

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-131015

(P2010-131015A)

(43) 公開日 平成22年6月17日(2010.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 B 10/00 (2006.01)	A 6 1 B 10/00 T	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 6 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 B O 6 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 102 O L 外国語出願 (全 116 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-293524 (P2009-293524)
 (22) 出願日 平成21年12月24日 (2009.12.24)
 (62) 分割の表示 特願2004-536115 (P2004-536115) の分割
 原出願日 平成15年9月5日 (2003.9.5)
 (31) 優先権主張番号 60/410,166
 (32) 優先日 平成14年9月11日 (2002.9.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 デービス, デビッド ピー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
 06, サン ブルーノ, チェスナット
 アベニュー 473

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の診断と治療のための組成物と方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 哺乳動物における腫瘍の存在を検出することができ、腫瘍性細胞成長を効果的に阻害することがそれぞれできる更なる診断及び治療薬を提供する。

【解決手段】 正常な非癌細胞の一又は複数のタイプと比較して、癌細胞の一又は複数のタイプでより多く発現される様々な細胞性ポリペプチド(及びそれらのコード核酸又はその断片)。該ポリペプチドは、腫瘍関連キナーゼポリペプチド(「TASK」ポリペプチド)と呼ばれ、哺乳動物における癌の治療と診断の効果的な標的となることが期待される。また、腫瘍関連抗原性標的ポリペプチド又はその断片(「TASK」ポリペプチド)をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列；

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列；又は

(d) (a)、(b)、(c) の相補鎖；

に対して少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

10

【請求項 2】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列；又は

(d) (a)、(b)、(c) の相補鎖；

を含んでなる単離された核酸。

【請求項 3】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列；

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列；又は

(d) (a)、(b)、(c) の相補鎖；

にハイブリダイズする単離された核酸。

20

【請求項 4】

ストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションが生じる、請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の核酸を含む発現ベクター。

30

【請求項 6】

ベクターを用いて形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に連結する、請求項 5 に記載のベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 8】

CHO 細胞、大腸菌細胞又は酵母細胞である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

ポリペプチドの産生方法において、請求項 7 に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

40

【請求項 10】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 11】

50

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列;

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列;

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列;

を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 1 2】

異種ポリペプチドに融合した請求項 1 0 に記載のポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチド。

【請求項 1 3】

前記異種ポリペプチドが免疫グロブリンの Fc 領域又はエピトープタグ配列である、請求項 1 2 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 1 4】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列;

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列;

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列;

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 1 5】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列;

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列;

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列;

を含んでなるポリペプチドに特異的に結合する、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

モノクローナル抗体である、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

抗体断片である、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

キメラ又はヒト化抗体である、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 9】

成長阻害剤にコンジュゲートさせた、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

細胞毒性剤にコンジュゲートさせた、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

細胞毒性剤が毒素である、請求項 2 0 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の抗体。

【請求項 2 4】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 2 2 に記載の抗体。

10

20

30

40

50

- 【請求項 25】
細菌中で産生される、請求項 14 に記載の抗体。
- 【請求項 26】
CHO 細胞中で産生される、請求項 14 に記載の抗体。
- 【請求項 27】
結合する細胞の死を誘導する、請求項 14 に記載の抗体。
- 【請求項 28】
検出可能に標識される、請求項 14 に記載の抗体。
- 【請求項 29】
請求項 14 に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。 10
- 【請求項 30】
ベクターを用いて形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に連結する、請求項 29 に記載の核酸を含む発現ベクター。
- 【請求項 31】
請求項 30 に記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。
- 【請求項 32】
CHO 細胞、大腸菌細胞又は酵母細胞である、請求項 31 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 33】
抗体の産生方法において、請求項 31 に記載の宿主細胞を、前記抗体の発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記抗体を回収することを含んでなる方法。 20
- 【請求項 34】
(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；
(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；
(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列；
に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する単離されたオリゴペプチド。 30
- 【請求項 35】
(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；
(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；
(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列；
を含んでなるポリペプチドに結合する請求項 34 に記載のオリゴペプチド。 40
- 【請求項 36】
成長阻害剤にコンジュゲートさせた、請求項 34 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 37】
細胞毒性剤にコンジュゲートさせた、請求項 34 に記載のオリゴペプチド。 40
- 【請求項 38】
毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項 37 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 39】
細胞毒性剤が毒素である、請求項 37 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 40】
毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項 39 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 41】 50

毒素がメイタンシノイドである、請求項 39 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 42】

結合する細胞の死を誘導する、請求項 34 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 43】

検出可能に標識される、請求項 34 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 44】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する T A S K 結合有機分子。

【請求項 45】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列；

を含んでなるポリペプチドに結合する、請求項 44 に記載の有機分子。

【請求項 46】

成長阻害剤にコンジュゲートさせた、請求項 44 に記載の有機分子。

【請求項 47】

細胞毒性剤にコンジュゲートさせた、請求項 44 に記載の有機分子。

【請求項 48】

毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項 47 に記載の有機分子。

【請求項 49】

細胞毒性剤が毒素である、請求項 47 に記載の有機分子。

【請求項 50】

毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項 49 に記載の有機分子。

【請求項 51】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 49 に記載の有機分子。

【請求項 52】

結合する細胞の死を誘導する、請求項 44 に記載の有機分子。

【請求項 53】

検出可能に標識される、請求項 44 に記載の有機分子。

【請求項 54】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列；

(c) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列；

(d) (a)、(b)、(c) の相補鎖；

に対して少なくとも 80% の配列同一性を有する核酸に結合する T A S K 結合干渉 RNA (s i R N A)。

10

20

30

40

50

【請求項 5 5】

請求項 5 4 に記載の s i R N A を含んでなる発現ベクター。

【請求項 5 6】

前記 s i R N A がベクターが形質移入された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に結合する、請求項 5 5 に記載の発現ベクター。

【請求項 5 7】

請求項 5 6 に記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 8】

担体との組み合わせで、(a) 請求項 1 0 に記載のポリペプチド、(b) 請求項 1 2 に記載のキメラポリペプチド、(c) 請求項 1 4 に記載の抗体、(d) 請求項 3 4 に記載のオリゴペプチド、又は(e) 請求項 5 4 に記載の s i R N A、又は(e) 請求項 4 4 に記載の T A S K 結合有機分子を含有する物質の組成物。

10

【請求項 5 9】

前記担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項 5 8 に記載の物質の組成物。

【請求項 6 0】

(a) 容器と、(b) 前記容器内に含まれる請求項 5 8 に記載の物質の組成物を含む、製造品。

【請求項 6 1】

癌の治癒的処置又は診断的検出のための前記物質の組成物の用途に言及する、前記容器に貼付されたラベル、又は前記容器内に収容されたパッケージ挿入物を更に含んでなる、請求項 6 0 に記載の製造品。

20

【請求項 6 2】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

に対して少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを発現する癌細胞の成長を阻害する方法であって、前記癌細胞を、前記癌細胞中の前記ポリペプチドに結合する抗体、オリゴヌクレオチド、s i R N A、オリゴペプチド、又は有機分子に接触させて、前記癌細胞の成長を阻害する方法。

30

【請求項 6 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記抗体が抗体断片である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記抗体、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチド、s i R N A 又は有機分子を成長阻害剤にコンジュゲートさせた、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記抗体、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチド、s i R N A 又は有機分子を細胞毒性剤にコンジュゲートさせた、請求項 6 2 に記載の方法。

40

【請求項 6 8】

毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

細胞毒性剤が毒素である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 0】

毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項 6 9 に記載の方法。

50

- 【請求項 7 1】
毒素がメイタンシノイドである、請求項 6 9 に記載の方法。
- 【請求項 7 2】
細菌中で産生される、請求項 6 2 に記載の方法。
- 【請求項 7 3】
C H O 細胞中で産生される、請求項 6 2 に記載の方法。
- 【請求項 7 4】
前記癌細胞が放射線治療又は化学療法薬に更にさらされる、請求項 6 2 に記載の方法。
- 【請求項 7 5】
前記癌細胞が、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、腎臓癌細胞、肺癌細胞、卵巣癌細胞、中枢神経系癌細胞、肝臓癌細胞、膀胱癌細胞、膵臓癌細胞、子宮頸癌細胞、メラノーマ細胞及び白血病細胞からなる群から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。 10
- 【請求項 7 6】
前記癌細胞が、同一組織由来の正常細胞と比較して上記ポリペプチドを過剰発現する、請求項 6 2 に記載の方法。
- 【請求項 7 7】
(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；
(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列； 20
に対して少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを発現する細胞を含む腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、前記ポリペプチドに結合する治療的有効量の抗体、オリゴペプチド (s i R N A) 又は有機分子を前記哺乳動物に投与して、前記哺乳動物を効果的に治療する方法。
- 【請求項 7 8】
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 7 7 に記載の方法。
- 【請求項 7 9】
前記抗体が抗体断片である、請求項 7 7 に記載の方法。
- 【請求項 8 0】
前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項 7 7 に記載の方法。 30
- 【請求項 8 1】
前記抗体、オリゴペプチド、s i R N A 又は有機分子を成長阻害剤にコンジュゲートさせた、請求項 7 7 に記載の方法。
- 【請求項 8 2】
前記抗体、オリゴペプチド、干渉 R N A (s i R N A) 又は有機分子を細胞毒性剤にコンジュゲートさせた、請求項 7 7 に記載の方法。
- 【請求項 8 3】
毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項 8 2 に記載の方法。
- 【請求項 8 4】
細胞毒性剤が毒素である、請求項 8 2 に記載の方法。 40
- 【請求項 8 5】
毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項 8 4 に記載の方法。
- 【請求項 8 6】
毒素がメイタンシノイドである、請求項 8 4 に記載の方法。
- 【請求項 8 7】
前記抗体が細菌中で産生される、請求項 7 7 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】
前記抗体が C H O 細胞中で産生される、請求項 7 7 に記載の方法。 50

