粒子/細胞(vp/c)において種々の感染多重度(MOI)で投与されたAd-101F6、Ad-fus1、およびAd-Gene 21ベクターによってインピトロで形質導入した；PBSで処理した細胞をモック(mock)として、空ベクターAd-EVをネガティブとして、Ad-LacZを非特異的として、そしてAd-p53を陽性コントロールとして、それぞれ使用した。非形質導入コントロール細胞と比較した場合、種々のMOIで、Ad-3 p形質転換HBE Cにおいて10%未満の細胞生存度損失、およびH358細胞において20%未満の細胞生存度損失が観察された。類似の損失もまた、Ad-EV形質導入細胞およびAd-LacZ形質導入細胞において観察され、形質導入後の時間経路の全体を通じて、Ad-p53形質導入細胞においてわずかに高い損失が観察され、全般的な細胞傷害性がこれらの3 p 遺伝子の過剰発現に関連していないことが示唆される。形質導入の効率を、蛍光顕微鏡下でAd-GFP形質導入細胞集団におけるGFP発現細胞を試験することによって決定した。

#### 【0244】

アデノウイルスベクターの形質導入の効率は、各細胞株に適用された最も高いMOIにおいて80%よりも高かった。細胞増殖を、それぞれ、形質導入後1日、3日および5日での細胞生存度を決定することによって分析した。細胞生存度は、Ad-101F6、Ad-Fus1およびAd-Gene 21を形質導入した、A549細胞およびH460細胞において有意に減少し、これらは3 p領域においてLOHを阻害するが、3 p領域および

p53のホモ接合欠失を含む野生型p53およびH1299細胞を含む(図6)。全ての  
場合において、形質導入細胞の生存度を、非形質導入(PBS処置)コントロール細胞(この生存度は100%に設定された)の生存度と比較した。

#### 【0245】

これらのAd-3p形質転換体における3p遺伝子の過剰発現を、定量的リアルタイムRT-PCRによって評価し、そしてアクチンDNAについてのヒト全RNA、プライマーおよびTaqManプローブの既知の濃度を、標準としておよび内部コントロールとして使用した(図7)。3p遺伝子のTaqManプローブおよびプライマーを、Primerexpressソフトウェア(Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して設計した。ヒトゲノムDNAまたは全RNAを、テンプレート標準として使用し、そしてヒトアクチンまたはグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)TaqManプローブおよびプライマーをコントロールとして使用した。全RNAを、TRIZOLを使用して、Ad-3p形質導入腫瘍細胞または腫瘍試料から単離した。リアルタイムRT-PCRおよびRT-PCR産物の定量化を行い、そしてTaqMan Gold RT-PCR Kit, an ABI Prism 7700 Sequence Detection Systemおよび備え付けのソフトウェアを使用して分析した。これらの結果は、これらの3p遺伝子の過剰発現がインビトロで腫瘍細胞増殖を阻害し得ることを示している。

#### 【0246】

(実施例6. 腫瘍細胞増殖および増幅に対する3p遺伝子の影響)

3pまたは3p遺伝子の異常性を有する種々の肺癌細胞の増殖特性が、野生型3p遺伝子の導入によって変更され得るか否かを試験するために、指定した形質導入後時間間隔における種々のMOIでのAd-3p形質導入腫瘍細胞における細胞生存度を、以前に記載されたような(Heら、1998)、XTT染色によってアッセイし、非形質導入細胞およびAd-EV-、Ad-GFP-またはAd-LacZ形質導入細胞を、コントロールとして使用した。各実験を、二連または三連に与えられた各処置によって、少なくとも3回繰返した。Ad-3p形質導入細胞の増幅を、プロモデオキシウリジン(BrdU)の細胞内への取り込みについて免疫蛍光酵素結合イムノソルベント検定法によって分析した。Ad-3p形質導入した正常なHBEcを使用して、インビトロでの3p遺伝子およびAd-3pの可能な一般の細胞傷害性を評価した。Ad-3p形質導入細胞における3p遺伝子の転写および発現を、抗3pタンパク質ポリクローナル抗体を用いた逆転写酵素連鎖反応またはノーザンプロットおよびウエスタンプロット分析によって試験した。

#### 【0247】

(実施例7. Ad-3p形質導入細胞における3p遺伝子の発現のウエスタンプロット分析)

Ad-3p形質導入細胞における3p遺伝子電子の発現を、推定3pアミノ酸配列から誘導されたポリペプチドに対するポリクローナル抗体、または3p融合タンパク質におけるFLAGタグのc-mycに対するモノクローナル抗体を使用するウエスタンプロットによって分析した。60mmディッシュ(1~5x10<sup>6</sup>/ウェル)において増殖した細胞を、Ad-3pを用いて処理し、そしてPBS単独をコントロールとして使用した。タンパク質を、SDS-PAGEによって分離した。各レーンを、約60μg細胞溶解物タンパク質で充填し、100Vで1~2時間電気泳動した。次いで、タンパク質をゲルからHybond-ECL<sup>TM</sup>膜に移した。膜をブロッキング溶液(3%乾燥乳、PBS中の0.1% Tween 20)中で、室温で1時間ブロックした。次いで、膜を、ウサギ抗ヒト3pペプチドまたは、抗mycまたはFLAGモノクローナル抗体の1:1000の希釈液と共にインキュベートし、そして、マウス抗アクチンモノクローナル抗体の1:1000の希釈液と共にインキュベートした。免疫複合体を、ECL<sup>TM</sup>キット(Amersham International)を使用して、二次HRP標識化ウサギ抗マウスIgG、またはヤギ抗ウサギIgG抗体を用いて検出した。

## 【0248】

(実施例8．Ad-3p形質導入腫瘍細胞における3p遺伝子によるアポトーシスの誘導)

外因性3p遺伝子のアポトーシス誘導能およびAd-3p形質導入H1299、A549、H460、H358およびHBEC細胞における細胞周期プロセスに対するそれらの効果を、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPニック末端標識(TUNEL)反応を使用したFACSによって分析した(図8)。アポトーシスの誘導を、Ad-3p形質導入H1299(図8A)、A549(図8B)およびH460(図8C)細胞において検出したが、H358(図8D)およびHBEC(図8E)細胞においては検出されなかった。細胞の15~20%、40~65%および75%より多くが、それぞれ、形質導入H1299、A549およびH460細胞においてAd-101F6、Ad-Fus1およびAd-Gene21を用いての形質導入後5日で死んだのに対して、それぞれ、PBS単独で処理され、そしてAd-EVベクターで形質導入された細胞のわずか約7%および10%が、同じ期間でTUNEL陽性であった。Ad-3p形質導入細胞におけるアポトーシスの誘導レベルは、形質導入後の時間と共に増加し、そして細胞の生存度と相関した(図6)。3p遺伝子による腫瘍細胞増幅の阻害は、アポトーシスの誘導を介して直接または間接的に媒介される。

10

## 【0249】

(実施例9．アポトーシスの誘導および細胞周期動力学Ad-3p形質導入細胞の変更) 腫瘍サプレッサー遺伝子による腫瘍細胞成長および増殖の阻害は、一般的に、アポトーシスの誘導および細胞周期プロセスの変更によって特徴付けられる。従って、3p遺伝子誘導アポトーシスおよび細胞周期動力学を、フルオレセインソチオシアネート標識化dUTP(Roche Molecular Biochemicals)を用いる末端デオキシトランスフェラーゼデオキシウリジルトリホスフェート(dUTP)ニック末端標識化(TUNEL)反応を使用するフローサイトメトリおよびヨウ化プロピジウム染色によってそれぞれ分析した。簡潔には、細胞( $1 \times 10^6$ /ウェル)を6つのウェルプレートに播種し、そして、Ap-3p構築物を用いて形質導入し;未処理の細胞、Ad-EV形質導入細胞、Ad-GFP形質導入細胞またはAd-LacZ形質導入細胞を、コントロールとして使用した。細胞を設計した形質導入後の設定した時間に収集し、次いで、前記のように、DNA断片化およびアポトーシスについてTUNEL反応により、ならびにDNA含有量および細胞周期状態についてフローサイトメトリを使用するヨウ化プロピジウム染色によってそれぞれ、分析した。Ad-101F6、Ad-Fus1およびAd-Gene21形質導入細胞における細胞周期プロフィールは、形質導入後3日目での非形質導入およびAd-EV形質導入コントロールにおけるものと比較して、後期G2期およびS期段階でのこれらの遺伝子の過剰発現によって有意に影響を受けるようであった(図9)。

20

30

## 【0250】

(実施例10．インビボでの3p遺伝子の過剰発現による腫瘍増殖の抑制)

3p遺伝子(101F6、Fus1、およびGene21)の腫瘍サプレッサー機能を、ヌードマウスのA549皮下腫瘍にこれらのAd-3pベクターを直接的に腫瘍内注入することにより、インビボで評価した(図10)。腫瘍の増殖を最初の注入から最後の注入後20日目まで記録した。Ad-101F6、Ad-Fus1、およびAd-Gene21で処理したマウス中の全ての腫瘍の増殖は、腫瘍と比較して有意に抑制されたことが示された。

40

## 【0251】

(実施例11．インビボでの腫瘍形成および腫瘍増殖に対する3p遺伝子の発現の効果) 腫瘍形成研究のために、H1299細胞またはA549細胞を、モックコントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、陰性コントロールとしてAd-EV、および非特異的コントロールとしてAd-LacZを用いた適切なMOIで、Ad-3pを用いてインビトロで形質導入した。形質導入した細胞を、それぞれ、形質導入後24時間および48

50

時間で収集した。細胞の生存性を、トリパンブルー排除染色により決定した。次いで、生存細胞 ( $1 \times 10^7$ ) を、6 ~ 8 週齢の雌ヌードマウスの右側腹部に皮下注入した。マウスにおける腫瘍形成を、週に2または3回、3ヶ月間まで観察した。腫瘍の寸法を2または3日毎に測定した。

【0252】

腫瘍増殖に対する3p遺伝子の効果を研究するために、H1299細胞またはA549細胞を用いて、ヌードマウスにおいて皮下腫瘍を構築した。簡潔にいうと、 $1 \times 10^7$ 細胞を、6 ~ 8 週齢の雌ヌードマウスの右側腹部に注入した。腫瘍が直径5 ~ 10 mmに達したとき(注入後約2週間)、この動物に、Ad-3pベクターおよびコントロールベクターを、それぞれ10 ~ 12日以内に4 ~ 5回、単位腫瘍あたり総用量  $3 \sim 5 \times 10^{10}$  p f uで腫瘍内注入した。腫瘍の大きさを、上記のようにして測定および算出した。この実験の最後に、この動物を殺傷し、そして腫瘍を切り出し、病理学的および免疫組織化学的分析のために処理した。

【0253】

(実施例12. インビボでのプロタミン-アデノウイルス複合体媒介の3p遺伝子の移入による肺転移性腫瘍増殖の阻害)

本発明者らは、インビトロでのアデノウイルス媒介性遺伝子移入の有効性の増強のため、およびプロタミン/アデノウイルス複合体の静脈内注入によるインビボでの組換えアデノウイルスの肺および他の器官への全身送達のために、新規のプロタミン/アデノウイルス複合体を開発した。プロタミン(Protamine)-Ad-3p複合体(PAD3p)を用いて、ヌードマウスのA549実験用肺転移モデルにおける肺転移性腫瘍増殖に対する3p遺伝子の過剰発現の効果を研究した(図11)。転移性腫瘍増殖は、PA101F6処理マウス、PA101F6-Fus1処理マウス、およびPA101F6-Gene21処理マウスにおいて、コントロール群におけるこれらと比較して有意に阻害された。これらのデータは、Ad-3p処理皮下腫瘍から獲得された結果と一致する。従って、3p遺伝子は、インビボでの腫瘍増殖の抑制および腫瘍進行の阻害において役割を果たす。

【0254】

(実施例13. インビボでのLPD3p媒介またはPAD3p媒介の3p遺伝子移入による転移性腫瘍増殖に対する3p遺伝子の効果)

H1299細胞またはA549細胞の実験用肺転移モデルを用いて、PAD3pまたはLPD3pのいずれかの複合体の静脈内注入を通じた肺転移性腫瘍の全身性処置による、腫瘍の進行および転移に対する3p遺伝子の効果を研究した。200  $\mu$ l PBS中のA549細胞( $1 \sim 2 \times 10^6$ )を用いてヌードマウスを、そしてH1299細胞( $1 \sim 2 \times 10^6$ )を用いてSCIDマウスを、それぞれ微量(intravenously)接種した。実験用転移性腫瘍コロニーは、接種後7 ~ 10日目に形成された。PAD3p複合体およびコントロール複合体を、2日毎に3回、各々  $2 \sim 5 \times 10^{10}$  ウイルス粒子/200 ~ 500  $\mu$ gプロタミンの用量(単位動物当たり総容量200  $\mu$ l)で静脈内注入により動物に投与した。あるいは、LPD3pを、1日毎に6回、各々120 nmリボソーム:6  $\mu$ gプロタミン:50  $\mu$ g DNAの用量(単位動物当たり総容量200  $\mu$ l)で静脈内注入により適用した。動物を、最後の注入後2週間で殺傷した。肺転移性腫瘍を、インディアンインク(Lira, 1998)を用いて染色し、肺の表面上の腫瘍コロニーを、解剖顕微鏡の下で計数し、次いで肺組織を、さらなる病理学的および免疫組織化学的分析のために切り出した。

【0255】

(実施例14. テロメラーゼ活性および細胞不死の分析)

細胞不死に関連する酵素テロメラーゼの活性化は、ヒト癌の発症における重要な工程を構成し得る。肺癌細胞におけるテロメラーゼのほぼ普遍的に調節されない発現、およびテロメラーゼ抑制調節経路における3p遺伝子の関与についての証拠に起因して、野生型3p21.3遺伝子の導入により与えられる腫瘍細胞の増殖(growthおよびproliferation)の変化が、Ad-3p形質導入体における抑制されたテロメラーゼ活

10

20

30

40

50

性に関係するか否かを研究することが重要である。テロメラーゼ活性をアッセイするために、形質導入されていない細胞および Ad - 3 p で形質導入された細胞ならびにコントロールベクターで形質導入された細胞 (  $10^5$  ) を、以前に記載された通りに収集および調製した ( Wu ら、1998 )。およそ  $10^3$ 、 $10^2$ 、または  $10^1$  個の細胞に相当する細胞抽出物を、各々のテロメラーゼアッセイに使用した。10 ~ 100 個程度の肺癌細胞におけるテロメラーゼ活性を検出し得る、標準的なテロメア反復増幅プロトコル手順を、記載されるように改変して実施した ( Pellegata ら、1996、Mizuguchi ら、1998、Kagawa ら、1999 )。

【0256】

( 実施例 15 . 肺癌および乳癌ならびに悪性表現型の抑制における 123F2 ( RASSF1A ) ( 339 ) )

( I . 123F2 ( RASSF1 ) 遺伝子の特徴付け )

123F2 ( RASSF1A ) 遺伝子が、肺癌および乳癌において変異しているか否かを決定するために、本発明者らは、ゲノム DNA に対する一本鎖コンホメーション多型アッセイを使用して、RASSF1A アイソフォームの広範な変異分析を実施した。本発明者らは、以前に、77 の肺癌細胞株サンプルにおいて RASSF1C 変異を見出せなかった ( 346 )。参照として RASSF1A 配列を使用することにより、本発明者らは、以下に挙げるいくつかの多型を見出した：コドン 21 ( AAG から CAG )、Lys から Gln；コドン 28 ( CGT から CGA )、アミノ酸変化なし；コドン 49 ( GGC から GGT )、アミノ酸変化なし；コドン 53 ( CGC から TGC )、Arg から Cys；コドン 129 ( GAC から GAG )、Asp から Glu；コドン 133 ( GCT から TCT )、Ala から Ser；およびコドン 325 ( TAT から TGT )、Tyr から Cys。123F2 ( RASSF1 ) 遺伝子を、図 12 に示す。

【0257】

( II . 肺癌細胞株および乳癌細胞株における RASSF1A および RASSF1C の発現 )

123F2 ( RASSF1 ) は、肺、乳房、頭頸部、腎臓、ならびに子宮頸部の腫瘍の増殖の間の対立遺伝子の欠失によりしばしば影響を受ける領域内に位置する ( 341 ~ 345 )。本発明者らは、123F2 ( RASSF1A ) および RASSF1C が肺癌細胞株および乳癌細胞株において発現されるか否かを調査した。本発明者らは、アイソフォーム特異的 RT - PCR を用いて、肺腫瘍細胞株および乳房腫瘍細胞株ならびに正常な肺上皮培養物および正常な乳房上皮培養物における 123F2 ( RASSF1A ) および RASSF1C の発現を試験した ( 図 13 )。

【0258】

アイソフォーム特異的 RT - PCR アッセイを、RASSF1A および RASSF1C の発現の分析のために使用した。RASSF1C に対するプライマーは、Nox3 ( 5' - CTGCAGCCAAAGAGGACTCGG - 3' ) および R182 であり、RASSF1A に対するプライマーは、PKCDF または NF ( 5' - TGC AAGTTTCACTGCCAC - 3' ) のいずれかおよび R182 であった ( 図 12C )。総 RNA を、5% ウシ胎仔血清を補充した RPMI - 1640 培地 ( 完全培地 ) 中で増殖された、以前に記載された肺癌細胞株および乳癌細胞株から、Trizol 抽出により単離した。4  $\mu$ g の総 RNA を、GIBCO - BRL Superscript First Strand cDNA Kit を使用して逆転写した。全ての cDNA 調製物を、RASSF1A 転写物の第 1 エキソンのすぐ上流の転写されないゲノム配列を増幅する能力について試験した。この配列由来の産物を生成する任意の cDNA を、ゲノム DNA が混入しているという理由で廃棄した。

【0259】

本発明者らはまた、5 - アザ - 2' - デオキシシチジン ( DNA のメチル化を阻害する薬物 ) に曝露した後の RASSF1A の発現を評価した。本発明者らは、RASSF1A を発現しない NSCLC 株 NCI - H157 のサブコンフルーエントカルチャーを、0.5

10

20

30

40

50

pM 5 - アザ - 2' - デオキシシチジンに48時間曝露し、その後、総RNAを単離し、そしてRASSF1A、RASSF1C、およびグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対してRT - PCRを実施した。GAPDH転写物のRT - PCRを正方向プライマーGAPDH - C (5' - CATGACAAC TTTGGTATCGTG - 3') および逆方向プライマーGAPDH - D (5' - GTGTCGCTGTTGAAGTCAGA - 3') を使用して実施した。RTPCR産物を、アガロースゲル電気泳動により分離し、そしてエチジウムブロミドを用いて染色した後に可視化した。

【0260】

123F2 (RASSF1A) は、正常な肺上皮培養物 (NHBEおよびSAB培養物)、正常な乳房上皮培養物において発現された (図13、C) が、32個のSCLC株のうち10個 (31%)、26のNSCLC細胞株のうち17個 (65%)、および25個 (60%) の乳癌細胞株のうち15個 (60%) においては発現されなかった。代表的なデータを図13に示す。対照的に、RASSF1Cは、試験したほぼ全ての肺癌細胞株および乳癌細胞株において発現された (123F2 (RASSF1) 遺伝子座を含む既知のホモ接合性欠失を有するいくつかの肺癌細胞株および乳癌細胞株を除く)。切除した肺腺癌において123F2 (RASSF1A) は、5つの癌のうち2つでしか発現されず、RASSF1Cは、全ての癌において発現された (図13C)。

10

【0261】

123F2 (RASSF1A) についてのRT - PCR分析の間、本発明者らは、RASSF1Aを発現する腫瘍およびNHBE培養物における2つの狭い間隔のバンドにしばしば注目した (図13)。本発明者らは、これらのRT - PCR産物を配列決定し、そして大きい方のバンドが123F2 (RASSF1A) に対応し、小さい方の産物が異なる転写物RASSF1F (GenBank登録番号AF286217) を示すことを見出した。この転写物は、エキソン1Cが除かれており、DAG結合ドメイン内で終了する92アミノ酸の推定短縮ペプチドをコードするmRNAを産生する (図12D)。ほぼ全てのサンプルにおいて、RASSF1Fは、123F2 (RASSF1A) が発現される場合に発現される。しかし、いくつかの乳癌および正常な乳房上皮培養物において (図13)、123F2 (RASSF1A) は、RASSF1Fの発現を伴わずに発現される。

20

【0262】

(III. 123F2 (RASSF1A) プロモーター領域のメチル化状態)  
腫瘍における異常なプロモーターのメチル化は、ヒトの癌においていくつかの腫瘍抑制子遺伝子の遺伝子発現の欠失を引き起こすことが見出されている (348)。肺癌における123F2 (RASSF1A) 発現の欠失が、プロモーターの過剰なメチル化の結果であるか否かを評価するために、本発明者らは、8つの肺癌細胞株由来の亜硫酸ナトリウム改変DNAを配列決定することにより、123F2 (RASSF1A) の5'領域 (推定123F2 (RASSF1A) 転写開始部位の - 800 ~ + 600 bp) におけるCpGメチル化状態を決定した。

30

【0263】

推定RASSF1AおよびRASSF1Cのプロモーター領域のメチル化状態を、メチル化特異的PCRにより決定した。RASSF1Aを発現しない肺癌細胞株 (NCI株H1299、H1184、H1304、H841、H2108、およびH128) またはRASSF1Aを発現する肺癌細胞株 (H1792およびH2009) 由来のゲノムDNAを、亜硫酸ナトリウム処理により改変した (352、353)。亜硫酸塩処理は、シトシン塩基をウラシル塩基に変換するが、メチルシトシン塩基に対する影響はない。PCR増幅後のPCRフラグメントの配列決定により、メチル化により改変されたプロモーター領域における特異的なCpGジヌクレオチドが同定される (352、354、355)。PCRプライマーを、RASSF1A (コスミドLucal2; GenBank登録番号AC002481ヌクレオチド17730 - 18370) およびRASSF1C (GenBank登録番号AC002481ヌクレオチド21022 - 21152および21194 - 21332) の推定プロモーター領域中のゲノム配列を増幅するよう設計した。得られた

