

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 534995

(P2002 - 534995A)

(43)公表日 平成14年10月22日(2002.10.22)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	T 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 2 4
39/395		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00		C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/47		1/19	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 81数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 595705(P2000 - 595705)

(86)(22)出願日 平成12年1月20日(2000.1.20)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月19日(2001.7.19)

(86)国際出願番号 PCT/US00/01484

(87)国際公開番号 W000/44403

(87)国際公開日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(31)優先権主張番号 09/234,208

(32)優先日 平成11年1月20日(1999.1.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 オレゴン ヘルス サイエンスーズ ユニ
バーシティ
アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートラン
ド エス.ダブリュー.サム ジャクソン
パーク ロード 3181

(72)発明者 ドハーティ, ジョニ クリスティン
アメリカ合衆国,カリフォルニア 90403,サ
ンタモニカ,カリフォルニア アベニュー 1
914

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HER - 2 結合アンタゴニスト

(57)【要約】

(a) 少なくとも10⁸の親和性でHER - 2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、(b) C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド、(c) HER - 2のECDに結合するモノクローナル抗体、及び(d) それらの組合せから成る群から選択された剤(但し、モノクローナル抗体のみではあり得ない)、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る、HER - 2を過剰発現する固形腫瘍を処理するための医薬組成物が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも 10^8 の親和性でHER - 2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド。

【請求項2】 前記単離されたポリペプチドが、約69~79個の長さのアミノ酸である請求項1記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 前記単離されたポリペプチドが、Herceptin(商標)(癌の処理のために使用され、そしてECD又はHER - 2に結合する市販のヒト型化モノクローナル抗体)の結合の部位とは異なる、HER - 2のECD上の部位に結合する請求項1記載の単離されたポリペプチド。

【請求項4】 少なくとも 10^8 の親和性でHER - 2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードする単離されたDNA配列。

【請求項5】 前記単離されたポリペプチドが、約69~79個の長さのアミノ酸である請求項4記載の単離されたポリペプチド。

【請求項6】 前記単離されたポリペプチドが、Herceptin(商標)の結合の部位とは異なる、HER - 2のECD上の部位に結合する請求項4記載の単離されたポリペプチド。

【請求項7】 少なくとも 10^8 の親和性でHER - 2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードするDNA配列を有する発現ベクターを含んで成るトランスフェクトされた細胞。

【請求項8】 C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合グリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約300~419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド。

【請求項9】 前記単離されたポリペプチドが、約350~419個の長さのアミノ酸であり、そして4個のN-結合グリコシル化部位が存在する請求項8記載の単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド。

【請求項10】 前記単離されたポリペプチドが、Herceptin(商標)の結

合の部位とは異なる、HER - 2 のECD上の部位に結合する請求項 8 記載の単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド。

【請求項 1 1】 C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合グリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約300~419個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードする単離されたDNA配列。

【請求項 1 2】 前記単離されたポリペプチドが、約350~419個の長さのアミノ酸であり、そして4個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する請求項11記載の単離されたDNA配列。

【請求項 1 3】 C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合グリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードするDNA配列を有する発現ベクターを含んで成るトランスフェクトされた細胞。

【請求項 1 4】 HER - 2 の過剰発現により特徴づけられる固形腫瘍を処理するための方法であって、(a) 少なくとも 10^8 の親和性でHER - 2 の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号 1 の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、(b) C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド、(c) HER - 2 のECDに結合するモノクローナル抗体、及び(d) それらの組合せから成る群から選択された、HER - 2 のECDに結合する剤(但し、モノクローナル抗体のみではあり得ない)を、投与することを含んで成る方法。

【請求項 1 5】 HER - 2 を過剰発現する固形腫瘍が、乳癌、小細胞肺癌、卵巣癌及び結腸癌から成る群から選択される請求項14記載の方法。

【請求項 1 6】 前記剤が、配列番号 1 の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドである請求項14記載の方法。

【請求項 1 7】 前記剤が、配列番号 1 の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、及びHER - 2 のECDに結合するモノクロー

ーナル抗体の組合せである請求項16記載の方法。

【請求項18】 (a) 少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、(b) C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合グリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド、(c) HER-2のECDに結合するモノクローナル抗体、及び(d) それらの組合せから成る群から選択された剤(但し、モノクローナル抗体のみではあり得ない)、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る、HER-2を過剰発現する固形腫瘍を処理するための医薬組成物。

【請求項19】 前記が、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドである請求項18記載の医薬組成物。

【請求項20】 前記剤が、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、及びHER-2のECEに結合するモノクローナル抗体の組み合わせである請求項19記載の医薬組成物。

【請求項21】 HER-2の過剰発現により特徴づけられる固形腫瘍組織に治療剤を標的化するための方法であって、少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドに、前記剤を結合することを含んで成る方法。

【請求項22】 前記単離されたポリペプチドが、約69~79個の長さのアミノ酸である請求項21記載の方法。

【請求項23】 前記単離されたポリペプチドが、Herceptin(商標)の結合の部位とは異なる、HER-2のECD上の部位に結合する請求項21記載の方法。

【請求項24】 HER-2を過剰発現する腫瘍についての腫瘍処理の予後(prognosis)を決定するための方法であって、(a) 血液、血清、尿リンパ、唾液、腫瘍組織及びそれらの組み合わせから成る群から選択された体液を得；そして(b) ELISA、免疫沈殿、免疫組織化学及びウェスタン分析から成る群から選択された抗-p68HER-2抗体に基づくアッセイを用いて、発現されたp68HER-2の

量を測定することを含んで成る方法。

【請求項25】 液体におけるp185HER - 2 ECDの量を測定することをさらに含んで成る請求項24記載の方法。

【請求項26】 p68HER - 2の量とp185HER - 2の量との間の比率を決定することをさらに含んで成り、それによりp185HER - 2の比率が高いほど、患者の予後が良好である請求項24記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

発明の技術分野：

本発明は、HER - 2 結合アンタゴニストを提供する。特に、イントロン保持が、HER - 2 受容体に結合する新規HER - 2 アンタゴニストポリペプチドを生成した。

この研究は、Department of Defense (DOD) Breast Cancer Research Program からの許可により支持された。アメリカ合衆国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0002】

発明の背景：

HER-2/neu (erbB-2) 腫瘍遺伝子は、いくつかのヒト癌 (Hynes and Stern, *Biochim. Et Biophys. Acta* 1198: 165-184, 1994; 及びDougall など., *Oncogene* 9: 2109-2123, 1994) 及び哺乳類進化 (Leeなど., *Nature* 378: 394-398, 1995) におけるその役割のために、広範囲に研究されて来た受容体 - 様チロシンキナーゼ (RTK) をコードする。HER - 2 タンパク質の配列は、胎盤 (Coussens など., *Science* 230: 1132-1139, 1985) からの、及び胃癌細胞系 (Yamamoto など., *Nature* 319: 230-234, 1986) からの上皮成長因子受容体 (EGFR) mRNA に対する相同性によりクローン化されたcDNAから決定された。

【0003】

HER - 2 mRNAは、約4.5kbであることが示されており (Coussens など., *Science* 230: 1132-1139, 1985; 及びYamamotoなど., *Nature* 319: 230-234, 1986)、そして正常及び悪性ヒト組織 (p185HER-2) における185kDaのトランスメンブリン糖タンパク質をコードする (Hynes and Stern, *Biochim. Et Biophys. Acta* 1198: 165-184, 1994; 及びDougall など., *Oncogene* 9: 2109-2123, 1994)。HER-2遺伝子の機能は、トランスフェクトされた細胞における4.5kbの転写体に対応するcDNAを発現することによって、及び185kDaのタンパク質生成物の構造及び生化学的特性から主に試験されて来た。p185HER-2は、大きな細胞外ドメイン、トランスメンブリンセグメント、及びチロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメイ

ンから成る (Hynes and Stem, *Biochem. Et Biophys. Acta* 1198: 165-184, 1994; 及びDougallなど., *Oncogene* 9: 2109-2123, 1994)。

【0004】

p185HER-2 の過剰発現は、培養された細胞の表現型形質転換を引き起こし (Di Fiore など., *Science* 237: 178-182, 1987; 及びHudziak など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159-7163, 1987)、そして乳癌及び卵巣癌の攻撃的な臨床学的進行に関連していた (Slamonなど., *Science* 235: 177-182, 1987; 及びSlamonなど., *Science* 244: 707-712, 1989)。p185HER-2は、EGFRに対して非常に相同である。しかしながら、p185HER-2に対して高い親和性で、直接的に結合するリガンドはまだ、同定されていない。さらに、HER-2のシグナル化活性は、EGFRファミリーの他のリガンド-結合膜とのヘテロ二量体化を通して仲介され得る (Carraway and Cantley, *Cell* 78: 5-8, 1994; Earpなど., *Breast Cancer Res. Treat.* 35: 115-132, 1995; 及びQianなど., *Oncogene* 10: 211-219, 1995)。

【0005】

HERファミリーRTKの細胞外ドメインの領域を含む規準からはずれたタンパク質は、十分な長さの受容体のタンパク質加水分解プロセッシングを通して (Lin and Clinton, *Oncogene* 6: 639-643, 1991; Zabreeky など., *J. Biol. Chem.* 266: 1716-1720, 1991; PuPaなど., *Oncogene* 8: 2917-2923, 1993; Vecchi など., *J. Biol. Chem.* 271: 18989-18995, 1996; 及びVecchi and Carpenter, *J. Cell Biol.* 139: 995-1003, 1997)、及び他のRNAプロセッシングを通して (Petch など., *Mol. Cell. Biol.* 10: 2973-2982, 1990; Scott など., *Mol. Cell. Biol.* 13: 2247-2257, 1993; 及びLee and Maihle, *Oncogene* 16: 3243-3252, 1998)、生成される。p185HER-2の細胞外ドメインは、培養における乳癌細胞からタンパク質加水分解的に生成され (Petchなど., *Mol Cell. Biol.* 10: 2973-2982, 1990; Scottなど., *Mol. Cell. Biol.* 13: 2247-2257, 1993; 及びLee and Maihle, *Oncogene* 16: 3243-3252, 1998)、そしてそれが転移性乳癌の血清マーカーであり得る場合 (Leitzelなど., *J. Clin. Oncol.* 10: 1436-1443, 1992)、及び免疫学的制御からのHER-2に富んでいる腫瘍の脱離を可能にできる場合 (Bas

elgaなど., J. Clin. Oncol. 14: 737-744, 1966; 及びBrodowiczなど., Int. J. Cancer 73: 875-879, 1997)、いく人かの癌患者の血清に見出される (Leitze Iなど., J. Clin. Oncol. 10: 1436-1443, 1992)。

【0006】

HER-2の切断された細胞外ドメインはまた、イントロン内のポリアデニル化シグナルの使用により生成される2.3kbの他の転写体の生成物である (Scottなど., Mol. Cell. Biol. 13: 2247-2257, 1993)。前記他の転写体は、胃癌細胞系MKN7において最初に同定され (Yamamotoなど., Nature 319: 230-234, 1986; 及びScottなど., Mol. Cell. Biol. 13: 2247-2257, 1993)、そして切断された受容体はそれらの腫瘍細胞から分泌されるよりもむしろ、核周囲細胞質内に位置した (Scottなど., Mol. Cell. Biol. 13: 2247-2257, 1993)。

【0007】

しかしながら、特定の治療、診断又は研究有用性は、この切断された細胞外ドメインポリペプチドに与えられたことはない。他のスプライシングにより生成される、EGFRの切断された細胞外ドメイン (Petchなど., Mol. Cell. Biol. 10: 2973-2982, 1990) は、分泌され、リガンド - 結合及び二重体化性質を示し (Basuなど., Mol. Cell. Biol. 9: 671-677, 1989)、そして受容体機能に対する優性の負の効果をも有することができる (Basuなど., Mol. Cell. Biol. 9: 671-677, 1989; 及びFlickingerなど., Mol. Cell. Biol. 12: 883-893, 1992)。

【0008】

従って、細胞HER-2に結合する分子、及び特に、HER-2に対するヒト型化抗体 (例えば、Herceptin (商標)) とは異なった部位に結合する分子を見出す必要性が当業界において存在する。そのような分子は、HER-2を過剰発現する種々の癌のための有用な治療剤であろう。

【0009】

発明の要約:

本発明は、少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドを提供する。好ましくは、前記単離されたポリペプチドは、約69~79個

の長さのアミノ酸である。好ましくは、前記単離されたポチペプチドは、Herceptin (商標)(癌の処理のために使用され、そしてECD又はHER - 2 に結合する市販のヒト型化モノクローナル抗体)の結合の部位とは異なる、HER - 2 のECD上の部位に結合する。

【0010】

本発明はさらに、少なくとも 10^8 の親和性でHER - 2 の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードする単離されたDNA配列を提供する。好ましくは、前記単離されたポリペプチドは、約69~79個の長さのアミノ酸である。好ましくは、前記単離されたポチペプチドは、Herceptin (商標)(癌の処理のために使用され、そしてECD又はHER - 2 に結合する市販のヒト型化モノクローナル抗体)の結合の部位とは異なる、HER - 2 のECD上の部位に結合する。本発明はさらに、少なくとも 10^8 の親和性でHER - 2 の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードするDNA配列を有する発現ベクターを含んで成るトランスフェクトされた細胞を提供する。

【0011】

本発明はさらに、C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチドを提供する。好ましくは、前記単離されたポチペプチドは、約350~419個の長さのアミノ酸であり、そして4個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する。好ましくは、前記単離されたポチペプチドは、Herceptin (商標)(癌の処理のために使用され、そしてECD又はHER - 2 に結合する市販のヒト型化モノクローナル抗体)の結合の部位とは異なる、HER - 2 のECD上の部位に結合する。

【0012】

本発明はさらに、C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号3の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードする単離され

たDNA配列を提供する。好ましくは、前記単離されたポリペプチドは、約350～419個の長さのアミノ酸であり、そして4個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する。本発明はさらに、C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号3の配列から取られる約80～419個のアミノ酸を有するポリペプチドを、発現に基づいてコードするDNA配列を有する発現ベクターを含んで成るトランスフェクトされた細胞を提供する。

【0013】

本発明は、(a) 少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50～79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、(b) C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80～419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド、(c) HER-2のECDに結合するモノクローナル抗体、及び(d) それらの組合せから成る群から選択された、HER-2のECDに結合する剤(但し、モノクローナル抗体のみではあり得ない)を、投与することを含んで成る、HER-2の過剰発現により特徴づけられる固形腫瘍を処理するための方法を提供する。

【0014】

好ましくは、HER-2を過剰発現する固形腫瘍は、乳癌、小細胞肺癌、卵巣癌及び結腸癌から成る群から選択される。好ましくは、前記剤は、配列番号1の配列から取られる約50～79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドである。最も好ましくは、前記剤は、配列番号1の配列から取られる約50～79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、及びHER-2のECDに結合するモノクローナル抗体の組合せである。

【0015】

本発明はさらに、(a) 少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50～79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、(b) C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80～419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリ

ペプチド、(c) HER-2のECDに結合するモノクローナル抗体、及び(d)それらの組合せから成る群から選択された剤(但し、モノクローナル抗体のみではあり得ない)、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る、HER-2を過剰発現する固形腫瘍を処理するための医薬組成物を提供する。

【0016】

好ましくは、前記は、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドである。最も好ましくは、前記剤は、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、及びHER-2のECEに結合するモノクローナル抗体の組み合わせである。

【0017】

本発明はさらに、少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドに、治療剤を結合することを含んで成る、HER-2の過剰発現により特徴づけられる固形腫瘍組織に治療剤を標的化するための方法を提供する。好ましくは、前記単離されたポリペプチドは、約69~79個の長さのアミノ酸である。好ましくは、前記単離されたポリペプチドは、Herceptin(商標)(癌の処理のために使用され、そしてECD又はHER-2に結合する市販のヒト型化モノクローナル抗体)の結合の部位とは異なる、HER-2のECD上の部位に結合する。

【0018】

本発明はさらに、(a)血液、血清、尿リンパ、唾液、腫瘍組織及びそれらの組み合わせから成る群から選択された体液を得；そして(b)ELISA、免疫沈殿、免疫組織化学及びウェスタン分析から成る群から選択された抗-p68HER-2抗体に基づくアッセイを用いて、発現されたp68HER-2の量を測定することを含んで成る、HER-2を過剰発現する腫瘍についての腫瘍処理の予後を決定するための方法を提供する。好ましくは、腫瘍処理の予後を決定するための方法はさらに、液体におけるp185HER-2 ECDの量を測定し、そしてp68HER-2の量とp185HER-2の量との間の比率を決定することを含んで成る。

【0019】

発明の特定の記載：

本発明は、イントロン8として同定された274bpの挿入体を有する4.8kbの他のHER-2 mRNAの最初の発見に基づかれています。保持されるイントロンは、読み取り枠を整合して存在し、そして79個のアミノ酸（配列番号1）、続いてヌクレオチド236での停止コドンにコードする。他のmRNAは、トランスメンブラン及び細胞内ドメインを欠いており、そして419個のアミノ酸（配列番号2）；p185HER-2のN-末端に対して同一である340個の残基及びC-末端での79個のユニーク残基（配列番号1）を含む切断されたHER-2タンパク質を予測する。

【0020】

新規の9個のアミノ酸残基C-末端配列（配列番号1）又はp185HER-2のN-末端のいずれかに対する特異的抗体を用いて、68kDaのタンパク質生成物が同定された（配列番号2）。この69kDaのタンパク質は、他のHER-2転写体の生成物であり、そしていくつかの細胞系からの細胞抽出物及び細胞外培地において見出される。他の転写体の発現は、トランスフェクトされていないヒト胚腎細胞系において最高であった。

【0021】

ここに提供される結果は、追加の274個のヌクレオチド、好ましくはイントロン8を含む他のHER-2 mRNAの発現を示す。約4.8kbの他の転写体がヒト胎児腎臓組織及びヒト胚腎細胞系HEK293において検出されることは、この発見と一致する。さらに、配列が2.3kbの切断されたHER-2 mRNAに保持される場合、予測するサイズである2.6kbの転写体（Yamamotoなど., Nature 319: 230-234, 1986; 及びScottなど., Mol. Cell. Biol. 13: 2247-2257, 1993）は、挿入された配列又はHER-2ECDコード配列に対して特異的なプローブを用いて、ノザンプロット分析によりヒト胎児肝臓組織において検出された（図2）。

【0022】

挿入された配列は、終結コドンを通り、そしてp185HER-2タンパク質の残基340で新規の79個のアミノ酸延長配列のECDIIIaを測定する。従って、その予測されるタンパク質は、トランスメンブラン及び細胞内ドメインを欠いているが、しかしp185HER-2の細胞外ドメインのサブドメインI及びIIを含む。予測されるように、p185HER-2のN-末端配列、及び新規配列の包含により提供されるC-末端延長

を含む分泌されたタンパク質が検出された(図3及び5)。ECDIIIaタンパク質は、p185HER-2のサブドメインI及びIIに見出される5個のN-結合されたグリコシル化部位がグリコシル化される場合、他の転写体によりコードされるタンパク質から予測されるおおよそのサイズである68kDaであることが見出された(Sternなど., Mol. Cell. Biol. 6: 1729-1740, 1986)。

【0023】

本明細書に提供されるデータは、p68HER-2がp185HER-2に特異的に結合することを示す。p185HER-2との結合は、p68HER-2のN-末端サブドメインI及びIIよりもむしろ新規のプロリンに富んでいるECDIIIaドメインにより付与され得る。インビトロ欠失突然変異誘発により生成されるHER-2 ECDIはまた、サブドメインI及びIIを含むが、それは、それらの接近性を増強するよう構築されない場合、p185-2の細胞外ドメインを会合しない(Tzaharなど., EMBO J. 16: 4938-4950, 1997; O'Rourkeなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3250-3255, 1997; 及びFitzpatrickなど., FEBS Letters 431: 102-106, 1998)。

【0024】

しかしながら、ユニークECDIIIaペプチドは、p185HER-2に対して、及びp185HER-2を過剰発現する、トランスフェクトされた17-3-1細胞に対して、高い親和性(nM濃度)で結合する(図5)。17-3-1細胞に対するECDIIIaドメインペプチドの選択的結合は、分泌されたp68HER-2が細胞表面でp185HER-2の細胞外領域と相互作用することを示す。従って、p68HER-2及びそのフラグメントは、HER-2遺伝子によりコードされる、天然に存在するHER-2結合タンパク質であると思われる。EGFRファミリーリガンド(Groenenなど., Growth Factors II: 235-257, 1994)に比較して、p68HER-2は、EFG相同ドメインを欠いており、そして受容体自体、すなわちp185HERの最初の340個のアミノ酸を含む。

【0025】

前に記載された推定上のHER-2リガンドは、EGFRファミリーメンバーを含むヘテロ二量体においてのみ、p185HER-2と間接的に会合することが見出された(Heldin and Ostman, Cytokine Growth Factor Rev. 7: 33-40, 1996)。ECDIIIaは補助受容体を通してp185HER-2に間接的に結合することが可能であるが、これは

たぶん、界面活性剤により溶解されたp184HER-2が固定されたECDIIIaペプチドにより特異的且つ効果的に“引き下された”ので、ありそうもないと思われる(図5B)。

【0026】

哺乳類EGFRファミリーメンバーのためのすべての天然に存在するか又は構築されたりガンドに関して、結合は、受容体二量体化及びチロシンリン酸化の刺激に強くカップリングされる(Hynes and Stern, *Biochim. et Biophys. Acta* 1198: 165-184, 1994; Dougallなど., *Oncogenes* 9: 2109-2123, 1994; 及びGroenenなど., *Growth Factors* 11: 235-257, 1994)。それらは結合するが、p68HER-2も、ECDIIIaペプチドもいずれも、p185HER-2を活性化することが見出されなかった。活性化は、p185HER-2チロシンリン酸化の程度で異なる2種の異なった細胞系、すなわちトランスフェクトされた17-3-1細胞及びSKOV-3卵巣癌細胞において評価された。

【0027】

さらに、p184HER-2の二量体化において増強されるインビトロ自己-リン酸化活性(Dougallなど., *Oncogene* 9: 2109-2123, 1994; 及びLinなど., *J. Cell. Biochem.* 49, 290-295, 1992)は、p68HER-2又はECDIIIaにより刺激されなかった。同様に、ショウジョウバエEGF受容体の細胞外インヒビター及びクラスIのRTKの唯一の既知アンタゴニストであるArgosタンパク質は、受容体のチロシンリン酸化を模倣しなかった(Schweitzerなど., *Nature* 376: 699-702, 1995)。同様に、Angiopoietin-2, すなわちTie 2 RTKのための天然のアンタゴニストは、内皮受容体を結合したが、しかしそれを活性化するには失敗した(Maisonpierreなど., *Science* 277: 55-60, 1997)。

【0028】

理論に拘束されるわけではないが、p68HER-2は占有するが、しかし活性化しないので、それはp185HER-2の二量体化を阻止することができた。類推によれば、HER-2は、RTKのその結合を増強するよう構築される場合、リン酸基転移及び受容体活性化のために必要とされる生産性二量体の形成を妨げ、それにより優性の負の効果をもつ(Orourkeなど., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3250-3255

, 1997)。

【0029】

HER-2 ECDに比較して、可溶性p68HER-2は、p185HER-2への強い結合性を示し、さらにまた、ECDのサブドメインI及びIIも含む。サブドメインIは低い親和性、すなわちヘテロマ - 複合体中へのp185HER-2の補充のために必要とされる種々のリガンド結合部位であるので (Tzaharなど., EMBO J. 16: 4938-4950, 1997)、p68HER-2は、この部位を阻止し、そしてそれにより、二量体中へのp185HER-2の補充を妨げる。他方では、p68HER-2は、p185HER-2への結合について特徴づけられていないリガンドと競争することができた。

【0030】

ヒト胎児肝臓及び腎臓におけるp68HER-2の組織 - 特異的発現は、p185HER-2がそれらの器官の進化の間、占有される程度を調節するよう機能することができる。さらに、HER-2遺伝子増幅による腫瘍細胞におけるp68HER-2に対してのp185HER-2の過剰発現 (図3) は、結合タンパク質、例えばp68HER-2の効果の克服に基づいての選択的圧力を通して生じ得た。従って、p68HER-2は、p185HER-2の活性化を妨げることができる天然に存在するp185HER-2結合タンパク質の第1の例である。

【0031】

医薬組成物：

本発明はさらに、(a) 少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、(b) C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド、(c) HER-2のECDに結合するモノクローナル抗体、及び(d) それらの組合せから成る群から選択された剤 (但し、モノクローナル抗体のみではあり得ない)、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る、HER-2を過剰発現する固形腫瘍を処理するための医薬組成物を提供する。

【0032】

好ましくは、前記は、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドである。最も好ましくは、前記剤は、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、及びHER-2のECEに結合するモノクローナル抗体の組み合わせである。

【0033】

本発明のポリペプチド及び/又はモノクローナル抗体のいずれか又は両者を含んで成る本発明の医薬組成物は、単独で(複合体又は組み合わせ)、又は適切なキャリアー及び賦形剤と共に混合されている医薬組成物の形で、患者に投与され得る。本発明のポリペプチドは、非経口的に、例えば静脈内注射又は注入、腹腔内注射、皮下注射又は筋肉内注射により投与され得る。本発明のポリペプチドは、錠剤、ピル、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー懸濁液及び同様のものを形成するために、キャリアー及び賦形剤と共に適切に配合することにより、経口又は直腸投与され得る。

【0034】

本発明のポリペプチドは、活性剤の適切な全身性レベルを達成するために、局部的に、例えば皮膚用パッチにより投与され得る。本発明のポリペプチドは、皮膚又は粘膜表面への局部適用に適切な局部クリーム、皮膚又は粘膜用パッチ、液体又はゲル中に配合される。本発明のポリペプチドは、HER-2の過剰発現により特徴づけられる癌の局部又は全身性処理のために呼吸気管への吸入により投与され得る。

【0035】

本発明への使用のために適切な本発明のポリペプチドの用量は、この開示から当業者により決定され得る。本発明のポリペプチドは、有効用量(活性剤の投与路及び薬物動力学に依存する)の本発明のポリペプチド、及び製剤の特定の投与路(すなわち、経口、非経口又は吸入)のために適切である適切な医薬キャリアー及び賦形剤を含むであろう。本発明の活性ポリペプチドは、混合、溶解、粒状化、糖剤製造、乳化、カプセル封入、封入又は凍結乾燥方法により、医薬剤中に混合される。非経口投与のための医薬製剤は、水溶性形での本発明のポリペプチドの水溶液を包含する。

【0036】

さらに、本発明のポリペプチドの懸濁液は、油状懸濁液として調製され得る。適切な親油性溶媒又はビークルは、脂肪油、例えばゴマ油、又は合成脂肪酸エステル、例えばエチルオレエート又はトリグリセリド又はリポソームを包含する。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘度を高める物質、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール又はデキストランを含むことができある。その懸濁液は任意には、より濃縮された溶液を可能にするために複合体又は組み合わせの溶解性を高めるための安定剤又は剤を含むことができる。

【0037】

経口投与のための医薬製剤は、活性化合物と、固体賦形剤、例えば糖（例えば、ラクトース、スクロース、マントニール又はソルビトール）、セルロース調製物（例えば、スターチ、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びナトリウムカルボキシメチルセルロース）、ゼラチン、ガム又はポリビニルピロリドンと組合すことによって得られる。さらに、粉碎剤及び安定剤が添加され得る。

【0038】

p68及び79個のアミノ酸のC末端領域の合成方法：_____

ポリペプチド合成は、ペプチドを合成するための製造業者の説明者に従って、ペプチド合成装置を通しての連続的アミノ酸構築によるポリペプチド合成のため一群の標準方法により行われる。好ましくは、100個以下のアミノ酸の短いポリペプチドは、ポリペプチドの連続的アミノ酸構築を通しての合成方法のために最良に適合される。さらに、異種ポリペプチドは、原核又は真核細胞のいずれかを形質転換し、それらの発現のための適切な増殖培地を提供し、そして次に、使用される細胞の型及びその発現特徴に依存して、培地又は細胞内含有物から本発明のポリペプチドを精製するために、標準の組換えDNA技法を用いて、形質転換された細胞により発現され得る。

【0039】

p68, 79個のアミノ酸のC末端領域及び組合せによる癌の処理方法：_____

本発明は、(a) 少なくとも 10° の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結

合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、(b)C末端の79個のアミノ酸が存在し、そして少なくとも3個のN-結合されたグリコシル化部位が存在する、配列番号2の配列から取られる約80~419個のアミノ酸を有する単離され、そしてグリコシル化されたポリペプチド、(c)HER-2のECDに結合するモノクローナル抗体、及び(d)それらの組合せから成る群から選択された、HER-2の細胞外ドメイン(ECD)に結合する剤(但し、モノクローナル抗体のみではあり得ない)を、投与することを含んで成る、HER-2又はHER-2変異体(例8を参照のこと)の過剰発現により特徴づけられる固形腫瘍を処理するための方法を提供する。

【0040】

好ましくは、HER-2を過剰発現する固形腫瘍は、乳癌、小細胞肺癌、卵巣癌及び結腸癌から成る群から選択される。好ましくは、前記剤は、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドである。最も好ましくは、前記剤は、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチド、及びHER-2のECDに結合するモノクローナル抗体の組合せである。

【0041】

本明細書に記載されるp68HER-2ポリペプチドは、HER-2に結合し、そしてキナーゼドメインを通してシグナルトランスダクションを妨げることが見出された。理論的ではないが、ユニークECDIIIaドメインは、p185HER-2への特異的結合を仲介し、そしてp68ECDIIIaとのその得られる相互作用は、p18HER-2の二量体化及び続くシグナルトランスダクションを妨げる。従って、p68HER-2は、シグナルトランスダクションのための必要な先行必要条件として二量体化を妨げることによりシグナルトランスダクションを妨げるためにHER-2アンタゴニストとして作用する。