【請求項 89】

前記腫瘍が放射線治療又は化学療法薬に更にさらされる、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 90】

前記腫瘍が、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、中枢神経系腫瘍、肝臓腫瘍、膀胱腫瘍、膵臓腫瘍又は子宮頸腫瘍である、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 91】

ポリペプチドを含んでいることが疑われる試料中のポリペプチドの存在を決定する方法であって、前記ポリペプチドが、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有し、前記ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド、siRNA、オリゴヌクレオチド又は有機分子に前記試料をさらし、前記試料中の前記ポリペプチドに対する前記抗体、オリゴペプチド、siRNA、オリゴヌクレオチド又は有機分子の結合を決定することを含む方法。

【請求項 92】

前記試料が前記ポリペプチドを発現することが疑われる細胞を含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記細胞が癌細胞である、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子を検出可能に標識する、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 95】

哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法において、前記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料中と同一の組織由来の既知の正常細胞のコントロール試料中において、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出し、コントロール試料と比較して、試験試料中の前記ポリペプチドのより高い発現レベルが、試験試料が得られた哺乳動物中における腫瘍の存在を示している方法。

【請求項 96】

前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出する工程が、インサイツハイブリダイゼーション又は RT-PCR 分析においてオリゴヌクレオチドを用いることを含む、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出する工程が、免疫組織化学分析において抗体を用いることを含む、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 98】

哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法において、前記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料を、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；又は

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する抗体、

10

20

30

40

50

オリゴペプチド又は有機分子に接触させ、試験試料中の前記抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は有機分子と前記ポリペプチドの間の複合体の生成を検出することを含み、複合体の生成が前記哺乳動物中における腫瘍の存在を示している方法。

【請求項 99】

前記抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は有機分子を検出可能に標識する、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

組織細胞の前記試験試料を、癌性腫瘍を有することが疑われる個体から得る、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 101】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4) 又は図 6 (配列番号 6) に示されたアミノ酸配列；又は

(b) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3) 又は図 5 (配列番号 5) に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドの発現又は活性の増加に関連する細胞増殖性疾患を治療又は予防する方法であって、有効量の T A S K ポリペプチドアンタゴニストを、治療を必要とする患者に投与することを含み、好ましくは細胞増殖性疾患が癌である方法。

【請求項 102】

前記アンタゴニストが抗 T A S K ポリペプチド抗体、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K s i R N A、T A S K 結合有機分子又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 101 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

発明の分野

本発明は、哺乳動物における腫瘍の診断と治療に有用な物質の組成物と、同用途のために該物質の組成物を使用する方法に関する。

【0002】

発明の背景

悪性腫瘍（癌）は、合衆国において心臓疾患に続き第 2 の主要な死亡原因である（Boring 等, CA Cancel J. Clin. 43:7(1993)）。癌は、正常な組織から誘導されて腫瘍塊を形成する異常な又は腫瘍形成性の細胞の数の増加、これらの腫瘍形成性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、及び最終的に血液やリンパ系を介して局所のリンパ節や遠くの部位に転移と呼ばれる過程を介して広がる悪性細胞の生成を特徴とする。癌性状態においては、正常細胞が成長しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる侵襲及び攻撃性の程度で特徴付けられる広範な種々の形態で顕現する。

【0003】

癌の治療に効果的な細胞標的を発見する試みでは、研究者達は、一又は複数の正常な非癌性細胞と比較し、特定の型の癌細胞に特異的に過剰発現するポリペプチドの同定を探求してきた。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療を介する癌細胞を標的として特異的に破壊する能力を生み出す。この点、抗体ベースの治療が、ある種の癌の治療において非常に効果的であることが証明されていることが留意される。例えば、ハーセプチン（登録商標）及びリツキサン（登録商標）（双方共にジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア）は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するのに成功裏に用いられている抗体である。より具体的には、ハーセプチン（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター 2（HER 2）プロト-オンコジーン

の細胞外ドメインに選択的に結合する組換え DNA 誘導ヒト化モノクローナル抗体である。HER 2 タンパク質の過剰発現は、25 - 30% の原発性乳癌に観察される。リツキサン（登録商標）は、正常及び悪性 B リンパ球の表面に見出される CD 20 抗原に対する遺

10

20

30

40

50

伝子操作キメラマウス/ヒトモノクローナル抗体である。

【0004】

癌の治療に効果的な細胞標的を発見する他の試みでは、研究者達は、一又は複数の正常な非癌性細胞中でのポリペプチドの正常な発現に対して特定の型の癌細胞によって過剰発現されるポリペプチドの同定を探索してきた。このような過剰発現したポリペプチドのアンタゴニストの同定は、このような癌の治療のための効果的な治療剤となることが期待される。更に、このようなポリペプチドの過剰発現の同定は、哺乳動物における特定の癌の診断に役立つであろう。

【0005】

シグナル伝達経路、細胞分裂周期及びプログラムされた細胞死を制御するキナーゼ類は細胞調節に重要である。これらの重要なキナーゼ類の過剰発現又は活性化変異は細胞調節を破壊し腫瘍形成に導く場合がある。既知の全発癌遺伝子の20パーセントがプロテインキナーゼである。適切なシグナル伝達経路の同定と、これら発癌キナーゼを特異的に阻害する薬剤の開発はしばらくの間、癌研究の主要なゴールであった。高処理スクリーニング系により、例えば触媒アデノシン三リン酸結合部位との競合、基質結合の阻害、又は基質自体の修飾など、異なった阻害態様の小分子が同定されている。ある種の化合物は単一のキナーゼに高度に特異的であるが、他のものは類似の結合構造で幾つかのキナーゼを阻害可能である (Busse等, *Semin Oncol* 2001, 28:47-55)。例えば、チロシンキナーゼ Bcr - Abl は慢性骨髄性白血病 (CML) における原因因子として同定された。小分子イマチニブメシレート (Novartis Pharmaceuticals Corp, East Hanover, NJ) は最近 CML の治療に対して承認され、シグナル伝達経路のキナーゼ成分の処置が癌の治療に効果的であることが実証されている (Griffin J. *Semin Oncol* 2001, 28:3-8)。

【0006】

哺乳動物の癌治療における上に記載の進歩にも関わらず、哺乳動物における腫瘍の存在を検出することができ、腫瘍性細胞成長を効果的に阻害することがそれぞれできる更なる診断及び治療薬に対する多大な需要がある。従って、本発明の目的は、正常細胞又は他の異なった癌細胞と比較してある種の癌細胞において過剰発現されるポリペプチドを同定し、これらポリペプチドとそれらのコード化核酸を使用し、哺乳動物における癌の治療的処置及び診断的検出に有用な物質の組成物を生産することが本発明の目的である。

【0007】

発明の概要

A. 実施態様

本明細書では、本出願人は、正常な非癌細胞の一又は複数のタイプと比較して、癌細胞の一又は複数のタイプでより多く発現される様々な細胞性ポリペプチド (及びそれらのコード核酸又はその断片) の同定を最初に記載する。ここで、このようなポリペプチドは、腫瘍関連キナーゼポリペプチド (「TASK」ポリペプチド) と呼ばれ、哺乳動物における癌の治療と診断の効果的な標的となることが期待される。

従って、本発明の一実施態様では、本発明は、腫瘍関連抗原性標的ポリペプチド又はその断片 (「TASK」ポリペプチド) をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子を提供する。

【0008】

ある態様では、単離された核酸分子は、(a) ここで開示されるアミノ酸配列を有する完全長 TASK ポリペプチド、又はここに開示される完全長 TASK ポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードする DNA 分子、又は (b) (a) の DNA 分子の相補鎖に対して、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

他の態様では、単離された核酸分子は、(a) ここで開示される完全長 TASK ポリペプチド cDNA のコード化配列、又はここに開示される完全長 TASK ポリペプチドアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片のコード化配列を含むDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0009】

更なる態様では、本発明は、ここに開示されたヒトタンパク質cDNAの何れかの完全長コード化領域によってコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。この点において、「完全長コード配列」という用語は、(添付図中、開始コドンと停止コドンの間にしばしば見られる)cDNAのTASKポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を意味する。

本発明の他の態様は、キナーゼドメイン不活性化されているTASKポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的である。従って、ここに記載のTASKポリペプチドの触媒的に不活性化形態が考慮される。

【0010】

他の態様では、本発明は、(a)ここで開示される完全長アミノ酸配列を有するTASKポリペプチド、ここで開示される完全長TASKポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするヌクレオチド配列、又は(b)(a)のヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリダイズする単離された核酸分子に関する。この点に関して、本発明の実施態様は、例えば診断プローブ、アンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとして有用なハイブリダイゼーションプローブとしての用途を見出し得る、ここに開示される、完全長TASKポリペプチドコード化配列の断片、又はその相補鎖、又は抗TASKポリペプチド抗体、TASK結合オリゴペプチド又はTASKポリペプチドに結合する他の小有機分子の結合部位を含むポリペプチドを任意にコードし得る完全長TASKポリペプチドのコード化断片に関する。このような核酸断片は、通常は少なくとも約5のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈において「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。TASKポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、よく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用してTASKポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのTASKポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することによって、常套的に決定しうることと認められる。そのようなTASKポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片の全てがここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片

10

20

30

40

50

によりコードされる T A S K ポリペプチド断片、好ましくは抗 T A S K 抗体、T A S K 結合オリゴペプチド又は T A S K ポリペプチドに結合する他の小有機分子に対する結合部位を含んでなる T A S K ポリペプチド断片である。