40

50

PCRフラグメントを、自動化された蛍光に基づくDNA配列決定により配列決定し、メチル化状態を決定した。

【0264】

RASSF1Aを発現しない肺癌細胞株におけるCpGメチル化についてのデータを用いて、RASSF1A 5'プロモーター領域に対するメチル化特異的PCR(352)プライマーを設計した。メチル化形態を検出するためのプライマーは、5'-GGGTTT TGC GAGAGCGCG-3'(正方向)および5'-GCTAACAAACGCGA ACCG-3'(逆方向)であり、そして非メチル化形態を検出するためのプライマーは、5'-GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG-3'(正方向)および5'-CACTAACAAACACAAACCAAAC-3'(逆方向)であった。各プライマーセットは、169塩基対(bp)産物を生成した。メチル化特異的PCRサイクル条件は、95℃にて15分間のインキュベーション1回、続いて、94℃にて30秒間の変性、アニーリング温度(メチル化特異的プライマーについては64℃、そして非メチル化特異的プライマーについては59℃)にて50秒間、72℃にて30秒間の伸長のサイクルを40回、そして72℃にて10分間の最終伸長から構成される。PCR産物を、2%アガロースゲル中で分離した。製造業者の指示に従い、CpG(SssI)メチラーゼ(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)によりインビトロでメチル化したリンパ球DNAを、陽性コントロールとして使用した。水のブランクを、陰性コントロールとして使用した。

10

【0265】

123F2(RASSF1A)を発現しない6つ全ての肺癌細胞株は、推定プロモーター領域におけるほぼ全てのCpGジヌクレオチド部位のメチル化を示した。123F2(RASSF1A)を発現した2つの肺癌細胞株は、これらのCpG部位でメチル化されなかったか、または限定されたメチル化を示したかのいずれかであった。対照的に、これらの8つの細胞株の推定RASSF1Cプロモーター領域のCpGにおいて、メチル化は見出されなかった。

20

【0266】

プロモーターの過剰なメチル化が、肺癌細胞株における123F2(RASSF1A)の発現の欠失に寄与することを確認するために、本発明者らは、123F2(RASSF1A)発現に対する5-アザ-2'-デオキシシチジン(DNAメチラーゼを阻害する薬物)の効果を評価した。本発明者らは、RASSF1Aを発現しないNSCLC株NCI-H157を、5-アザ-2'-デオキシシチジンに曝露し、そしてこの細胞株による123F2(RASSF1A)の再発現を見出したが、ハウスキーピング遺伝子GAPDHまたはRASSF1Cの発現における変化はほとんどなかったか、または全くなかった(図14)。

30

【0267】

(IV.肺癌および乳癌における123F2(RASSF1A)のプロモーター領域のメチル化特異的PCR分析)

原発性の肺癌および乳癌におけるRASSF1Aのプロモーター領域のメチル化状態を決定するために、本発明者らは、メチル化特異的PCR分析を使用した。多くの原発性の切除されたNSCLC由来のゲノムDNA、同一の患者から切除されたが癌に関与していない一対の肺組織、原発性の切除された乳癌、および肺癌細胞株ならびに乳癌細胞株の大パネルを、亜硫酸水素ナトリウムで処理し、そして123F2(RASSF1A)のプロモーター領域におけるメチル化CpGジヌクレオチドおよび非メチル化CpGジヌクレオチドの存在について試験した(図15)。原発性の切除されたNSCLCおよび非腫瘍対サンプルは全て、非メチル化プロモーター配列を含んだ。このことは、これらの切除された腫瘍が顕微解剖されず、間質細胞が混入していたことが理由であると考えられた。しかし、107個の原発性NSCLCのうちの32個(30%)、47個のNSCLC株のうちの47個(100%)、および39個の原発性乳癌のうちの19個(49%)が、メチル化RASSF1A対立遺伝子を示した(図15;表7)。対照的に、104個の切除された

40

50

非悪性肺組織の対において、メチル化対立遺伝子は検出されなかった（図15；表7）。

【0268】

（表7．肺癌および乳癌におけるRASSF1A CpU島 - メチル化対立遺伝子の検出のための、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応アッセイの頻度）

【0269】

【表7】

DNA サンプル供給源*	試験した数	メチル化対立遺伝子 (ポジティブ) の数(%)
原発性の切除された NSCLC	107	32(30%)
対応する非悪性の肺	104	0(0%)
NSCLC 株	27	17 (63%)
SCLC 株	47	47 (100%)
原発性の切除された乳癌	39	19(49%)
乳癌株	22	14(64%)

\* NSCLC = 非小細胞肺癌；SCLC 小細胞肺癌。

【0270】

本発明者らは、肺癌細胞株および乳癌細胞株のパネルにおいて、高頻度のメチル化123F2 (RASSF1A) 対立遺伝子を見出した（表7）。肺癌細胞株および乳癌細胞株は、正常細胞が混入していない癌細胞の本質的なクローン集団を表わす。本発明者らは、メチル化123F2 (RASSF1A) 対立遺伝子および非メチル化123F2 (RASSF1A) 対立遺伝子の頻度を表にした（表8）。肺癌株および乳癌株は、しばしば、平均的な腫瘍の集団よりも臨床的により攻撃的な病巣に由来する（349～351）が、本発明者らの以前の研究（350、351）は、癌細胞株が、それらの由来となった培養されていない癌標本において見出される遺伝子的変更を保持し続けることを示した。メチル化対立遺伝子のみが存在は、両方の親の対立遺伝子のメチル化またはメチル化対立遺伝子の保持のいずれか、および非メチル化3p対立遺伝子の喪失と一致する。全てのSCLC細胞株は、ホモ接合性の欠失が理由で、メチル化対立遺伝子のみを有するか、または123F2 (RASSF1A) を完全に欠失した。このことは、SCLCにおいて、ほぼ普遍的である3p21.3対立遺伝子の欠失と一致する（341、350、および356）。NSCLC細胞株のうち、27個のうちの13個（48%）（表8）は、メチル化123F2 (RASSF1A) 対立遺伝子のみを有し、そして27個のうちの10個（37%）は、非メチル化対立遺伝子のみを有した。このことは、この腫瘍細胞型におけるより低い割合の3p21.3対立遺伝子の喪失と一致する（341）。同様に、乳癌細胞株の22個のサンプルのうち10個（45%）（表8）は、メチル化対立遺伝子のみを有し、そして22個のうちの7個（32%）は、非メチル化対立遺伝子のみを有した。再度、このことは、乳癌において見出された3p21.3対立遺伝子の欠失の割合と一致する（351）。予測した通り、3p21.3領域に参与するホモ接合性欠失を有することが以前に示された2つの腫瘍株は、メチル化および非メチル化の両方の対立遺伝子に対して陰性である（表8）（346、347）。

【0271】

（表8．97個の肺癌細胞株および乳癌細胞株\*におけるメチル化および非メチル化RASSF1A対立遺伝子の存在）

【0272】

【表8】

10

20

30

40

RASSF1A CpG 遺伝子型					
メチル化	非メチル化	SCLC	NSCLC	BCC	合計
対立遺伝子	対立遺伝子				
+	+	0	4	4	8
+	-	47	13	10	70
-	+	0	10	7	17
-	-	1	0	1	2†
合計		48	27	22	97

\* SCLC = 小細胞肺癌 ~ NSCLC = 非小細胞肺癌； BCC = 乳癌細胞株。

† メチル化および非メチル化の両方の対立遺伝子を欠失したメチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応遺伝子型を有する2つの腫瘍細胞株（SCLC株NCIH740および乳癌株11CC 1500）は、染色体領域3p21.3におけるRASSF1遺伝子座を含むホモ接合性欠失を有することが知られていた。

#### 【0273】

61個の肺癌細胞株および乳癌細胞株のサブセットについて、本発明者らは、発現分析およびメチル化分析の両方を実施し、そしてメチル化RASSF1A対立遺伝子の存在と123F2(RASSF1A)発現の欠失との間に統計的に有意な関係（ $P < 0.001$ 、Fisherの直接確率法）を見出した。12個のサンプルにおいて、123F2(RASSF1A)は、メチル化対立遺伝子の非存在下で発現され；44個のサンプルにおいて、123F2(RASSF1A)は、メチル化対立遺伝子の存在下で発現されず；4個のサンプルにおいて、123F2(RASSF1A)は、メチル化対立遺伝子の非存在下で発現されず；そして1個のサンプル（乳癌細胞株）において、123F2(RASSF1A)は、メチル化対立遺伝子および非メチル化対立遺伝子の両方の存在下で発現された。これらのデータは、123F2(RASSF1A)のメチル化と123F2(RASSF1A)発現の欠失との重要な関係を示す。

#### 【0274】

次に、本発明者らは、123F2(RASSF1A)プロモーターのメチル化と原発性NSCLCを有する患者における臨床的知見との間に任意の関係が存在するか否かを評価した。本発明者らは、107個の切除されたNSCLCにおいて、123F2(RASSF1A)のメチル化と、年齢、性別、腫瘍-結節-転移(TNM)病理段階、または腫瘍組織学との間に統計的に有意な関係を見出さなかった。さらに、本発明者らは、39個の原発性の切除された乳癌において、123F2(RASSF1A)のメチル化と、年齢、TNM病理段階、腫瘍組織学、エストロゲン、もしくはプロゲステロンレセプター状態、またはHER2/Neuの発現との間に統計的に有意な関係を見出さなかった。

#### 【0275】

肺癌患者の間の生存率は、123F2(RASSF1A)のメチル化状態により異なった（ $P = 0.046$ ）（図16）。また、一変量分析によって、治療的外科切除を試みて処置されたNSCLCを有するこの107人の患者の群において、腫瘍（T1、T2、およびT3）、リンパ節段階（N1およびN2）、および報告された体重減少は、反生存性の統計的に有意な予測因子であった。喫煙歴の差異（はい/いいえ、または1年に40箱のカットオフでの年間箱数）も処置の差異（全ての患者は葉切除または肺切除の外科的切除を受け、そして5人のみ以前に放射線療法または化学療法を受けた）も、いずれも反生存性を説明しなかった。多変量分析は、小さなサンプルの大きさでの使用に制限されるので、本発明者らは、123F2(RASSF1A)のメチル化および主要な一変量因子（腫瘍、リンパ節段階、および体重喪失）の使用により、Cox比例的障害回帰分析（Cox proportional hazards regression analysis）を実施した。123F2(RASSF1A)のメチル化は、生存の非依存的な予後因

10

20

30

40

50

子であることが見出されなかった。しかし、この結果は、少数であることに起因し得る。なぜなら、リンパ節段階（公知の予後因子）さえもまた、もはやこの分析において非依存性因子でなかったからである。

【0276】

（V．腫瘍細胞表現型に対する123F2（RASSF1A）の外因性発現の効果）  
本発明者らは、腫瘍細胞表現型に対するRASSF1Aの効果をもつ方法により試験した。本発明者らは、増殖の尺度として足場依存性のコロニー形成を、そして悪性潜在性の尺度として足場非依存性のコロニー形成を使用した。本発明者らはまた、インビボでの腫瘍形成を直接的に評価した。

【0277】

RASSF1Aを発現するNSCLC NCI-H 1299クローンのインビトロでの増殖の特徴を、足場依存性増殖および足場非依存性（軟寒天）増殖について試験した。非選択培地における増殖の48時間後、一過的にトランスフェクトしたNSCLC NCI-H 1299細胞をトリプシンを用いて取り外し、そして800 μg/mLのG418を含む完全培地中に希釈（通常は、10～25倍）し、そして新鮮な100 mmディッシュにプレートした。培地を週に二度交換した。14日後、培地を除き、プレートをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、そしてコロニーを1%メチレンブルーを含有する50%（vol/vol）エタノールで染色した。足場非依存性の軟寒天増殖アッセイについて、1000個のRASSF1A発現細胞を懸濁し、そして600 μg/mL G418を補充した0.33% Noble寒天（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）を含む完全培地にプレートし、そして0.50%寒天ベースを含む完全培地の上に重層した。21日後、直径0.2 mmよりも大きいコロニーを計数した。

【0278】

レトロウイルス感染細胞について、足場非依存性増殖アッセイを以下の通り実施した：各々の感染由来の1000個の生存可能な選択された細胞を、0.50%寒天ベースの上に0.33%軟寒天を含むDulbeccoの改変Eagle培地（Life Technologies, Inc.）（10%熱不活性化ウシ胎仔血清を含む）にプレートした。21日後、直径0.2 mmよりも大きいコロニーを計数した。

【0279】

本発明者らはまた、インビボでヌードマウスにおいて増殖するRASSF1A感染細胞の能力を試験した。雄BALB/cヌード（nu/nu）3～6週齢マウスを、セシウム源からの350 cGyへの5分間の曝露によって、5匹の動物の群における実験の0日目に照射した。次の日、10<sup>7</sup>個の生存可能な親のベクターコントロールまたはRASSF1Aレトロウイルスを感染させたNSCLC NCI-H 1299腫瘍細胞を含む0.2 mLの滅菌PBSを用いて、各マウスに、側腹部で皮下注入した。マウスを、腫瘍の大きさについて2～3日毎にモニタリングし；一旦、腫瘍が1500 mm<sup>3</sup>より大きくなった場合、そのマウスを殺傷した。

【0280】

本発明者らは、最初に、RASSF1A cDNAをpcDNA3.1+（選択マーカを含む発現ベクター）中にクローニングし、そして内因性の123F2（RASSF1A）発現を欠くNCI-H 1299細胞をトランスフェクトした。14～21日間の選択後、本発明者らは、足場依存性アッセイおよび足場非依存性アッセイの両方において、NCI-H 1299細胞のコロニー形成を決定した。NCI-H 1299細胞における123F2（RASSF1A）の発現は、pcDNA3.1ベクター単独でトランスフェクトした細胞と比較して、足場依存性コロニー形成における40%～60%の減少および足場非依存性コロニー形成におけるおよそ90%の減少を引き起こした（図17A）。NCI-H 1299細胞は、遺伝子内p53ホモ接合性欠失を有するので（34）、野生型p53の一過的な発現は、増殖阻害についての陽性コントロールとして機能し得る。実際、NCI-H 1299細胞における野生型p53の発現は、足場依存性アッセイおよび足場非依存性アッセイにおけるコロニー形成において、それぞれ80%および95%の減少を

10

20

30

40

50

引き起こした(図17A)。123F2(RASSF1A)でトランスフェクトしたNCI-H1299細胞のいくつかのコロニーを選択培地中で単離し、そしてノーザンブロット分析により123F2(RASSF1A)を発現することを見出した(図17B)。これらのコロニーはインピトロで十分に増殖したが、各々は、ベクターでトランスフェクトしたコントロールクローンと比較して、足場非依存性コロニー形成をおよそ90%減少した(図17C)。

#### 【0281】

p c D N A 3 . 1 + ベクターが増殖抑制効果を媒介する可能性を排除するために、本発明者らは、123F2(RASSF1A)またはRASSF1Cを含むレトロウイルス発現ベクターを用いてNCI-H1299細胞を感染させ、そして足場非依存性の様式で増殖するこれらの細胞の能力を試験した。123F2(RASSF1A)を発現する細胞は、空のレトロウイルスベクターまたはRASSF1Cを含むレトロウイルスベクターを用いて感染させた細胞と比較して、軟寒天コロニーを形成する能力における顕著な減少を有した(図17D)。このレトロウイルスベクターを発現する細胞は、プレートした10000個の細胞当たり3200個のコロニーを形成した。123F2(RASSF1A)発現細胞は、ベクターコントロールコロニーの19%のみを形成したが、RASSF1Cは、ベクターコントロールの108%を形成した。RASSF1A感染細胞およびRASSF1C感染細胞はインピトロで十分に増殖し、そして毒性またはアポトーシスの徴候を示さなかった。

#### 【0282】

最後に、本発明者らは、レトロウイルス感染NCI-H1299細胞の、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成する能力を試験した。ベクターでトランスフェクトした細胞(親細胞)は、迅速に腫瘍を形成した(図17E)。対照的に、123F2(RASSF1A)レトロウイルスベクターで感染し、そして123F2(RASSF1A)タンパク質を発現する細胞は、インピボですっと低い腫瘍形成性を有した(図17E)。

#### 【0283】

(実施例16. ヒト染色体3p21.3ホモ接合性欠失領域におけるいくつかの遺伝子は、インピトロおよびインピボで腫瘍サプレッサー活性を示す)

(I. 腫瘍細胞増殖に対する、3p遺伝子の強制的発現の効果)

3p遺伝子の1つ以上が、インピトロで腫瘍サプレッサーとして機能するという仮説を試験するために、本発明者らは、いくつかの型のAd-3p形質導入されたヒトNSCLC細胞および正常HBE株における細胞増殖に対する、3p21.3遺伝子の発現の効果を研究するために、一連の実験を行った。各株における細胞を、vp/cの単位の種々のMOIで、Ad-101F6、Ad-FUS1、Ad-NPRL2、Ad-BLU、Ad-RASSF1、Ad-HYAL2およびAd-HYAL1ベクターによってインピトロで形質導入した；細胞を、偽コントロール、陰性コントロール、非特異的コントロール、または陽性コントロールとして、それぞれPBS、Ad-EV、Ad-LacZ、またはAd-p53で処理した。形質導入効率を、蛍光顕微鏡下でAd-GFP形質導入細胞集団中のGFP-発現細胞を試験することによって決定し、そして各細胞株に適用した最も高いMOIで、80%より高いことを見出した。

#### 【0284】

細胞増殖を、XTTアッセイを使用して分析して、形質導入の1、2、3、および5日後に残ってる生存細胞の数を決定した{5日目については、最も高いMOI(それぞれ、A549について5000vp/c、H1299について1000vp/c、H460について5000vp/c、H358について2500vp/c、およびHBEについて1000vp/c)についてのデータのみ示す}(図19)。全ての場合において、形質導入した細胞の生存度を、形質導入していない(PBS処理)コントロール細胞の生存度(これらの生存度を100%に設定した)と比較した。図22において見られ得るように、細胞の生存度は、Ad-101F6-、Ad-Fus1-、およびAd-NPRL2形質導入したA549およびH460細胞において有意に減少し、これらは、複数の3p21.

10

20

30

40

50

3 マーカーに対するホモ接合性を示し、そして野生型の p 5 3、および H 1 2 9 9 細胞を含む（これらは、3 p 2 1 . 3 ホモ接合性を示すが、p 5 3 のホモ接合性欠失もまた有する）。細胞生存度の緩やかな減少は、A d - R A S S F 1 C 形質導入した H 1 2 9 9 細胞において示される。しかし、A d - H Y A L 1、A d - H Y A L 2、A d - B L U、A d - E V または A d - L a c Z で形質導入されたこれらの細胞のいずれにおいても、増殖に対する有意な効果は観察されなかった。これらの結果は、いくつかの野生型 3 p 2 1 . 3 遺伝子の外因的発現が、3 p 欠乏性腫瘍細胞の増殖を阻害し得るか、またはこれらの 3 p 2 1 . 3 遺伝子のインビトロでの腫瘍サプレッサー機能を回復し得ることを示唆する。

#### 【 0 2 8 5 】

腫瘍細胞増殖に対して観察された阻害効果の特異性を明らかにし、そして正常細胞上で外因的に発現された 3 p 2 1 . 3 遺伝子の潜在的な細胞傷害性を試験するために、本発明者らは、3 p 2 1 . 3 ヘテロ接合性 H 3 5 8 細胞および正常 H B E C における細胞増殖に対する、これらの 3 p 2 1 . 3 遺伝子の効果を分析した（図 1 9）。図 1 9 に示されるように、最も高い M O I ですべての A d - 3 p 遺伝子で形質導入された H B E C は、1 0 % 未満の細胞生存度の損失を有するが、同じベクターで形質導入された H 3 5 8 細胞は、形質導入されていないコントロール細胞と比較した場合、2 0 % 未満の細胞生存度の損失を有した。細胞数の同様のレベルの損失を、A d - E V および A d - L a c Z で形質導入した H 3 5 8 細胞および H B E C 細胞において観察した。p 5 3 を欠失する H 3 5 8 細胞は、A d - p 5 3 コントロールで形質導入される場合に、細胞生存度が減少した。これらの結果は、A d - L a c Z、A d - H Y A L 2、A d - H Y A L 1、A d - R A S S F 1、および A d - B L U を用いる効果の欠如と関連し、3 p 欠乏性腫瘍細胞における 3 p 2 1 . 3 遺伝子、F U S 1、N P R L 2、1 0 1 F 6 の腫瘍抑制機能の特異性を実証し、そして全般的な細胞傷害性はこれらの野生型 3 p 2 1 . 3 遺伝子の外因的発現と関連しないことを示す。

#### 【 0 2 8 6 】

A d - 3 p トランスフェクト体における 3 p 2 1 . 3 遺伝子の発現を、定量的リアルタイム R T - P C R によって確認し、そして既知濃度のヒト総 R N A およびプライマーならびに - アクチン D N A および G A P D H c D N A のための T a q M a n プローブを、それぞれ、標準および内部コントロールとして使用した（図 2 0）。F U S 1（図 2 0 A）、1 0 1 F 6（図 2 0 B）、N P R L 2（図 2 0 C）、および H Y A L 1（図 2 0 D）の転写を、これらの 3 p 2 1 . 3 遺伝子の増大した発現レベルと、形質導入された H 1 2 9 9 細胞における対応する A d - 3 p ベクターの増大した M O I との間の関連性を示すことによって定量的に実証した。他の 3 p 2 1 . 3 遺伝子（H Y A L 2、H Y A L 1、B L U、および R A S S F 1）の転写もまた、リアルタイム R T - P C R によって検出した。F U S 1 タンパク質および 1 0 1 F 6 タンパク質の発現もまた、その推定アミノ酸配列由来のオリゴペプチドに対して惹起された利用可能なポリクローナル抗体を使用して、ウエスタンブロット分析によって検出した。