【0042】

従って、HER-2アンタゴニストとしてのp68HER-2の機構は、結合剤、例えば本明細書に記載される79個のアミノ酸のポリペプチド、又はHER-2のECDに結合するモノクローナル抗体の機構とは異なる。本発明の方法は、p68HER-2が、選択的圧

力をそのような腫瘍細胞に提供することによって、HER-2を過剰発現する腫瘍における腫瘍細胞増殖を阻害することを提供する。同様に、結合剤であるHER-2アンタゴニストはまた、HER-2のECDへのリガンドの結合を妨げ、そして可能性ある二量体化の前でさえ、シグナルトランスダクションを妨げるために選択的圧力を、HER-2を過剰発現する腫瘍細胞に提供することによって、そのような腫瘍における腫瘍細胞を阻害する。

【0043】

標的化分子としての79個のアミノ酸のC末端領域の使用：

本発明はさらに、少なくとも 10^8 の親和性でHER-2の細胞外ドメインECDに結合する、配列番号1の配列から取られる約50~79個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドに、治療剤を結合することを含んで成る、HER-2の過剰発現により特徴づけられる固形腫瘍組織に治療剤を標的化するための方法を提供する。好ましくは、前記単離されたポリペプチドは、約69~79個の長さのアミノ酸である。

【0044】

好ましくは、前記単離されたポリペプチドは、Herceptin(商標)(癌の処理のために使用され、そしてECD又はHER-2に結合する市販のヒト型モノクローナル抗体)の結合の部位とは異なる、HER-2のECD上の部位に結合する。79個のアミノ酸のポリペプチド(配列番号1)が、HER-2のECDへの驚くべき高い結合親和性を示したことが発見された。さらに、そのような結合の部位は、市販のヒト型モノクローナル抗体(Herceptin(商標))の部位とは異なり、そしてその部位により影響されない。従って、その高い結合親和性は、HER-2を発現する腫瘍細胞への標的分子としてのその79個のアミノ酸ポリペプチドの機能を可能にする。

【0045】

診断/予後剤としての抗-p68抗体：

p68HER-2グリコシル化されたポリペプチドは、抗体生成のための抗原として発現され、そして使用された。特に、p68HER-2に対して特異的な抗体は、イントロンをコードされた新規C-末端又はp68HER-2、すなわちp185HER-2に高い親和性

で結合するドメインと同じである精製されたポリヒスチジン - 標的化されたECDIIIaペプチドを、ウサギに注射することによって調製された。単離されたポリクローナル抗体は、高い特異性で、pMの量のECDIIIaペプチド又はp68HER-2を検出した(図3及び5を参照のこと)。従って、p68HER-2に対して特異的な抗体は、診断技法、例えばELISA、免疫沈殿、免疫組織化学又はウェスタン分析を用いて、体液及び腫瘍組織におけるp68HER-2を検出するための診断剤として有用である。

【0046】

従って、本発明はさらに、(a)血液、血清、尿リンパ、唾液、腫瘍組織及びそれらの組み合わせから成る群から選択された体液を得；そして(b)ELISA、免疫沈殿、免疫組織化学及びウェスタン分析から成る群から選択された抗-p68HER-2抗体に基づくアッセイを用いて、発現されたp68HER-2の量を測定することを含んで成る、HER-2を過剰発現する腫瘍についての腫瘍処理の予後を決定するための方法を提供する。好ましくは、腫瘍処理の予後を決定するための方法はさらに、液体におけるp185HER-2 ECDの量を測定し、そしてp68HER-2の量とp185HER-2の量との間の比率を決定することを含んで成る。p68HER-2: p185HER-2の比が高いほど、処理予後は良好である。

【0047】

診断/予後剤としてのECDIIIa領域変異体：_____

例11は、イントロン8のヒト配列が多型性であることを示す。15個の異なった個人からのゲノムDNAの配列決定は、Her-2イントロン8内の10個の可変配列領域の同定をもたらした。配列番号10：図8；及び表1を参照のこと。配列番号10及び図8は、非保存性アミノ酸置換をもたらすであろう10種の異なった多型現象(Xにより示される)を有するイントロン8の最も共通するヌクレオチド配列を示す。

【0048】

例えば、残基#54(G C)での多型現象は、プロリン(P)とアルギニン(R)との置換をもたらすであろう。この図において位置1として企画されるN-末端グリシン(G)は、ヘルスタチン(herstatin)配列におけるアミノ酸残基341に

対応する (Dahertyなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA96: 10,869-10,874, 1999)。図1(A)に示されるヌクレオチド配列 (Dahertyなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA96: 10,869-10,874, 1999) は、図8に示される最も通常に検出される配列とは、アミノ酸残基#6及び#73で異なる多型現象形である。

【0049】

この結果は、ヒト集団において、ヘルスタチンタンパク質変異体間で、変更された生化学及び生物学的性質を導くイントロン-8コードのドメインにおいて、いくつかの変動性が存在することを示す。個人は中でも、2種の変異体に対して遺伝的にヘテロ接合性であり、所定の変異体に対してホモ接合性であり、又は二重変異体に対してホモ接合性であり得る。腫瘍の進行及び最適な処理の両者は、所定の個人において表される特定の変異体に依存して変化することができる。

【0050】

従って、本発明はさらに、(a)血液、血清、尿リンパ、唾液、腫瘍組織及びそれらの組み合わせから成る群から選択された体液を得；そして(b)ELISA、免疫沈殿、免疫組織化学及びウェスタン分析から成る群から選択された抗-p68HER-2変異体抗体に基づくアッセイを用いて、発現されたp68HER-2変異体の量を測定することを含んで成る、HER-2変異体を過剰発現する腫瘍についての腫瘍処理の予後を決定するための方法を提供する。

【0051】

好ましくは、腫瘍処理の予後を決定するための方法はさらに、液体におけるp185HER-2 ECDの量を測定し、そしてp68HER-2の量とp185HER-2の量との間の比率を決定することを含んで成る。p68HER-2: p185HER-2の比が高いほど、処理予後は良好である。好ましくは、腫瘍処理の予後を決定するための方法はさらに、特定のHER-2変異体が存在するかどうかを決定し、そしてヘルスタチンタンパク質変異体間でのいずれかの変更された生化学及び生物学的性質の観点から、腫瘍処理を最適化することを含んで成る。

【0052】

治療剤としてのp68HER-2: _____

理論的には知られていないが、p68HER-2又はECDIIaペプチドが、細胞表面でp

185HER-2に結合することによって、HER-2過剰発現する腫瘍細胞の増殖を阻害すると思われる。この仮説は、悪性増殖に関してp185HER-2過剰発現に依存するが、検出できるp68HER-2をほとんど又はまったく有さない細胞を用いて、p68HER-2の存在又は不在下で、細胞の足場独立性増殖を試験することによって試験された。軟寒天における細胞の足場独立増殖が、腫瘍細胞毒性のための予測モデルとして使用された。これは、形質転換活性を試験し、そして細胞の腫瘍形成及び腫瘍遺伝子潜在性に影響を及ぼすための通常で且つ予測的な方法である (DiForeなど., Science 237: 178-182, 1987; Hudziakなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7159-7163, 1987; 及びBaasnerなど., Oncogene 13: 901-911, 1996)。

【0053】

軟寒天における足場独立性増殖に対するp68HER-2の効果が、腫瘍形成性であり、そしてp185HER-2を過剰発現する、SKOV-3癌細胞及びHER-2トランスフェクトされた17-3-1細胞を用いて決定された。細胞が、p68HER-2の存在又は不在下で、ウシ胎児血清により補充された培地に懸濁され、そして保湿されたインキュベーターにおいて21日間、インキュベートされた。足場独立性増殖が、50個よりも多くの細胞を含むコロニーの数を計数することによって定量化された。図7は、p68HER-2の存在下で、SKOV-3細胞及び17-3-1細胞の足場独立性増殖が数倍、阻害されたことを示す。従って、それらのデータは、p68HER-2が細胞増殖抑制性のみならず、また細胞毒性且つたぶん、アポプトシス性であることを示す。

【0054】

実施例

例1:

この例は、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) を用いて、細胞外ドメイン (ECD) コード配列内のHER-2 mRNA変化を調べるために実験からの結果を提供する。SKOV-3細胞 (American Type Culture Collection (Rockville, MD) は、10%ウシ胎児血清及び0.05%ゲンタマイシンにより補充されたDMEMにおいて維持した)、すなわちHER-2遺伝子が8倍に増幅されている卵巣癌細胞 (Tysonなど., Am. J. Obstet. Gynecol. 165: 640-646, 1991) からのcDNAライブラリーを、ヌクレオチド142-161に対して同一のエキソン1に対して特異的な前方向プライマー (Talなど.,

Mol. Cell. Biol. 7: 2597-2601, 1987)、及びエキソン9におけるヌクレオチド1265 - 1286に対して相補的な逆方向プライマー (Scottなど., Mol. Cell. Biol. 13: 2247-2257, 1993) を用いて試験した。

【0055】

手短には、SKOV-3 cDNAライブラリーは、Origene Technologies, Inc. (Rockville, Md) により供給され、そしてSKOV-3細胞から抽出されたRNAから調製された。RNAを、全RNAを得るために、製造業者のプロトコールに従って、Triagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) により、15cmプレート上で80%の集密性まで増殖されたSKOV-3細胞から抽出した。RNAを、逆転写及びcDNAライブラリー構成のために、10mMのトリス - EDTA (pH8.0) に、又はリボヌクレアーゼ保護アッセイ (RPA) のために、RNAハイブリダイゼーション緩衝液 (80%ホルムアミド、40mMのPIPES、4mMのNaCl、1mMのEDTA, pH7.5) に再懸濁した。RNA濃度を、OD₂₆₀で分光光学的に決定した。ポリA⁺ mRNAを、mRNA抽出キット (Oligotex, Qiagen) を用いて、全RNAから選択した。

【0056】

サザンプロットによりHER-2-特異的であることが決定されている約1420bpの生成物は、前に記載されたcDNA配列からの1144bpの予測されるサイズよりも約270bp大きかった (Coussensなど., Science 230: 1132-1139, 1985)。手短には、サザンプロット方法は、0.4MのNaOHにおける真空 (Bio - Rad Model 785 Vacuum Blotter) 下でのアガロースゲルからの核酸を、Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane (NEN Research Products, Boston, MA) に移行した。

【0057】

核酸を、UV - Stratalinker (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) においてUV架橋することによって膜に固定し、そして膜を、42℃で2時間、ハイブリダイゼーション緩衝液 (50%のホルムアミド、5 × SSC、1% SDS、10mg/mlのニシン精子DNA) においてブロックした。膜を、Random Prime DNA Labelling Kit (Boehringer Mannheim) を用いて、(³²P)dCTPによりラベルされたECDIIIa cDNA (NEC Life Sciences) からの10⁷cpmの220bpのKpn - Hinc II フラグメントにより、ハイブリダイゼーション緩衝液において42℃で16時間、ハイブリダイズした。

【0058】

鋳型を、2.5mMのMgCl₂、5μMの個々のプライマー及び200μMのdNTPを含む1× High Fidelity PCR 緩衝液と共に、Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) を用いて、Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Cetus, Emeryville, CA) において増幅した。すべてのプライマーを、GIBCO BRL (Life Technologies) から得た。ヌクレオチド及びアミノ酸残基の番号付けは、Coussensなど. (Coussensなど., Science 230: 1132-1139, 1985)により報告されるHER-2 cDNA配列に従う。

【0059】

HER-2細胞外ドメインを、開始コドン(下線)に及ぶHER-R cDNAのヌクレオチド(nt)142-161と同一の前方向プライマー(A)(5'-TGAGCACCATGGAGCTGGC-3') (配列番号3)、及びnt1265-1286でHER-2エクソン配列に対して相補的である逆方向プライマー(B)(5'-TCCGGCAGAAATGCCAGGCTCC-3') (配列番号4)を用いて、SKOV-3 cDNAライブラリー(Origene Technologies, Inc.)からの増幅のために標的化した。

【0060】

サイクリングパラメーターは次の通りであった: 94、30秒; 58、45秒; 68、3分(30サイクル)。ゲノムDNAからの他の配列(ECDIIIaと称する)に及ぶ領域を、nt1131-1152でHER-2エクソン-特異的配列と同一の前方向はプライマー(C)(5'-AACACAGCGGTGTGAGAAGTGC-3') (配列番号5)、及び逆方向プライマー(B)(配列番号4)を用いて、Bandなど., FEBS Letters 367: 61-66, 1995により記載のようにして調製されたDNAに基づいて、次のサイクリングパラメーターにより増幅した: 94、30秒; 62、30秒; 72、60秒(25サイクル)。

【0061】

逆転写酵素-ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)を用いて、ECDIIIa配列を含むmRNAの構造を調べた。第1鎖cDNAを、0.5μgのオリゴdTにより感染された5μgのRNAを用いて、逆転写した(Bandなど., FEBS Letter 367: 61-66, 1995)。ECDIIIa挿入体及び隣接する5' HER-2エクソン配列を増幅するために、上記の前方向プライマー(A)、及び3' ECDIIIa-特異的配列に対して相補的である逆方

向プライマー (D) (5' -ATACCGGGACAGGTCAACAGC-3') (配列番号6)を使用した。サイクリングパラメーターは次の通りであった: 94、30秒; 60、40秒; 68、2分 (30サイクル)。

【0062】

ECDIIIa挿入体及び隣接する3' HER-2エキソン - 特異的配列の増幅を、5' ECDIIIa - 特異的配列と同一であり、そしてKpnI制限部位を含む前方向プライマー (E) (5' -TCTGGGTACCCACTCACTGC-3') (配列番号7)、及びnt3898-3919でHER-2エキソン配列に対して相補的であり、そして終結コドン (下線) まで及ぶ逆方向プライマー (F) (5' -TTCACACTTGGCACGTCCAGACC-3') (配列番号8)を用いて行った。サイクリングパラメーターは次の通りであった: 94、30秒; 60、40秒; 68、5分 (30サイクル)。

【0063】

PCR生成物をサブクローン化し、そしてヌクレオチド配列を決定した。その結果は、正常なHER-2コード配列が、5' プライマー配列で開始し、そしてヌクレオチド1171を通して中断しない連続したことを示した。この位置で、274個のヌクレオチド挿入体が見出され、続いて3' プライマー配列を包含する予測されるコード配列が見出された。予測されるタンパク質生成物の分析は、274個のヌクレオチド挿入体が、残基340で開始する既知のHER-2タンパク質の拡張部分をコードし (Cousseus など., Science 23: 1132-1139, 1985)、そしてその後、読み取り枠停止コドンの79個のアミノ酸を挿入していることを示した (図1)。

【0064】

挿入されたヌクレオチド及びそれらの予測されるアミノ酸配列と、Genbankにおける配列との比較は、相同性を示さなかった。規準からはずれた配列の5' 及び3' 結合部分の試験は、コンセンサスプライドナー及び受容体部位を示し (Sharp and Burge, Cell 91: 875-879, 1997)、そして挿入体配列の3' 末端近くにピリミジン及び可能性ある枝分かれ点アデニン残基を包含する (図1)。従って、挿入された配列はたぶんイントロンである。