【 0 0 1 1 】

他の実施態様では、本発明は上記において特定した単離された核酸配列の何れかによりコードされる単離された T A S K ポリペプチドを提供する。

ある態様では、本発明は、ここに開示される完全長アミノ酸配列を有する T A S K ポリペプチド、ここに開示される核酸配列の任意のものによってコードされるアミノ酸配列、又はここに開示される完全長 T A S K ポリペプチドアミノ酸配列でその他の具体的に定まった断片によってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離された T A S K ポリペプチドに関する。

10

【 0 0 1 2 】

更なる態様では、本発明は、ここに開示されヒトタンパク質 c D N A の何れかによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離された T A S K ポリペプチドに関する。

20

本発明の他の態様は、単離された T A S K ポリペプチドを提供する。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法は、T A S K ポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物から T A S K ポリペプチドを回収することを含む。

【 0 0 1 3 】

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここで記載されているポリペプチドの何れかをコードする D N A を含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞は C H O 細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに開示されているポリペプチドの何れかの製造方法がさらに提供され、所望するポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望するポリペプチドを回収することを含んでなる。

30

他の実施態様では、本発明は、異種（非 T A S K）ポリペプチドに融合した、ここに開示の T A S K ポリペプチドの何れかを含む単離したキメラポリペプチドを提供する。そのようなキメラ分子の例は、例えば、エピトプタグ配列又は免疫グロブリンの F c 領域等の異種ポリペプチドと融合したここに開示の T A S K ポリペプチドの何れかを含む。

【 0 0 1 4 】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの何れかと、好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、その抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体又は抗 T A S K ポリペプチド抗体がその各抗原性エピトプと結合するのを競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害剤、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の抗体は、場合によっては C H O 細胞又は細菌細胞中で産生され、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明の抗体は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりする。

40

本発明の他の実施態様では、本発明はここで開示されている抗体の何れかをコードする D N A を含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、この宿主細胞は C H O 細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されている抗体の製造方法が更に提供され、所望する抗体の発現に適した条件下で宿

50

主細胞を培養し、細胞培養物からその所望する抗体を回収することを含んでなる。

【0015】

他の実施態様では、本発明は、上記の又は下記のT A S Kポリペプチドの何れかに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチド(「T A S K結合オリゴペプチド」)を提供する。場合によっては、本発明のT A S K結合オリゴペプチドは、例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害剤、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等とコンジュゲートされうる。本発明のT A S K結合オリゴペプチドは場合によってはC H O細胞又は細菌細胞中で産生され、好ましくは結合する細胞の死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明のT A S K結合オリゴペプチドは、検出可能に標識されたり、固体支持体等に付着させられたりする。

10

本発明の他の実施態様では、本発明はここに記載のT A S K結合オリゴペプチドの何れかをコードするD N Aを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞がまた提供される。例を挙げると、この宿主細胞はC H O細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されているT A S K結合オリゴペプチドの製造方法が更に提供され、所望する抗体の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望する抗体を回収することを含んでなる。

【0016】

他の実施態様では、本発明は、上記の又は下記のT A S Kポリペプチドの何れかに、好ましくは特異的に、結合する小有機分子(「T A S K結合有機分子」)を提供する。場合によっては、本発明のT A S K結合有機分子は、例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害剤、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等とコンジュゲートされうる。本発明のT A S K結合有機分子は好ましくはT A S Kのキナーゼ活性を部分的に又は全体的に不活性化する。本発明のT A S K結合有機分子は最も好ましくはそれらが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明のT A S K結合有機分子は、検出可能に標識されたり、固体支持体等に付着させられたりする。

20

より更なる実施態様では、本発明は、担体と組み合わせられて、ここに記載のT A S Kポリペプチド、ここに記載のキメラT A S Kポリペプチド、ここに記載の抗T A S K抗体、ここに記載のT A S K結合オリゴペプチド、T A S K結合干渉R N A (s i R N A)、又はここに記載のT A S K結合有機分子を含有する物質の組成物に関する。場合によっては、この担体は薬学的に許容可能な担体である。

30

【0017】

更に他の実施態様では、本発明は、容器及び容器内に収容された組成物を含む製造品に関し、その組成物には、ここに記載のT A S Kポリペプチド、ここに記載のキメラT A S Kポリペプチド、ここに記載の抗T A S K抗体、ここに記載のT A S K結合オリゴペプチド、又はここに記載のT A S K結合有機分子が含まれ得る。製造品は、更に場合によっては、腫瘍の治療的処置又は診断的検出のためのこの組成物の使用に言及する、容器に添付したラベル、又は容器内に含まれるパッケージ入物を含みうる。

本発明の他の実施態様は、T A S Kポリペプチド、キメラT A S Kポリペプチド、抗T A S Kポリペプチド抗体、T A S K結合オリゴペプチド、又はT A S K結合有機分子に反応する症状の治療に有用な医薬の調製のための、ここに記載のT A S Kポリペプチド、ここに記載のキメラT A S Kポリペプチド、ここに記載の抗T A S Kポリペプチド抗体、ここに記載のT A S K結合オリゴペプチド、又はここに記載のT A S K結合有機分子の使用に関する。

40

【0018】

B. 更なる実施態様

本発明の他の実施態様は、T A S Kポリペプチドを発現する癌細胞を殺す方法に関し、該方法は、癌細胞を、T A S Kポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子と接触させ、それによって癌細胞の死を生じさせる。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の

50

方法に用いられる抗体、T A S K 結合オリゴペプチド及びT A S K 結合有機分子は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害剤、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の方法に用いられる抗体及びT A S K 結合オリゴペプチドは、場合によってはC H O 細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

本発明の他の実施態様は、癌細胞の成長がT A S K ポリペプチドの成長増強効果に少なくとも部分的に依存する、癌細胞の成長を阻害する方法に関し、該方法は、T A S K ポリペプチドを、T A S K ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子と接触させることを含み、これによって、T A S K ポリペプチドの成長増強活性をアンタゴナイズし、ひいては癌細胞の成長を阻害する。好ましくは、癌細胞の成長が完全に阻害される。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、T A S K 結合オリゴペプチド及びT A S K 結合有機分子は、場合によっては、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害剤、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等とコンジュゲートし得る。本発明の方法に用いられる抗体及びT A S K 結合オリゴペプチドは、場合によってはC H O 細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

10

【0019】

本発明の更に他の実施態様は、哺乳動物におけるT A S K ポリペプチド発現腫瘍を治療的に処置する方法に関し、該方法は、T A S K ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子の治療的に有効な量を哺乳動物に投与することを含み、それによって腫瘍の効果的な治療的処置が達成される。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、T A S K 結合オリゴペプチド及びT A S K 結合有機分子は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害剤、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等と場合によってはコンジュゲートされうる。本発明の方法に用いられる抗体及びオリゴペプチドは、場合によってはC H O 細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

20

本発明の更に他の実施態様は、哺乳動物において腫瘍を治療的に処置する方法に関し、ここで、上記腫瘍の成長はT A S K ポリペプチドの成長増強効果に少なくとも部分的に依存し、該方法は、T A S K ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子を哺乳動物に投与することを含んでなり、それによって上記T A S K ポリペプチドの成長増強活性をアンタゴナイズし、腫瘍の効果的な治療的処置をもたらす。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法において使用される抗体、T A S K 結合オリゴペプチド及びT A S K 結合有機分子は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害剤、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等と場合によってはコンジュゲートされうる。本発明の方法に用いられる抗体及びオリゴペプチドは、場合によってはC H O 細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

30

【0020】

本発明の更に他の実施態様は、T A S K ポリペプチドの改変、好ましくは増加された発現又は活性に関連した細胞増殖性疾患を治療又は防止する方法に関し、該方法はそのような治療を必要とする患者に、有効量のT A S K ポリペプチドのアンタゴニストを投与することを含んでなる。好ましくは、細胞増殖性疾患は癌であり、T A S K ポリペプチドのアンタゴニストは抗T A S K ポリペプチド抗体、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K 結合有機分子又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。細胞増殖性疾患の効果的な治療又は防止はT A S K ポリペプチドを発現する細胞の直接の死滅又は成長阻害の結果又はT A S K ポリペプチドの細胞成長増強活性のアンタゴナイズによるものでありうる。

40

本発明の更に他の実施態様は、T A S K ポリペプチドを含むと思われる試料中のT A S K ポリペプチドの存在を決定する方法に関し、該方法は、試料をT A S K ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子に曝して、試料中のT A S K ポリペプチド

50

への抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合を定量することを含み、そのような結合の存在が、試料中のT A S Kポリペプチドの存在を示す。場合によっては、試料は、T A S Kポリペプチドを発現していると思われる細胞（癌細胞であり得る）を含み得る。この方法で用いる抗体、T A S K結合オリゴペプチド又はT A S K結合有機分子は、場合によっては検出可能なように標識されたり、固体支持体に付着させられたりする。

【0021】

本発明の更なる実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、(a)前記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び(b)同じ組織源又は型の既知の正常な非癌性細胞のコントロール試料中における、T A S Kポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較して、試験試料中のT A S Kポリペプチドのより高いレベルの発現が、試験試料が得られた哺乳動物での腫瘍の存在を示す。

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、(a)哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料を、T A S Kポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子と接触させ、(b)試験試料中での、抗体、オリゴペプチド又は小有機分子とT A S Kポリペプチドの間で形成される複合体を検出することを含んでなり、複合体の形成が、哺乳動物での腫瘍の存在を示す。場合によっては、用いられる抗体、T A S K結合オリゴペプチド又はT A S K結合有機分子は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりするか及び/又は組織細胞の試験試料が癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。