#### 【 0 2 8 7 】

（ I I . A d - 3 p 形質導入した腫瘍細胞中の 3 p 遺伝子による、アポトーシスの誘導）A d - 3 p 形質導入した H 1 2 9 9、A 5 4 9、H 4 6 0、H 3 5 8、および H B E C 細胞においてアポトーシスを誘導する、外因的に発現された 3 p 2 1 . 3 遺伝子の能力を、T U N E L 反応を使用して、F A C S によって分析した（図 2 1）。アポトーシスの誘導を、A d - 1 0 1 F 6 -、A d - F U S 1 -、および A d - N P R L 2 形質導入した A 5 4 9（図 2 1 A）、H 1 2 9 9（図 2 1 B）、および H 4 6 0（図 2 1 C）細胞において検出したが、H 3 5 8（図 2 1 D）および H B E C（図 2 1 E）細胞においては検出されなかった。アポトーシス細胞集団は、形質導入の持続時間の増加に伴って増加した；形質導入された H 1 2 9 9、A 5 4 9、および H 4 6 0 細胞において、それぞれ、A d - 1 0 1 F 6、A d - F U S 1、および A d - N P R L 2 で形質導入した 5 日後に、細胞の 1 5 ~ 2 0 %、4 0 ~ 6 5 %、および 7 5 % より多くがアポトーシス細胞であったが、一方、P B S 単独で処理した細胞および A d - E V ベクターで形質導入した細胞のうち、それぞ

10

20

30

40

50

れ7%および10%のみが、同じ時間間隔の後でTUNEL陽性であった。Ad101F6、Ad-FUS1、およびAd-NPRL2によるアポトーシス誘導レベルは、p53遺伝子を欠失するH1299細胞株(図21B)においてよりも、野生型p53を有するA549およびH460細胞株(図21Aおよび21C)において、20~50%より有意に現れた。A549細胞およびH460細胞におけるアポトーシスのレベルは、p53欠乏性のH1299細胞およびH358細胞におけるAd-p53によって誘導されるレベルに匹敵した(図21Bおよび21D)。しかし、Ad-BLU、Ad-RASSF1、Ad-HYAL2、およびAd-HYAL1によって形質導入された腫瘍細胞株のいずれにおいても、アポトーシスの有意な誘導は観察されなかった(図21)。これらのAd-3pベクターによって形質導入された細胞におけるアポトーシスのレベルおよび誘導時間 10は、同じベクターで処理した細胞における細胞増殖阻害のレベルおよび誘導時間と十分に関連し(図19)、これは、3p21.3遺伝子による腫瘍細胞増殖の抑制が、アポトーシス誘導の機構を直接的または間接的に介して媒介されることを示唆する。

#### 【0288】

(III. Ad-3pベクターの腫瘍内注射による腫瘍増殖の抑制)  
インビボで観察されたこれらの3p21.3遺伝子の腫瘍細胞増殖に対する阻害効果が、インビボでの腫瘍増殖に対しても実証され得るか否かを決定するために、本発明者らは、コントロールとしてPBSおよびAd-EV、Ad-LacZ、およびAd-p53ベクターと共に、nu/nuマウスにおけるA549またはH1299腫瘍異種移植片に、Ad-3p21.3遺伝子ベクターを直接腫瘍内注射することによって、腫瘍増殖の抑制 20における3p21.3遺伝子の効力を評価した(図22)。腫瘍の増殖を、最初の注射から最後の注射の20日後まで記録した。腫瘍容積を、各群における処置の開始時の容積に対して、処置後の腫瘍容積の増加のパーセンテージを算出することによって正規化した。A549(図22A)およびH1299(図22B)腫瘍モデルの両方において、Ad-101F6、Ad-FUS1、またはAd-NPRL2で処置した腫瘍の全ては、Ad-LacZまたはAd-EVコントロールで処置したマウス群と比較して、有意な増殖の抑制を示した( $P < 0.001$ )が、Ad-BLU、Ad-RASSF1、およびAd-HYAL1-処置した腫瘍においては、有意な効果は観察されなかった。Ad-HYAL2で処置したA549 H1299腫瘍ではなくH1299 A549腫瘍異種移植片は、処置の 30の終点でのみ有意な減少を示した( $P = 0.036$ )。さらに、Ad-p53ベクターで処置した腫瘍よりも有意に強力な腫瘍増殖阻害が、Ad-101F6およびAd-NPRL2ベクターで処置したA549腫瘍において示された(図22A)。

#### 【0289】

(IV. プロタミン-アデノウイルス複合体-媒介3p21.3遺伝子移入による、実験的な肺転移の発生の阻害)  
全身的転移を抑制する際の3p21.3遺伝子の潜在能力をさらに探索するために、インビボでの組換えアデノウイルスの全身的送達を増大するための、プロタミン/アデノウイルス複合体(P-Adと名付ける)を使用する新規な処方物を開発した。実験的なA549転移性ヒト肺癌モデルを使用して、nu/nuマウスにおける肺転移の発生に対する3p21.3遺伝子移入の効果を研究した(図23)。アデノウイルス3p21.3遺伝子 40ベクターをプロタミンと複合体化し、そして静脈内注射を介して送達した。A549転移の発生は有意に阻害され、そしてA549を接種したマウス由来の肺表面上の転移性腫瘍コロニーの形成は、コントロール処置群における形成と比較して、P-Ad-101F6、P-Ad-FUS1、P-Ad-NPRL2、P-Ad-BLUまたはP-Ad-HYAL2で処置した動物において80%より多く減少した(図23A)。しかし、P-Ad-HYAL1およびP-Ad-RASSF1 P-Ad-BLUで処置した動物においては、転移性コロニー形成の有意な減少は観察されなかった。これらのデータは、Ad-3pで処置した皮下腫瘍から得られた結果と一致しており、腫瘍増殖の抑制およびインビボでの腫瘍の進行の阻害における、これらの3p21.3遺伝子の役割をさらに支持する。

#### 【0290】

10

20

30

40

50

(実施例17.3p21.3ホモ接合性欠失領域から単離された候補腫瘍サプレッサー遺伝子FUS1の過剰発現は、G1停止および肺癌細胞の増殖の障害を導く)

小肺癌(SCLC)および非小細胞肺癌(NSCLC)の両方における染色体アーム3pの1つの対立遺伝子の非常に頻繁な損失は、この染色体領域における腫瘍サプレッサー遺伝子(TSG)の存在についての強力な証拠を提供する(363;364;367;371;372)。単離された対立遺伝子損失を示す複数の異なる3p領域を、詳細な対立形質決定(allelotyping)研究によって同定し、これにより3p上に位置するいくつかの異なるTSGが存在することを示唆される(361;362;372)。肺癌細胞株および乳癌細胞株におけるネスト化したホモ接合性欠失は、3p21.3において見出され、TSG候補としての25の新しい遺伝子の同定、注釈付け(annota- 10  
tion)および評価を含む本発明者らの検索の焦点を、630kbの領域にあてた(357;365;366;368;369;370)。乳癌の欠失は、この領域をさらに120kbにまで狭め、そして9つのTSG候補(CACNA2D2, PL6, 106F6, N  
PRL2/g21, BLU, RASSF1, FUS1, HYAL2, HYAL1)を、この領域内またはこの領域の境界に位置付けた(369)。これらの候補TSGの1つ、FUS1(AF055479)(既知遺伝子のいずれとも相同性を示さない)は、肺癌においてほんのわずかの変異しか有さないこと、そして通常は肺癌におけるmRNAレベルで発現されることが見出された(366)。いくつかのNSCLC(NCI-H322およびNCI-H1334)は、同じ非センスの変異を示し、この変異は、異常なmRNAの 20  
スプライシングから生じる。この異常な形態は、FUS1エキソン2の3'末端で28bpのmRNAを欠失し、野生型における110アミノ酸と比較して、82アミノ酸の短縮された推定タンパク質を生じる(図24)。肺癌細胞株DNAについて以前に行われてた本発明者らの変異分析を確認するために、本発明者らは、一次非培養肺癌中のFUS1における他の変異を探索した。一本鎖構造多型(SSCP)分析を、40の一次非培養肺癌のゲノムDNA(9のSCLCおよび31のNSCLC)を使用して行った(図24)(360)。変異は検出されなかったが、本発明者らは、イントロン2において1つのヌクレオチド多型を見出し、これはFUS1のアミノ酸配列を変更しなかった。

#### 【0291】

次に、本発明者らは、TSGの不活化を導く後成的機構として、CpG島プロモーター領域のメチル化を考えた。実際、このような腫瘍後天性プロモーター領域のメチル化は、FUS1のすぐ動原体側(centromeric)に存在するRASSF1A mRNA アイソフォームを生じることが見出された(354;358)。しかし、FUS1 mRNAは、このようなCpGのメチル化を起こす大部分の肺癌において発現され、FUS1の不活化の方法について見込みがない(366)。さらに、FUS1のCpG島を含む5'推定プロモーター領域を、6つの肺癌由来の亜硫酸水素ナトリウム処理した(355)DNAを使用して配列決定し、本発明者らは、FUS1タンパク質の発現を検出せず(以下を参照のこと)、そしてCpGメチル化を見出さなかった。 30

#### 【0292】

この遺伝子が肺癌の病因に関与する別の機構として、FUS1の単独機能不全(haploinsufficiency)または発現の減少の可能性を考えた(356;359;373)。本発明者らは、最初に、抗Fus1抗ペプチド抗体(これは、外因的に発現されるFus1を容易に検出する)を使用して肺癌細胞株のパネルのウエスタンブロット分析を行ったが(図25)、肺癌においていずれの内因的FUS1発現も検出されなかった(ネガティブなデータの例として与えら得るH1299 NSCLCについては、図25)。この検出の欠如は、種々の要因(抗体の品質を含む)に起因し得る。それにもかかわらず、FUS1タンパク質発現の欠如または低レベルのFUS1タンパク質発現が肺癌の病因に関与する場合、本発明者らは、Fus1の内因的導入および発現が悪性の表現型を抑制し得ると結論付けた。コロニー形成アッセイを、FUS1発現ベクターのトランスフェクション後に行った。本発明者らは、PCRによってC末端FLAGタグ化FUS1構築物を作製し、そしてこれを発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen, 40 50

Carlsbad CA) に連結した。空のベクター、ならびに野生型 FUS1、FLAG-タグ化 FUS1、および 82aa の変異 FUS1 を含む発現ベクターを、NSCLC NCI-H1299 細胞 (これは、3p21.3-630kb 領域についての対立遺伝子を喪失し、そして検出可能な FUS1 タンパク質を発現しない (図 25))、および NSCLC NCI-H322 細胞 (これは、FUS1 の内因性のホモ接合性の非センス短縮変異の発現を含み、そしてまた、検出可能な FUS1 タンパク質を発現しない) にトランスフェクトした。H1299 細胞中の FUS1 構築物の、一過性のトランスフェクション後の発現を、抗 Flag 抗体および抗 N 末端 FUS1 抗体を使用して、ウエスタンブロット分析によって確認した (図 25)。肺癌コロニー形成に対する、neo 耐性遺伝子での FUS1 のトランスフェクションの効果を試験した。FUS1 トランスフェクションにおける G418 耐性コロニーの数は、空のベクターでのトランスフェクションと比較して、劇的に減少した (図 25)。対照的に、変異 FUS1 トランスフェクト体において形成したコロニーの数は、わずかに減少したのみであり、これにより、この肺癌に関連した変異 FUS1 が、機能的に不活性であったことが示唆される (図 25)。

#### 【0293】

H1299 細胞中でエクジソン誘導性哺乳動物発現系を発生させて、FUS1 の過剰発現が腫瘍細胞増殖を阻害し得ることを確認した。この系において、FUS1 の発現を、Ponasterone A の存在下で誘導する。調節可能なホルモンレセプターベクター pVgRXR のみを有する H1299 親 ECR9 細胞を、さらなるコントロールとして役立てた。H1299 ECR9 細胞を、pINDsp1-FUS1-FLAG (neo) でトランスフェクトし、Ponasterone A の存在または非存在下で G418 を用いて選択し、そして G418 耐性コロニーの数を比較した。FUS1 誘導条件下で発現が誘導された、細胞中に形成されたコロニーの数は、非誘導条件下での細胞中でのコロニーの数と比較して、平均  $75 \pm 8\%$  減少した。これは、FUS1 の増殖阻害活性の別の確認 (confirming action) を提供する。20 の安定な G418 耐性コロニーを、非誘導条件下で単離し、そして FUS1-FLAG の誘導可能な発現を試験した。その中で、6 つのコロニーが、ある程度の FUS1 誘導を示し、そして 2 つの安定なコロニーを選択し (C1.13 および C1.16)、このコロニーにおいて、FUS1-Flag の発現は、Ponasterone A によって明らかに誘導性であった (図 26)。しかし、両方の細胞株は、非誘導条件においてある程度の FUS1 を発現した。これは FUS1 発現の調節が漏出性であることを示す。

#### 【0294】

MTT アッセイによって、誘導条件および非誘導条件における細胞増殖速度を試験した。Ponasterone A は、親細胞株である H1299 ECR9 細胞の増殖に対しては何の効果も有さないが、C1.13 細胞および C1.16 細胞の増殖は、Ponasterone A の存在下で阻害された (図 26)。Fus1 の発現の誘導および腫瘍細胞増殖の阻害は、Ponasterone A の用量に依存するようであり、この両方は、Ponasterone A の濃度の増加と共に増加する (図 26)。Fus1 誘導の場合、この腫瘍細胞の倍加時間もまた、両方のクローンにおいて増加した (それぞれ、C1.13 については、22 時間から 46 時間、そして C1.16 については、21 時間から 45 時間)。これらの結果はまた、Fus1 の過剰発現が、インビトロでの H1299 肺癌細胞の増殖を抑制することを示した。

#### 【0295】

TUNEL アッセイによって、誘導条件下での H1299 細胞におけるアポトーシスの増加は観察されなかった。しかし、細胞が Ponasterone A によって誘導されて 48 時間にわたって Fus1 を発現し、そして FACS 分析によって蛍光発色セルソーター (FACS) 分析 (詳細には、図 26 の説明文を参照のこと) によって分析した場合、本発明者らは以下を見出した: 親 H1299-ECR9 細胞が、細胞周期パラメーターの変化を有さないこと (G1 51%、S 18%、G2/M 31% (非誘導) および G1 50%、S 18%、G2/M 32% (誘導)); 一方、Fus1 誘導クローンは

10

20

30

40

50

、G1停止を示した(H1299クローン13は、G1 50%、S 17%、G2/M 33%(非誘導)、およびG1 65%、S 10%、G2/M 25%(誘導)を示し;そしてH1299クローン16は、G1 56%、S 16%、G2/M 28%(非誘導)およびG1 65%、S 12%、G2/M 23%(誘導)を示した)。G1%における増加は有意であった(P<0.05、スチューデントt検定)。これらの細胞周期分析の結果は、H1299細胞におけるFUS1の過剰発現がG1停止および細胞周期動力学的の変更に関連することを示すことを示唆する。

#### 【0296】

肺癌細胞株は、検出可能な内因的レベルのFus1タンパク質を発現せず、そして過剰発現によるFus1の内因的導入は、インビトロで肺癌細胞の増殖を阻害した。この増殖阻害は、この領域について対立遺伝子を喪失した肺癌株およびFUS1のホモ接合性の短縮変異を有する別の株において見られた。さらに、本発明者らは、この短縮Fus1タンパク質が、腫瘍増殖抑制活性を喪失していたことを見出した。急性トランスフェクション研究に加えて、本発明者らは、Fus1誘導系を確立し、そして腫瘍増殖阻害がFus1タンパク質の発現レベルに相関したことを示した。さらに、同じ発現調節系を使用する細胞周期分析は、細胞増殖の阻害についての機構が、G1停止に関連し、そしてアポトーシスの誘導には関連しなかったことを示した。最後に、本発明者らは、FUS1の体細胞性変異が、原発性肺癌においては珍しい(0/40)ことを確認し、これは、以前の研究(3/79の肺癌が、FUS1遺伝子における変更を有することを示す(2つの非センス変異および1つの欠失))と一致している。実際に、本発明者らがこの600kbの3p21.3領域において詳細に研究した25の候補遺伝子のうち22のいずれかにおける変異の頻度は、この遺伝子座での高頻度のLOHと比較して、低い。この低い変異の頻度を説明する1つの可能性は、FUS1の発現の喪失、または腫瘍プロモーターの後天性メチル化による3p21.3遺伝子の他の喪失である。同じ3p21.3欠失領域から単離されたRASSF1A mRNAアイソフォームの発現およびFUS1の15.5kb動原体性は、この遺伝子についての後天性CpG島プロモーターDNAのメチル化によって、多くの肺癌において阻止された(354;358)。RASSF1Aの置換は、インビトロおよびインビボでの腫瘍細胞増殖を阻害し、これは、RASSF1Aが、この遺伝子座における別の候補腫瘍サプレッサーであることを示す。しかし、本発明者らは、FUS1 mRNA発現の損失(366)または肺癌におけるFUS1についての5'領域のCpGメチル化を見出さなかったため、FUS1遺伝子についての不活化機構として腫瘍後天性プロモーターのメチル化を除外した。FUS1は、単独機能不全腫瘍サプレッサー遺伝子として作用し得る(356)。本発明者らの実験は、FUS1の過剰発現が、H1299におけるG1停止を引き起こすことを示した。いくつかのシグナルまたは環境的なキュー(cue)は、正常細胞においてFus1の発現を誘導し、そしてG1停止を導き得るが、悪性細胞における3p対立遺伝子の損失およびFUS1のいくつかの他の変更は、肺腫瘍におけるFUS1の単独機能不全および/または発現の損失を導き得、そして細胞周期の停止から脱出し得る。

#### 【0297】

本明細書中に開示されそして特許請求される全ての組成物および/または方法は、本開示を鑑みて、過度の実験なく作製および実施され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関して記載されているが、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される組成物および/または方法、ならびにこの方法の工程または工程の順序において、変更が適用され得ることが当業者に明らかである。より詳細には、化学的および生理学的の両方で関連する特定の因子が、本明細書中に記載の因子の代わりに使用され得、その上、同じかまたは同様の結果が達成され得ることが明らかである。当業者に明白な全てのこのような類似の置換および改変は、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神、範囲および概念に含まれるとみなされる。

#### 【0298】

(参考文献)

10

20

30

40

50

以下の参考文献は、これらが本明細書中の記載に対する例示的な手順的または補足となる他の詳細を提供する程度まで、本明細書中で詳細に参考として援用される：

【 0 2 9 9 】

【表 9】

1. Roth JA. Gene replacement strategies for lung cancer. *Curr Opin Oncol* 1998; 10:127-132.
2. Roth JA. Restoration of tumour suppressor gene expression for cancer. *Forum* 1998; 8:368-376. 10
3. Chengalvala MV, Lubeck MD, Selling BJ, *et al.* Adenovirus vectors for gene expression. *Curr.Opin.Biotechnol.* 1991; 2:718-722.
4. Adams DH, Hubscher SG, Fisher NC, Williams A, Robinson M. Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation. *Hepato* 1996; 24:533-8.
5. Ji L, Fang B, Yen N, Fong K, Minna JD, Roth JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res.* 1999; 59:3333-3339. 20
6. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica Biophysica Acta* 1998; 1378:F21-F59
7. Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, McIntire D, Hung J, Tonk V, *et al.* Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes, Chrom Cancer* 1998; 21:308-319. 30
8. Gazdar AF, Bader S, Hung J, Kishimoto Y, Sekido Y, Sugio K, *et al.* Molecular genetic changes found in human lung cancer and its precursor lesions. *Cold Spring Harbor Sym Quant Biol* 1994; 59:565-572.

(表9の続き)

9. Minna JD. Summary of the role of dominant and recessive oncogenes in the pathogenesis of lung cancer and the application of this knowledge in translational research. In: Pass H, Mitchell J, Johnson D, Turrisi A, editors. Summary of the role of dominant and recessive oncogenes in the pathogenesis of lung cancer and the application of this knowledge in translational research. Philadelphia: JB Lippincott Co., 1994:
10. Minna JD, Sekido Y, Fong K, Gazdar AF. Molecular Biology of Lung Cancer. In: DeVita VT, Jr., Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, 1997:849-857. 10
11. Daly MC, Xiang RH, Buchhagen D, Hensel CH, Garcia DK, Killary AM, *et al.* A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity. *Oncogene* 1993; 8:1721-1729.
12. Bernues M, Casadevall C, Miro R, Caballin MR, Gelabert A, Ejarque MJ, *et al.* Analysis of 3p allelic losses in renal cell carcinomas: Comparison with cytogenetic results. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 107:121-124. 20
13. Zbar B, Branch H, Talmadge C, Linehan M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 1987; 327:721-724.
14. Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, *et al.* Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Internatl J Cancer* 1998; 78:766-774. 30
15. Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba II, Latif F, Bader S, Wei MH, *et al.* Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene. *Oncogene* 1998; 16:3151-3157.
16. Buchhagen DL, Worsham MJ, Dyke DL, Carey TE. Two regions of homozygosity on chromosome 3p in squamous cell carcinoma of the head and neck: comparison with cytogenetic analysis. *Head & Neck* 1996; 18:529-537.