【0065】

挿入された配列によりコードされる新規の79個のアミノ酸の予測されるアミノ

酸配列（配列番号1）の調査は、コンセンサスのN-結合されたグリコシル化部位及び19%の高いプロリン含有率を示す（図1）。挿入された配列は、それがp185HER-2配列の細胞外ドメインにおけるサブドメインII及びIII間の境界部分に位置するので、ECDIIIaと命名された（Laxなど., Mol. Cell. Biol. 8: 1831-1834, 1988）。その挿入体配列は、停止コドンが存在する、236ntのための隣接する5' HER-2エキソン配列と読み取り枠を整合して存在する。

【0066】

例2:

この例は、ゲノムにおけるHER-2エキソンと隣接するようなECDIIIaを特徴づける実験からの結果を提供する。ECDIIIaの配列の領域におけるHER-2遺伝子配列を調べるために、ヌクレオチド763 - 78と同一の前方向プライマー、及びHER-2 cDNAのヌクレオチド1265 - 1286に対して相補的な逆方向プライマーを、ヒトゲノムDNAに基づくPCRに使用した。増幅生成物は、エキソン5（Talなど., Mol. Cell. Biol. 7: 2597-2601, 1987）から、ECDIIIa配列のすぐ3'側に存在するエキソンまで及ぶことが予測された。イントロン数及び部位を、PCR生成物サイズ、制限消化物分析、及び増幅生成物の部分配列分析に基づいて評価した。

【0067】

次に、ヒトゲノムDNAを、ECDIIIa配列をすぐ端に有する配列を決定するために、挿入体を端に直接的に有するHER-2エキソン - 特異的プライマーを用いて試験した。約430bpの生成物を、正常なヒトゲノムDNAから、及びすべてはHER-2遺伝子増幅を有し、（Krausなど., EMBO J. 6: 605-610, 1987）そしてそれらのcDNAにおいてECDIIIaを発現することが見出されている、癌細胞系SKOV - 3、SKBR - 3及びBT474から抽出されたゲノムDNAから増幅した。

【0068】

HER-2としてのPCR生成物の正体を、例1に記載される方法を用いて、サザンプロット分析により確かめた。ヌクレオチド配列分析は、ヒトゲノムDNAからのPCR生成物が既知のHER-2コード配列をすぐ両端に有するECDIIIaの挿入体を含むことを示し；突然変異又は転位は見出されなかった。それらのデータは、ECDIIIa配列が完全に保持されたイントロン、たぶん、イントロン4に続いて増幅された生

成物のサイズ、及び相同EGFR遺伝子及びHER-3遺伝子におけるイントロン8の位置に基づいて、イントロン8を表すことを示す (Lee and Maihle, Oncogene 16: 3243-3252, 1998)。

【0069】

例3:

この例は、ECD111aがHER-2 mRNAのコード配列内の唯一の保持されたイントロンであることを示す。追加のイントロンがECD111a挿入体配列を含むmRNAに保持されるかどうかを決定するために、逆転写酵素 - ポリメラーゼ鎖反応 (RT - PCR) を用いた。最初に、開始コドンに及ぶ142 - 161での5' HER-2 cDNA配列と同一である前方向プライマー、及び3' ECD111a配列に対して相補的な逆方向プライマーを、SKBR-3及びSKOV-3 cDNAと共に使用した。

【0070】

生成物がイントロン8以外のイントロンを含まない場合に予測されるサイズである1.3kbの生成物を増幅した。次に、3' HER-2コード配列の増幅を、5' ECD111a配列と同一の前方向プライマー、及びp185HER-2停止コドンまで及ぶ、ヌクレオチド3898 - 3919での3' HER-2 cDNAに対して相補的な逆方向プライマーを用いて行った。追加のイントロンが保持されていない場合、HER-2 cDNAから予測されるサイズである、2.9kbの生成物を増幅した。

【0071】

制限消化物分析及びヌクレオチド配列決定による5' (1.3kb) 及び3' (2.9kb) 増幅生成物のさらなる特徴化は、追加の保持されたイントロンの不在を確かめた。イントロン配列が包含される場合、増幅される生成物のサイズを決定するために、ゲノムDNAを、5' コード配列のための約10kb及び3' コード配列のための5kbの生成物をもたらす、PCR反応のための鋳型として使用した。それらの結果は、274bpのイントロンの保持に起因する他のHER-2転写体が、5' 未翻訳 (5' UTR) 及び3' 未翻訳 (3' UTR) 領域が前に記載された約4.5kbのHER-2 cDNA (Cousens など., Science 230: 1132-1139, 1985) とサイズの的に同一である場合、約4.8kbのサイズであることが予測されることを示す。

【0072】

例4：

この例は、ECD111a配列を含むタンパク質の発現を示す。他の配列がタンパク質生成物に翻訳されるかどうかを評価するために、ECD111aの配列を、細胞においてポリヒスチジン - 標識化ペプチドとして発現し、ニッケル親和性クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、そして精製されたペプチドに対する抗血清を生ぜしめた。手短には、細菌発現ベクターを、プライマーE、及びECD111a挿入体配列の3'末端に対して相補的な逆方向プライマーを用いて、SKOV-3 cDNAライブラリーからのECD111a配列を増幅することによって調製した。

【0073】

逆方向プライマーは、BamHI制限部位配列を含み、そしてRPA（例1及び2に記載される）における鋳型構造のために使用されるものと同一であった。約280bpのPCR増幅生成物を、KpnI及びBamHIにより消化し、ゲル精製し（Qiaex II, Qiagen, Chatsworth, CA）、そして発現されたタンパク質のアミノ末端で6個のヒスチジン標識をコードするpET30aベクター中にクローン化した。得られる発現ベクター、すなわちpET-ECD111aを、細菌株BL21の形質転換のために使用した。

【0074】

ECD111aタンパク質生成物を発現するために、pET-ECD111a発現ベクターにより形質転換されたBL21細胞を、37℃で4時間、30 µg/mlのカナマイシンを含むLBブイヨンにおいて増殖した。発現を0.1mMのIPTGにより誘発し、そして収穫された細胞を音波処理により溶解し、そして次に、39,000 × gで20分間、遠心分離した。上清液を、Ni - NTAアガロース（Qiagen）上に、温室で60分間、振盪することによって吸収した。

【0075】

樹脂を、10体積の洗浄緩衝液（10mMのトリス（pH7.9）及び300mMのNaCl）、続いて50mMのイミダゾールを含む洗浄緩衝液10体積により洗浄した。His - 標識されたECD111aタンパク質を、250mMのイミダゾールを含む洗浄緩衝液に溶出した。ゲルのクーマシーブルー染色により約90%の純度であることが評価されたhis - 標識されたECD111aタンパク質を用いて、抗体を生成し、そして特徴づけた。

【0076】

手短には、抗 - ECDIIIa抗血清を、精製されたポリヒスチジン - 標識されたECD IIIaペプチド（下記に記載される）による2匹のウサギへの注射により、Cocalico Biologicals, Inc. (Reamstown, PA) に従って生成した。p185HER-2のアミノ酸残基151 - 165と同一のペプチドに対するポリクローナル抗 - neu (N) を生成した (Lin and Clinton, Oncogene 6: 639-643, 1991)。p185HER-2のカルボキシ末端の最後の15個の残基と同一のペプチドに対するポリクローナル抗 - neu (C) を製造した (Linなど., Mol. Cell. Endocrin. 69: 111-119, 1990)。2匹の免疫化されたウサギからの抗血清を特徴づけ、そしてそれは、精製されたECDIIIaのペプチドと反応する高力価の抗体を含むことが見出された。

【0077】

ウェスタンブロット分析は、他の配列をそのcDNAにおいて発現するSKBR - 3細胞が、抗 - ECDIIIa抗体と反応するタンパク質を生成するかどうかを試験した。細胞抽出物からの及び細胞外培地からの68kDaのタンパク質は、少なくとも20,000倍に希釈された、2匹の異なったウサギからの抗 - ECDIIIa抗体と反応したが、しかし前記免疫血清とは反応しなかった。他の転写体のcDNA配列（図1）の調査は、N - 末端p185HER-2配列におけるすべての5個のコンセンサスN - 結合されたグリコシル部位がグリコシル化される場合、65 - 70kDaの分泌されたタンパク質生成物を予測した (Sternなど., Mol. Cell. Biol. 6: 1729-1740, 1986)。

【0078】

68kDaのECDIIIaタンパク質（配列番号2）が他のHER-2 mRNAの翻訳生成物である場合、そのN - 末端残基は、p185HER-2のN - 末端の340個の残基と同一であるべきである。従って、SKBR-3細胞からの細胞抽出物を、HER-2のN - 末端配列に対する抗 - ペプチド抗体、抗 - neu (N) (Lin and Clinton, Oncogene 6: 639-643, 1991)、又は抗 - ECDIIIaにより免疫沈殿し、そして免疫複合体を、両抗体によるウェスタンブロット分析により試験した。

【0079】

手短には、3 ~ 5 μ lの抗血清を、核を除去するために遠心分離されている、M - RIPA緩衝液（1%のNonidet P-40, 50mMのトリス、pH7.4, 0.1%のナトリウムデオキシコレート、150mMのNaCl, 1mMのPMSF, 1%のアプロチニン）において調

製された細胞溶解物からの2mgのタンパク質に添加した。免疫沈殿を、Linなど、Mol. Cell. Endocrin. 69: 111-119, 1990に記載のようにして、4 で2時間振盪することにより行った。

【0080】

免疫複合体を、振盪しながら4 で1時間インキュベートすることによりタンパク質Gセファロース (Pharmacia) に結合し、遠心分離により集め、そしてM-RIPAにより4度、洗浄した。タンパク質を、SDS - PAGEサンプル緩衝液において95 で2分間、インキュベートすることにより免疫複合体から開放し、そして7.5%ゲルにおいてSDS-PAGEにより分解した (Mini-Protean II 電気泳動セル、Bio - Rad)。

【0081】

ウェスタンブロットを、SDS - PAGEに続いて行った。タンパク質を、25mMのトリス (pH8.3)、193mMのグリシン、50mMのNaCl、及び20%メタノールにより平衡化されたゲル (0.75mmの厚さ) 当たり15Vで20分間、半 - 乾燥トランスファー単位 (Bio - Rad) を用いて、ニトロセルロース (Trans-blot, Bio-Rad) 上に電気ブロットした。膜を、5%脱脂粉乳により25 で1時間ブロックした。

【0082】

次に、ブロットを一次抗体と共にインキュベートし、TBS - Tween (0.05% のTweenを含むトリス - 緩衝溶液) により、15分間2度、及び5分間4度、洗浄し、そして次に、TBS - Tweenにより1 : 10,000に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼ (Bio-Rad) に接合されたヤギ抗 - ウサギ二次抗体と共に40分間インキュベートした。二次抗体と共にインキュベートした後、膜を上記のようにして洗浄し、そして化学ルミネセンス試薬 (Pierce) と反応せしめ、そして次に、Kodak X-OMAT BLUフィルムに露光した。

【0083】

予測されるように、抗 - ECDIIIaが免疫沈殿及びウェルターンブロット分析のために使用される場合、p68HER-2を検出した。抗 - ECDIIIaが免疫沈殿のために使用され、そして抗 - neu (N) がウェスタンブロットにおいてプローブである場合、68kDaのタンパク質が検出され、これは、p68ECDIIIaがp185HER-2のN - 末

端配列を含むことを示す。さらに、抗 - neu (N) はp68HER-2を沈殿せしめ、これは、抗 - ECD111a抗体によりプローブすることにより検出された。それらの結果は、p68HER-2がECD111a、及びHER-2のN - 末端配列の両者を含むことを示す。

【0084】

いくつかの他の細胞系を、p68ECD111aの発現について試験した。それらのcDNAにECD111a配列を含む癌細胞系 (BT474, SKOV-3) はまた、p68HER-2を有した。試験されたいくつかの細胞系のうち、正常なヒト胚腎細胞に由来するHEK293細胞は、SKBR - 3細胞よりも約5 ~ 10倍、高い量で、細胞抽出物において、及び細胞外倍地において、最高レベルのp68ECD111aを発現した。p185HER-2を過剰発現する、試験された癌細胞系 (SKVR-3, SKOV-3及びBT474) に比較すれば、HER293細胞は約20倍低い量のp185HER-2を含んだ。

【0085】

従って、p185HER-2に対するp68HER-2の相対的割合は、研究された3種の癌細胞系においてよりもHEK293細胞において少なくとも100倍、高かった。P68HER-2との、及び特に、HEK293抽出物において明らかである約120kDaのタンパク質との反応性を、配列 - 特異的活性を示す、精製されたECD111aペプチドと共に抗血清プレインキュベーションによりブロックした。より大きなタンパク質は、p68HER-2の二量体であり得る。従って、p68HER-2を、いくつかの癌細胞系から発現し、そしてスクリーンし、そしてそれはHEK293において5 ~ 10倍の高レベルで存在する。

【0086】

例5:

この例は、ECD111aイントロ配列を含む他のHER-2転写体の発現を示す。RT-PCR分析の結果は、ECD111a配列が他の正常にサイズ分類されたHER-2 mRNA中に挿入されたことを示した。それらのデータは、約4.8kbの他の転写体を示唆する。他のECD111a転写体のサイズ及び発現を試験するために、ノザンプロット分析を、ECD111a - 特異的プローブを用いて行った。手短には、抗RNAプローブ分析のための鋳型を、全ECD111a挿入体配列に及び、そして隣接する5' HER-2エクソン配列を含む389bpの配列のPCR増幅により、SKOV-3 cDNAから構成した。

【0087】

nt 1131 - 1152でHER-2 cDNAと同一である前方向プライマーC (配列番号5)、及び3' BamHI制限エンドヌクレアーゼ部位を含み、そしてECD111a配列の3' スプライス部位まで及び配列に対して相補的である逆方向プライマー (5' -GCACGGATCCATAGCAGACTGAGGAGG-3') (配列番号9)を用いて、PCRを行った。次に、PCR生成物を、BamHIにより消化し、pBluescript SK (Stratagene) 中にクローン化される375bpのフラグメントを生成した。プラスミドを、m13前方向及び逆方向プライマーを用いて、Vollum Institute Core Sequencing Facility (Portland, OR) により配列決定した。

【0088】

完全なECD111a配列に対して、及び挿入体の5' 側の87ntのHER-2 エキソン配列に対して相補的なアンチセンスRNAプローブを、($-^{32}\text{P}$) CTP, T7 RNAポリメラーゼ及びT7/SP6 Riboprobe Synthesis System (Promega, Madison, WI) を用いて、1 μg の線状化された鋳型から転写した。このプローブは、ECD111a及び隣接するHER-2エキソン配列を含むmRNAによりハイブリダイズされる場合、370ntのフラグメントを保護し、そして十分にスプライシングされたHER-2 mRNAによりハイブリダイズされる場合、87ntのフラグメントを保護することが予測された。

【0089】

RNAハイブリッドを調製するために、30 μg のRNAを、約50,000cpmのアンチセンスRNAプローブにより48 時間で16時間ハイブリダイズした。RNAハイブリッドを、250mMのNaCl、5mMのEDTA及び10mMのトリス (pH7.5) の溶液において、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のRnaseA (Boehringer Mannheim) 及び2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のRnaseT1 (Life Technologies) により37 時間で30分間、消化した。20 μl の10%SDS中、プロテイナーゼK (100 μg) (Life Technologies) を添加し、消化を停止した。