本発明のさらなる実施形態は、本明細書を読めば当業者に明らかである。

【0022】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される「T A S Kポリペプチド」及び「T A S K」という用語は、直後に数値表示がある場合には種々のポリペプチドを指し、完全な表示(つまり、T A S K / 数字)は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。「数字」という用語がここでは実際の数的表示として提供されている「T A S K / 数字ポリペプチド」及び「T A S K / 数字」という用語には、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片(ここでさらに定義される)を包含する。ここに記載されているT A S Kポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え又は合成法によって調製してもよい。「T A S Kポリペプチド」という用語は、ここに記載の各個々のT A S K / 数字ポリペプチドを指す。「T A S Kポリペプチド」を指すこの明細書の全ての開示は、各ポリペプチドを個々に指すと同時に集合的に指す。例えば、調製、精製、誘導、抗体の形成、T A S K結合オリゴペプチドの形成、T A S K結合有機分子の形成、投与、含有する組成物、疾患の治療等の記載は、本発明の各ポリペプチドに関する。「T A S Kポリペプチド」という用語は、また、ここに記載のT A S K / 数字ポリペプチドの変異体を含む。

【0023】

「天然配列T A S Kポリペプチド」には、天然由来のT A S Kポリペプチドに対応する同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。このような天然配列T A S Kポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。「天然配列T A S Kポリペプチド」という用語には、特に、特定のT A S Kポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、ここに開示される天然配列T A S Kポリペプチドは、添付図に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドン(示されているならば)は、図において太字及び下線で示した。添付図に「N」で示した核酸残基は、任意の核酸残基である。しかし、添付図に開示したT A S Kポリペプチドは、図面においてアミノ酸位置1とし

てここに表示されたメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置 1 の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基を T A S K ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし、可能でもある。

【 0 0 2 4 】

「 T A S K ポリペプチド変異体」とは T A S K ポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような完全長天然配列 T A S K ポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチドを欠く T A S K ポリペプチド配列、ここに開示するようなシグナルペプチドを有する又は有しない T A S K ポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示する完全長 T A S K ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長 T A S K ポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを示す核酸によってコードされるもの）と少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性な T A S K ポリペプチドを意味する。このような T A S K ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列の N 末端又は C 末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失された T A S K ポリペプチドが含まれる。通常、 T A S K ポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列 T A S K ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く T A S K ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示する T A S K ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長 T A S K ポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、又は 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有している。通常、 T A S K 変異体ポリペプチドは、少なくとも約 1 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 2 0、 3 0、 4 0、 5 0、 6 0、 7 0、 8 0、 9 0、 1 0 0、 1 1 0、 1 2 0、 1 3 0、 1 4 0、 1 5 0、 1 6 0、 1 7 0、 1 8 0、 1 9 0、 2 0 0、 2 1 0、 2 2 0、 2 3 0、 2 4 0、 2 5 0、 2 6 0、 2 7 0、 2 8 0、 2 9 0、 3 0 0、 3 1 0、 3 2 0、 3 3 0、 3 4 0、 3 5 0、 3 6 0、 3 7 0、 3 8 0、 3 9 0、 4 0 0、 4 1 0、 4 2 0、 4 3 0、 4 4 0、 4 5 0、 4 6 0、 4 7 0、 4 8 0、 4 9 0、 5 0 0、 5 1 0、 5 2 0、 5 3 0、 5 4 0、 5 5 0、 5 6 0、 5 7 0、 5 8 0、 5 9 0、 6 0 0 アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、 T A S K 変異体ポリペプチドは、天然 T A S K ポリペプチド配列に比較して一つ以下の保存的アミノ酸置換、あるいは天然 T A S K ポリペプチド配列に比較して 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、又は 1 0 以下の同類アミノ酸置換を有するにすぎない。

【 0 0 2 5 】

ここで同定した T A S K ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の T A S K ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば B L A S T、 B L A S T - 2、 A L I G N、又は M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、 A L I G N - 2 プログラム用の完全なソースコードが下記の表 1 に提供されている配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用することによって得られる。 A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表 1 に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントン D.C., 20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 で登録されている。 A L I G N - 2 プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。 A L I G N - 2 プログラムは、

UNIX（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0026】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「TASK」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「TASK」は対象の仮想TASKポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象の「TASK」ポリペプチドと比較され、これに対するポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」は、それぞれ異なる仮定アミノ酸残基を表す。特に断らない限りは、ここで使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。

【0027】

「TASK変異体ポリヌクレオチド」又は「TASK変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、TASKポリペプチド、好ましくは活性TASKポリペプチドをコードし、ここに開示する完全長天然配列TASKポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列TASKポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するTASKポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長TASKポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列（完全長TASKポリペプチドの完全なコード化配列の一部のみを表す核酸によってコードされた）と、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、TASK変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列TASKポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列TASKポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するTASKポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長TASKポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【0028】

通常、TASK変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、

610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

【0029】

ここで同定されるTASKコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のTASK核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

10

20

【0030】

核酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される：

30

分率 W/Z の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチドである。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、「TASK-DNA」が対象となる仮説的TASKコード化核酸配列を表し、「比較DNA」が対象となる「TASK-DNA」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮想ヌクレオチドを表して、表4及び5が「比較DNA」と称される核酸配列の「TASK-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

40

【0031】

他の実施態様では、TASK変異体ポリヌクレオチドとは、TASKポリペプチドをコードし、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに記載の完全長TASKポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる核酸分子である。TASK変異体ポリペプチドは、TASK変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

ここに開示される種々のTASKポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定され及び分離及び/又は回収されたポリペプチドを意味する

50

。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、TASKポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0032】

「単離された」TASKポリペプチドをコードする核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞中に存在する特異的なポリペプチドをコードする核酸分子とは区別される。しかし、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列と、リボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

【0033】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0034】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにすることになり、低い温度はストリンジェントを低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明については、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience Publishers, 1995)を参照のこと。

【0035】

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50 において0.015M

10

20

30

40

50

の塩化ナトリウム / 0.0015 M のクエン酸ナトリウム / 0.1% のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの ; (2) ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42 において 50% (v/v) ホルムアミドと 0.1% ウシ血清アルブミン / 0.1% フィコール / 0.1% のポリビニルピロリドン / 50 mM の pH 6.5 のリン酸ナトリウムバッファー、及び 750 mM の塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを用いるもの ; 又は (3) 42 において 50% ホルムアミド、5 x SSC (0.75 M の NaCl、0.075 M のクエン酸ナトリウム)、50 mM のリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1% のピロリン酸ナトリウム、5 x デンハード液、超音波処理サケ精子 DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS、及び 10% の硫酸デキストランを用い、42 においての 0.2 x SSC (塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム) でと、55 においての 50% ホルムアミドでの洗浄を含み、ついで 55 において EDTA を含む 0.1 x SSC からなる高ストリンジェンシー洗浄を行うものによって同定される。

10

【0036】

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook 等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) に記載されているように同定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件 (例えば、温度、イオン強度及び % SDS) の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、20% ホルムアミド、5 x SSC (150 mM の NaCl、15 mM のクエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 x デンハード液、10% 硫酸デキストラン、及び 20 mg/ml の変性剪断サケ精子 DNA を含む溶液中の 37 での終夜インキュベーション、ついで 1 x SSC 中 37 - 50 でのフィルター洗浄という条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

20

【0037】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合した T A S K ポリペプチド又は抗 T A S K 抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようになりにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも 6 のアミノ酸残基、通常は約 8 ~ 50 のアミノ酸残基 (好ましくは、約 10 ~ 20 の残基) を有する。

30

ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じる T A S K の生物学的及び / 又は免疫学的活性を保持する T A S K ポリペプチドの形態を意味し、その中で、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生 T A S K が保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘導する能力以外の、天然又は天然発生 T A S K によって引き起こされる生物機能 (阻害又は刺激) を意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生 T A S K が保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘導する能力を意味する。

【0038】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、そしてここに開示した天然 T A S K ポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全にブロック、阻害、又は中和する任意の分子が含まれる。同じように、「アゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然 T A S K ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子が含まれる。適切なアゴニスト又はアンタゴニスト分子には、特にアゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、又は天然 T A S K ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小有機分子等が含まれる。T A S K ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は、T A S K ポリペプチドと候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子を接触させ、そして通常は T A S K ポリペプチドに関連している一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することが含まれ得る。

40

【0039】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的

50

療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え（小さく）させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患に既に罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。本発明の方法に従って抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド又はTAS K結合有機分子の治療量を投与された後に、患者が次の一又は複数のものについて観察可能な及び/又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被検体又は哺乳動物は、TAS Kポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍成長のある程度の阻害；及び/又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の緩和；疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。ある程度、抗TAS K抗体又はTAS K結合オリゴペプチドは、生存癌細胞の成長を防ぐ及び/又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び/又は細胞毒性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができる。

【0040】

疾患における成功裏の治療及び改善を評価することに関する上記のパラメーターは、医師にとってよく知られている日常的手法によって容易に測定が可能である。癌治療では、有効性は、例えば、病気の進行までの時間（TTP）の算定及び/又は反応速度（RR）を確かめることによって測定できる。転移は、ステージング試験によって、骨のスキャン及び骨への広がりを確かめるためのカルシウムレベル及び他の酵素に関する試験によって確かめることができる。CTスキャンは、また、領域の骨盤及びリンパ節への広がりを探索することでおこなうことができる。胸部X線、及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの測定を、それぞれ肺及び肝臓への転移を探索するために用いる。疾患をモニタリングする他の常套的方法には、経直腸的超音波断層法（TRUS）及び経直腸的針生検（TRNB）が含まれる。

【0041】

より局所的な癌である膀胱癌に関しては、疾患の進行を確かめる方法には、膀胱鏡検査による尿細胞評価、尿中に存在する血液のモニタリング、超音波断層撮影又は静脈性腎盂像、コンピュータ断層撮影法（CT）及び磁気共鳴映像法（MRI）による尿路上皮性路の視覚化が含まれる。遠隔転移の存在は、腹部のCT、胸X線、又は骨格の放射性核種イメージングによって評価することができる。