(表9の続き)

17. Gorunova L, Hoglund M, Andren-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin YS, Mitelman, *et al.* Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: Intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chrom Cancer* 1998; 23:81-99.
18. Hughson MD, Dickman K, Bigler SA, Meloni AM, Sandberg AA. Clear-cell and papillary carcinoma of the kidney: An analysis of chromosome 3, 7, and 17 abnormalities by microsatellite amplification, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 106:93-104. 10
19. Uzawa N, Yoshida MA, Hosoe S, Oshimura M, Amagasa T, Ikeuchi T. Functional evidence for involvement of multiple putative tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 107:125-131.
20. Kersemaekers AM, Kenter GG, Hermans J, Fleuren GJ, van d, V. Allelic loss and prognosis in carcinoma of the uterine cervix. *Internatl J Cancer* 1998; 79:411-417. 20
21. Wistuba II, Montellano FD, Milchgrub S, Virmani AK, Behrens C, Chen H, *et al.* Deletions of chromosome 3p are frequent and early events in the pathogenesis of uterine cervical carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57:3154-3158.
22. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, *et al.* Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA* 1995; 273:1908 30
23. Sekido Y, Bader S, Latif F, Chen JY, Duh FM, Wei MH, *et al.* Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc Natl Acad Sci,U.S.A* 1996; 93:4120-4125.
24. Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, Bryant D, Hung J, Minna JD, *et al.* Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene* 1999; 18:643-650. 40

(表9の続き)

25. Kohno H, Hiroshima K, Toyozaki T, Fujisawa T, Ohwada H. p53 mutation and allelic loss of chromosome 3p, 9p of preneoplastic lesions in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1999; 85:341-347.
26. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed S, Lam S, *et al.* Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res* 1999; 59:1973-1979.
27. van den Berg A, Dijkhuizen T, Draaijers TG, Hulsbeek MM, Maher ER, van, *et al.* Analysis of multiple renal cell adenomas and carcinomas suggests allelic loss at 3p21 to be a prerequisite for malignant development. *Genes Chrom Cancer* 1997; 19:228-232. 10
28. Shay JW. Telomerase in human development and cancer., *J Cell Physiol* 1997; 173:266-270.
29. Shay JW. Telomerase in cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer J Sci American* 1998; 4 Suppl 1:S26-S34 20
30. Sanchez Y, El-Naggar A, Pathak S, Killary AM. A tumor suppressor locus within 3p14-p12 mediates rapid cell death of renal cell carcinoma *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci, U.S.A* 1994; 91:3383-3387.
31. Wu X, Zhao Y, Honn SE, Tomlinson GE, Minna JD, Hong WK, *et al.* Benzo[a]pyrene diol epoxide-induced 3p21.3 aberrations and genetic predisposition to lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58:1605-1608.
32. Pellegata NS, Ranzani GN. The significance of p53 mutations in human cancers. *Eur J Histochem* 1996; 40:273-282. 30
33. Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Devel* 1996; 10:
34. Wang XW, Harris CC. Tp53 tumour suppressor gene - clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surv* 1996; 28:169-196.

(表9の続き)

35. Quigley JP, Armstrong PB. Tumor cell intravasation elucidated: the chick embryo opens the window. *Cell* 1998; 94:281-284.
36. Killary AM, Wolf ME, Giambernardi TA, Naylor SL. Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22. *Proc Natl Acad Sci,U.S.A.* 1992; 89:10877-10881.
37. Killary AM, Fournier RE. Microcell fusion. *Methods in Enzymology* 1995; 254:133-152. 10
38. Satoh H, Lamb PW, Dong JT, Everitt J, Boreiko C, Oshimura M, *et al.* Suppression of tumorigenicity of A549 lung adenocarcinoma cells by human chromosomes 3 and 11 introduced via microcell-mediated chromosome transfer. *Mol Carcinogenesis* 1993; 7:157-164.
39. Berkner KL. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotech* 1988; 6:616-629. 20
40. Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994; 91:8802-8806.
41. Ketner G, Spencer F, Tugendreich S, Connelly C, Hieter, P. Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994; 91:6186-6190.
42. Fu S, Deisseroth AB. Use of the cosmid adenoviral vector cloning system for the *in vitro* construction of recombinant adenoviral vectors. *Human Gene Ther* 1997; 8:1321-1330. 30
43. Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavloff, N., and Meier-Tackmann, D. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J.Virol.* 70, 4805-4810. 1996.

(表9の続き)

44. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998; 95:2509-2514.
45. Mizuguchi H, Kay MA. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Human Gene Ther* 1998; 9:2577-2583.
46. Kagawa S, Pearson SA, Ji L, Xu K, McDonnell TJ, Swisher S, *et al.* A binary adenoviral vector for expressing high levels of the proapoptotic gene *bax*. *Gene Ther.* 1999; 10
47. Clark PR, Stopeck AT, Brailey JL, Wang Q, McArthur J, Finer MH, *et al.* Polycations and cationic lipids enhance adenovirus transduction and transgene expression in tumor cells. *Cancer Gene Ther* 1999; 6:437-446.
48. Lanuti M, El Kouri C, Force SD, Chang MY, Amin K, Xu K, *et al.* Use of protamine to augment adenovirus-mediated cancer gene therapy. *Gene Ther* 1999; 20 6:1600-1610.
49. Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts, DD, *et al.* Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol* 1997; 15:647-652.
50. Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 1998; 5:930-937.
51. Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 30 1998; 5:930-937.
52. Mabry M, Nelkin BD, Baylin SB. Lung Cancer in *The Genetic Basis of Human Cancer*; (Vogelstein B and Kinzler KW, eds., McGraw Hill 1998) p.671-679.

(表9の続き)

53. Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes", In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.
54. Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 1-284, 1979.
55. Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem*, A31(1): 1355-1376, 1994.
56. Benvenisty and Neshif, "Direction introduction of genes into rats and expression of the genes", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986. 10
57. Bishop, J.M., "Molecular themes in oncogenesis", *Cell*, 64:2351-248, 1991.
58. Boring *et al.*, *Cancer Statistics, 1994 CA*, 43:7-26, 1994.
59. Brinster *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 4438-4442, 1985.
60. Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977
61. Chang *et al.*, "Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector", *Hepatology*, 14:124A, 1991. 20
62. Chen and Okayama, "High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA", *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
63. Coffin, *Retroviridae and Their Replication*. In: *Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.
64. Cohen, P., "The discovery of protein phosphatases: From chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease", *Bioessays*, 61-583-588, 1994. 30
65. Collet *et al.*, "Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2021-2024, 1978.
66. Cook *et al.*, "In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence," *Cell*, 27:487-496, 1981.

(表9の続き)

67. Couch *et al.*, "Immunization with types 4 and 7 adenovirus by selective infection of the intestinal tract," *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
68. Coupar *et al.*, "A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes", *Gene*, 68:1-10, 1988.
69. Culver *et al.*, *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256:1550-1552, 1992. 10
70. Daly *et al.*, "A homozygous deletion on chromosome 3 in small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressive activity", *Oncogene* 8:1721-1729, 1993.
71. Davey *et al.*, EPO No. 329 822.
72. Denu *et al.*, "Form and function in protein dephosphorylation", *Cell* 87:361-364, 1996.
73. Dubensky *et al.*, "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
74. EP 329 822, Davey *et al.* 20
75. Fanning and Anderson, "Protein-protein interactions: PDZ domain networks.", *Curr Biol*, 6:(11)1385-1388, 1996.
76. Fechheimer *et al.*, "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
77. Ferkol *et al.*, "Regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase/human factor IX gene introduced into the livers of adult rats by receptor-mediated gene transfer", *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993. 30
78. Fodor *et al.*, "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", *Science*, 251:767-773, 1991.
79. Forster & Symons, "Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites," *Cell*, 49:211-220, 1987.
80. Foulds, The natural history of cancer. *J. Chronic Dis.*, 8:2-37, 1958.

(表9の続き)

81. Fraley *et al.*, "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
82. Freifelder, *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. Wm. Freeman and Co., New York, NY, 1982.
83. Freshner, *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd ed., Oxford/New York, IRL Press, Oxford University Press, 1992. 10
84. Friedmann, "Progress toward human gene therapy", *Science*, 244:1275-1281, 1989.
85. Frohman, In: *PCR™ Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.
86. Geffer *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3: 231-236, 1977.
87. Gerlach *et al.*, "Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus," *Nature (London)*, 328:802-805, 1987. 20
88. Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
89. Ghosh and Bachhawat, Targeting of Liposomes to Hepatocytes. In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*. Wu *et al.*, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 87-104, 1991.
90. Goding, 1986, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fla., pp. 60-61, and 71-74, 1986. 30
91. Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
92. Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures", *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
93. 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.

(表9の続き)

94. Graham and van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology*, 52:456-467, 1973.
95. Graham *et al.*, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
96. Grunhaus and Horwitz, "Adenovirus as cloning vector", *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
97. Hardie and Hanks, In: *The Protein Kinase Facts Book*, 1995 10
98. Harland and Weintraub, "Translation of mammalian mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA", *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
99. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
100. Hermonat and Muzycska, "Use of adenoassociated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984. 20
101. Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.
102. Herz and Gerard, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
103. Horwich, *et al.*, "Synthesis of hepadnavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells", *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
104. Hunter, T., "Cooperation between oncogenes", *Cell*, 64-249-270, 1991. 30
105. Innis *et al.*, *PCR™ Protocols*, Academic Press, Inc., San Diego CA, 1990.
106. Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" IN: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto *et al.*, eds., Chapman and Hall, New York, 1993.
107. Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
108. Kaneda *et al.*, "Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver", *Science*, 243:375-378, 1989.

(表9の続き)

109. Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.
110. Kato *et al.*, "Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver", *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
111. Kim & Cook, "Three dimensional model of the active site of the self-splicing rRNA precursor of *Tetrahymena*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8788-8792, 1987.
112. Klein *et al.*, "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells", *Nature*, 327:70-73, 1987. 10
113. Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
114. Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
115. Kok *et al.*, "A homozygous deletion in a small cell lung cancer cell line involving a 3p21 region with a marked instability in yeast artificial chromosomes", *Cancer Res.* 54:4183-4187, 1994.
116. Komiya *et al.*, "Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer", *Genes Chromo. Cancer* 17:245-253, 1996. 20
117. Kruglyak, *et al.*, "Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach," *Am. J. Hum. Genet.*, 58:347-1363, 1996.
118. Kwoh *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989.
119. Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
120. Lathrop, *et al.*, "Strategies for multilocus linkage analysis in humans," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3443-3446, 1984. 30
121. Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
122. Lee *et al.*, "Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence", *Science*, 235:1394-1399, 1987.
123. Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
124. Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.

(表9の続き)

125. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Hogan *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
126. Mann *et al.*, "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus", *Cell*, 33:153-159, 1983.
127. Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
128. Merrifield, *Science*, 232: 341-347, 1986. 10
129. Michel & Westhof, "Modeling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis," *J. Mol. Biol.*, 216:585-610, 1990.
130. Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993.
131. Myers, EP 0273085
132. Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988. 20
133. Nicolau and Sene, "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells", *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
134. Nicolau *et al.*, "Liposomes as carriers for *in vivo* gene transfer and expression," *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
135. Ohara *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 5673-5677, 1989.
136. PCT/US87/00880 30
137. PCT/US89/01025
138. Pease *et al.*, "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5022-5026, 1994.
139. Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988.

(表9の続き)

140. Perales *et al.*, "Gene transfer *in vivo*: Sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4086-4090, 1994.
141. Petersen *et al.*, "Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 13q, and 17p", *Brit. J. Cancer* 75:79-86, 1997.
142. Pignon *et al.*, *Hum. Mutat.*, 3: 126-132, 1994.
143. Potter *et al.*, "Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984. 10
144. Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
145. Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
146. Ransom *et al.*, "Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas", *Genes Chromosom. Cancer* 5:357-374, 1992. 20
147. Rasheed *et al.*, *Oncogene*, 11:2243-2246, 1995.
148. Reinhold-Hurek & Shub, "Self-splicing introns in tRNA genes of widely divergent bacteria," *Nature*, 357:173-176, 1992.
149. Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.
150. Renan, "Cancer genes: Current status, future prospects and applications in radiotherapy/oncology," *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990. 30
151. Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
152. Ridgeway, Mammalian Expression Vectors, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.*, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988.

(表9の続き)

153. Rippe *et al.*, "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
154. Rosenfeld *et al.*, *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 68:143-155, 1992.
155. Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991. 10
156. Roux *et al.*, "A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: Application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses", *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
157. Sambrook *et al.*, In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
158. Sanchez, *et al.*, "Microparticle immunoenzymatic assay for detection of prostate specific antigen: characterization of the technique and comparative analysis with a monoclonal immunoradiometric assay", *Mil Med.*, 160:(8)416-419, 1995. 20
159. Saras and Heldin CH "PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins", *Trends Biochem Sci.* 21 (12) 455-458, 1996.
160. Sarver *et al.*, "Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents," *Science*, 247:1222-1225, 1990.
161. Scanlon *et al.*, "Ribozyme-mediated cleavages of c-fos mRNA reduce gene expression of DNA synthesis enzymes and metallothionein," *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10591-10595, 1991. 30
162. Shoemaker *et al.*, "Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy", *Nature Genetics* 14:450-456, 1996.
163. Sonoda *et al.*, *Cancer Res.*, 55:2166-2168, 1995.

(表9の続き)

164. Spruck, *et al.*, "p16 gene in uncultured tumours [letter] [see comments]"  
*Nature*, 370:(6486)183-184, (see also Comment in *Nature* 1994 Jul 21;370(6486):180-1994)
165. Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
166. Stratford-Perricaudet and Perricaudet, Gene transfer into animals: the promise of adenovirus. In: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenuer *et al.*, eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991. 10
167. Stratford-Perricaudet *et al.*, "Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector", *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
168. Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
169. Temin, Retrovirus vectors for gene transfer: Efficient integration into and expression of exogenous DNA in vertebrate cell genome. In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986. 20
170. Tonks and Neel, "From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases" *Cell* 87:(3)365-368, (see also Comment in *Cell* 1996 Nov 1;87(3):361-4.) 1996.
171. Top *et al.*, "Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. II. Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7," *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971. 30
172. Tur-Kaspa *et al.*, "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes", *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
173. U.S. 4,873,191, Wagner and Hoppe
174. U.S. 5,279,721
175. Varmus *et al.*, *Cell*, 25:23-36, 1981.

(表9の続き)

176. Vogelstein, *et al.*, "RAS gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: a Pediatric Oncology Group study", *Genes Chromosomes Cancer*, 2:(2)159-162, 1990.
177. Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(9):3410-3414, 1990.
178. Wagner *et al.*, *Science*, 260:1510-1513, 1993.
179. Walker *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
180. Wei *et al.*, "Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG", *Cancer Res.* 56:1487-1494, 1996. 10
181. Weinberg, "Positive and negative controls on cell growth", *Biochemistry*, 28:8263-8269, 1989.
182. WO 88/10351, Gingeras *et al.*
183. WO 89/06700, Miller *et al.* 20
184. WO 90/07641, filed December 21, 1990.
185. Wong *et al.*, "Appearance of b-lactamase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer", *Gene*, 10:87-94, 1980.
186. Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
187. Wu and Wu, "Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells *in vitro*" *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.
188. Wu and Wu, "Receptor-mediated *in vitro* gene transfections by a soluble DNA carrier system", *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987. 30
189. Wu *et al.*, *Genomics*, 4:560, 1989.
190. Yang *et al.*, *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.

(表9の続き)

191. Zelenin *et al.*, "High-velocity mechanical DNA transfer of the chloramphenicol acetyltransferase gene into rodent liver, kidney and mammary gland cells in organ explants and *in vivo*", *FEBS Lett.*, 280:94-96, 1991.
192. Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16: 182(#151), 1990.
193. Alfthan *et al.*, *Cancer Res.*, 52:4628-4633, 1992.
194. Allred *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16: 182(#149), 1990. 10
195. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990.
196. Ando *et al.*, *Int. J. Cancer*, 40:12-17, 1987.
197. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988.
198. Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith, Struhl, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York), 1994. 20
199. Barany and Merrifield, "The Peptides, Gross and Meienhofer, eds", Academic Press, New York, 1-284, 1979
200. Basombrio, *Cancer Res.*, 30:2458-2462, 1970.
201. Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol*, 153:516-544, 1987.
202. Boel *et al.*, *Immunity*, 2(2):167-75, 1995.
203. Boon *et al.*, *J. Exp. Med.*, 152:1184-1193, 1980. 30
204. Boring *et al.*, *Cancer Statistics*, 1994.
205. Brown *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16: 192(#191), 1990.
206. Brunner *et al.*, *J. Immunol.*, 124:1627-1634, 1980.
207. Bystryn *et al.*, *Cancer Res.*, 45:5603-5607, 1985.

(表9の続き)

208. Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden & Von Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 71-74; 75-83, 1984.
209. Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
210. Carubia et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120:500-504, 1984.
211. Chen et al., *Proc. Am. Urol. Assn.*, 153: 267A, 1995. 10
212. Chien et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582, 1991.
213. Chinault and Carbon, *Gene*, 5:111-126, 1979.
214. Chomczynski and Mackey, *Anal. Biochem.*, 225:163-164, 1995.
215. Cohen, *Science*, 259:1691-1692, 1993
216. Cole et al., *Endocrinology*, 113:1176-1178, 1983. 20
217. Cox et al., *J. Virol.*, 67(9):5664-5667, 1993.
218. Datta et al., *J. Clin. Oncol.*, 12:475-482, 1994.
219. Denton et al., *J Pathol*, 167(2):187-91, 1992.
220. Diamond et al., *J. Urol.*, 128:729-734, 1982.
221. Donahue et al., *J. Biol. Chem.*, 269: 8604-8609, 1994
222. Dzau et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11421-11425, 1996. 30
223. Elder et al., *Cancer Res.*, 49:5091-5096, 1989.
224. EP 431,523
225. EPO 329,822
226. Fearon et al., *Am J Clin Nutr*, 47 (1):42-48, 1988.

(表9の続き)

227. Fidler and Hart, *Science*, 217:998-1001, 1982.
228. Fidler, et al., *Res Immunol.*,144:(4)284-7; discussion 294-8, 1983.
229. Fitzpatrick, T.B. , In: *The American Cancer Society Cancer Handbook*. Ch. 30, pp. 532-547, Doubleday & Co., Garden City, NY (Arthur I. Holleb, M.D., ed.) 1986.
230. Forrest, A.P., *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:1525, 1990.
231. Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990. 10
232. Furukawa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90:1972-1976, 1993.
233. Fynan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:11478-11482, 1993.
234. Gal et. al., *Lab. Invest.*, 68(1):18, 1993.
235. Gaugler et al., *J. Exper. Med.*, 179:921-930, 1994. 20
236. GB 2,202,328
237. Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3: 231-236, 1977
238. Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fla., pp. 65-66, and 71-74, 1986.
239. Gomella et al., *J. Urology*, 158:326-337, 1997.
240. Gross, *Cancer Res.*, 3:326-333, 1943. 30
241. Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149, 1968.
242. Hewitt et al., *Br J Cancer*, 33 (3) p241-59, 1976.
243. Hewitt et al., *Br Med J*, 2 (6033):477, 1976.
244. Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980.
245. Holland et al., *Biochemistry*, 17:4900, 1978.

(表9の続き)

246. Hollingsworth et al., *Int J Cancer*, 57(2):198-203, 1994.
247. Hoon et al., *Int J Cancer*, 69(5):369-74, 1996.
248. Hoon et al., *J. Immunol.*, 154:730-737, 1995.
249. Hoon et al., *J. Urol.*, 150(6):2013-2018, 1993.
250. Hoon et al., *Int. J. Cancer*, 43:857-862, 1989. 10
251. Innis et al., *PCR Protocols*, Academic Press, Inc., San Diego CA, 1990.
252. Inouye et al., *Nucleic Acids Res.*, 13: 3101-3109, 1985.
253. Irie, In: M. Torisu and T. Yoshida (eds), *Basic mechanisms and clinical treatment of tumor metastasis*, pp. 371-384, Academic Press, Tokyo, 1985.
254. Johnson et al., *Peptide Turn Mimetics*" IN: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York, 1993. 20
255. Jones, *Genetics*, 85: 12, 1977.
256. Kingsman et al., *Gene*, 7: 141, 1979.
257. Klein et al., *Cancer Res.*, 20:1561-1572, 1960.
258. Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976.
259. Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975
260. Kripke, *J. Natl. Canc. Inst.*, 53:333-1336, 1974. 30
261. Kwoh et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989.
262. Kwon, B.S, *J Invest. Dermatol.*, 100(2 Suppl):134S-140S, 1993.
263. Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.
264. Lehmann et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9891-9895, 1989.

(表9の続き)

265. Lehmann, et al., *Cancer Res.*, 47:841-845, 1987.
266. Levy et al., *Adv. Cancer Res.*, 24:1-59, 1977.
267. Liang and Pardee, *Science*, 257: 967-971, 1992.
268. Liang et al., *Cancer Res.*, 52:6966-6968, 1992.
269. Lin and Guidotti, *J. Biol. Chem.*, 264:14408-14414, 1989. 10
270. Lowy et al., *Cell*, 22: 17, 1980.
271. Madersbacher et al., *Cancer Res.*, 54:5096-5100, 1994.
272. Marcillac et al., *Cancer Res.*, 52:3901-3907, 1992.
273. Maryanski et al., *Eur. J. Immunol.*, 124:1627-1634, 1980.
274. Maryanski et al., *Eur. J. Immunol.*, 12:406-412, 1982.
275. McManus et al., *Cancer Res.*, 36:3476-3481, 1976. 20
276. Melcher and Johnson, *Mol. Cell Biol.*, 15:2839-2848, 1995.
277. Merrifield, *Science*, 232: 341-347, 1986.
278. Mok et al., *Gynecol. Oncol.*, 52: 247-252, 1994.
279. Morton et al., *Cancer*, 71:3737-3743, 1993.
280. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983. 30
281. Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993.
282. Nagata et al., *J. Biol. Chem.*, 267:12082-12089, 1992.
283. 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.