【0090】

サンプルを、酸フェノール (pH4.5; Life Technologies) 及びクロロホルムにより抽出し、2体積の100%エタノールにより沈殿し、そして5 μl のRPAサンプル緩衝液 (88%のホルムアミド、10mMのEDTA, pH8.0, 1mg/mlのキシレンシアノール、及び1mg/mlのプロモフェノールブルー) に懸濁した。サンプルを95 度で10

分間、変性し、そしてTBE (89mMのトリス、89mMのボレ - ト、2 mMのEDTA, pH8.3) 中、5%のポリアクリルアミド/ウレアゲル上で電気泳動した。ゲルを真空下で乾燥し、そして保護されたフラグメントの定量化のためにホスホイメージャー分析にゆだねた (IP Lab Gel, Molecular Dynamics)。

【0091】

約4.8kbの他の転写体を、最高レベルのp68ECDIIIaを発現するHEK293細胞において検出した。しかしながら、他の転写体は、SKBR-3, BT474, 又はSKOV-3癌細胞系のノザンプロット分析により検出され得なかった。従って、より感受性のリボヌクレアーゼ保護アッセイ (RPA) を用いて、十分にスプライシングされた4.5 kbの転写体に対する前記他の転写体の発現レベルを試験した。検出レベルのp68ECDIIIaを含む、卵巣 (SKOV-3) 及び乳 (SKBR-3及びBT474) 癌細胞系、及び対照細胞系、すなわちHER-2 cDNAにより安定してトランスフェクトされた17-3-1からのRNAを、完全なECDIIIa (イントロン8) 配列及びイントロン8を端に有する5' HER-2エキソン配列まで及ぶアンチセンスの³²P - ラベルされたRNAプローブによりハイブリダイズした。

【0092】

RNAアーゼ消化、電気泳動及びオートラジオグラフィー処理に続いて、370個のヌクレオチドのバンドを個々の細胞系において検出したが、但し、ECDIIIa - 含有HER-2 mRNAにより保護された、予測されるサイズに対応する17-3-1を除く。さらに、87のヌクレオチドにより保護されたフラグメントを、すべての細胞において検出し、そしてそれは、正常な対照細胞系に比較して、それらの癌細胞において100倍以上、過剰発現される十分にスプライシングされたHER-2メッセージに関して予測されるサイズである (Krausなど., EMBO J. 6: 605-610, 1987)。

【0093】

個々の保護されたフラグメントの量を、p185HER-2 mRNAの百分率として表される、他の転写体の相対的量を評価するために、定量化し、そしてサイズについて標準化した。ECDIIIa挿入体を有する前記他のHER-2 mRNAは、SKOV-3における十分にスプライシングされた転写体のレベルの4.2%で存在し; SKBR - 3において5.4%で存在し; そしてBT474細胞において0.8で存在した。

【0094】

例6：

この例は、ECDIIIa挿入体を含む他の転写体がヒト胚腎臓及び肝臓において発現されたことを示す。ECDIIIa配列を含む他の転写体が正常なヒト組織において発現されるかどうかを試験するために、ノザンプロットを行った。ノザンプロットとして調製された種々のヒト胎児組織からのポリA⁺mRNAを、ユニークECDIIIa配列に対して特異的な、放射性ラベルされたプローブによりハイブリダイズした。4.8kbの転写体を腎臓において検出し、そして2.6kbの転写体を肝臓において検出した(図2)。

【0095】

前記4.8kbの転写体は274bpの挿入体を有する十分な長さの4.5kbの転写体にたぶん対応し、そして前記2.6kbの転写体は、274bpのECDIIIa挿入体を有する、前に記載された2.3kbの他の転写体(Yamamoto など., Nature 319: 230-234, 1996; 及びScottなど., Mol. Cell. Biol. 13: 2247-2257, 1993)に対応する。プロットが除かれ、そして5' HER-2コード配列に対して特異的なプローブによりハイブリダイズされる場合、4.8及び4.5kbのmRNAを表す広いバンドが胎児腎臓組織において検出され、そして切断された2.6kbの転写体が、肝臓において検出され、そのことは、それらの他の転写体がHER-2 ECDをコードする配列を含むことを示す。挿入されたECDIIIa配列は停止コドンを含むので、同じタンパク質生成物がそれらの個々のmRNAから生成され得る。

【0096】

いくつかの細胞系をまた、ノザンプロット分析により、ECDIIIa - 含有の他の転写体について調べた。4.8kbの他の転写体を、ヒト胚腎細胞系、すなわちHEK-293において検出した(図2)。ECDIIIa配列は、すべて、HER-2遺伝子増幅を含む、SKBR-3, BT474及びSKOV-3癌細胞系のRT-PCR分析により検出されたが、ECDIIIa含有の他の転写体はそれらの細胞のノザン分析により検出され得なかった。

【0097】

従って、より敏感なリボヌクレアーゼ保護アッセイ(RPA)が、完全なECDIIIa配列、及びECDIIIa配列を端に有する5' HER-2エキソン配列まで及ぶアンチセン

スプローブを用いて行われた。ECDIIIa挿入体を有する前記他のHER-2 mRNAを、SKOV-3及びBT474細胞において、十分にスプライシングされた転写体の5%以下で検出した。それらの発見は、ECDIIIa配列を含む2種の他の転写体が正常なヒト組織において組織 - 特異的態様で発現され、4.8kbの他の転写体がHEK - 293細胞系において発現され、そして遺伝子増幅による癌細胞が、4.5kbのHER-2転写体の5%以下で前記他の転写体の量を低めたことを示す。

【0098】

例7:

この例は、ECDIIIa配列を含むタンパク質の発現を示す。前記他の配列がタンパク質生成物中に翻訳されたかどうかを評価するために、細菌におけるポリヒスチジン - 標識されたペプチドとしてのECDIIIa配列を、発現し、そしてニッケル - 親和性クロマトグラフィーにより精製し、そして精製されたペプチドに対する抗血清を高めた。4.8kbのECDIIIa - 他の転写体を発現したHEK - 293細胞を、ウェスタン分析により、ECDIIIa - 含有タンパク質の発現について試験した。細胞抽出物及び細胞外培地からの68kDaのタンパク質は、抗 - ECDIIIa抗体と反応したが(図3)、しかし前記免疫血清とは反応せず、そして反応性は、前記抗血清と精製されたECDIIIaペプチドとのプレインキュベーションによりブロックされた(図3)。

【0099】

いくつかの細胞抽出物において検出された約125kDaの大きなタンパク質は、p68HER-2の凝集体であり得る。他の転写体のcDNA配列(図1)は、N - 末端のp185HER-2配列におけるすべての5個のコンセンサスN - 結合グリコシル化部位がグリコシル化される場合、65 - 70kDaの分泌されたタンパク質生成物を予測する(Sternなど., Mol. Cell. Biol. 6: 1729-1740, 1986)。いくつかの他の細胞系を、p68ECDIIIaの発現について試験した。それらのcDNAにECDIIIa配列を含む癌細胞系(BT474, SKOV-3, SKBR-3)はまた、検出できるレベルのp68HER-2を有した。

【0100】

例8:

この例は、p185HER-2に対するp68HER-2の発現が、HER-2遺伝子が増幅される癌

細胞系において著しく低められたことを示す。p68HER-2 mRNAは、HER-2遺伝子増幅を有する癌細胞系において、p185HER-2 mRNAよりも非常に低いレベルで発現されるので、いくつかの細胞系におけるp68HER-2及びp185HER-2タンパク質の相対的割合を、HER-2遺伝子増幅を伴って及びそれを伴わないで試験した。ウェスタンブロットを、調製し、そしてp68HER-2及びp185HER-2に対して特異的な抗血清によりプローブした。

【0101】

図4は、p185HER-2が、約8倍、増幅されたそれらのHER-2遺伝子を有する癌細胞系において容易に検出されたことを示す(Krausなど., EMBO J. 6: 605-610, 1987)しかしながら、p68HER-2においては、対応する上昇率は存在しなかった。比較すると、p68HER-2は、HEK-293, IOSEVAN及びHBL100非腫瘍形成細胞において検出される唯一のHER-2タンパク質であるが、但し、p185HER-2はそれらの細胞において非常に低いレベルで発現され(Krausなど., EMBO J. 6: 605-610, 1987)、そして過剰暴露されたブロットにおいて検出された。それらのデータは、p68HER-2がHER-2遺伝子増幅を有する癌細胞において、p185HER-2に比較した低い割合であることを示し、そしてある機能が、p185HER-2が過剰発現される場合、低レベルのp68HER-2を維持するために存在することを示唆する。

【0102】

例9:

この例は、p68HER-2及びECDIIIaペプチドがp185HER-2に特異的に結合することを示す。p68HER-2が分泌され、そして新規配列の他に、p185HER-2と同一のサブドメインI及びIIを含むので、p68HER-2がp185HER-2と相互作用できる可能性が調べられた。p185HER-2及びp68HER-2のN-末端に対する抗ペプチド抗体、すなわち抗-neu (N)、又はp185HER-2に対して特異的な抗体、すなわち抗-neu (C)を、低レベルのp68HER-2を発現し、そしてp185HER-2を過剰発現するSKBR-3癌細胞の免疫沈殿のために使用した。

【0103】

免疫沈殿された材料を、ウェスタンブロットとして調製し、そしてp68HER-2に対して特異的な抗-ECDIIIa及び抗-neu (C)によりプローブした。抗-neu (

N) は、p68HER-2及びp185HER-2の両者を免疫沈殿した(図5A)。さらに、p185HER-2のC-末端に対し特異的な抗体は、p185HER-2を免疫沈殿し、そしてp68HER-2を同時沈殿し(図5A)、これは、それらの2種のタンパク質間の相互作用を示す。

【0104】

ECDIIIa配列間の結合相互作用は非常に弱いので(Traharなど., EMBO J. 16: 4938-4950, 1997; Fitzpatrickなど., FEBS Letters 431: 102-106, 1998)、結合が新規のプロリンに富んでいるECDIIIaドメインにより付与され得る可能性を試験した。His-標識されたタンパク質として精製されたユニークな79個のアミノ酸ドメインを、ニッケルアガロース上に固定し、そしてプル-ダウンアッセイに使用した。対照に関しては、ECDIIIaに関係しない2種の精製されたHis-標識されたペプチド、すなわちウィルソン病膜タンパク質の600個の残基のフラグメント、及びCREBタンパク質のDNA結合ドメインを含む70個の残基のフラグメントを、同様に、ニッケルアガロース樹脂上に固定した。

【0105】

固定されたペプチドを、HER-2によりトランスフェクトされた3T3細胞(17-3-1)から調製されたタンパク質抽出物と共にインキュベートした。集中的な洗浄に続いて、結合されたタンパク質を溶出し、そしてp185HER-2に対して特異的な抗体によりプローブされたウェスタンブロットとして調製した。等量のHis-標識されたペプチド及び対照ペプチドを、1Mのイミダゾールによる溶出、及びSDS-ゲルにおける溶出された材料のクーマシー染色により確認されるように、樹脂に結合した。p185HER-2はペプチドを伴わないでも、又は対照ペプチドを伴っても樹脂により保持されないが、p185HER-2はECDIIIaペプチドにより選択的に保持された(図5B)。

【0106】

ECDIIIaドメインはプルダウンアッセイにおいてp185HER-2に結合したので、ECDIIIaドメインがp185HER-2を過剰発現する細胞に選択的に結合するかどうかの問題を試験した。これは、親3T3細胞に比較して、HER-2によりトランスフェクトされた17-3-1細胞の単層培養を用いて調べられた。細胞を、異なった濃度のHis-EC

DIIIaのペプチドと共にインキュベートし、洗浄し、そしてプロテアーゼインヒビターを含む変性緩衝液により抽出した。

【0107】

いずれかの結合されたペプチドを検出するために、細胞抽出物を、ECDIIIaに対して特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロット分析により試験した。さらに、等アリコートのエCDIIIaペプチド処理の細胞を、p185HER-2に対して特異的な抗体と、ウェスタンブロットとして反応せしめ、トランスフェクトされた17-3-1細胞におけるp185HER-2の過剰発現を示した。ECDIIIaペプチドはnM濃度で、損なわれていない17-3-1細胞に選択的に結合し(図5C)、ところがペプチドは等量の親3T3細胞に結合することはほとんど又はまったく見出されず、このことは、p185HER-2の細胞外ドメインとの特異的相互作用を示す。

【0108】

例10:

p185HER-2のチロシンリン酸化に対するp68ECDIIIa及びECDIIIaペプチドの効果を試験した。RTKのチロシンリン酸化は、リガンド活性化及びシグナルトランスダクションの初期徴候である。種々の量の精製されたECDIIIaペプチド、高レベルのp68HER-2を含むHEK293細胞からのならし培地(図2A)、又は検出できるp68HER-2を有さないSKOV-3細胞からの対照のならし培地により処理された17-3-1細胞におけるチロシンリン酸化を、試験した。His-ECDIIIa又は濃縮されたCMによる処理の10分後(図6)又は2時間後でのチロシンリン酸化シグナルの上昇は存在せず、このことは、p185HER-2が活性化されなかったことを示す。

【0109】

p68HER-2 - 含有CMもECDIIIaペプチドのいずれも、p185HER-2チロシンリン酸化レベルが低かったSKOV-3細胞からのp185HER-2に対応するリン酸化シグナルを検出できるほど変化しなかった。さらに、p68HER-2及びECDIIIaペプチドは、17-3-1細胞抽出物から免疫沈殿されたp185HER-2のインビトロ自己-リン酸化活性に対する認識できる効果を有さなかった。それらの結果は、p68HER-2がp185HER-2シグナルトランスダクションを活性化しなかった結論を支持する。

【0110】

例 1.1 :

この例は、イントロン 8 の配列が多型性であることを示す。他方ではヒトHER-2遺伝子のイントロン 8 は、mRNAに保持され、そしてp185HER-2の細胞ドメインの一部のC - 末端で新規の79 - 残基ドメインをコードする。保持されたイントロンを有する他の転写体の生成物、すなわち“ヘルスタチン”は、HER-2腫瘍遺伝子の自己インヒビターとして機能する。イントロン 8 をコードするドメインは、単独で、p185HER-2にnMの親和性で結合することが示されている (Dohertyなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10,869-10,874, 1999)。

【 0 1 1 1 】

さらに、HER-2遺伝子におけるイントロン 8 のヌクレオチド及び推定されるアミノ酸配列の多型現象を、15人の異なった個人からのゲノムDNAを配列決定することによって同定した。図 8 及び配列番号10は、非保存性アミノ酸置換をもたらす10の異なった多型現象 (Xにより示される) を有するイントロン 8 の最も共通するヌクレオチド配列を示す。例えば、残基 # 54での多型現象 (G C) は、プロリン (p) に代わるアルギニン (R) の置換をもたらす。