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

癌の治療、症状の緩和又は診断のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数の更なる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

【0042】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる服用量及び濃度でそれらに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナ

10

20

30

40

50

トリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えば、T W E E N (登録商標)、ポリエチレングリコール (P E G)、及び P L U R O N I C S (登録商標)を含む。

【 0 0 4 3 】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、T A S K 結合オリゴペプチド又はT A S K 結合有機分子が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィ

10

ーカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第 4 2 7 5 1 4 9 号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばT A S K ポリペプチド、それらに対する抗体又はT A S K 結合オリゴペプチド）輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。

【 0 0 4 4 】

ここで定義されている「小」分子又は「小」有機分子とは、約 5 0 0 ダルトン未満の分子量である。

ここに開示するポリペプチド、抗体、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K 結合有機分子、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量のことである。「有効量」は、述べられた目的に関連して、経験的及び常套的な形で決定することができる。

20

「治療的有效量」という用語は、患者又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的な抗体、ポリペプチド、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K 結合有機分子又は他の薬剤の量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止）し；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度まで減速及び好ましくは停止）し；腫瘍成長をある程度まで阻害し；及び／又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度まで緩和する。「治療する」のここでの定義を参照せよ。薬が存在する癌細胞の成長を妨げ及び／又は死滅させる程度まで、それは、細胞分裂停止及び／又は細胞毒性であり得る。

30

【 0 0 4 5 】

抗T A S K 抗体、T A S K ポリペプチド、T A S K 結合オリゴペプチド又はT A S K 結合有機分子の「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗T A S K 抗体、T A S K ポリペプチド、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K s i R N A 又はT A S K 結合有機分子の「成長阻害量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

抗T A S K 抗体、T A S K ポリペプチド、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K s i R N A 又はT A S K 結合有機分子の「細胞毒性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗T A S K 抗体、T A S K ポリペプチド、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K s i R N A 又はT A S K 結合有機分子の「細胞毒性量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

40

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗T A S K モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ (polyepitopic) 特異性を持つ抗T A S K 抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗T A S K 抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗T A S K 抗体の断片（下記を参照）を包含する。「免疫グロブリン」（I g）という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え可能に用いられる。

【 0 0 4 6 】

50

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって定量して95重量%以上の、最も好ましくは99重量%以上の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

10

【0047】

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本的な4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は一つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、及び鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(C_H)が、 μ 及びアイソタイプに対しては4つの C_H ドメインが続く可変ドメイン(V_H)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をN末端に有する。 V_L は V_H と整列し、 C_L は重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。 V_L と V_H は共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

20

【0048】

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カップ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 及び λ と呼ばれる重鎖を有する。さらに μ 及び λ のクラスは、 C_H 配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

30

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。 V ドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、 V 領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15-30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きな β -シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、 β -シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは抗体の抗原

40

50

への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害 (ADCC) における抗体の寄与を示す。

【0049】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(すなわち、 V_L においては、およそ残基 24 - 34 (L1)、50 - 56 (L2) 及び 89 - 97 (L3)、及び V_H においては、およそ 1 - 35 (H1)、50 - 65 (H2) 及び 95 - 102 (H3); Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991) 及び / 又は「高度可変ループ」からの残基(例えば、 V_L においては、およそ残基 26 - 32 (L1)、50 - 52 (L2) 及び 91 - 96 (L3)、及び V_H においては、およそ 26 - 32 (H1)、53 - 55 (H2) 及び 96 - 101 (H3); Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。

10

【0050】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第4816567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

20

【0051】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び / 又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物学的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4816567号; 及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)を参照)。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

30

「無傷」の抗体は、抗原-結合部位、並びに C_L 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

40

【0052】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、及びFv断片; ダイアボディ(diabodies); 直鎖状抗体(米国特許第5641870号、実施例2; Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]を参照); 単鎖抗体分子; 及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Fc」断片を産生する。Fab断片は全長

50

L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})からなる。各Fab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな $F(ab')_2$ 断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む C_{H1} ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

10

【0053】

Fc断片はジスルフィドにより一緒に保持されている双方のH鎖のカルボキシ末端部位を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列により決定され、その領域は、所定の型の細胞に見出されるFcレセプター(FcR)によって認識される部位である。

「Fv」は、完全な抗原-認識及び-結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

20

【0054】

「sFv」又は「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖内に結合した V_H 及び V_L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sFvポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それはsFVが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、 V_H と V_L ドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つsFv断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sFv断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体の V_H 及び V_L ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号; 国際公開93/11161号; 及びHollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

30

【0055】

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらな

40

50

る詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986) ; Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988) ; 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

【 0 0 5 6 】

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗-ヒトIgE抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原（すなわち、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} 以下、最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(Kd)値を有する)と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上に定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

10

【 0 0 5 7 】

「TASK結合オリゴペプチド」はここで記載される様なTASKポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。TASK結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び精製することができる。TASK結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なTASKポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。TASK結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する(例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号; PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号; Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.等 (1991) Nature, 352:624; Marks, J. D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照)。

20

30

40

【 0 0 5 8 】

「TASK結合有機分子」とは、ここに記載されるようなTASKポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。TASK結合有機分子は既知の方法(例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照)を用いて同定され、化学的に合成されうる。TASK結合有機分子は通常、約2000ダルトン未満の大きさであり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトン未満の大きさであり、ここに記載される様なTASKポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリーを検索する

50

技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照）。

「干渉RNA」又は「小干渉RNA (siRNA)」は標的遺伝子の発現を低減させるヌクレオチド長30未満の二重鎖RNA分子である。「TASK干渉RNA」又は「TASK siRNA」は、好ましくは特異的に、TASK核酸に結合し、その発現を低減させる。これは、TASK分子の発現が、干渉RNAが存在していないコントロール中でのTASK分子の発現と比較して干渉RNAが存在している場合により低いことを意味する。TASK干渉RNAは既知の方法を使用して同定し合成することができる(Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003), 国際公開2003056012及び国際公開2003064621)。

【0059】

対象の抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的と「結合する」抗体、オリゴペプチド、siRNA又は他の有機分子は、その抗体、オリゴペプチド、siRNA又は他の有機分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的とする診断及び/又は治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように十分な親和性でその抗原と結合するものである。そのような実施態様では、抗体、オリゴペプチド、siRNA又は他の有機分子の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示式細胞分取器(FACS)分析又は放射免疫沈降(RIA)によって定量して、その特定の標的タンパク質との抗体、オリゴペプチド、siRNA又は他の有機分子の結合の約10%よりも低い。標的分子への抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子とも競合にとって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的な結合が示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、あるいはそれ以上のKdを持つ分子によって示されうる。一実施態様では、「特異的に結合する」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへ実質的に結合することなく分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。

【0060】

「TASKポリペプチドを発現する腫瘍細胞の成長を阻害する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、又は「成長阻害」抗体、オリゴペプチド、siRNA又は他の有機分子は、適切なTASKポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。好ましい成長阻害抗TASK抗体、オリゴペプチド、siRNA又は他の有機分子は、典型的には、試験された抗体、オリゴペプチド、siRNA又は他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、20%より多く、好ましくは約20%から約50%、そしてさらに好ましくは50%よりも多く(例えば、約50%から約100%)でTASK発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施態様では、成長阻害は、細胞培養で約0.1から30 μ g/ml又は約0.5nMから200nMの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を1-10日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、下記の実験実施例に記載しているような種々の方法で確かめることができる。約1 μ g/k

10

20

30

40

50

g から約 100 mg / kg 体重の抗 T A S K 抗体の投与が、最初の抗体の投与から約 5 日から 3 ヶ月内、好ましくは約 5 から 30 日以内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで成長阻害性である。

【0061】

「アポトーシスを誘導する」抗体、オリゴペプチド、s i R N A 又は他の有機分子は、アネキシン V の結合、D N A の断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び / 又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)等により決定されるようなプログラム細胞死を誘導するものである。細胞は、通常、T A S K ポリペプチドを過剰発現しているものである。好ましくは、細胞は腫瘍細胞、例えば前立腺、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、肺、腎臓、結腸、膀胱細胞である。アポトーシスに伴う細胞事象を評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン(P S)転位をアネキシン結合により測定することができ；D N A 断片化はD N A ラダーリングにより評価することができ；D N A 断片化に伴う細胞核 / クロマチン凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、アネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、未処理細胞の約 2 ~ 50 倍、好ましくは約 5 ~ 50 倍、最も好ましくは約 10 ~ 50 倍のアネキシン結合を誘導するという結果を生じるものである。

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体の F c 領域(天然配列 F c 領域又はアミノ酸配列変異体 F c 領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C 1 q 結合及び補体依存性細胞障害；F c レセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(A D C C)；貪食作用；細胞表面レセプター(例えば、B 細胞レセプター)のダウンレギュレーション；及び B 細胞活性化が含まれる。

【0062】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「A D C C」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(N K)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在する F c レセプター(F c R s)と結合した分泌 I g により、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞毒性の形態を意味する。抗体は細胞障害細胞を「備えて」おり、これはこのような死滅には絶対に必要なものである。A D C C を媒介する主要な細胞の N K 細胞は F c R I I I のみを発現するのに対し、単球は F c R I 、F c R I I 及び F c R I I I を発現する。造血細胞での F c R の発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991) の 464 頁の表 3 に要約されている。対象の分子の A D C C 活性を評価するために、米国特許第 5500362 号又は同 5821337 号に記載されているようなインビトロ A D C C アッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(P B M C)及びナチュラルキラー細胞(N K 細胞)が含まれる。代替りとして、もしくは付加的に、対象の分子の A D C C 活性は、例えば、Clynes 等, (USA) 95:652-656 (1998) において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