(表9の続き)

284. Natali et al., *Cancer*, 59:55-63, 1987.
285. Nordlund et al., *J. Invest. Dermatol.*, 92:53S-60S, 1989.
286. Nowell, P.C. Genetic instability in cancer cells: relationship to tumor cell heterogeneity. *TUMOR CELL HETEROGENEITY*, Owens, A.H., Coffey, D.S., Baylin, S.B. (eds.). New York, Academic Press (1982) pp. 351-365.
287. O'Hare et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 78: 1527, 1981. 10
288. Ohara et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 5673-5677, 1989.
289. Palladino et al., *Canc. Res.*, 47:5074-5079, 1987.
290. PCT/US87/00880
291. PCT/US89/01025
292. Pinkel, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(9):2934-8, 1986. 20
293. Prehn, et al., *J. Natl. Canc. Inst.*, 18:769-778, 1957.
294. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580; 624-652.
295. Robbins et al., *Cancer Res*, 54(12):3124-6, 1994.
296. Robzyk and Kassir, "A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast," *Nucl. Acids Res.*, 20:3790, 1992. 30
297. Rubinstein et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:1113-1120, 1990.
298. Sager et al., *FASEB J.*, 7: 964-970, 1993.
299. Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, 1.38-1.39, 1989.
300. Santerre et al., *Gene*, 30:147, 1984.

(表9の続き)

301. Sarantou et al., *Cancer Res*, 57(7):1371-6, 1997.
302. See Hewitt, et al., *Brit. J. Cancer*, 33:241-259, 1976.
303. Serrano et al., *Nature*, 366:704-707, 1993.
304. Serrano et al., *Science*, 267:249-252, 1995.
305. Smith and Johnson, "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia Coli* as fusions with glutathione S-transferase," *Gene*, 67:31-40, 1988. 10
306. Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
307. Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39, 1979.
308. Sun and Cohen, *Gene*, 137:127-132, 1993.
309. Szybalska et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 48: 2026, 1962.
310. Talmadge et al., *Nature*, 307:37-40, 1984. 20
311. Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
312. Tang et al., *Nature*, 356:152-154, 1992.
313. Traversari et al., *Immunogenetics* , 35(3):145-52, 1992.
314. Traversari et al, *J Exp Med.*, 176(5):1453-7, 1992.
315. Tschemper et al., *Gene*, 10: 157, 1980. 30
316. Tsuchida et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 78:45-54, 1987a.
317. Tsuchida et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 78:55-60, 1987b.
318. Ulmer et al., *Science*, 259:1745-1749, 1993.
319. Van den Eynde, et al., *Biochem Soc Trans*, 23(3):681-6, 1995.
320. Van den Eynde et al., *J Exp Med*, 182(3):689-98, 1995.

(表9の続き)

321. Van Der Bruggen, Traversari, Chomez, Lurquin, De Plaen, Van Den Eynde, Knuth, Boon, "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma," *Science*, 254:1643-1647, 1991.
322. Van Pel et al., *J. Exp. Med.*, 157:1992-2001, 1983.
323. Vijayasardahi et al., *J. Experimental Medicine*, 171(4):1375-1380, 1990.
324. *Visualization of Nucleic Acids*" Gerard Morell Ed., CRC publ., 1995. 10
325. Wagner et al., *Science*, 260:1510-1513, 1993.
326. Walker et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
327. Wang et al., In: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, S. Kaminogawa et al., (eds), vol. 5, pp463-469, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1993.
328. Watson et al., *Cancer Res.*, 54: 4598-4602, 1994.
329. Weitzel and Patel, *GATA*, 11(5-6) 165-170, 1994. 20
330. Weitzel et al., *Genomics*, 14:309-319, 1992.
331. Welsh et al., *Nucleic Acids Res.*, 20: 4965-4970, 1992.
332. Whitton et al., *J. Virol.*, 67:(1)348-352,1993.
333. Wigler et al., *Cell*, 11: 223, 1977.
334. Wigler et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 77: 3567, 1980. 30
335. Wong et al., *Int. J. Oncol.*, 3: 13-17, 1993.
336. Wu et al., *Genomics*, 4:560, 1989
337. Yamaguchi et al., *Br. J. Cancer*, 60:382-384, 1989.
338. Yoshimura et al., *Cancer*, 73:2745-2752, 1994.

(表9の続き)

339. Burbee et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 691-699, 2001.340. Gao et al., *J. Biol. Chem.*, 275: 12237-12242, 2000.

341. Wistuba I, Behrens C, Vinnani A, Mele O, Milchgrub S, Girard L. et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res* 2000;60:1949—60.

342. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F21—59.

10

343. Wistuba I, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche S, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1366—73.

344. Wistuba I, Behrens C, Milchgrub S, Bryant D, Hung J, Minna ID. et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene* 1999; 18:643—50.

20

345. Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res* 1997;71:27—92.

346. Lerman MI, Minna ID. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 2000;60:61 16—33.

347. Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba I, Latif F, Bader S, Wei MH, et al. Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressorgene. *Oncogene* 1998;16:3151—7.

30

348. Baylin SB, Herman JO, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141—96.

(表9の続き)

349. Phelps RM, Johnson BE, Ihde DC, Oazdar AF, Carbone DP, McClintock PR, et al. NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line database. *J Cell Biochem Suppl* 1996;24:32—91.
350. Wistuba II, Bryant D, Behrens C, Milchgrub S, Virmani AK, Ashfaq R, et al. Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Chin Cancer Res* 1999;5:991—1000.
351. Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, Gollal~on L, Sakaguchi M, Westerfield M, et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1998;78:766—74. 10
352. Herman JO, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylationspecific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpO islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
353. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts S, Gazdar AF, Minna SD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249—55. 20
354. Burbee, D., Forgacs, E., Zöchbauer-Müller, S., Shivakuma, L., Fong, K., Gao, B., Randle, D., Virmani, A., Bader, S., Sekido, Y., Latif, F., Milchgrub, S., Gazdar, A., Lerman, M., Zabarovsky, E., White, M. & Minna, J. (2001). *J Natl Cancer Inst*, (In Press).
355. Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. & Frommer, M. (1994). *Nucleic Acids Res*, **22**, 2990-7.
356. Cook, W.D. & McCaw, B.J. (2000). *Oncogene*, **19**, 3434-8. 30
357. Daly, M.C., Xiang, R.H., Buchhagen, D., Hensel, C.H., Garcia, D.K., Killary, A.M., Minna, J.D. & Naylor, S.L. (1993). *Oncogene*, **8**, 1721-9.
358. Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S. & Pfeifer, G.P. (2000). *Nat Genet*, **25**, 315-9.

(表9の続き)

359. Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P.P. (1998). *Nat Genet*, **19**, 348-55.
360. Forgacs, E., Biesterveld, E.J., Sekido, Y., Fong, K., Muneer, S., Wistuba, II, Milchgrub, S., Brezinschek, R., Virmani, A., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. (1998). *Oncogene*, **17**, 1557-65.
361. Hibi, K., Takahashi, T., Yamakawa, K., Ueda, R., Sekido, Y., Ariyoshi, Y., Suyama, M., Takagi, H., Nakamura, Y. & Takahashi, T. (1992). *Oncogene*, **7**, 445-449. 10
362. Killary, A.M., Wolf, M.E., Giambernardi, T.A. & Naylor, S.L. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10877-81.
363. Kok, K., Naylor, S.L. & Buys, C.H. (1997). *Adv Cancer Res*, **71**, 27-92.
364. Kok, K., Osinga, J., Carritt, B., Davis, M., van der Hout, A., van der Veen, A., Landsvater, R., de Leij, L., Berendsen, H., Postmus, P., Poppema, S. & Buys, C. (1987). *Nature (London)*, **330**, 578-581. 20
365. Kok, K., van den Berg, A., Veldhuis, P., van der Veen, A., Franke, M., Schoenmakers, E., Hulsbeek, M., van der Hout, A., de Leij, L., van de Ven, W. & Buys, C. (1994). *Cancer Res*, **54**, 4183-4187.
366. Lerman, M. & Minna, J. (2000). *Cancer Res*, **60**, 6116-6133.
367. Naylor, S.L., Johnson, B.E., Minna, J.D. & Sakaguchi, A.Y. (1987). *Nature*, **329**, 451-4.
368. Roche, J., Boldog, F., Robinson, M., Robinson, L., Varella-Garcia, M., Swanton, M., Waggoner, B., Fishel, R., Franklin, W., Gemmill, R. & Drabkin, H. (1996). *Oncogene*, **12**, 1289-97. 30
369. Sekido, Y., Ahmadian, M., Wistuba, II, Latif, F., Bader, S., Wei, M.H., Duh, F.M., Gazdar, A.F., Lerman, M.I. & Minna, J.D. (1998). *Oncogene*, **16**, 3151-7.

(表9の続き)

370. Wei, M.H., Latif, F., Bader, S., Kashuba, V., Chen, J.Y., Duh, F.M., Sekido, Y., Lee, C.C., Geil, L., Kuzmin, I., Zbarovsky, E., Klein, G., Zbar, B., Minna, J.D. & Lerman, M.I. (1996). *Cancer Res*, **56**, 1487-92.

371. Whang-Peng, J., Bunn, P.J., Kao, S.C., Lee, E.C., Carney, D.N., Gazdar, A. & Minna, J.D. (1982). *Cancer Genet Cytogenet*, **6**, 119-134.

372. Wistuba, II, Behrens, C., Virmani, A.K., Mele, G., Milchgrub, S., Girard, L., Fondon, J.W., 3rd, Garner, H.R., McKay, B., Latif, F., Lerman, M.I., Lam, S., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. (2000). *Cancer Res*, **60**, 1949-60.

373. Xu, X., Brodie, S.G., Yang, X., Im, Y.H., Parks, W.T., Chen, L., Zhou, Y.X., Weinstein, M., Kim, S.J. & Deng, C.X. (2000). *Oncogene*, **19**, 1868-74.

374. Zöchbauer-Müller, S., Fong, K., Virmani, A., Geradts, J., Gazdar, A. & Minna, J. (2001). *Cancer Res*, **61**, 249-255.

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに実証することが意図される。本発明はまた、本明細書中に示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの1つ以上を参照することによって、より良好に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 pAd-RAPシステムおよびpAd-RAP-シャトルシステムを用いた、組換えアデノウイルスの構築スキームおよび産生スキーム。

【図2】 pAd-RAP-Tet-OffおよびpAd-RAP-TRE-CMV-シャトルを用いた、組換えアデノウイルスの構築スキーム。TetR-Off = テトラサイクリン耐性-offトランスアクチベータ-遺伝子、TRE = TetR-Off応答エレメント。

【図3】 初代非小細胞肺癌と関連する気道上皮の新生物形成前病変において見出される、遺伝子変化のタイミング。

【図4】 ヒト肺癌細胞株および腫瘍由来のDNAにおける3p領域の相互型決定 (allelotyping)。黒い楕円 = ヘテロ接合性の損失；白い楕円 = 対立遺伝子の維持；および斜線を引いた楕円 = ホモ接合性欠失。

【図5】 ヒト染色体3pにおける3p21腫瘍抑制領域の位置および3p遺伝子の組換えアデノウイルスベクターの構造のスキーム。個々の3p遺伝子のサイズおよびそれらの対応するアミノ酸残基、ならびに活性化腫瘍抑制(TS)領域および3p中の既知のTSGもまた、示す。

【図6】 Ad-3p形質導入肺癌細胞および正常ヒト気管支上皮細胞における腫瘍細胞増殖に対する3p遺伝子過剰発現の影響。MOIは、ウイルス粒子/細胞(vp/c)として表す。

【図7】 リアルタイムRT-PCRによるH1299細胞におけるアデノウイルス媒介3p遺伝子発現の定量。MOIは、ウイルス粒子/細胞(vp/c)として表す。

【図8】 Ad-3pで形質導入された肺癌細胞および正常HBEcにおける3p遺伝子過剰発現によるアポトーシスの誘導。アポトーシスを、TUNEL反応を用いてFACSによって分析した。

【図9】 Ad-3pで形質導入されたヒト肺癌細胞A549およびH1299における細胞周期動態に対する、3p遺伝子過剰発現の影響。

【図10】 ノードマウスにおけるAd-3pベクターの腫瘍内注射による、A549腫瘍増殖に対する、3p遺伝子過剰発現の影響。

10

20

30

40

50

【図11】 ノードマウスにおけるプロタミン - A d - 3 p ベクター複合体の全身注射による、A549肺転移性腫瘍増殖に対する、3p遺伝子過剰発現の影響。

【図12】 RASSF1座位、転写物、およびタンパク質ドメイン ( domain ) のマップ。A) RASSF1AおよびRASSF1Cの推定プロモーター領域 ( 二方向の矢印によって示される位置 ) におけるCpGアイランドの位置を有する、RASSF1座位のエキソン - イントロン構造。RASSF1A転写物は、CpGアイランド内に位置する最も動原体性のプロモーター領域から生じると推定され、そしてエキソン1Aで開始する。RASSF1Cもまた、このプロモーターで開始するが、エキソン1Cを失っている。RASSF1Cの転写物は、RASSF1Aのプロモーター領域から約2キロベースである最もテロメアのプロモーター領域で開始し、そしてエキソン1で開始する。四角は、エキソンを示し；線は、イントロンを示す。B) RASSF1A転写物および推定タンパク質配列ドメインの模式図。アイソフォーム特異的逆転写 ( RT ) ポリメラーゼ連鎖反応 ( PCR ) 分析に使用した種々のプライマー ( PKCDF、NF、R182、およびR292 ) の位置を示す。目盛りの印は、エキソンの境界を同定する。潜在的なarc相同性3 ( 5H3 ) 結合領域、推定ジアシルグリセロール ( DAG ) 結合ドメイン、PEST配列、Ras associationドメイン、および毛細管拡張性運動失調 - 変異 ( ATM ) リン酸化部位を標識する。C) RASSF1C転写物および推定タンパク質配列ドメインの模式図。アイソフォーム特異的RT - PCR分析に使用した種々のプライマー ( NOX3、R182、およびR292 ) の位置を、示す。D) RASSF1A転写物および推定タンパク質配列ドメインの模式図。

10

20

【図13】 肺癌細胞株 ( A )、胸部癌株 ( B )、ならびに切除した肺腫瘍および正常ヒト肺および胸部上皮培養物 ( C ) のサンプリングにおける、アイソフォーム特異的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 ( RT - PCR ) によって検出された、RASSF1AおよびRASSF1CのメッセンジャーRNAレベル。全てのRT - PCR産物を、2%アガロースゲル上で分離し、そしてエチジウムブロマイドを用いた染色によって同定した。矢印は、転写物の位置を示す。A) 試験した肺癌株：レーン1 = 11157；レーン2 = 11358；レーン3 = 11727；レーン4 = 11740；レーン5 = 11748；レーン6 = 11838；レーン7 = 111184；レーン8 = 111299；レーン9 = 111304；レーン10 = 111437；レーン11 = 111450；レーン12 = 111770；レーン13 = 111792；レーン14 = 111963；レーン15 = 111993；レーン16 = 112009；レーン17 = 112077；レーン18 = 112108；レーン19 = 11HCC44；およびレーン20 = HCC78。B) 試験した胸部癌株：レーン1 = 11CC38；レーン2 = 11CC1187；レーン3 = HTB19；レーン4 = HTB20；レーン5 = HTB22；レーン6 = 11TB23；レーン7 = 11TB24；レーン8 = 11TB25；レーン9 = 11TB26；レーン10 = 11TB27；レーン11 = HTB12I；レーン12 = HTB129；レーン13 = HTB130；レーン14 = HTBI31；レーン15 = HTB132；レーン16 = H' I' B133；レーン17 = 11CC1395；レーン18 = 11CC1428；レーン19 = 11CC1569；レーン20 = 11CC1806；およびレーン21 = 11CC2157。C) 切除した肺腺癌サンプル ( ADC1 ~ 5 ) および正常小気道上皮細胞 ( SAEC ) の培養物、正常ヒト気管支上皮 ( NHBE ) 培養物、および正常ヒト胸部上皮 ( NHBRE ) 培養物。

30

40

【図14】 5 - アザ - 2' - デオキシシチジン ( SAza - CdR ) を用いた肺癌細胞の処理後の、RASSF1Aの発現。RASSF1Cを発現するがRASSF1Aは発現しないNCI - 11157 ( 非小細胞肺癌腫 ( NSCLC ) 細胞株 ) を、0.5 p . M SAza - CdRの存在下 ( + のレーン ) および非存在下 ( - のレーン ) で48時間増殖させた。総RNAを単離し、相補鎖DNAを調製し、そしてアイソフォーム特異的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を、RASSF1A、RASSF1C、およびコントロールとしてのグリセルアルデヒド3 - リン酸デヒドロゲナーゼ ( GAPDH ) について実行した。

【図15】 切除された原発性非小細胞肺癌腫 ( NSCLC ) およびそれに伴う正常肺

50

組織（上部パネル）、小細胞肺癌腫（SCLC）細胞株（中央のパネル）、および原発性胸部癌（下部のパネル）における、メチル化されたRASSF1A 5、CpG配列の検出のための、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）。代表的なサンプルを示す。切除されたNSCLCについて、U = 非メチル化配列に特異的なプライマーを用いた結果；M = メチル化配列に特異的なプライマーを用いた結果。NL = 正常肺組織；T = 腫瘍；P = 末梢血リンパ球DNA（これは、メチル化されていないかまたはインビトロでメチル化されている（IVMD））を用いた結果；ならびに、1120 = 水のブランクを用いた陰性コントロール。SCLCについて、各レーンは、異なる細胞株由来のメチル化配列についてのPCR結果を示す。レーン20は、陰性コントロールである。乳癌について、各レーンは、異なるサンプル由来のメチル化配列についてのPCR結果を示す。PCR産物は、2%アガロースゲル上で分離し、そしてバンドを、エチジウムブロマイドを用いた染色後に検出した。

【図16】 RASSF1Aメチル化状態に基づいて非小細胞肺癌腫が切除された107人の患者（32人はメチル化され、75人はメチル化されていなかった）についてのKaplan-Meier生存曲線。メチル化されていないRASSF1A対立遺伝子を有する患者について、症例数 = 75、検閲 = 39、および事象 = 36、全体の生存平均は、52ヶ月であり（95%の信頼区間（CI） = 44 ~ 59）、全体の生存中央値は、49ヶ月であった（95%のCI = 44 ~ 59）；メチル化されたRASSF1A対立遺伝子を有する患者について、症例数 = 32、検閲 = 9、および事象 = 23、全体の生存平均は、37ヶ月であり（95%のCI = 27 ~ 46）、全体の生存中央値は、28ヶ月であった（95%のCI = 9 ~ 47）。RASSF1Aメチル化の生存分布の一様性について統計的なlog-rank検定は、3.97であった（df = 1、P = 0.0463）。各群について危険性のある患者は以下のものであった：RASSF1A非メチル化 - 12ヶ月（n = 63）、36ヶ月（n = 34）、および60ヶ月（n = 16）；RASSF1Aメチル化 - 12ヶ月（n = 24）、36ヶ月（n = 13）、および60ヶ月（n = 5）。

【図17】 非小細胞肺癌腫（NSCLC）細胞株NCI-111299のインビトロ増殖およびインビボ増殖に対する、RASSF1Aの影響。A) i.o.o空のベクター（pcDNA3.1+）または野生型p53もしくはRASSF1Aを含むpeDNA3.1+発現ベクターを用いたNCI-H1299細胞のトランスフェクション後の、足場依存性コロニー形成および足場非依存性コロニー形成。足場依存的増殖の分析のために、非選択増殖培地中で2日間の後、トランスフェクトしたNCI-111299細胞を、選択培地を用いて100-mm<sup>2</sup>ディッシュに希釈した。トランスフェクトした細胞を、800 μg/mLのG418を含む液体培地（足場依存的アッセイのために）または軟寒天（足場非依存的アッセイのために）中に配置した。コロニーを、14日後に足場依存的実験においてメチレンブルーを用いて染色した。結果は、液体培地における8 ~ 12回の実験および3回の軟寒天実験の平均を示す。標準偏差を示すか、または標準偏差は2%未満である。黒色のバー、足場依存的増殖（95%の信頼区間 [CI] = 0 ~ 36（wt（野生型）p53について）および52 ~ 60（RASSF1Aについて））；白色のバー、足場非依存的増殖（95%のCI = 0 ~ 6（wt（野生型）p53について）および0 ~ 39（RASSF1Aについて））。B) pcDNA3.1+ベクターまたはRASSF1A相補鎖DNA（cDNA）を含むpcDNA3.1+でトランスフェクトしたNCI-H1299細胞の安定クローンにおけるRASSF1A発現のノーザンブロット分析。ベクターコントロール（ベクター）および種々のRASSF1AメッセンジャーRNAレベルを有する4つの別個のクローンを示す。これらのクローンのうちのいくつかを、Dに示す足場非依存的増殖アッセイに使用した。リボソームRNAのエチジウムブロマイド染色を、充填コントロールとして示す。アイソフォーム特異的プライマーを用いた逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応によって、クローンがまたRASSF1Aアイソフォームを発現することを確認した。C) pcDNA3.1+ベクターまたはRASSF1A cDNAを含むpcDNA3.1+でトランスフェクトしたNCI-111299細胞の安定クローンにおける、軟寒天（足場非依存的）コロニー形成。平均および標準偏差を示す。RASSF