【 0 1 1 2 】

この図において位置 1 として示されるN - 末端グリシン (G) は、ヘルスタチン配列におけるアミノ酸残基341に対応する (Doheryなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10,869-10,874, 1999)。図 1 (A) に示されるヌクレオチド配列は、図 8 に示される最も共通して検出される配列とは、アミノ酸残基 # 6 及び # 73 で異なる多型性である。

この結果は、ヒト集団において、ヘルスタチンタンパク質変異体間で、変更された生化学的及び生物学的性質を導く、イントロン - 8 コードのドメインにいくつかの変動が存在することを示す。いくつかの同定された変異体が表 1 に要約されている。

【 0 1 1 3 】

【表 1】

表 1

	X(4)	X(14)	X(17)	X(47)	X(54)	X(62)	X(106)	X(161)	X(191)	X(217)
変異体1	T									
変異体2		C								
変異体3			T							
変異体4				A						
変異体5					A					
変異体6						C, T, A				
変異体7							A			
変異体8								G		
変異体9									T	
変異体10										C
変異体11			T							C

【 0 1 1 4 】

表 1 : ヒト集団 (15人の異なった個人に基づく) に見出されたイントロン - 8 コードのドメインにおける配列変異体。図 8 に示される最も共通する DNA 配列に見出される塩基変化に対しての特定の X 位置での塩基変化を示す配列変異体 1-10 が列挙される。個々の X の後の括弧の数は、図 8 に示される DNA 配列における位置に対応する。

【 0 1 1 5 】

ここに列挙される DNA 配列は、次の通りに、配列番号 1 の可変性アミノ酸位置 (“ Xaa ”) に対応し : X(4) 対 Xaa(2); X(14) 対 Xaa(5); X(17) 対 Xaa(6); X(47) 対 Xaa(16); X(54) 対 Xaa(18); X(62) 対 Xaa(21); X(106) 対 Xaa(36); X(161) 対 Xaa(54); X(191) 対 Xaa(64); X(217) 対 Xaa(73); そして次の通りに、配列番号 2 の可変性アミノ酸位置に対応する : X(4) 対 Xaa(342); X(14) 対 Xaa(345); X(17) 対 Xaa(346); X(47) 対 Xaa(356); X(54) 対 Xaa(358); X(62) 対 Xaa(361); X(106) 対 Xaa(376); X(161) 対 Xaa(394); X(191) 対 Xaa(404); X(217) 対 Xaa(413)。

【0116】

配列番号1における可変性アミノ酸位置に対する特定のアミノ酸変化(図8の最も共通するDNA配列に対しての)は、次の通りである:変異体1、Xaa(2)(Thr Ser);変異体2、Xaa(5)(Leu Pro);変異体3、Xaa(6)(Pro Leu);変異体4、Xaa(16)(Leu Gln);変異体5、Xaa(18)(Met Leu);変異体6、Xaa(21)(Gly);変異体7、Xaa(36)(Leu Ile);変異体8、Xaa(54)(Pro Arg);変異体9、Xaa(64)(Pro Leu);及び変異体10、Xaa(73)(Asp Asn)。同じ置換が、配列番号2におけるその対応する可変性アミノ酸位置に適用される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANTS: Clinton, Gail and Doherty, Joni Kristin
- (ii) TITLE OF INVENTION: HER-2 BINDING ANTAGONISTS
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 10
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
 - (A) ADDRESSEE: DAVIS WRIGHT TREMAINE
 - (B) STREET: 1501 Fourth Avenue, 2600 Century Square
 - (C) CITY: Seattle
 - (D) STATE: Washington
 - (E) COUNTRY: U.S.A.
 - (F) ZIP: 98101
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
 - (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: PC compatible
 - (C) OPERATING SYSTEM: Windows95
 - (D) SOFTWARE: Word
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: to be assigned
 - (B) FILING DATE: 19 January 2000
 - (C) CLASSIFICATION:
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 - (A) NAME: Oster, Jeffrey B.
 - (B) REGISTRATION NUMBER: 32,585
 - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 49321-1
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
 - (A) TELEPHONE: 206 628 7711
 - (B) TELEFAX: 206 628 7699

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 79
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: HER-2 ECD antagonist
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: variable amino acid positions (Xaa)

(B) LOCATION: POSITIONS 2, 5, 6, 16, 18, 21, 36, 54, 64, 73

(C) IDENTIFICATION METHOD: sequence comparison of genomic DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

```
Gly Xaa His Ser Xaa Xaa Pro Arg Pro Ala Ala Val Pro Val Pro Xaa
      5              10              15
Arg Xaa Gln Pro Xaa Pro Ala His Pro Val Leu Ser Phe Leu Arg Pro
      20              25              30
Ser Trp Asp Xaa Val Ser Ala Phe Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Pro Leu
      35              40              45
Ser Pro Thr Ser Val Xaa Ile Ser Pro Val Ser Val Gly Arg Gly Xaa
      50              55              60
Asp Pro Asp Ala His Val Ala Val Xaa Leu Ser Arg Tyr Glu Gly
      65              70              75
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 419

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: polypeptide

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: variable amino acid positions (Xaa)

(B) LOCATION: POSITIONS 2, 5, 6, 16, 18, 21, 36, 54, 64, 73

(C) IDENTIFICATION METHOD: sequence comparison of genomic DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
      5              10              15
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Cys Lys
      20              25              30
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
      35              40              45
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
      50              55              60
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
      65              70              75
Gln Gly Tyr Val Leu Cys Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
      80              85              90              95
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
      100             105             110
```

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Agn Agn Thr Thr Pro
115 120 125
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140
Leu Thr Glu Cys Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
160 165 170 175
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190
His Pro Cys Ser Pro Cys Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
240 245 250 255
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Cys Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Lys Leu
290 295 300
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
320 325 330 335
Pro Cys Ala Arg Val Gly Xaa His Ser Xaa Xaa Pro Arg Pro Ala Ala
340 345 350
Val Pro Val Pro Xaa Arg Xaa Gln Pro Xaa Pro Ala His Pro Val Leu
355 360 365
Ser Phe Leu Arg Pro Ser Trp Asp Xaa Val Ser Ala Phe Tyr Ser Leu
370 375 380
Pro Leu Ala Pro Leu Asp Pro Thr Ser Val Xaa Ile Ser Pro Val Ser
385 390 395
Val Gly Arg Gly Xaa Asp Pro Asp Ala His Val Ala Val Xaa Leu Ser
400 405 410 415
Arg Tyr Glu Gly

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 19
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: unknown

- (ii) MOLECULE TYPE: oligonucleotide
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

TGAGCACCAT GGAGCTGGC 19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 22
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: oligonucleotide
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

TCCGGCAGAA ATGCCAGGCT CC 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 22
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: oligonucleotide
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

AACACAGCGG TGTGAGAAGT GC 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 21
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: oligonucleotide
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

ATACCGGGAC AGGTCAACAG C 21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 20
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: oligonucleotide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

TCTGGGTACC CACTCACTGC 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: oligonucleotide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

TTCACACTGG CACGTCCAGA CC 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 27
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: oligonucleotide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

GCACGGATCC ATAGCAGACT GAGGAGG 27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 240 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

GGT WCC CAC TCA CYG CYC CCG AGG CCA GCT GCA GTT CCT GTC CCT CWG
Gly Thr His Ser Leu Pro Pro Arg Pro Ala Ala Val Pro Val Pro Leu
5 10 15

CGC ATR CAG CCT GNC CCA GCC CAC CCT GTC CTA TCC TTC CTC AGA CCC
Arg Met Gln Pro Gly Pro Ala His Pro Val Leu Ser Phe Leu Arg Pro
20 25 30

TCT TGG GAC MTA GTC TCT GCC TTC TAC TCT CTA CCC CTG GCC CCC CTC
Ser Trp Asp Leu Val Ser Ala Phe Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Pro Leu
35 40 45

AGC CCT ACA AGT GTC CST ATA TCC CCT GTC AGT GTG GGG AGG GGC CYG
Ser Pro Thr Ser Val Pro Ile Ser Pro Val Ser Val Gly Arg Gly Pro
50 55 60

GAC CCT GAT GCT CAT GTG GCT GTT SAC CTG TCC CGG TAT GAA GGC TGA
Asp Pro Asp Ala His Val Ala Val Asp Leu Ser Arg Tyr Glu Gly
65 70 75

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、HER-2の細胞外ドメインにおける挿入体のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。エキソン1-9(プライマーA及びB)からの配列をコードするHER-2 ECDを、SKOV-3細胞からのcDNAライブラリーからのPCRにより増幅した。約1420bpの生成物は、サザンブロット分析によりHER-2-特異的であることが見出された。この生成物をサブクローン化し、そしてヌクレオチド配列を決定した。パネルAにおいては、274bpの挿入体(ボックスの外側)についての及びボックスに封入される隣接する5'及び3'配列についてのヌクレオチド配列が示される。挿入体を、Coussensなど。(Science 230: 1132-1139, 1985)の番号付けを用いて、ヌクレオチド残基1171及び1172と、p185HER-2における次のアミノ酸残基340との間に配置する。矢印でのコンセンサス5'及び3'スプライス部位は、太字で示される。挿入された配列は、5' HER-2エキソン配列と読み取り枠を整合して存在し、そしてArg 340(R³⁴⁰)に続いて79個のアミノ酸の延長をコードすることが推定される。挿入体によりコードされる新規の79個のアミノ酸配列は、プロリンに富んでおり(19%)、そして下線が引かれているコンセンサスのアスパラギン結合グリコシル化部位を有する。停止コドンは、挿入された配列内のヌクレオチド236-238に見出された。パネルBにおいては、他の転写体の予測される生成物は、p185と同一のサブドメインI及びIIを含み、そしてトランスメンブランドメイン及び細胞質ドメインを欠いている切断され、分泌されたタンパク質である。十分にグリコシル化される場合、その予測されるサイズは、60-70kDaである。このポリペプチド生成物は、p68HER-2として言及される。従って、生成物は、p185HER-2に見出されるトランスメンブランドメイン及び細胞質ドメインを欠いている切断され、分泌されたタンパク質であろう。

【図2】

図2は、ノザンブロット分析による、ECDIIIa配列を含む他のHER-2転写体の検出を示す。異なったヒト胎児組織(Clontech)からの、又はHEK-293細胞から単離されたポリA⁺ mRNA(2.5 µg)を、ホルマリンアガロースゲルにおいて分解し、そして10×SSCにおけるBrightStar(商標)膜(Ambion)に移行した。膜を、ECDIIIa配列に対して相補的な³²P-ラベルされたアンチセンスRNAプローブによりハイブリダイズし、除き、そして5' HER-2エキソン配列に対して特異的な³²P-

ラベルされたcDNAプローブにより再プローブした。膜を、高い緊縮条件下で洗浄し、そしてホスホリメーキング (Molecular Dynamics) により分析した。

【図3】

図3は、ヒト胚腎細胞系 (HEK293) における約68kDaのタンパク質との抗 - ECD IIIaの配列 - 特異的反応性を示す。細胞抽出物タンパク質 (20 μ g)、及びHER-293細胞により条件づけられた培地20 μ lを、ウェスタンブロットし、そして1:10,000に希釈された抗 - ECD IIIa (レーン1及び2) により、又は50 μ g/mlの精製された、His - 標識されたECD IIIaペプチドを含む1 : 10,000に希釈された抗 - ECD IIIa (レーン3及び4) によりプローブした。

【図4】

図4は、p68ECD IIIa発現に対するp185HER-2の発現が、HER - 2 遺伝子が増幅されている癌細胞系において著しく高められることを示す。ヒト胚腎細胞系 (HEK293)、非腫瘍形成卵巣表面上皮細胞系 (IOSEVAN)、HER-2遺伝子増幅を有する卵巣癌細胞系 (SKOV-3)、非腫瘍形成乳上皮細胞系 (HBL100)、及びHER-2遺伝子増幅を有する乳癌細胞系 (BT474及びSKBR-3) からの細胞抽出物 (15 μ gのタンパク質) を、7.5%アクリルアミドゲルにおけるSDS - PAGEにより分解し、そしてウェスタンブロットとして分析した。ウェスタンブロットを、p68HER-2 (抗 - ECD IIIa) 及びp185HER-2 (抗 - neu(C)) に対して特異的な抗体によりプローブした。

【図5】

図5は、p68ECD IIIaがp185HER-2に結合することを示す。パネルAにおいては、非変性緩衝液により抽出されたSKBR-3細胞2mgを、p68HER-2及びp185HER-2のN - 末端配列に対して特異的な抗 - neu(N) 5 μ l、又はp185HER-2のC - 末端に対して特異的な抗 - neu(C) 5 μ lにより免疫沈殿せしめ、そして次に、p68HER-2に対して特異的な抗 - ECD IIIa、及びp185HER-2に対して特異的な抗 - neu(C)によりウェスタンブロットとしてプローブした。パネルBにおいては、100 μ gの17-3-1細胞を、200 μ lの洗浄緩衝液 (20mMのトリス、pH8.0、300mMのNaCl) において、20 μ gのHis-標識されたECD IIIa又は20 μ gのHis - 標識されたCREBフラグメントに結合された、50 μ lのパックされたNiNTAアガロース (Qiagen) と共に、室温で1時

間、振盪しながら、二重反復してインキュベートした。次に、樹脂を、500 μ lの洗浄緩衝液により4度、洗浄し、そしてタンパク質を、50 μ lのSDS - サンプル緩衝液と共に100 で2分間インキュベートすることにより溶離した。溶離されたタンパク質を、p185HER-2のC - 末端に対する抗体、すなわち抗 - neu (C) を用いて、ウェスタンブロット分析により分析した。パネルCにおいては、12ウェルプレートにおける、約 10^5 個の3T3細胞又はHER-2トランスフェクトされた17-3-1細胞の単層を、PBSにより2度、洗浄し、そして次に、1%のBSA及び39, 75, 150及び300nMの精製された組換えHis - 標識されたECDIIIaを含む血清フリー培地0.5mlと共に、4 で2時間インキュベートした。細胞を、1%のBSAを含むPBSにより1度、及びPBSにより2度、洗浄し、そして次に、変性緩衝液により抽出した。等アリコート (20 μ gのタンパク質) を、ECDIIIaに対して特異的な抗体 (抗 - ECDIIIa)、又はp185HER-2に対して特異的な抗体 (抗 - neu (C)) (上方のパネル) によりウエスタンブロットすることにより分析した。

【図6】

図6は、p68に富んでいるならし培地又はECDIIIaペプチドのいずれも、p185HER-2のチロシンリン酸化を刺激しないことを示す。約 10^5 個のHER-2トランスフェクトされた17-3-1細胞の単層培養物を、PBSにより2度、洗浄し、血清フリーの培地において37 で24時間インキュベートし、そして次に、75又は150 μ MのHis - 標識されたECDIIIaにより、又は高いレベルのp68を分泌するHEK - 293細胞からの50 \times CM又は検出できるp68HER-2を有さないSKOV-3細胞からの50 \times CMにより10分間、処理した。その処理された細胞を、ホスホチロシンホスファターゼインヒビターバナデート (2mM) を含む変性緩衝液により抽出し、そして個々のサンプルからの20 μ /mlの細胞抽出物タンパク質を、ホスホチロシン (Sigma) に対するモノクローナル抗体によるウエスタンブロットにより分析した。プロットを、62.5mMのトリス (pH6.7)、2%のSDS及び100mMの2 - メルカプトエタノールにおいて55 で30分間インキュベートすることにより除き、そして次に、p185HER-2に対して特異的な抗 - neu (C) により再プローブした。