【0063】

「F c レセプター」又は「F c R」は、抗体の F c 領域に結合するレセプターを記載するものである。好適な F c R は天然配列ヒト F c R である。さらに好適な F c R は、I g G 抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、F c R I 、F c R I I 及び F c R I I I サブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。F c R I I I レセプターには、F c R I I I A (「活性型レセプター」)及び F c R I I I B (「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプター F c R I I I A は、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; I T A M)を含んでいる。阻害型レセプター F c R I I I B は、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ; I T I M)を含

10

20

30

40

50

んでいる (Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。F c R sに関しては、Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のF c R sはここでの「F c R」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性I g G sが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターF c R n (Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol.24:249 (1994))も含まれる。

【0064】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のF c R sを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともF c R I I Iを発現し、A D C Cエフェクター機能を実行することが望ましい。A D C Cを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(P B M C)、ナチュラルキラー(N K)細胞、単球、細胞毒性T細胞及び好中球が含まれるが、P B M CとN K細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

「補体依存性細胞障害」もしくは「C D C」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C 1 q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラス)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、C D Cアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

【0065】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ様悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌(squamous cell cancer)(例えば扁平上皮細胞癌)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫(squamous carcinoma)を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃(gastric)又は腹部(stomach)癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓(kidney)又は腎(renal)癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、多発性骨髄腫及びB細胞リンパ腫、脳、並びに頭部及び頸部の癌、及び関連した転移が含まれる。

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖を伴う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

【0066】

「細胞死を誘導する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、生細胞を生育不能にするものである。細胞は、T A S Kポリペプチドを発現するもの、好ましくは、同じ組織型の正常細胞と比較してT A S Kポリペプチドを過剰発現する細胞である。T A S Kポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞により生成され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましくは、その細胞は癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害(A D C C)又は補体依存性細胞障害(C D C)によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清(すなわち、補体の無い)を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロピジウム(P I)、トリパンブルー(Moore等 Cytotechnology 17: 1-11(1995))又は7 A A Dの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、B T 4 7 4細胞でのP I取り込みアッセイで、P I取り込みを誘導するものであ

る。

【0067】

「TASK発現細胞」は内因性又は形質移入されたTASKポリペプチドを発現する細胞である。「TASK発現癌」は、細胞表面上に存在するTASKポリペプチドを有する、又はTASKポリペプチドを生成し分泌する細胞を含む癌である。任意には、「TASK発現癌」は十分なレベルのTASKポリペプチドを生成し、抗TASK抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子はそれへ結合することができ、癌に関して治療的效果を有する。他の実施態様では、任意には「TASK発現癌」は、抗TASK抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子アンタゴニストが結合することができ、癌に対して治療的有効量を有するように十分なレベルのTASKポリペプチドを産生及び分泌する。後者に関して、アンタゴニストは腫瘍細胞によるTASKポリペプチドの産生を減少、阻害又は防止するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。TASKポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その顕著により高いレベルのTASKポリペプチドを有するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。TASKポリペプチド過剰発現は、診断又は予後アッセイにおいて、細胞に存在するTASKタンパク質の増大したレベルを評価することによって定量されうる（例えば、TASKポリペプチドをコードする単離された核酸から、組換えDNA技術を用いて調製することができる単離されたTASKポリペプチドに対して調製した抗TASK抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；FACS分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、TASKコード化核酸又はその相補鎖に対応する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション；（FISH；1998年10月に公開の国際公開98/45479を参照）、サザンブロットティング、ノーザンブロットティング、又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術、例えばリアルタイム定量PCR（RT-PCR）を介して、細胞のTASKポリペプチドコード化核酸又はmRNAのレベルを測定してもよい。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイを当業者は利用可能である。例えば、患者の体内にある細胞を、例えば、放射性同位元素のような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射性的外部スキニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

10

20

30

【0068】

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子を作製するために、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位元素標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。

40

【0069】

ここで用いられる「細胞障害剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位元素（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及びLuの放射性同位元素）、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ピンカアルカロイド類（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトボシド）、ドキシソルビ

50

シン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞毒性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0070】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にT A S K発現癌細胞の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、S期でT A S K発現細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘導する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピンカス(ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びプレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・プーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、プリストル-マイヤー スクウィブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

「ドキソルピシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルピシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンである。

【0071】

「サイトカイン」なる用語は、一つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエータとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体化ホルモン(LH)；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-及び-；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンプオエチン(TPO)；NGF-等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF-及びTGF-等のトランスフォーミング成長因子(TGFs)；インシュリン様成長因子-I及びII；エリスロポエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン-、-、及び-等のインターフェロン；コロニー刺激因子(CSFs)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；及び顆粒球-CSF(G-CSF)；インターロイキン(ILs)、例えばIL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘍壊死因子、例えばTNF-及びTNF-；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインには、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び/又は

その治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【 0 0 7 2 】

表1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26]={
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, 2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, 2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

10

20

表1(続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
#define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int spc; /* number of leading spaces */
    short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long ofiset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path *pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

10

20

30

表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
        1, 2(1<<(D-'A'))(1<<(N-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25(1<<(E-'A'))(1<<(Q-'A'))
};

main(ac, av)
int      ac;
char     *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps(); /* get the actual jumps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

10

main

20

30

表1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx; /* keep track of delx */
    int           *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;             /* score for each type */
    int           ins0, ins1; /* insertion penalties */
    register      id;             /* diagonal index */
    register      ij;            /* jmp index */
    register      *col0, *col1;    /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;         /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

表1(続き)

...DW

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] = ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
  if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
    delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
    ndelx = 1;
  } else {
    delx -= ins1;
    ndelx++;
  }
} else {
  if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
    delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
    ndelx = 1;
  } else
    ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

10

20

30

表1(続き)

...NW

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] = ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] = ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

10

20

30

表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
int      lx, ly;                                                    /* "core" (minus endgaps) */
int      firstgap, lastgap;                                         /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].n[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].n[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

10

20

30

表1(続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;       /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];      /* jmp index for a path */
static      nc[2];      /* number at start of current line */
static      ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];

static char *ps[2];     /* ptr to current element */
static char *po[2];     /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;
    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = outf[i];
    }
}

```

...getmat

10

20

pr_align

30

表1(続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '\0';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nm = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

10

20

30

dumpblock

40

表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '\0'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == '\0' && *(p0[0]) == '\0') ||
        !*out[1] || (*out[1] == '\0' && *(p1[1]) == '\0'))
        return;

    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = '\0';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '!';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

10

stars

20

30

表1(続き)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homg>XXXXXX";      /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;                               10

int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                cleanup
    int    i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char     *
getseq(file, len)                          getseq
    char    *file;      /* file name */
    int     *len;      /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

表1(続き)