10

20

30

40

50

1 Aを発現するクローンの各々について、95%のCI = 0 ~ 4 (F1A . 4)、2 ~ 16 (F1A . 5)、および3 ~ 14 (F1A . 19)。D) NCI 111299細胞を、ベクターコントロールまたはRASSF1AもしくはRASSF1C cDNAのいずれかを含むpBABE puroレトロウイルス発現ベクターを用いて感染させた。感染細胞(1プレート当たり10,000細胞)を、0.33% 寒天中に懸濁し、そして懸濁物を、0.5% 寒天ベース上に層にした。直径が0.2mmより大きいコロニーを、21日後に計数した。下の右のパネルは、RASSF1グルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質に対するウサギ抗体を用いて展開した代表的なウエスタンブロットを示し、RASSF1タンパク質の発現を確認する。C = RASSF1A cDNAを含むpEDNA3 . 1+を用いたNCI - 111299細胞の一過性トランスフェクションによって生成される陽性コントロール; V = レトロウイルスベクターコントロールを用いたNCI - H1299細胞の感染(陽性コントロールからはみ出しに注意すること; 1A = RASSF1Aを含むレトロウイルスベクターを用いたNCI - H1299細胞の感染; および1C = RASSF1Cを含むレトロウイルスベクターを用いたNCI - H1299細胞の感染)。E) NCI - 111299細胞のインビボ増殖に対するRASSF1Aの影響。RASSF1Aを発現する約 $10^7$ 個の生存可能なNCI - H1299細胞を、各々注射前に5回照射したBALB/c (nu/nu)ヌードマウスの脇腹に注射した。腫瘍サイズを、時間を追ってモニターし、そしてサイズは、立方ミリメートルで示す。ベクターをトランスフェクトしたNCI - H1299細胞の注射を与えた20匹より多くのマウスにおける腫瘍増殖の平均容積を示す(H1299親)。RASSF1A感染させたNCI - H1299細胞の注射を与えたマウスは、測定可能な腫瘍を増殖しなかった。

10

20

【図18】 ヒト染色体3pにおける推定3p21.3腫瘍抑制領域の位置および3p21.3遺伝子の組換えアデノウイルスベクターの構造の模式図。個々の3p21.3遺伝子のサイズおよびcDNAのコード配列から推定される対応するアミノ酸残基、ならびに活性な腫瘍抑制(TS)領域および3p中の既知のTSGを示す。3p21.3遺伝子がCMVプロモーターによって駆動され、複製不能5型アデノウイルス(Ad5)ゲノムのE1欠失領域中のBGHポリAシグナル配列で尾の部分形成する哺乳動物発現カセットを挿入することによって、3p21.3遺伝子の組換えアデノウイルスベクター(Ad-3p)を構築した。E1欠失(E1)およびE3欠失(E3)の相対的な位置、Ad5ゲノム中の反転反復末端(IRT)配列を示す。

30

【図19】 Ad-3p形質導入ヒト肺癌細胞および正常気管支上皮細胞における腫瘍細胞増殖に対する、3p21.3遺伝子の外因性発現の影響。細胞を、3p21.3遺伝子(101F6、NPR L2、BLU、RASSF1C FUS1、HYAL2、およびHYAL1)のアデノウイルスベクター、コントロール遺伝子(LacZおよびp53)のアデノウイルスベクター、および空ベクター(Ad-EV)を用いて、最も高いMOI(vp/c)(それぞれ、A549について5000、H1299について1000、H460について5000、H358について2500、およびHBEについて1000)で形質導入し、PBS単独を、mockコントロールとして使用した。細胞の生存度を、PBS処理コントロール細胞(100%)に対する、生存可能なアデノウイルスベクター形質導入細胞のパーセンテージとして表す。誤差のバーは、少なくとも3回の個々の実験における平均の標準偏差を表す。処理は、各実験について4連で与えた。ベクター処理細胞とAd-EV-処理細胞、Ad-LacZ-処理細胞、またはPBS-処理コントロールとの間の細胞生存度における差異の有意性を、両側スチューデントのt検定によって分析した。P < 0.05を、有意であるとした。Ad-EV形質導入細胞およびAd-LacZ形質導入細胞 対 PBS処理コントロールとの間の細胞生存度の差異は、有意ではなかった(異なる時点および細胞株から、P = 0.25 ~ P = 0.95)。同じMOIにおけるAd-101F6形質導入細胞、Ad-Fus1形質導入細胞、およびAd-NPR L2形質導入細胞 対 Ad-EV形質導入細胞、Ad-LacZ形質導入細胞、またはPBS処理コントロールとの間の細胞生存度の差異は、形質導入の3日後および5日後の両方においてA549細胞、H1299細胞、およびH460細胞において有意であった

40

50

( P 0 . 0 0 0 1 ~ P 0 . 0 0 5 ) が、形質導入の3日後および5日後の両方において、それぞれ、H358細胞株およびHBE C細胞株において有意ではなかった( P 0 . 1 0 ~ P 0 . 9 5、異なる時点および細胞株より)。細胞生存度に対するAd-BLU、Ad-HYAL2、およびAd-HYAL1の影響は、Ad-EVおよびAd-LacZの影響と比較して、全細胞において有意ではなかった( P > 0 . 4 5 )。

【図20】 リアルタイムRT-PCRによるH1299細胞におけるアデノウイルス媒介3p21.3遺伝子発現の定量。リアルタイムRT-PCRを実行し、そしてPCRプロファイルを、ABI Prism 7700 Sequence Detection Systemおよび装備されたソフトウェア(Perkin Elmer Applied Biosystems)によって作製した。既知濃度の - アクチンDNAを、標準として使用した。H1299細胞を、それぞれ、1 pfu / 細胞、5 pfu / 細胞、および10 pfu / 細胞のMOI (矢印で示す) で48時間、3p21.3遺伝子のアデノウイルスベクター( FUS1 ( A )、101F6 ( B )、NPRL2 ( C )、およびHYAL1 ( D ) ) によって形質導入した。

【図21】 Ad-3p形質導入ヒトNSCLC細胞および正常HBE Cにおける3p21.3遺伝子の外因性発現による、アポトーシスの誘導。アポトーシスを、FITC標識dUTPを用いたTUNEL反応を使用してFACSによって分析した。細胞を、それぞれ、A549 ( A ) について5000のMOI ( vp / c )、H1299 ( B ) について1000のMOI ( vp / c )、H460 ( C ) について5000のMOI ( vp / c )、H358 ( D ) について2500のMOI ( vp / c )、およびHBE C ( E ) について1000のMOI ( vp / c ) で3p21.3遺伝子のアデノウイルスベクターを用いて形質導入し、そしてPBS、Ad-EV、およびp53をコントロールとして使用した。形質導入後に示された日に、細胞を収集し、そしてアポトーシスについて分析した。アポトーシスの割合は、総細胞集団中のFITC標識細胞のパーセンテージとして表す。誤差のバーは、3連の処理物での2または3回の反復した実験および各実験についてのTUNEL反応における平均の標準偏差を表す。ベクター処理細胞とAd-EV処理細胞、Ad-LacZ処理細胞、またはPBS処理コントロールとの間のアポトーシスにおける差異の有意性を、両側スチューデントのt検定によって分析した。P < 0 . 0 5 を、有意であるとした。Ad-EV形質導入細胞およびAd-LacZ形質導入細胞によって誘導されたアポトーシス 対 PBS処理コントロールによって誘導されたアポトーシスとの間の差異は、有意ではなかった( P = 0 . 9 2 5 ~ P = 0 . 6 7 5、異なる時点および細胞株より)。Ad-101F6形質導入細胞、Ad-FUS1形質導入細胞、およびAd-NPRL2形質導入細胞において誘導されたアポトーシスとAd-EV処理細胞、Ad-LacZ処理細胞、またはPBS処理コントロールにおいて誘導されたアポトーシスとの間の差異は、形質導入の3日後および5日後の両方においてA549細胞およびH460細胞で有意であり( P < 0 . 0 0 0 1 ~ P < 0 . 0 0 5 )、そして形質導入の5日後におけるH1299細胞においてAd-EV処理細胞およびPBS処理細胞に対して有意であった( P < 0 . 0 2 ) が、それぞれ、形質導入の3日後および5日後の両方の全時点で、H358細胞株およびHBE C細胞株は有意ではなかった( P 0 . 8 5 ~ P 0 . 9 5 )。Ad-p53形質導入H358細胞におけるアポトーシスの誘導は、全ての他の実験と比較して、全時点で有意であった( P < 0 . 0 0 0 1 )。Ad-BLU、Ad-HYAL2、およびAd-HYALy a l l を用いて処理された細胞におけるアポトーシスの誘導は、PBS、Ad-EV、またはAd-LacZで処理したものと比較して、全細胞株および全時点において有意ではなかった( P > 0 . 8 5 )。

【図22】 nu / nuマウスにおけるヒト肺癌A549 ( A ) およびH1299 ( B ) 皮下腫瘍の増殖に対する、3p21.3遺伝子アデノウイルスベクターの腫瘍内投与の影響。腫瘍の直径が腫瘍接種の約2週間後に5 ~ 10 mmに達したときに、この腫瘍に、個々の3p21.3遺伝子( 101F6、NPRL2、BLU、RASSF1CFUS1、HYAL2、およびHYAL1 ) アデノウイルスベクターまたはコントロールベクターAd-EV、LacZおよびp53を用いて、それぞれ、 $5 \times 10^{10}$  vp / 腫瘍の用量(

10

20

30

40

50

各々、200  $\mu$ lのPBS、1週間に3回)を注射した。PBS単独をmockコントロールとして使用した。結果を、各処理群について5~10匹のマウスにおける平均値 $\pm$ SDとして報告する。腫瘍容積を、各群において、処理開始の腫瘍サイズに対する、処理後の腫瘍サイズの増加のパーセンテージによって正規化する。これらの実験からの平均腫瘍容積 $\pm$ SEを示す。ANOVAを実行して、Statisticaソフトウェア(StatSoft Inc.)を用いて各処理群間の統計的有意性を決定し、P 0.05を有意とみなした。Ad-101F6処理マウス、Ad-FUS1処理マウス、Ad-NPRL2処理マウス 対 Ad-EV処理コントロールマウスおよびAd-LacZ処理コントロールマウスとの間の腫瘍容積における差異は、A549腫瘍モデルおよびH1299腫瘍モデルの両方において統計的に有意であり(P<0.0001)、そしてAd-HYAL2処理マウスにおける差異はA549において有意であった(P=0.024)が、最後の注射から5日後のH1299腫瘍モデルにおいて有意ではなく(P<0.0001)、Ad-HYAL1処理、Ad-HYAL2処理、Ad-RASSF1C処理、およびAd-BLU処理は有意ではなかった(A549腫瘍モデルおよびH1299腫瘍モデルの両方とも、P>0.05)。

【図23A】 nu/nuマウスにおけるA549の実験的肺転移の発生に対する、プロタミン-As-3p複合体の全身投与の影響。A.、P-Ad-3p21.3遺伝子を用いて処理したマウスにおける相対的な転移性腫瘍。全ての動物に、各動物につき200  $\mu$ lの総容量の、 $3 \times 10^{10}$ ウイルス粒子および300  $\mu$ gプロタミンの各用量で、2日おきに3回、種々のプロタミン-アデノウイルスベクター複合体を静脈内注射し、そしてPBS単独を、mockコントロールとして使用した。各処理群は、5~10匹の動物からなった。肺を、最後の注射の2週間後に収集し、そして肺表面上の転移性コロニーを、どれが処理群であるかを認識しないままで計数した。転移の発生は、PBS処理群において形成された転移性コロニー(100%とする)に対する、プロタミン-アデノウイルス複合体処理群において形成された転移性コロニーのパーセンテージとして表す。誤差のバーは、標準誤差(SE)を表す。ノンパラメトリックなt検定(Wald-Wolfowitz Runs Test)を実行して、Statisticaソフトウェア(StatSoft Inc.)を用いて各処置群間の統計的有意性を決定し、P 0.05を有意とみなした。転移発生の有意な障害が、PBS、P-Ad-EV、またはP-Ad-LacZで処理したマウスと比較して、それぞれ、P-Ad-101F6(P=0.002)、P-Ad-NPRL2(P=0.001)、P-Ad-BLU(P=0.018)、P-Ad-FUS1(P=0.002)、およびP-Ad-HYAL2(P=0.014)を用いて処理したマウスにおいて観察されたが、P-Ad-BLU(P=0.818)またはP-Ad-HYAL1(P=0.904)を用いて処理したマウスにおいて有意な障害はなかった。

【図23B】 nu/nuマウスにおけるA549の実験的肺転移の発生に対する、プロタミン-As-3p複合体の全身投与の影響。B.、転移について墨汁で染色した代表的な肺の写真。転移性コロニーは、肺表面上の白色の点として示される。

【図24】 (a) NSCLC cDNA HCC515(野生型FUS1)およびH322(FUS1の小さいcDNA変異形態)のRT-PCR分析。(b)野生型FUS1および変異体異常プライミング形態のゲノム構造。一番上の線は、コスミドクローンLUC#13(#Z84492)由来のゲノムDNAおよび表示されるヌクレオチド配列番号である。矢じり形は、SSCP分析のプライマーを示す。四角は、110アミノ酸のFUS1野生型形態および82アミノ酸のFUS1異常プライミング形態についての、オープンリーディングフレーム(黒)および非翻訳領域(白)を有するcDNAを表す。FUS1についての配列およびFUS1異常についての配列の最初の80アミノ酸が同じであることに注意すること。PCR-SSCP分析のために3つのプライマーセットを、全長FUS1オープンリーディングフレームをカバーするように設計した。使用したプライマーは、以下であった：

S1: GTTATGGTAGTGCGGACTGおよび

10

20

30

40

50

AS1:GGTGGAAACCAATTGCCCTTAC;  
 S2:GACCTGTGACATTTGCCGTGおよび  
 AS2:CAACAGATCCCATCTGGGTC:ならびに  
 S3:CCTGAGCTGACCCCTTACA:および  
 AS3:TCTGTCTGCCACCTCCAG.

【図25】 (a.) 肺癌細胞におけるFUS1の内因性発現および一過性発現のウエスタンブロット。トランスフェクションを、DMRIE C (Life Technologies, Inc., GIBCO BRL Gaithersburg, MD) を用いて製造業者らの指示書に従って実行した。NSCLC H1299 ( $2 \times 10^5$  細胞) を、トランスフェクションの24時間前に3.5cmディッシュにプレートし、2  $\mu$ gのプラスミドおよび4  $\mu$ lのDMRIE Cを各トランスフェクションに使用した。全プラスミドを、PCR構築後に再び配列決定し、そして種々のFUS1オープンリーディングフレームの配列を検証した。2  $\times 10^4$  細胞から、サンプル緩衝液 (100 mM Tris、2% SDS、10%  $\beta$ -メルカプトエタノール、20% グリセロール、0.03% PBP) を用いて10  $\mu$ lの溶解物を作製し、12.5% SDS-PAGEゲルで泳動し、続いてニトロセルロース膜に転写した。PBS中の5% ドライミルクおよび0.2% Tweenを用いたブロッキング後、この膜をウサギポリクローナル抗体と共に1時間室温でインキュベートした。抗FUS1抗体(血清の1:300希釈)を、ヒトFUS1タンパク質配列のアミノ酸1~15に対するペプチドを用いてウサギ(Strategic Biosolution Ramona, CA)を免疫することによって作製した。抗FLAG抗体M2は、Sigma (St. Louis, MO)からのものであった。ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体または抗マウスIgG抗体を用いたインキュベーション後に、Super Signal化学発光基質(Pierce Rockford, IL)を用いてこの膜を現像した。FLAGタグ化FUS1の計算分子量は15 kDであり、両方の抗体によって認識されたバンドのサイズは、計算したサイズよりもわずかに大きかった。予想したとおり、変異体FUS1(82アミノ酸であることが予想された)は、野生型FUS1(110アミノ酸)よりもわずかに小さい。(b.) H1299 NSCLC細胞におけるコロニー形成アッセイの結果。トランスフェクション後、H1299細胞を、トリプシン処理し、再びプレートに播き、そしてG418(600  $\mu$ g/ml)を補充した培地(RPMI 1640 5%ウシ胎仔血清)中で2~3週間培養し、そしてエタノール/PBS(50/50%)中のメチレンブルーを用いた染色後に、G418耐性コロニーの数を計数した。FUS1およびFUS1-FLAGを用いたトランスフェクション後、コロニー形成は劇的に抑制されたが、82アミノ酸異常FUS1構築物はほとんど抑制しなかったことに注意すること。H1299について、2以上の実験の2~4プレートの平均の、平均値および標準偏差は、以下のものであった:ベクターコントロールpCDNA3.1、 $100 \pm 18\%$  (100% = 248コロニー)、FUS1-FLAG  $16 \pm 10\%$ 、FUS1  $23 \pm 11\%$ 、FUS1変異体  $77 \pm 11\%$ 。FUS1トランスフェクト細胞およびFUS1-FLAGトランスフェクト細胞のコロニー数は、ベクターコントロールと比較して有意に減少した( $P < 0.01$ 、スチューデントのt検定)。H322細胞は、ベクターコントロール(100%)と比較して、FUS1-FLAGトランスフェクションによって $40 \pm 34\%$ のコロニー形成を有した( $P < 0.05$ )。

【図26】 (a.) NCI-H1299安定トランスフェクトクローンにおける、Ponasterone Aの制御下のエクジソン発現ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)によるFUS1タンパク質の誘導。本発明者らは、調節可能なホルモンレセプターベクターであるpVgRXRをH1299にトランスフェクトし、そして20個のZeocin(pVgRXRの選択マーカー)耐性コロニーを得た。これらの安定なpVgRXRトランスフェクト体を、pIND-LacZでのトランスフェクト後に、 $\beta$ -gal活性についてスクリーニングした。これらのコロニーから、本発明者らは、 $\beta$ -gal活性がH1299細胞中でPonasterone Aによって特異的に調

10

20

30

40

50

節された親細胞として、クローン ECR 9 を選択した。本発明者らは、FUSI-FLAG を含む発現ベクター (pINDsp1-FUS1-FLAG) を作製し、そしてこれを ECR 9 にトランスフェクトした。ウエスタン分析。各細胞株からの  $10 \mu\text{g}$  の総細胞溶解タンパク質および抗 FUS1 抗体を、分析に使用した。誘導に使用した Ponasterone A の濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を、プロットの上に示す。ECR 9 は、調節ベクター単独でトランスフェクトした H1299 親細胞株である。; クローン 13 および 16 は、調節可能な FUS1 ベクターを含む H1299 クローンを表す。(b.) NSCLC H1299 ECR 9 (コントロール)、(c.) H1299 FUS1 クローン 13、および (d.) H1299 FUS1 クローン 16 のインピトロ増殖を、MTT アッセイによって測定した。細胞 ( $10^4$ ) を、5% ウシ胎仔血清を含む RPMI 1640 (Life Technologies Inc.) の 1ml でプレートし、24 ウェルプレートで Ponasterone A (0 日目に添加した) の存在下 ( $1.5 \mu\text{M}$ ) または非存在において培養し、そしてウェルを、表示される日に MTT アッセイのために回収した。MTT (Sigma) ( $500 \mu\text{g/ml}$ ) を、培養物に添加し、37 °C で 2 時間インキュベートし、細胞内ホルマザン結晶を、0.01N HCl を含むイソプロパノールを用いて可溶化し、この溶液の 560 nm における吸光度を、分光計を用いて測定した。OD 560 は、0 ~ 1.2 の範囲で細胞数に直接比例する。データ点は、各データ点の SD (約 5%、記号内に含まれる) と共に、3 ウェルの平均を表す。FUS1 で誘導可能な H1299 クローンの細胞周期分布分析について、ECR 9 細胞 (クローン 13 およびクローン 16) ( $2 \times 10^5$ ) を、10 cm ディッシュにプレートし、そして Ponasterone A の存在下 ( $5 \mu\text{M}$ ) または非存在下で 2 日間培養した。細胞を収集し、50% エタノール/PBS で固定し、5 mg/ml RNase を用いて処理し、ヨウ化プロピジウムを用いて染色し、そして FACSCaliber 装置 (Becton Dickinson San Jose, CA) によって DNA 含量について分析した。FACS 分析を 3 回の独立した実験で実行し、これらは類似の結果であった。FUS1 誘導条件下で、G1 細胞の % は、コントロールと比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に増加した。

【配列表】

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> JI, Lin  
MINNA, John  
ROTH, Jack  
LERMAN, Michael