【図7】

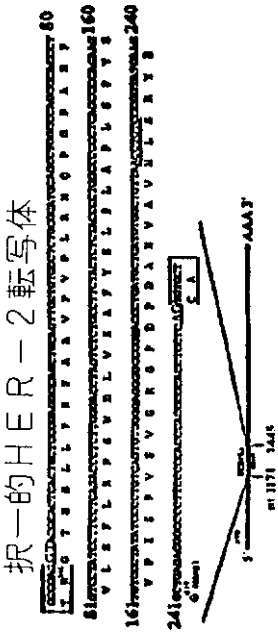
図7は、p68HER-2が腫瘍形成細胞の足場独立性増殖を阻害したことを示す。SK

OV-3卵巣癌細胞及びHER-2によりトランスフェクトされた17-3-1細胞を、SKOV-3細胞（検出できるp68HER-2を含まない（- p68CM））により条件づけられた、50倍に濃縮された培地、又はHEK-293細胞（20nMのp68HER-2を含む（+ p68CM））により条件づけされた、50倍に濃縮された培地を添加された、10%ウシ胎児血清含有の0.3%寒天（対照条件）を含む培地に懸濁した。10³個の細胞を、12ウェルプレートにおける0.5%アガロース含有培地の0.5ml層上に、個々の実験条件のために三重反復してプレートした。示される結果を、21日間のインキュベーションで計数された、三重反復ウェルにおいて50個以上を有するコロニーの数の平均及び標準偏差としてプロットする。類似する結果を、3回の別々の実験において観察した。

【図8】

図8は、HER-2イントロン8のヌクレオチド及び推定されるアミノ酸配列を示す。ヒトゲノムDNAを、イントロン8を端に有するプライマーを用いてのPCRにゆだねた。PCRパラメーターは次の通りであった：94、1分；62、1分；72、30分（30サイクル）、続いて72、7分（1サイクル）。410bpの生成物をゲル精製し、そして前方向及び逆方向に配列決定した。示される配列は、約15人の異なる個人からのイントロン8内に見出される最も共通する配列である。アミノ酸置換をもたらす配列変動の位置は、Xにより示される。

A ECD IIIa 配列を含む
択一のHER-2 転写体



R ECD IIIa HER-2 遺伝子生成物



p185 HER-2 遺伝子生成物



Figure 1

【図2】

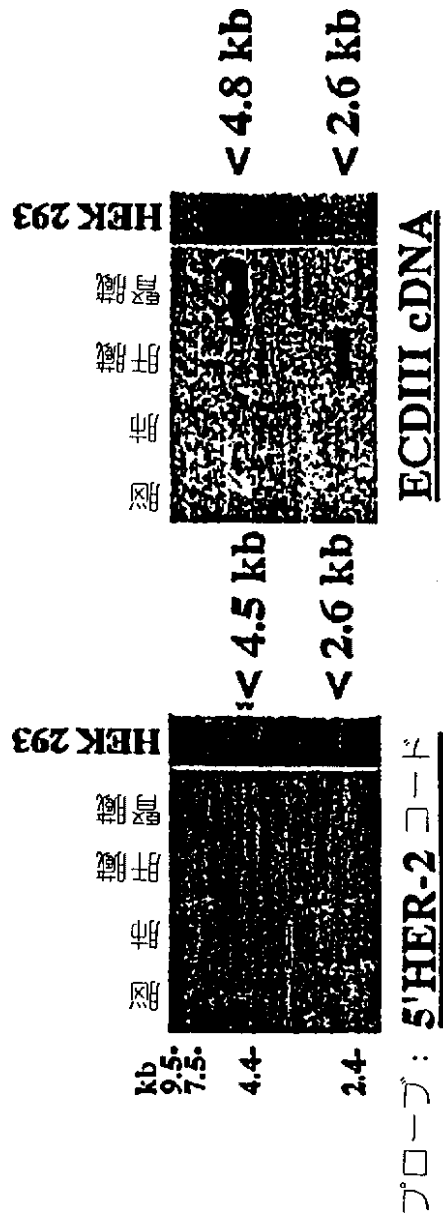


Figure 2

【図3】



Figure 3

【図4】

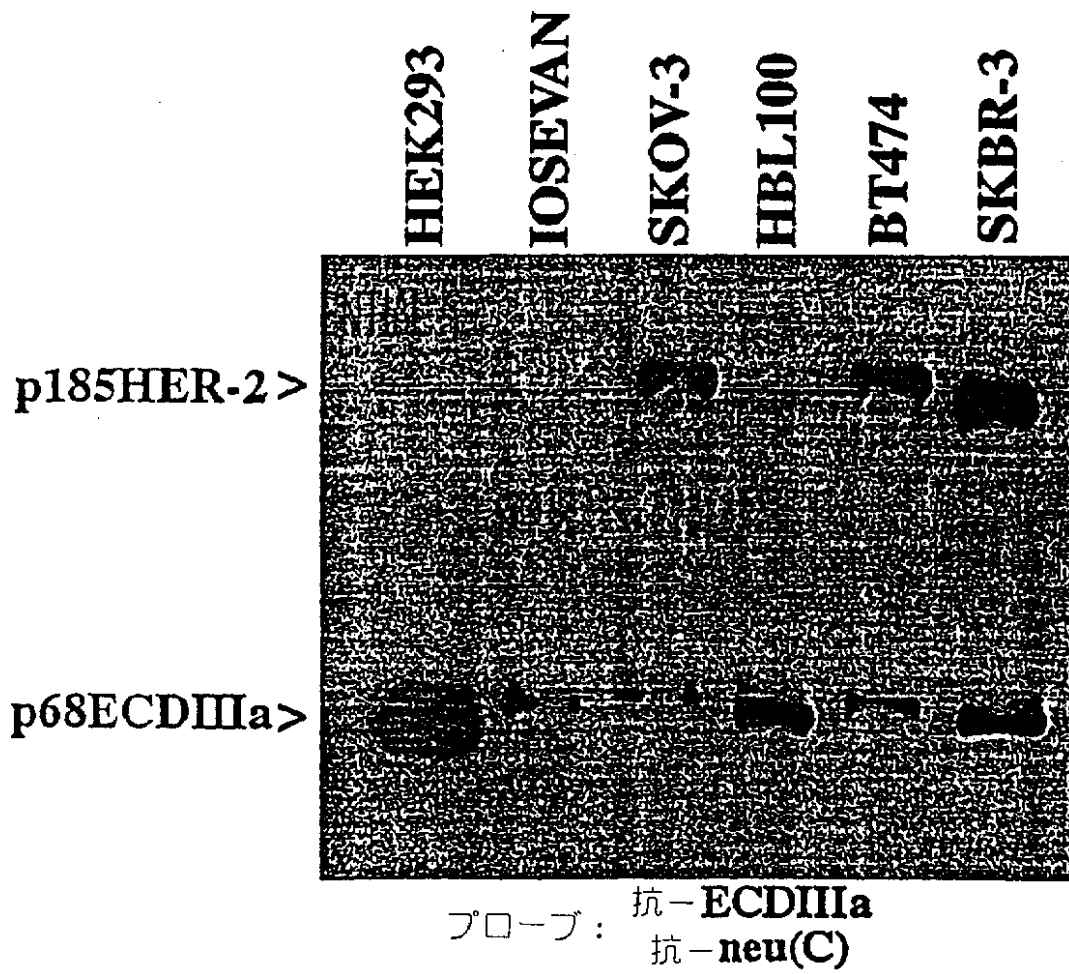


Figure 4

【図5】

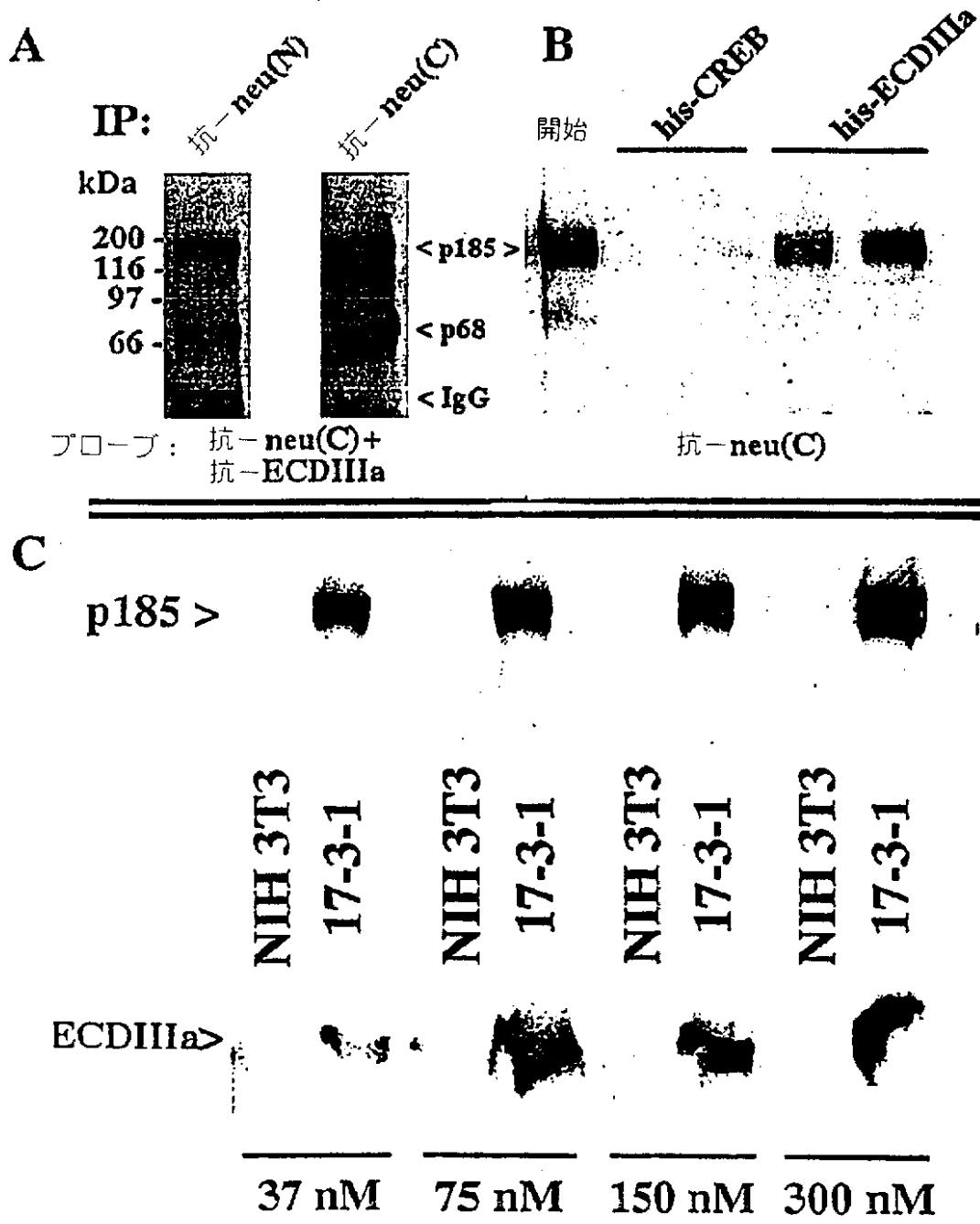


Figure 5

【図6】

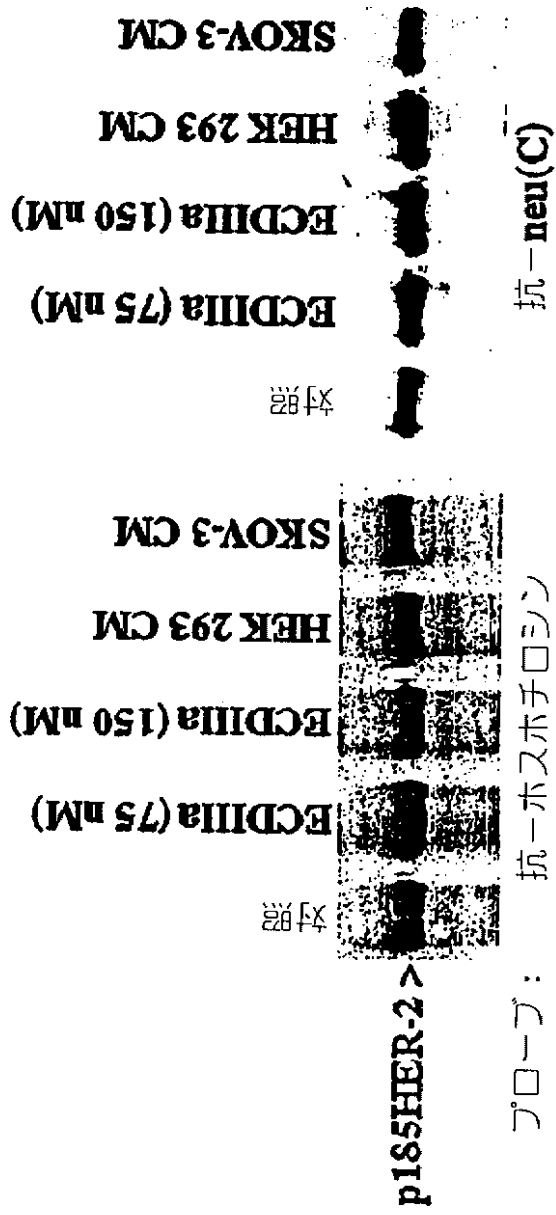


Figure 6

【図7】

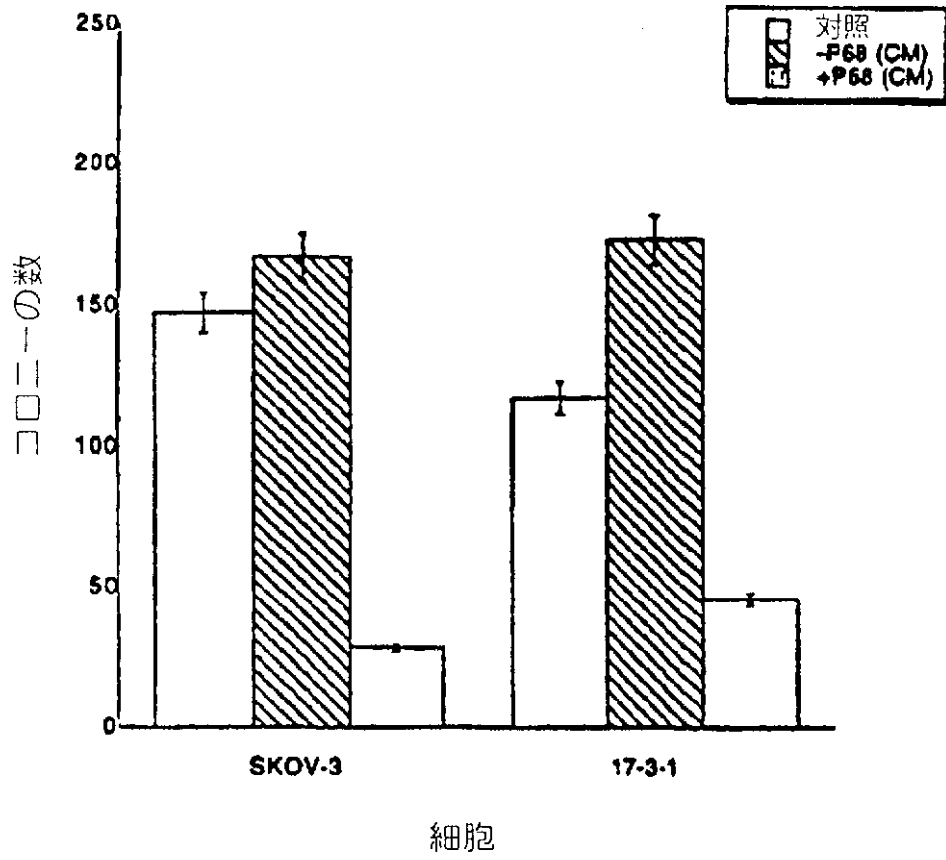


Figure 7

HER-2イントロン8多型現象

1 G T H S L P P R P A A V P V P L R M Q P G
 1 GGTACCCACTCACTGCCCGAGGCCAGCTGCAGTTCCTGTCCCTCTGGCATGCAGCCCTGGC
 X X X X X X X
 22 P A H P V L S F L R P S W D L V S A F Y S
 64 CCAGCCACCCTGTCCCTATCCCTCAGACCCTCTTGGGACCTAGTCTCTGCCTTCTACTCT
 X
 43 L P L A P L S P T S V P I S P V S V G R G
 127 CTACCCCTGGCCCTCAGCCCTACAAGTGTCCCTATATCCCTGTCAAGTGTGGGAGGGGC
 X
 64 P D P D A H V A V D L S R Y E G stop 80
 190 CCGGACCCTGATGCTCATGTGGCTGTGACCTGTCCCGGTATGAAGGCTGA 240
 X