```

...getseq
py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

表1(続き)

```

...readjumps
    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* jd = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw0
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    int ix;
    char *mktemp();
    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

10

【 0 0 7 3 】

表2

20

TASK	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)
% アミノ酸配列同一性 =		

(ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)
 ÷ (PRO ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =
 5 ÷ 15 = 33.3%

30

表3

TASK	XXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)
% アミノ酸配列同一性 =		

(ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)
 ÷ (PRO ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =
 5 ÷ 10 = 50%

40

表4

TASK-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNNNLLLLLLLLLL	(長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)

÷ (PRO-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数) =

6 ÷ 14 = 42.9%

10

表5

TASK-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLVV	(長さ = 9 ヌクレオチド)

%核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)

÷ (PRO-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数) =

4 ÷ 12 = 33.3%

20

【 0 0 7 4 】

I I . 本発明の組成物及び方法

A . 抗 T A S K 抗体

一実施態様では、本発明は、ここで治療及び / 又は診断薬としての用途が見出され得る抗 T A S K 抗体を提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

30

【 0 0 7 5 】

1 . ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原(特に、合成ペプチドが用いられる場合)を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導體形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、SOCl₂、又はR及びR¹が異なるアルキル基であるR¹N=C=NRを用いて結合させることができる。

40

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100µg又は5µg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導體に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加

50

免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0076】

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler等, *Nature*, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作成することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫化の後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞(融合のパートナーとも呼ばれる)の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

【0077】

好ましい融合のパートナーである骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

【0078】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson等, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980)のスキヤッチャード分析によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマト

グラフィー（例えばプロテイン A 又はプロテイン G -セファロースを用いる）又はイオン交換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、ゲル電気泳動、透析等のような常套的な抗体精製法によって、培地、腹水、又は血清から適切に分離される。

モノクローナル抗体をコードする DNA は、常法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このような DNA の好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNA を発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードする DNA の細菌中での組換え発現に関する概説論文には、Skerra 等, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262(1993)及び Pluckthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188(1992)が含まれる。

【 0 0 7 9 】

更なる実施態様では、モノクローナル抗体又は抗体断片は、McCafferty 等, *Nature*, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991)及び Marks 等, *J.Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性 (nM 範囲)のヒト抗体の生成 (Marks 等, *Bio/Technology*, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え (Waterhouse 等, *Nuc.Acids.Res.*, 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

抗体をコードする DNA は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン (C_H 及び C_L) の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号; Morrison 等, *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド (異種ポリペプチド) のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する一つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【 0 0 8 0 】

3 . ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗 T A S K 抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えば F_v、F a b、F a b'、F (a b')₂ あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域 (CDR) の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種 (ドナー抗体) の CDR の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンの F_v フレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入された CDR もしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての CDR 領域が非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全ての FR 領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む [Jones 等, *Natur*

e, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr . Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)と共同研究者 [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986) ; Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988) ; Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類 C D R 又は C D R 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの C D R 残基及びおそらくは幾つかの F R 残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【 0 0 8 1 】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及び H A M A 反応(ヒト抗-マウス抗体)を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト V ドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク (F R) をヒト化抗体のために受け入れる (Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993) ; Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる (Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992) ; Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

更に、抗体を、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【 0 0 8 2 】

ヒト化抗 T A S K 抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて一又は複数の細胞傷害剤と結合していてもよい抗体断片、例えば F a b であってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷 I g G 1 抗体であってもよい。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H) 遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993) ; Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993) ; B ruggeman等, Year in Immuno., 7:33 (1993) ; 米国特許第 5 5 4 5 8 0 6 号、同 5 5 6 9

10

20

30

40

50

825号、同5591669号(全てジェンファーム(GenPharm))；同5545807号；及び国際公開第97/17852号を参照されたい。

【0083】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348:552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レポトリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは、例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)に概説されている多様な形式で行うことができる。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレポトリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

10

20

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

【0084】

4. 抗体断片

ある状況下では、抗体全体よりも、抗体断片を用いることに利点がある。より小さな大きさの断片によって迅速なクリアランスが可能となり、固形腫瘍への接近の改良につながり得る。

抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク質分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。Fab、Fv及びScFv抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(ab')₂断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むFab及びF(ab')₂が、米国特許第5869046号に記載されている。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖Fv断片(scfv)である。国際公開93/16185号；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びscfvは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。scfv融合タンパク質は、scfvのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

30

40

【0085】

50

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、T A S Kタンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位とT A S K結合部位とが結合しうる。あるいは、抗T A S Kアームは、T A S K-発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、F c R I (C D 6 4)、F c R I I (C D 3 2)及びF c R I I I (C D 1 6)等のI g G (F c R)に対するF c レセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばC D 3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はT A S Kを発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はT A S K結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(sa porin)、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位元素ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばF (a b')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

国際公開第96/16673号には、二重特異性抗-E r b B 2 / 抗-F c R I I I 抗体が記載されており、米国特許第5837234号には、二重特異性抗-E r b B 2 / 抗-F c R I 抗体が開示されている。二重特異性抗-E r b B 2 / F c 抗体は国際公開第98/02463号に示されている。米国特許第5821337号は、二重特異性抗-E r b B 2 / 抗-C D 3 抗体を教示するものである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTrauneker等、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【0086】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C_H2及びC_H3領域を含むI g 重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_H1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

この手法の好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0087】

米国特許第5731168号に記載された他の手法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすること

10

20

30

40

50

ができる。好適な界面はC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合される。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4676980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

【0088】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再変換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

最近の進歩により、大腸菌からのF a b'-S H断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の製造を記述している。各F a b'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びE r b B 2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0089】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーによりV_LにV_Hを結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v(s F v)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

【0090】

6. ヘテロコンジュゲート抗体

10

20

30

40

50

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4676980号]及びHIV感染の治療のために[国際公開第91/00360;国際公開第92/200373;欧州特許第03089号]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。

10

【0091】

7. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも一つのポリペプチド鎖(好ましくは2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はVD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcを有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は: VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域鎖;又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2~約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

20

30

【0092】

8. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞毒性(ADCC)及び/又は補体依存細胞毒性(CDC)を向上させることは望ましい。これは、抗体のFc領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされうる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞毒性(ADCC)を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

40

50

【 0 0 9 3 】

9 . 免疫複合体

また、本発明は、化学治療薬、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞障害剤、あるいは放射性同位元素（即ち、放射性コンジュゲート）と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデクシン(modeccin) A 鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質
 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サバオナリア・オフィシナリス(saponaire officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコセセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が含まれる。抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2, 6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコセセン(trichothene)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【 0 0 9 4 】

メイタンシン及びメイタンシノイド

好ましい一実施態様では、本発明の抗TAS K抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。

メイタンシノイドは、チュープリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば
 米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに
 取り込まれる。

【 0 0 9 5 】

メイタンシノイド-抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗

10

20

30

40

50

原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5208020号、同5416064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞毒性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞毒性を示した。

10

【0096】

抗TASKポリペプチド抗体-メイタンシノイドコンジュゲート(免疫コンジュゲート)

抗TASK抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗TASK抗体を化学的に結合させることにより調製される。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞毒性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞毒性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した非特許刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

20

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235B1号、及びChari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

30

【0097】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合を提供するN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

40

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例

50

えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好ましい実施態様において、結合はメイトンシノール又はメイトンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0098】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗TAS K抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 1^I 、 2^I 、 3^I 、N-アセチル- 1^I 、PSAG及び 1^I (Hinman等, Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方とも、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

10

20

【0099】

他の細胞障害剤

本発明の抗TAS K抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイン、ピンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

30

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNAアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

40

【0100】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗TAS K抗体を生成するために、種々の放射性同位元素が利用される。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位元素が含まれる。コンジュゲートが診断用を使用される場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば tc^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

50

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば $t c^{99m}$ 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0101】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

別法として、抗TAS K抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

他の実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0102】

10. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗TAS K抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号; 及び1997年10月23日に公開の国際公開97/38731に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、

ジスルフィド交換反応を介して、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

【 0 1 0 3 】

B . T A S K 結合オリゴペプチド

本発明のT A S K 結合オリゴペプチドはここで記載される様なT A S K ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。T A S K 結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び生成することができる。T A S K 結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なT A S K ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。T A S K 結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する(例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号; P C T 公開第W O 8 4 / 0 3 5 0 6 号、及びW O 8 4 / 0 3 5 6 4 号; Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirlla, S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.等 (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照)。

【 0 1 0 4 】