<120> CHROMOSOME 3p21.3 GENES AS A TUMOR SUPPRESSOR REGION

<130> INGN095-10019803

<140> Filed Herewith

<141> 2000-07-10

<160> 2

10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1746

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gatccccaac cgtcccgcaa ctgtcctgtc ccagactttg gcaccgtcgg ggtccgctgt 60
ccccgaatgt gacagcatcc ccaccccggc tgctgcccag gatccgccgg accccggcct 120
cgatatggga gacctggaac tgctgctgcc cggggaagct gaagtgtctg tgcgggtct 180
gcgcagcttc ccgctacgcg agatgggctc cgaagggtgg aaccagcagc atgagaacct 240
ggagaagctg aacatgcaag ccacccctga tgccacagtc agccagggcg agcccattca 300
ggagctgctg gtcacccatg ggaaggtccc aacactggtg gaggagctga tcgcagtgga 360
gatgtggaag cagaaggtgt tccctgtggt ctgcagggtg gaggacttca agcccagaa 420
caccttcccc atctacatgg tgggtgacca cgaggcctcc atcatcaacc tcttgagac 480
agtgttcttc cacaaggagg tgtgtgagtc agcagaagac actgtcttgg acttggtaga 540
ctattgccac cgcaaacctga ccctgctggt ggcccagagt ggctgtggtg gccccctga 600
yggggaggga tcccaggaca gcaaccccat gcaggagctg cagaagcagg cagagctgat 660
ggaatgtgag attgcaactga aggccctctc agtactacgc taccatcacag actgtgtgga 720
cagcctctct ctacagacct tgagccgtat gcttagcaca cacaacctgc cctgcctcct 780
ggtggaactg ctggagcata gtccctggag ccggcgggaa ggaggcaagc tgcagcagtt 840
cgagggcagc cgttggcata ctgtggcccc ctccagagcag caaaagctga gcaagttgga 900
cgggcaagtg tggatcgccc tgtacaacct gctgctaagc cctgaggctc aggcgcgcta 960
ctgcctcaca agttttgcca agggacggct actcaagctt cgggccttcc tcacagacac 1020
actgctggac cagctgcccc acctggcccc cttgcagagt ttcttgccc atctgacct 1080
aactgaaacc cagcctccta agaaggacct ggtgttgtaa cagatcccag aaatctggga 1140
gcggctggag cgagaaaaca gaggcaagtg gcaggcaatt gccagcacc agctccagca 1200
tgtgttcagc ccctcagagc aggacctgtg gctgcaggcg cgaagggtgg ctgagacct 1260
caggctggat gtgctagagg cagtggctcc agagcggccc cgtgtgtctt actgcagtgc 1320
agaggcttct aagcgtgct caccgatgcca gaatgagtgg tattgtgca gggagtgcca 1380
agtcaagcac tgggaaaagc atggaaagac ttgtgtcctg gcagcccagg gtgacagagc 1440
caaatgaggg ctgcagttgc tgagggcoga ccacccatgc caagggaatc caccagaat 1500
gcacccctga acctcaagat cacggctccag cctctgccgg agcccagtc tccgcagtgg 1560
agagcagagc gggcggtaaa gctgctgacc gatctcctc ctctcacc caagtgaag 1620
ctcgagactt cctgccccac ccagtgggta ggccaagtgt gttgcttcag caaacggac 1680
caggaggggc agggcgggat gtggggaacc tcttctctca gcacagtaa gctggcctcc 1740
agatcg 1746

```

20

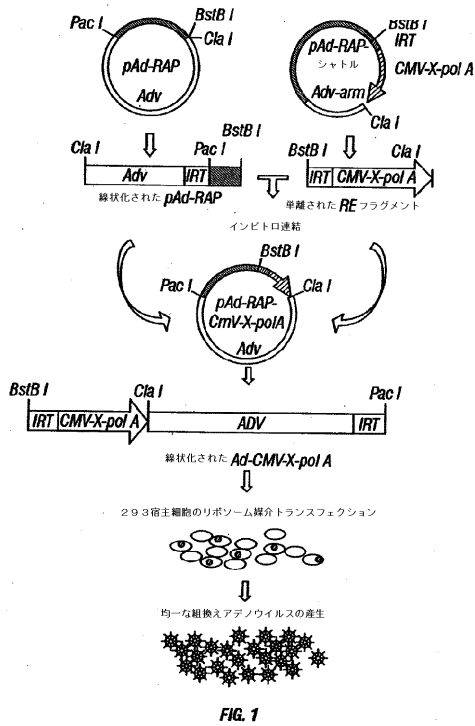
30

<210> 2

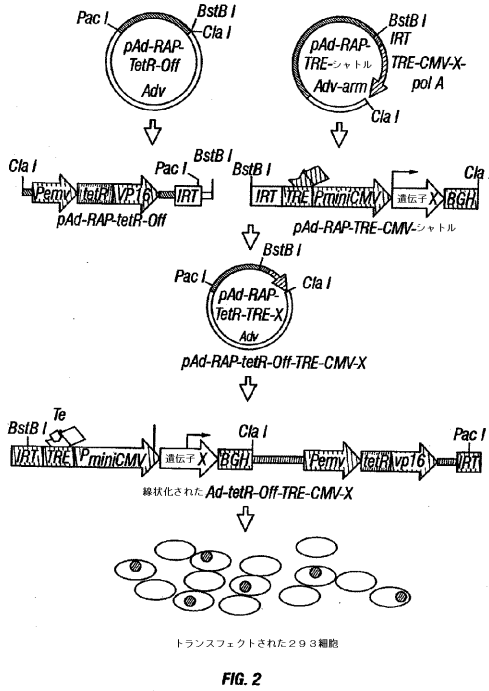
25050573.1



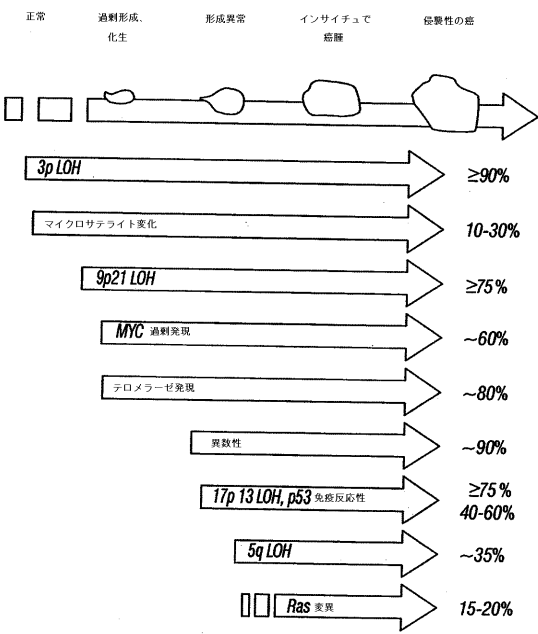
【 図 1 】



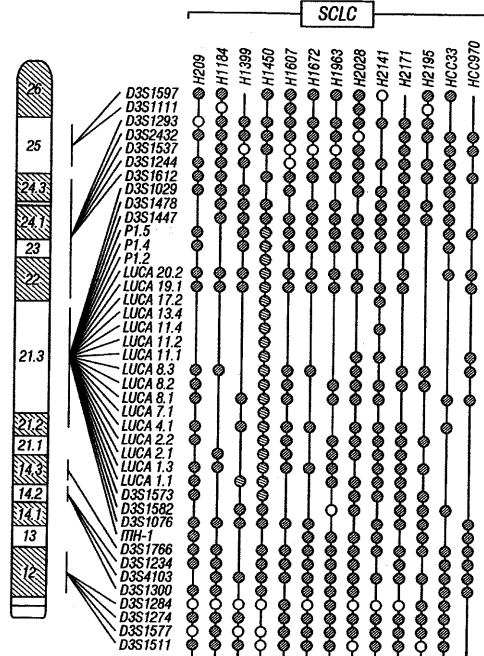
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



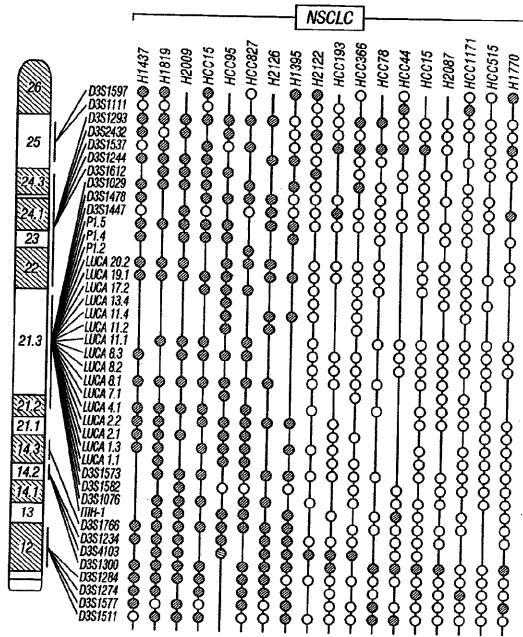


FIG. 4A-2

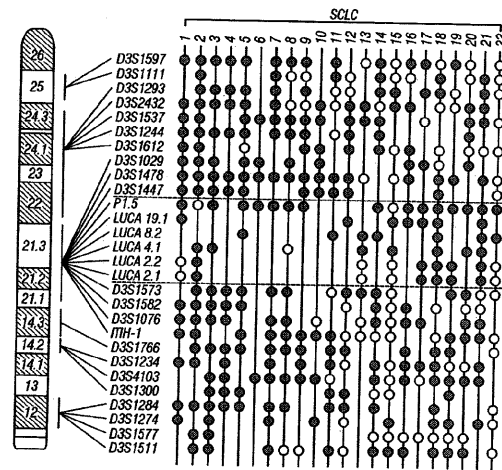


FIG. 4B-1

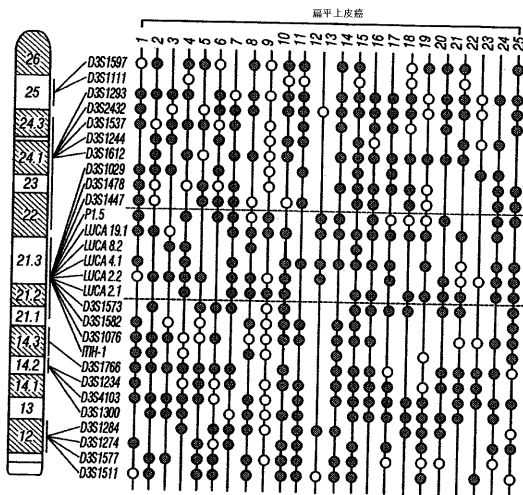


FIG. 4B-2

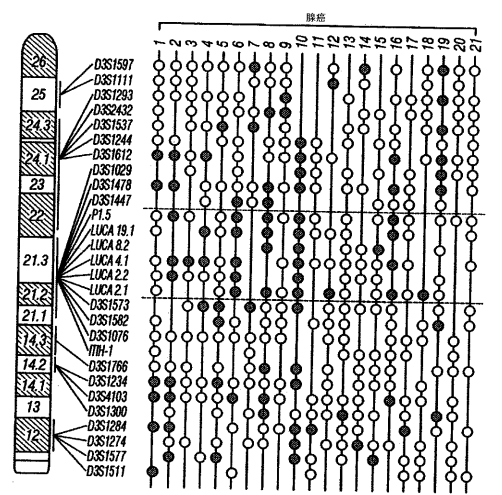


FIG. 4B-3

【 5 】

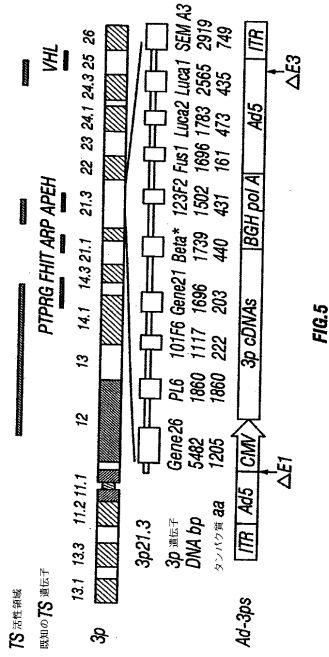


FIG. 5

【 6 】

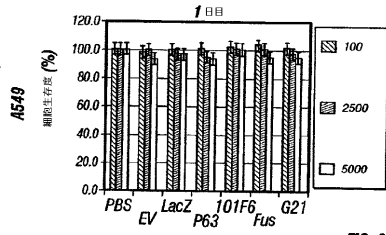


FIG. 6A

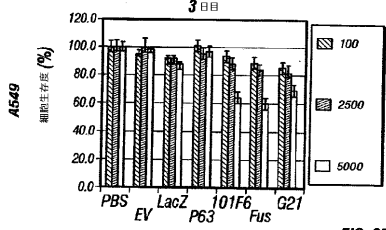


FIG. 6B

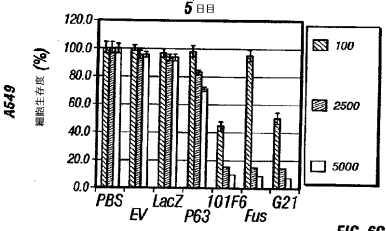


FIG. 6C

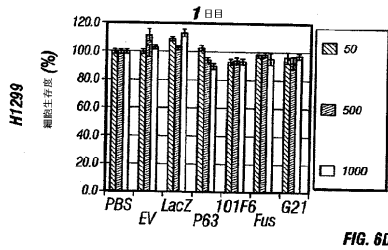


FIG. 6D

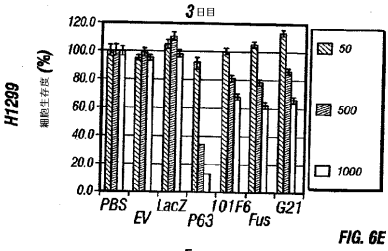


FIG. 6E

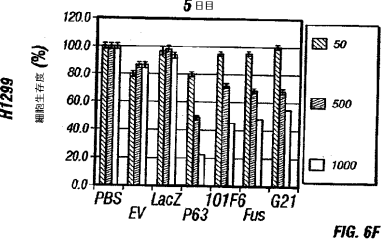


FIG. 6F

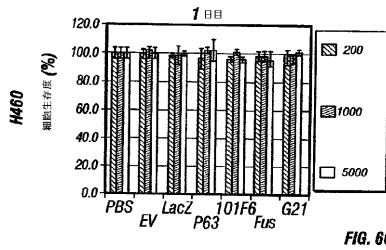


FIG. 6G

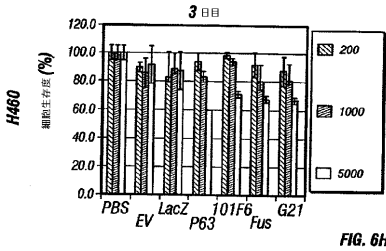


FIG. 6H

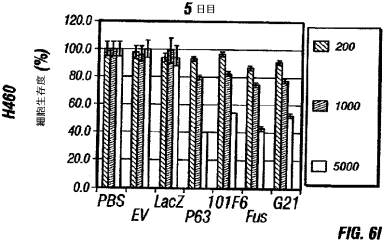


FIG. 6I

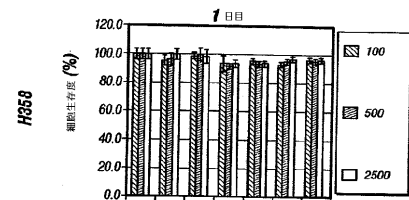


FIG. 6J

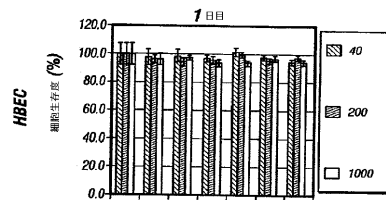


FIG. 6M

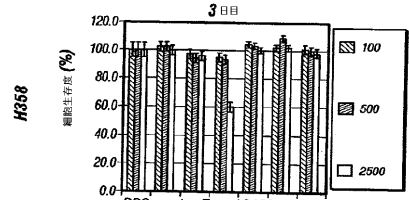


FIG. 6K

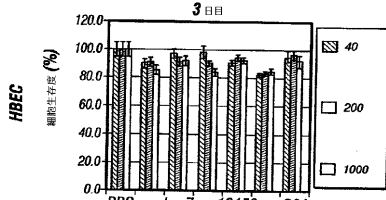


FIG. 6N

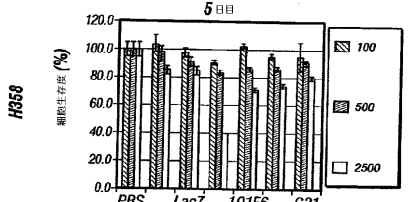


FIG. 6L

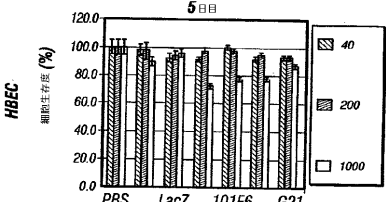


FIG. 6O

【 図 7 】

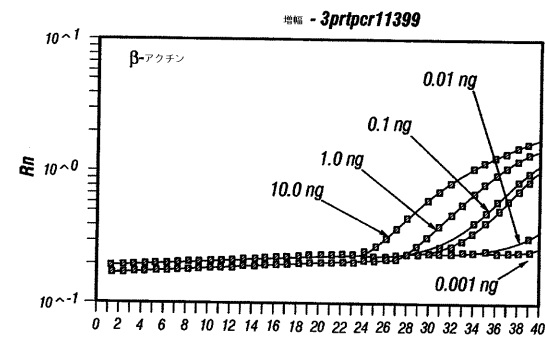


FIG. 7A

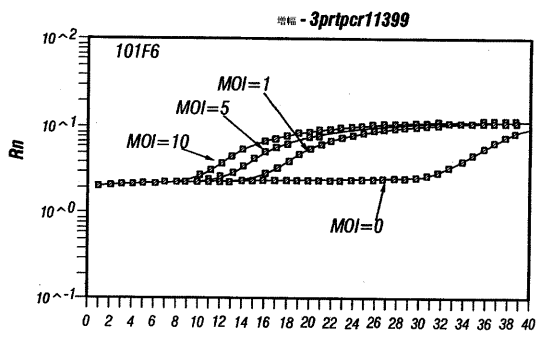


FIG. 7C

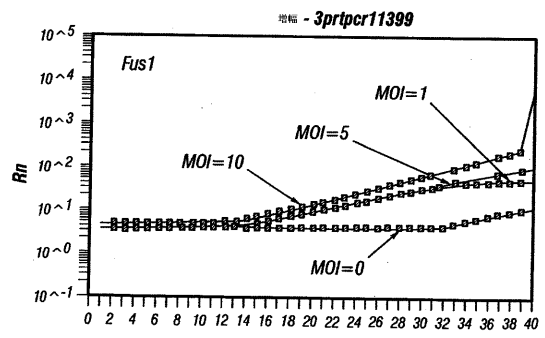


FIG. 7B

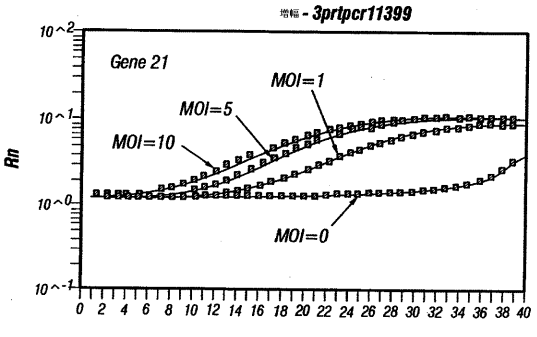
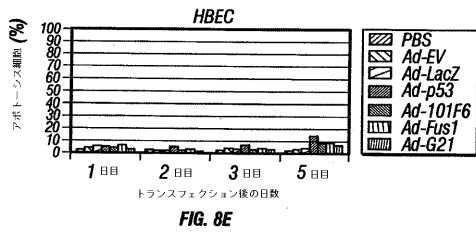
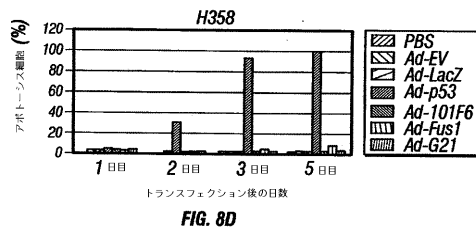
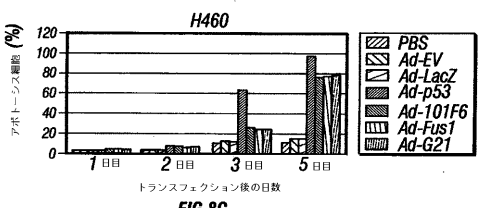
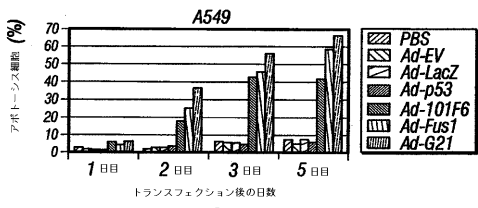
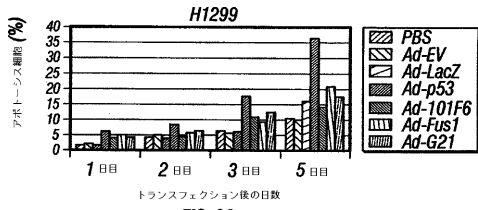
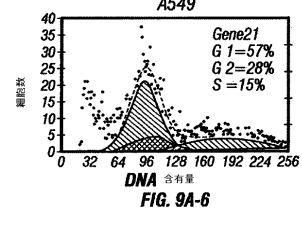
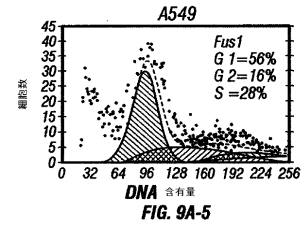
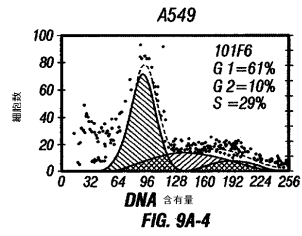
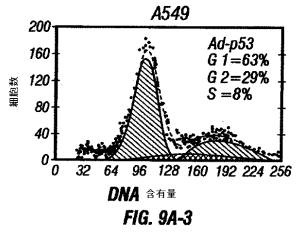
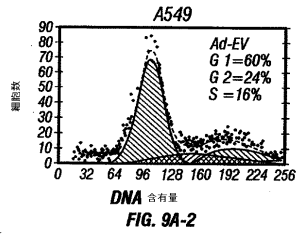
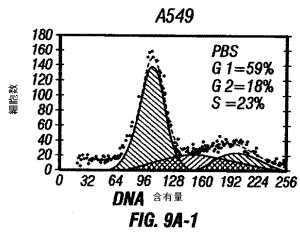


FIG. 7D

【 図 8 】



【 図 9 】



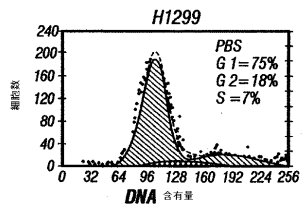


FIG. 9B-1

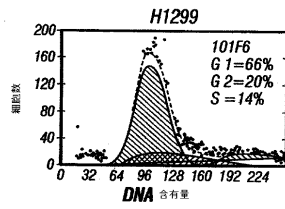


FIG. 9B-4

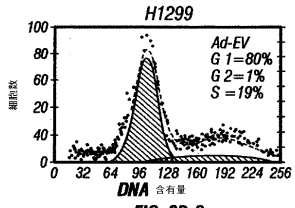


FIG. 9B-2

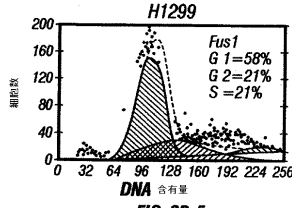


FIG. 9B-5

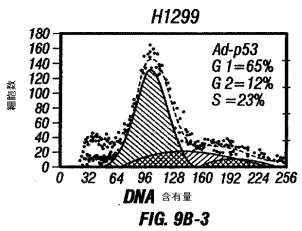


FIG. 9B-3

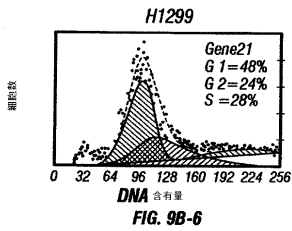
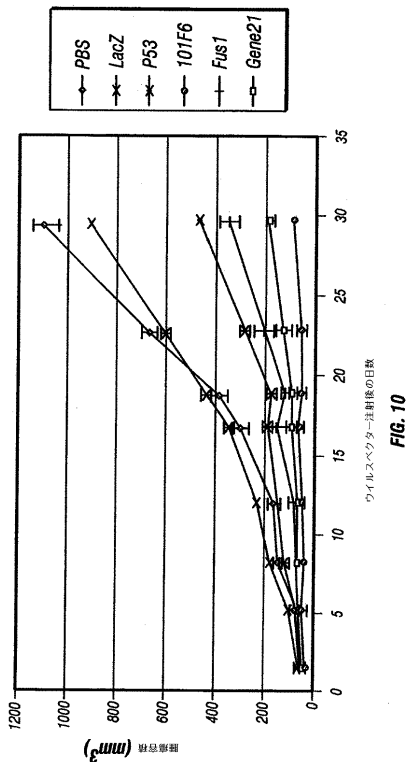
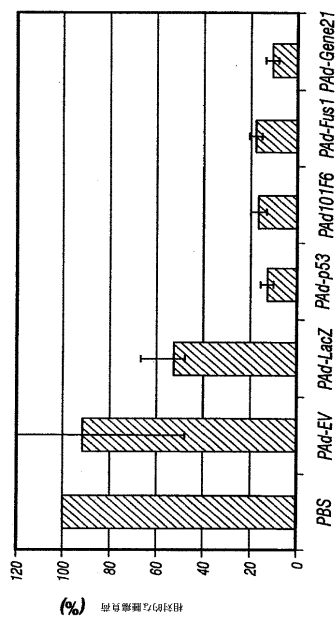


FIG. 9B-6

【 10 】



【 11 】



【 12 】

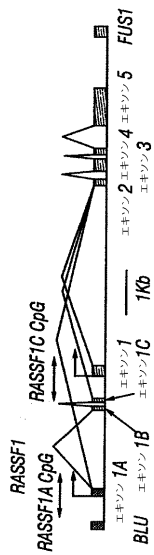


FIG. 12A

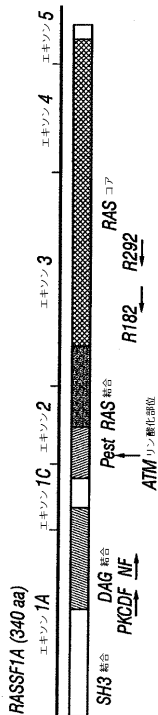


FIG. 12B



FIG. 12C

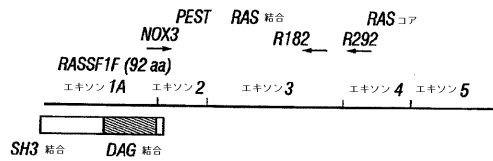
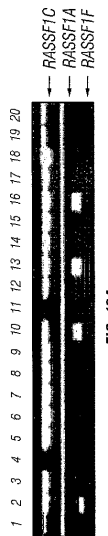


FIG. 12D

【 13 A 】



【 13 C 】

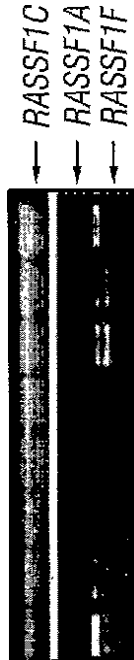


FIG. 13C