Figure 8

【手続補正書】

【提出日】平成13年12月11日(2001.12.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0116】

配列番号1における可変性アミノ酸位置に対する特定のアミノ酸変化(図8の最も共通するDNA配列に対しての)は、次の通りである:変異体1、Xaa(2)(Thr Ser);変異体2、Xaa(5)(Leu Pro);変異体3、Xaa(6)(Pro Leu);変異体4、Xaa(16)(Leu Gln);変異体5、Xaa(18)(Met Leu);変異体6、Xaa(21)(Gly);変異体7、Xaa(36)(Leu Ile);変異体8、Xaa(54)(Pro Arg);変異体9、Xaa(64)(Pro Leu);及び変異体10、Xaa(73)(Asp Asn)。同じ置換が、配列番号2におけるその対応する可変性アミノ酸位置に適用される。

<配列表>

SEQUENCE LISTING

<110> Oregon Health Sciences University

<120> HER-2 BINDING ANTAGONISTS

<130> B016484

<140> PCT/US00/01484

<141> 2000-01-20

<150> US 09/234,208

<151> 1999-01-20

<160> 10

<210> 1

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> Variable

<222> 2

<223> Applicants herein disclose Thr and Ser sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 5

<223> Applicants herein disclose Leu and Pro sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 6

<223> Applicants herein disclose Pro and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 16

<223> Applicants herein disclose Leu and Gln sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 18

<223> Applicants herein disclose Met and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 21

<223> Applicants herein disclose Gly, Asp, Ala and Val sequence variants

at this position

<220>

<221> Variable

<222> 36

<223> Applicants herein disclose Leu and Ile sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 54

<223> Applicants herein disclose Pro and Arg sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 64

<223> Applicants herein disclose Pro and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 73

<223> Applicants herein disclose Asp and Asn sequence variants at this position

<400> 1

Gly Xaa His Ser Xaa Xaa Pro Arg Pro Ala Ala Val Pro Val Pro Xaa

5

10

15

Arg Xaa Gln Pro Xaa Pro Ala His Pro Val Leu Ser Phe Leu Arg Pro

20

25

30

Ser Trp Asp Xaa Val Ser Ala Phe Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Pro Leu

35

40

45

Ser Pro Thr Ser Val Xaa Ile Ser Pro Val Ser Val Gly Arg Gly Xaa

<222> 358

<223> Applicants herein disclose Met and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 361

<223> Applicants herein disclose Gly, Asp, Ala and Val sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 376

<223> Applicants herein disclose Leu and Ile sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 394

<223> Applicants herein disclose Pro and Arg sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 404

<223> Applicants herein disclose Pro and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 413

<223> Applicants herein disclose Asp and Asn sequence variants at this position

<400> 2

<223> HER-2-specific oligonucleotide primer

<400> 3

tgagcaccat ggagctggc 19

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HER-2-specific oligonucleotide primer

<400> 4

tccggcagaa atgccaggct cc 22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HER-2 cDNA-specific oligonucleotide primer

<400> 5

aacacagcgg tgtgagaagt gc 22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HER-2 ECDIIIa-region-specific oligonucleotide primer

<400> 6

ataccgggac aggtcaacag c 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HER-2 ECDIIIa-region-specific oligonucleotide primer

<400> 7

tctgggtacc cactcactgc 20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HER-2 exon-specific oligonucleotide primer

<400> 8

ttcacactgg cacgtccaga cc 22

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HER-2 cDNA-specific oligonucleotide primer

<400> 9

gcacggatcc atagcagact gaggagg 27

<210> 10

<211> 240

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> Variable

<222> 62

<223> Applicants disclose C, T, A and G variants at this position

<400> 10

ggt wcc cac tca cyg cyc ccg agg cca gct gca gtt cct gtc cct 45

Gly Xaa His Ser Xaa Xaa Pro Arg Pro Ala Ala Val Pro Val Pro

5 10 15

cwg cgc atr cag cct gnc cca gcc cac cct gtc cta tcc ttc ctc 90

Xaa Arg Xaa Gln Pro Xaa Pro Ala His Pro Val Leu Ser Phe Leu

20 25 30

aga ccc tct tgg gac mta gtc tct gcc ttc tac tct cta ccc ctg 135

Arg Pro Ser Trp Asp Xaa Val Ser Ala Phe Tyr Ser Leu Pro Leu

35 40 45

gcc ccc ctc agc cct aca agt gtc cst ata tcc cct gtc agt gtg 180

Ala Pro Leu Ser Pro Thr Ser Val Xaa Ile Ser Pro Val Ser Val

50 55 60

ggg agg ggc cyg gac cct gat gct cat gtg gct gtt sac ctg tcc 225

Gly Arg Gly Xaa Asp Pro Asp Ala His Val Ala Val Xaa Leu Ser

65 70 75

cgg tat gaa ggc tga 240

Arg Tyr Glu Gly

【手続補正書】

【提出日】平成14年6月3日(2002.6.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0116】

配列番号1における可変性アミノ酸位置に対する特定のアミノ酸変化(図8の最も共通するDNA配列に対しての)は、次の通りである:変異体1、Xaa(2)(Thr

Ser) ; 変異体 2、Xaa(5)(Leu Pro); 変異体 3、Xaa(6)(Pro Leu): 変異体 4、Xaa(16)(Leu Gln) ; 変異体 5、Xaa(18)(Met Leu); 変異体 6、Xaa(21)(Gly) ; 変異体 7、Xaa(36)(Leu Ile) ; 変異体 8、Xaa(54)(Pro Arg) : 変異体 9、Xaa(64)(Pro Leu); 及び変異体10、Xaa(73)(Asp Asn)。同じ置換が、配列番号 2 におけるその対応する可変性アミノ酸位置に適用される。

<配列表>

SEQUENCE LISTING

<110> Oregon Health Sciences University

<120> HER-2 BINDING ANTAGONISTS

<130> B016484

<140> PCT/US00/01484

<141> 2000-01-20

<150> US 09/234,208

<151> 1999-01-20

<160> 10

<210> 1

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> Variable

<222> 2

<223> Applicants herein disclose Thr and Ser sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 5

<223> Applicants herein disclose Leu and Pro sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 6

<223> Applicants herein disclose Pro and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 16

<223> Applicants herein disclose Leu and Gln sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 18

<223> Applicants herein disclose Met and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 21

<223> Applicants herein disclose Gly, Asp, Ala and Val sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 36

<223> Applicants herein disclose Leu and Ile sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 54

<223> Applicants herein disclose Pro and Arg sequence variants at this position

osition

<220>

<221> Variable

<222> 64

<223> Applicants herein disclose Pro and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 73

<223> Applicants herein disclose Asp and Asn sequence variants at this position

<400> 1

Gly Xaa His Ser Xaa Xaa Pro Arg Pro Ala Ala Val Pro Val Pro Xaa

1 5 10 15

Arg Xaa Gln Pro Xaa Pro Ala His Pro Val Leu Ser Phe Leu Arg Pro

20 25 30

Ser Trp Asp Xaa Val Ser Ala Phe Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Pro Leu

35 40 45

Ser Pro Thr Ser Val Xaa Ile Ser Pro Val Ser Val Gly Arg Gly Xaa

50 55 60

Asp Pro Asp Ala His Val Ala Val Xaa Leu Ser Arg Tyr Glu Gly

65 70 75

<210> 2

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> Variable

<222> 342

<223> Applicants herein disclose Thr and Ser sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 345

<223> Applicants herein disclose Leu and Pro sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 346

<223> Applicants herein disclose Pro and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 356

<223> Applicants herein disclose Leu and Gln sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 358

<223> Applicants herein disclose Met and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 361

<223> Applicants herein disclose Gly, Asp, Ala and Val sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 376

<223> Applicants herein disclose Leu and Ile sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 394

<223> Applicants herein disclose Pro and Arg sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 404

<223> Applicants herein disclose Pro and Leu sequence variants at this position

<220>

<221> Variable

<222> 413

<223> Applicants herein disclose Asp and Asn sequence variants at this position

<400> 2

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Cys Lys

20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His

35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr

50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val

65 70 75 80

tccggcagaa atgccaggct cc	22
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HER-2 cDNA-specific oligonucleotide primer	
<400> 5	
aacacagcgg tgtgagaagt gc	22
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HER-2 ECDIIIa-region-specific oligonucleotide primer	
<400> 6	
ataccgggac aggtcaacag c	21
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HER-2 ECDIIIa-region-specific oligonucleotide primer	
<400> 7	
tctgggtacc cactcactgc	20
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>

<223> HER-2 exon-specific oligonucleotide primer

<400> 8

ttcacactgg cacgtccaga cc

22

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HER-2 cDNA-specific oligonucleotide primer

<400> 9

gcacggatcc atagcagact gaggagg

27

<210> 10

<211> 240

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> Variable

<222> 62

<223> Applicants disclose C, T, A and G variants at this position

<400> 10

ggt wcc cac tca cyg cyc ccg agg cca gct gca gtt cct gtc cct cwg 48

Gly Xaa His Ser Xaa Xaa Pro Arg Pro Ala Ala Val Pro Val Pro Xaa

1

5

10

15

cgc atr cag cct gnc cca gcc cac cct gtc cta tcc ttc ctc aga ccc 96

Arg Xaa Gln Pro Xaa Pro Ala His Pro Val Leu Ser Phe Leu Arg Pro

20

25

30

tct tgg gac mta gtc tct gcc ttc tac tct cta ccc ctg gcc ccc ctc 144

Ser Trp Asp Xaa Val Ser Ala Phe Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Pro Leu

35 40 45
agc cct aca agt gtc cst ata tcc cct gtc agt gtg ggg agg ggc cyg 192
Ser Pro Thr Ser Val Xaa Ile Ser Pro Val Ser Val Gly Arg Gly Xaa
50 55 60
gac cct gat gct cat gtg gct gtt sac ctg tcc cgg tat gaa ggc tga 240
Asp Pro Asp Ala His Val Ala Val Xaa Leu Ser Arg Tyr Glu Gly
65 70 75

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/01484
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : 424/277.1; 536/23.1; 435/325, 320.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/277.1; 536/23.1; 435/325, 320.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,783,186 (ARAKAWA et al.) 21 July 1998, col 1-3.	24-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
B earlier document published on or after the international filing date		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*g* document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 03 JULY 2000	Date of mailing of the international search report 11 JUL 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>Jayne Bridgers</i> JENNIFER E. NICHOLS, NEE HUNT Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/01484

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The claims recite SEQ ID NO's, but the application is not in compliance with sequence rules.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/01484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

A61K 39/00; C07H 21/02, 21/04; C12N 15/00, 15/09, 15/63, 15/70, 15/74, 5/00, 5/02

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
	1/19	G 0 1 N	33/50	G
	1/21			R
	5/10		33/53	B
G 0 1 N	33/50		33/566	
			33/577	B
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566	A 6 1 K	37/02	
	33/577	C 1 2 N	5/00	A
(72)発明者	クリントン,ゲイル エム. アメリカ合衆国,オレゴン 97201,ポ- トランド,サウスウエスト ビ-バ-トン アベニュー 3040			
(72)発明者	エ-デルマン,ジョン ピ-. アメリカ合衆国,オレゴン 97201,ポ- トランド,サウスウエスト ミツチエル ストリート 2433			
F タ-ム(参考)	2G045 AA26 CA25 CA26 CB01 CB03 CB07 DA12 DA13 DA14 DA36 DA44 FB02 FB03 FB05 FB09 JA20 4B024 AA01 BA80 CA04 DA02 GA11 4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA19 BA20 BA23 MA01 NA14 ZB262 ZC412 4C085 AA14 CC32 EE01 GG01 4H045 AA10 AA30 BA10 BA53 CA40 EA28 EA51 FA72 FA73 FA74			

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2002534995A5	公开(公告)日	2007-11-15
申请号	JP2000595705	申请日	2000-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康科学大学		
申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康科学大学		
当前申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康科学大学		
[标]发明人	ドハーティジョニクリスティン クリントンゲイルエム エーデルマンジョンピー		
发明人	ドハーティ,ジョニ クリスティン クリントン,ゲイル エム. エーデルマン,ジョン ピー.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577 A61K38/00 C12N5/10		
CPC分类号	A61K39/39558 A61K38/00 C07K14/71 A61P35/00 A61K2300/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.T A61P35/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/50. G G01N33/50.R G01N33/53.B G01N33/566 G01N33/577.B A61K37/02 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA44 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB09 2G045/JA20 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	09/234208 1999-01-20 US		
其他公开文献	JP2002534995A		

摘要(译)

(a) 具有约50-79个氨基酸的分离的多肽，该多肽取自SEQ ID NO : 1的序列，以至少108的亲合力与HER-2的胞外域ECD结合，(b) 分离物，其具有选自SEQ ID NO : 2的序列的约80-419个氨基酸，其中存在C端79个氨基酸，并且存在至少3个N-连接的糖基化位点，以及选自糖基化多肽的试剂，(c) 与HER-2的ECD结合的单克隆抗体，和(d) 它们的组合，尽管不一定是单独的单克隆抗体，和公开了一种用于治疗过度表达HER-2的实体瘤的药物组合物，其包含药学上可接受的载体。