【 13 B 】

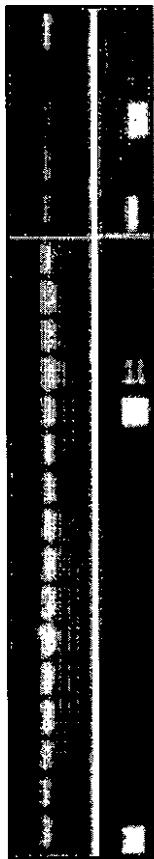


FIG. 13B



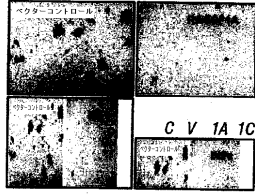
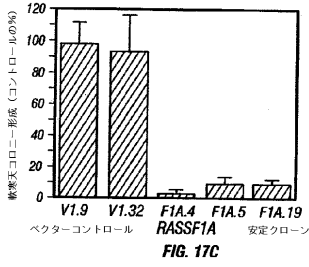


FIG. 17D

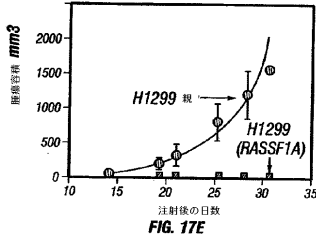


FIG. 17E

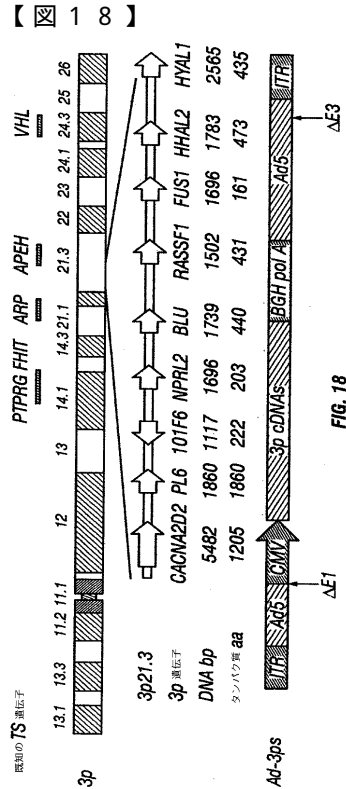


FIG. 18

【 19 】

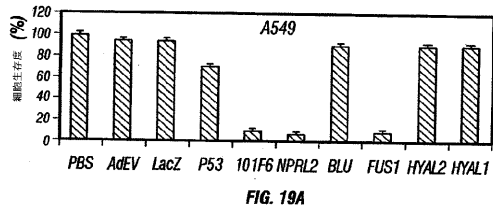


FIG. 19A

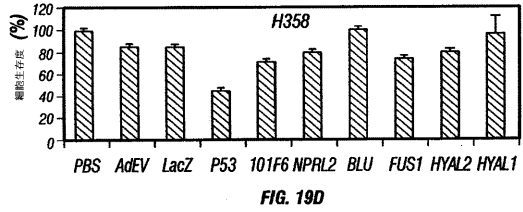


FIG. 19D

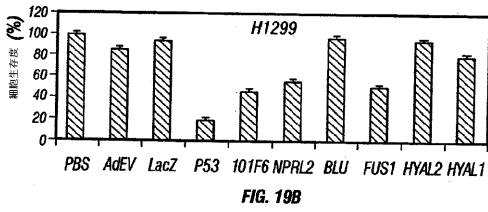


FIG. 19B

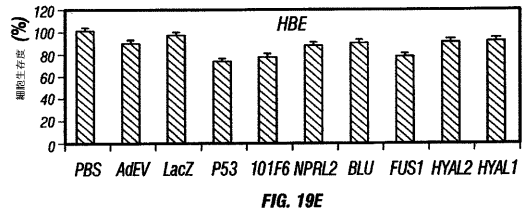


FIG. 19E

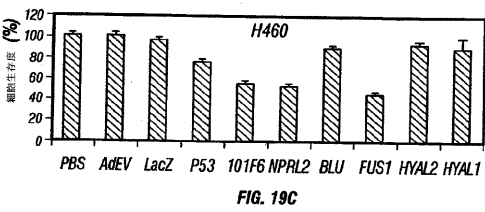


FIG. 19C

【 図 2 0 】

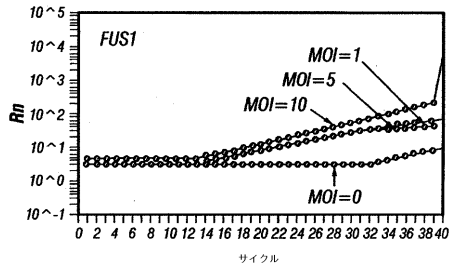


FIG. 20A

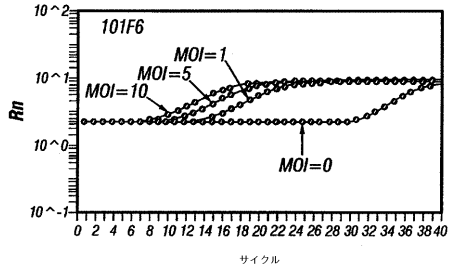


FIG. 20B

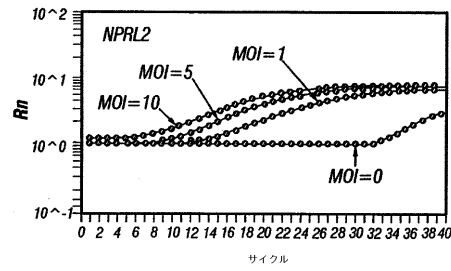


FIG. 20C

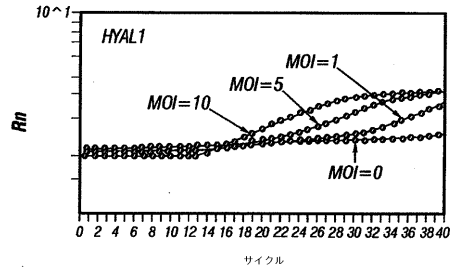


FIG. 20D

【 図 2 1 】

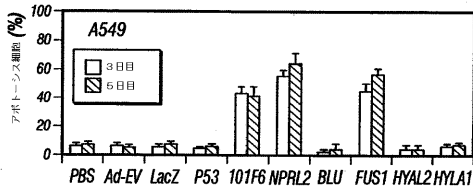


FIG. 21A

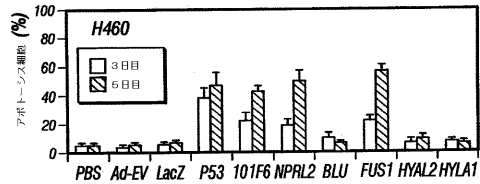


FIG. 21D

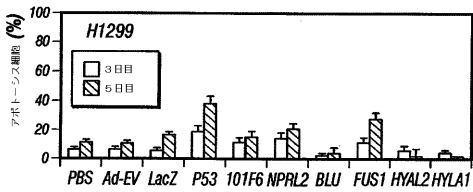


FIG. 21B

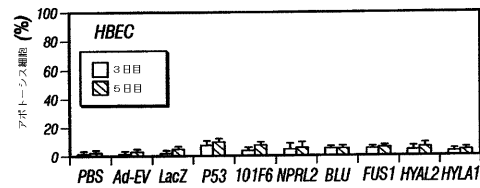


FIG. 21E

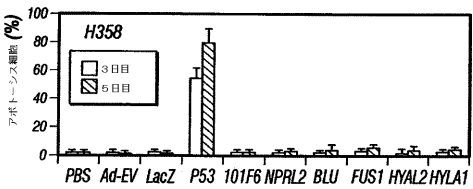
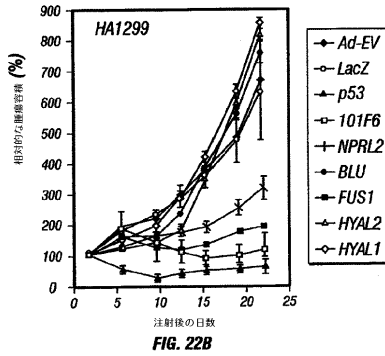
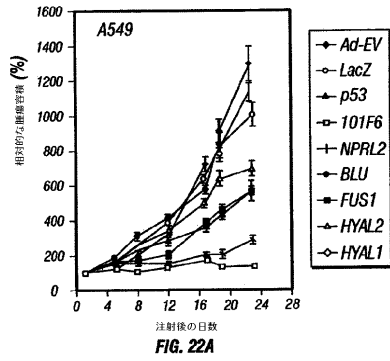
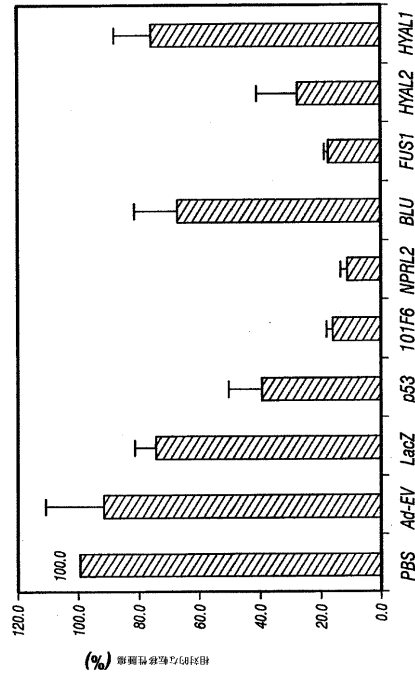


FIG. 21C

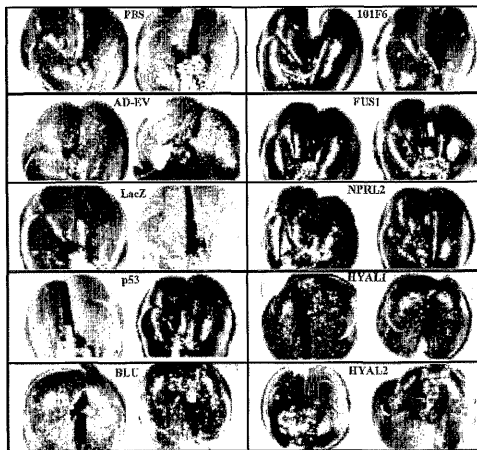
【 2 2 】



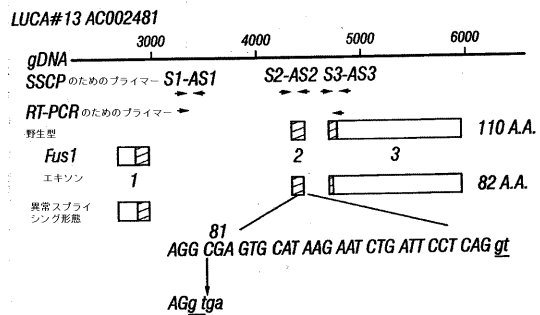
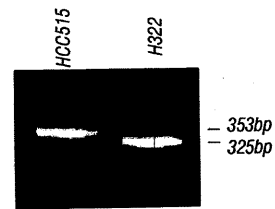
【 2 3 A 】



【 2 3 B 】



【 2 4 】



【 25 】

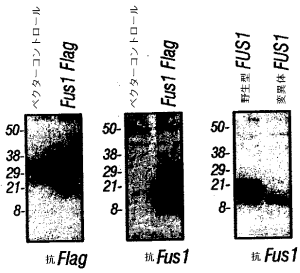


FIG. 25A

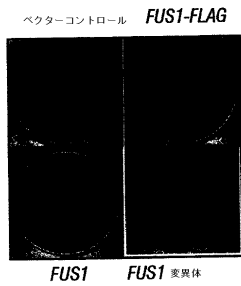


FIG. 25B

【 26 】

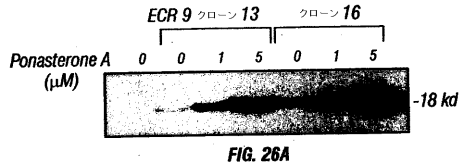


FIG. 26A

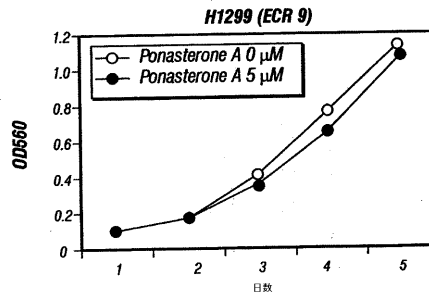


FIG. 26B

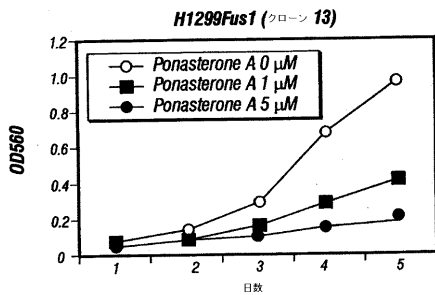


FIG. 26C

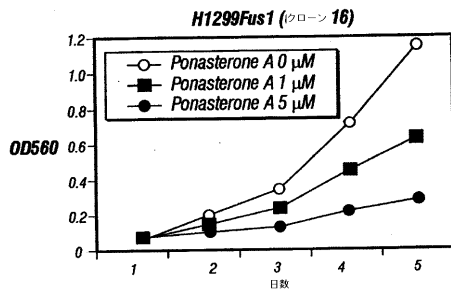


FIG. 26D

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04
C 0 7 K	14/82 (2006.01)	C 0 7 K	14/82
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 N	5/09 (2010.01)	C 1 2 N	5/00 2 0 2 U

(73)特許権者 305056858

ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ アズ リプレゼンテッド  
 バイ ザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービシー  
 ズ, センターズ フォー  
 アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 3 4 1, アトランタ, エムエス ケー79, パフォ  
 ード ハイウェイ 4 7 7 0, テクノロジー トランスファー オフィス

(74)代理人 100107489

弁理士 大塩 竹志

(72)発明者 ジ, リン

アメリカ合衆国 テキサス 7 7 4 7 8, シュガーランド, サイプレス ラン ドライブ 2  
 3 2 3

(72)発明者 ミナ, ジョン

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 2 0 1, ダラス, メープル アベニュー 3 1 3 1, アパ  
 ートメント 8エイチ

(72)発明者 ロス, ジャック

アメリカ合衆国 テキサス 7 7 0 0 5, ヒューストン, ブロンプトン ロード 6 5 1 6

(72)発明者 ラーマン, マイケル

アメリカ合衆国 メリーランド 2 9 8 5 2, ロックビル, マーサ テラス 1 6 1 8

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 Database GenBank, Accession No.AF055479, 1 9 9 8年 9月14日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/3599990?sat=NCBI&satkey=593167>  
 WISTUBA, I.I. et al., Cancer Res., 2 0 0 0年 4月 1日, Vol.60, pp.1949-1960  
 MIZUGUCHI, H. and KAY, M.A., Hum. Gene Ther., 1 9 9 8年 1 1月 2 0日, Vol.9, pp.2577-258  
 3  
 クロンテクニク 2 0 0 0年 4月号, 2 0 0 0年 4月, pp.12-14, URL, [http://clontech.takara-bio.co.jp/archive/200004/pdf/200004\\_12.pdf](http://clontech.takara-bio.co.jp/archive/200004/pdf/200004_12.pdf)  
 Database GenBank, Accession No.AAA99003, 1 9 9 5年 4月 6日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/762848?sat=oldid&satkey=1354909>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

PubMed

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	染色体3p21.3基因是肿瘤抑制因子		
公开(公告)号	<a href="#">JP4813746B2</a>	公开(公告)日	2011-11-09
申请号	JP2002509374	申请日	2001-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	美国卫生及公共服务部		
申请(专利权)人(译)	评议委员会, 盐湖城OVU德州系统 美利坚合众国政府作为丽局局长介绍泰德, 健康和人类Sabishizu系		
当前申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会, 德州系统的通用名称 美利坚合众国由李书记介绍泰德, 卫生署和人类Sabishizu, 中心政府		
[标]发明人	ジリン ミナジョン ロスジャック ラーマンマイケル		
发明人	ジ, リン ミナ, ジョン ロス, ジャック ラーマン, マイケル		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 A61K31/713 A61K35/76 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/82 A61K38/00 G01N33/15 G01N33/50 C12Q1/02 C12N5/09 A01K67/027 A61K31/7088 C07K14/47 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12N15/85 C12N15/861 C12Q1/6886 G01N33/566		
CPC分类号	C12N15/86 A01K67/0271 A01K67/0275 A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2217/20 A01K2227/105 A01K2267/0331 A61K48/00 C07K14/4703 C12N15/8509 C12N2710/10343 C12N2830/006 C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/154 Y10S977/916		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/53.D A61K31/713 A61K35/76 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/82 A61K37/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12Q1/02 C12N5/00.202.U		
优先权	60/217112 2000-07-10 US		
其他公开文献	JP2004502449A5 JP2004502449A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)	アミノ酸		コドン					
	アラニン	Ala A	GCA	GCC	GCG	GCU		
<p>肿瘤抑制基因在人肺癌和其他癌症的病理学中起主要作用。对新肿瘤和肿瘤衍生细胞系的细胞遗传和序列基因分型的研究表明, 染色体3 (3p) 短臂中的细胞遗传学变化和等位基因丢失最常见大约90%的细胞肺癌和超过50%的非小细胞肺癌。Fus1,101F6, 基因21 (NPRL2), 基因26 (CACNA2D2), Luca1 (HYAL1), Luca2 (HYAL2), PL6,123F2 (HYAL2), 其是由肺癌中纯合性缺失定义的抑制性癌基因组。RaSSFI), SEM A3和β* (BLU) 位于3p21.3并在此处分离。</p>	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				