この点において、バクテリオファージ(ファージ)ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラリーを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるこれらライブラリーのメンバーを同定することを可能にするよく知られた技術の一つである。ファージディスプレイは、様々なポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として表示されることによる技術である(Scott, J.K.及びSmith G. P. (1990) Science 249:386)。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体(又はランダムクローンcDNA)の大きなライブラリーを標的分子に高い親和性で結合するこれらの配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド(Cwirlla, S.E.等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378)又はタンパク質(Lowman, H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.ら (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.等 (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363)ライブラリーのディスプレイは、特異的に結合する特性を有するものについて無数のポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている(Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。ランダム突然変異体のファージライブラリーの分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強

の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第 5 2 2 3 4 0 9 号、同第 5 4 0 3 4 8 4 号、同第 5 5 7 1 6 8 9 号、及び同第 5 6 6 3 1 4 3 号。

【 0 1 0 5 】

ほとんどのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、ファージディスプレイシステム (WO 9 5 / 3 4 6 8 3 ; 米国特許第 5 6 2 7 0 2 4 号)、T 4 ファージディスプレイシステム (Ren, Z-J.ら (1998) Gene 215:439; Zhu, Z. (1997) CAN 33 :534; Jiang, J.等 (1997) can 128:44380; Ren, Z-J.等 (1997) CAN 127:215644; Ren, Z-J. (1996) Protein Sci. 5:1833; Efimov, V.P.等 (1995) Virus Genes 10:173) 及び T 7 ファージディスプレイシステム (Smith, G.P. 及び Scott, J.K. (1993) Methods in Enzymology, 217, 228-257; 米国特許第 5 7 6 6 9 0 5 号) も知られている。

現在、基礎的なファージディスプレイ構想の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラリーをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組換え反応手段について記載があり (WO 9 8 / 1 4 2 7 7) 及びファージディスプレイライブラリーは二分子相互作用 (WO 9 8 / 2 0 1 6 9 ; WO 9 8 / 2 0 1 5 9) 及び拘束性ヘリックスペプチドの特性 (WO 9 8 / 2 0 0 3 6) を分析及び制御するために使用されている。WO 9 7 / 3 5 1 9 6 は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリーを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法を記載する。WO 9 7 / 4 6 2 5 1 は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、ついで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) タンパク質 A の親和性タグとしての使用も報告されている (Li 等, (1998) Mol Biotech., 9:187)。WO 9 7 / 4 7 3 1 4 は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法は WO 9 7 / 0 9 4 4 6 に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第 5 4 9 8 5 3 8 号、同第 5 4 3 2 0 1 8 号、及び WO 9 8 / 1 5 8 3 3 に記載されている。

ペプチドライブラリーの作製及びこれらのライブラリーのスクリーニングの方法は、米国特許第 5 7 2 3 2 8 6 号、同第 5 4 3 2 0 1 8 号、同第 5 5 8 0 7 1 7 号、同第 5 4 2 7 9 0 8 号、同第 5 4 9 8 5 3 0 号、同第 5 7 7 0 4 3 4 号、同第 5 7 3 4 0 1 8 号、同第 5 6 9 8 4 2 6 号、同第 5 7 6 3 1 9 2 号、及び同第 5 7 2 3 3 2 3 号に記載される。

【 0 1 0 6 】

C . T A S K 結合有機分子

T A S K 結合有機分子とは、ここに記載されるような T A S K ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。T A S K 結合有機分子は既知の方法 (例えば P C T 公開第 WO 0 0 / 0 0 8 2 3 及び WO 0 0 / 3 9 5 8 5 号参照) を用いて同定され、化学的に合成されうる。T A S K 結合有機分子は通常、約 2 0 0 0 ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約 1 5 0 0、7 5 0、5 0 0、2 5 0 又は 2 0 0 ダルトンの大きさであり、ここに記載される様な T A S K ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する (例えば P C T 公開第 WO 0 0 / 0 0 8 2 3 及び WO 0 0 / 3 9 5 8 5 号参照)。T A S K 結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N 置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジ

スルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

【0107】

D. 所望する特性を有する抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド及びTAS K結合有機分子のスクリーニング

TAS Kポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド及び有機分子を生成する技術を上に記載した。所望される、所定の生物学的特性を有する抗体、オリゴペプチド又は有機分子をさらに選択することができる。

本発明の抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又はTAS K遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでTAS Kポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びTAS K形質移入細胞は、数日間(例えば、2-7日)、種々の濃度の本発明の抗TAS Kモノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理し、クリスタル・バイオレット又はMTTで染色、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方法は、本発明の抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド又はTAS K結合有機分子の存在又は非存在下で処理した細胞の³H-チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、DNAへ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。好ましくは、腫瘍細胞は、TAS Kポリペプチドを過剰発現するものである。好ましくは、抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド又はTAS K結合有機分子は、ある実施態様では約0.5から30 µg/mlの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約25-100%、より好ましくは約30-100%、そしてさらにより好ましくは約50-100%又は70-100%のTAS K発現腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約0.5から30 µg/ml又は0.5 nMから200 nMの抗体濃度で測定することができ、その成長阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後1-10日で確かめられる。約1 µg/kgから約100 mg/kg体重での抗TAS K抗体の投与が、抗体の最初の投与から約5日から3ヶ月、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで成長阻害作用がある。

【0108】

細胞死を誘導する抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド又はTAS K結合有機分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム(PI)、トリバンブルー又は7AADの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。PI取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。TAS Kポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗TAS K抗体(例えば約10 µg/ml)、TAS K結合オリゴペプチド又はTAS K結合有機分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために35 mmのストレーナキャップ付き12 x 75チューブ(チューブ当たり1 ml、処理グループ当たり3チューブ)に等分する。ついで、チューブへPI(10 µg/ml)を与える。サンプルをFACSCAN(登録商標)フローサイトメータとFACSCONVERT(登録商標)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析してもよい。PI取込みによって測定して、統計的に有意なレベルの細胞死を誘導する抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド又はTAS K結合有機分子は、細胞死誘導抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド又はTAS K結合有機分子

として選択することができる。

関心のある抗体が結合したT A S Kポリペプチド上のエピトープに結合する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。既知の抗T A S K抗体のように、試験抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が同じ部位又はエピトープと結合するならば、このアッセイを確定するために用いることができる。あるいは、又は付加的に、エピトープマッピングを、当該分野で周知の方法によって行うことができる。例えば、接触残基を同定するために、例えばアラニンスキャンニングによって抗体配列を変異させることができる。この変異体抗体は、適切なフォールディングを確かめるために、最初にポリクローナル抗体との結合について試験される。異なる方法では、T A S Kポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体による競合アッセイで用いることができる。

10

【0109】

E. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開81/01145を参照)を活性化酵素へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、ADEPTにおいて使用することができる。例えば国際公開88/07378及び米国特許第4975278号を参照されたい。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性化細胞毒形態に変換するようにプロドラッグへ作用し得る任意の酵素が含まれる。

20

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なノイラミニダーゼ及びラクタシダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを変換させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

30

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗T A S K抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性化部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる(Neuberger等, Nature 312:604-608[1984])。

40

【0110】

F. 完全長T A S Kポリペプチド

本発明は、本出願でT A S Kポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々のT A S KポリペプチドをコードするcDNA(部分及び完全長)が同定され単離された。

50

下記の実施例に開示するように、種々の cDNA クローンが記載されている。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載した T A S K ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

【 0 1 1 1 】

G . 抗 T A S K 抗体及び T A S K ポリペプチド変異体

ここに記載した抗 T A S K 抗体及び完全長天然配列 T A S K ポリペプチドに加えて、抗 T A S K 抗体及び T A S K ポリペプチド変異体も調製できると考えられる。抗 T A S K 抗体及び T A S K ポリペプチド変異体は、コード化 D N A に適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び / 又は所望の抗体又はポリペプチドを合成することによって調製できる。当業者は、アミノ酸変化がグリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などの抗 T A S K 抗体の翻訳後プロセス又は T A S K ポリペプチドの翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。

ここに記載した抗 T A S K 抗体及び T A S K ポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第 5 3 6 4 9 3 4 号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体又はポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び / 又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であることができる。挿入及び欠失は、場合によっては 1 から 5 のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

【 0 1 1 2 】

抗 T A S K 抗体及び T A S K ポリペプチド断片がここで提供されている。そのような断片は、例えば完全長天然抗体又はタンパク質と比較した時に、N 末端又は C 末端で切断しているか、又は内部残基を欠いている可能性がある。ある断片は、抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドの所望される生物学的活性にとって必修ではないアミノ酸残基を欠く。

抗 T A S K 抗体及び T A S K ポリペプチド断片は、多くの従来技術のいずれかによって調製してもよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法には、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基で確定した部位でタンパク質を切断することが知られた酵素によってタンパク質を処理することで、又は適当な制限酵素で D N A を消化して所望の断片を単離することによって抗体又はポリペプチド断片を生成することが含まれる。さらにその他の好適な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、所望の抗体又はポリペプチド断片をコードする D N A 断片を単離し増幅することが含まれる。D N A 断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、P C R の 5 ' 及び 3 ' プライマーで用いられる。好ましくは、抗 T A S K 抗体及び T A S K ポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドと少なくとも一つの生物学的及び / 又は免疫学的活性を共有する。

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表 6 に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 6 に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【 0 1 1 3 】

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln	
Asp (D)	glu	glu	
Cys (C)	ser	ser	
Gln (Q)	asn	asn	
Glu (E)	asp	asp	
Gly (G)	pro; ala	ala	10
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro (P)	ala	ala	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	tyr; phe	tyr	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	20
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

【 0 1 1 4 】

抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b) 標的部位の電荷又は分子疎水性、又は(c) 側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

30

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、又はより好ましくは、残された(非保存)部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘導、アラニンスキャンニング、及び P C R 突然変異誘導等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘導 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘導 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘導 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] 又は他の知られた技術をクローニングした D N A に実施して、抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド変異体 D N A を作成することもできる。

40

【 0 1 1 5 】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくい

50

ので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

抗T A S K抗体又はT A S Kポリペプチドの適切なコンフォメーションを維持することに関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐために、概してセリンと置換され得る。逆に、抗T A S K抗体又はT A S Kポリペプチドの安定性(特に、抗体がFv断片のような抗体断片)を向上させるために、それにシステイン結合(複数でも)を加えてもよい。

10

【0116】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる開発のために得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性成熟がふくまれる。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位(例えば、6-7部位)を変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。変更の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘導を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトT A S Kポリペプチドとの接点を同定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

20

抗T A S K抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で周知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘導、PCR突然変異誘導、そして抗T A S K抗体の早期に調製した変異体又は非変異体形のカセット突然変異誘導による、天然ソースからの単離(天然発生アミノ酸配列変異体の場合)又は調製が含まれる。

30

【0117】

H. 抗T A S K抗体及びT A S Kポリペプチドの修飾

抗T A S K抗体及びT A S Kポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型には、抗T A S K抗体又はT A S Kポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗T A S K抗体又はT A S Kポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えば抗T A S K抗体又はT A S Kポリペプチドを、抗T A S K抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通常用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

40

他の修飾には、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の

50

-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)], N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0118】

本発明の範囲内に含まれる抗TASK抗体又はTASKポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。ここで意図される「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列抗TASK抗体又はTASKポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分を欠失させること（内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、又は化学及び/又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることのいずれか）、及び/又は天然配列抗TASK抗体又はTASKポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。更には、この語句には、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的な変化が含まれる。

抗体及び他のポリペプチドのグリコシル化とは、典型的にはN-結合又はO-結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付与を指す。トリペプチドは、Xがプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンの配列であり、アスパラギン側鎖への炭水化物部分が酵素的に付与される認識部位である。従って、ポリペプチドのこれらトリペプチド配列のいずれかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。O-結合グリコシル化とは、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも用いられるが、殆どの場合にはセリン又はスレオニンへN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの一つの糖をヒドロキシアミノ酸へ付与することを指す。

【0119】

抗TASK抗体又はTASKポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記に記載のトリペプチド配列（N-結合グリコシル化部位について）の一つ又は複数を含むようにすることによって簡便に完遂できる。この改変は、また、最初の抗TASK抗体又はTASKポリペプチドの配列へ一つ又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（O-結合グリコシル化部位について）。抗TASK抗体又はTASKポリペプチドアミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化を通して、特に、コドンが所望するアミノ酸へ翻訳されるように、あらかじめ選択した塩基での抗TASK抗体又はTASKポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって、改変され得る。

抗TASK抗体又はTASKポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。そのような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開された国際公開87/05330、及びAplin及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0120】

抗TASK抗体又はTASKポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグリコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)によって、そしてEdge等, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

抗TASK抗体又はTASKポリペプチド共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第479119

10

20

30

40

50

2号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。また、抗体又はポリペプチドは、例えばコアセルベーション法によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)に、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンで捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16版, A. Oslo編(1980)に開示されている。

また、本発明の抗TASK抗体又はTASKポリペプチドは、その他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合した抗TASK抗体又はTASKポリペプチドを含むキメラ分子が形成される方法で修飾されてもよい。

【0121】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと抗TASK抗体又はTASKポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には抗TASK抗体又はTASKポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような抗TASK抗体又はTASKポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって抗TASK抗体又はTASKポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-His）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（poly-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗TASK抗体又はTASKポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも一つの可変領域に換えて抗TASK抗体又はTASKポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ、CH₂及びCH₃、又はヒンジ、CH₁、CH₂及びCH₃領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5428130号を参照のこと。

【0122】

I. 抗TASK抗体及びTASKポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、抗TASK抗体及びTASKポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより抗TASK抗体及びTASKポリペプチドを産生させる方法に関する。勿論、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて抗TASK抗体及びTASKポリペプチドを調製することができると考えられている。例えば、適切なアミノ酸配列、又はその一部分を、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生成してもよい [例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サンフランシスコ, カリフォルニア(1969)；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動を使用することに

よってインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 (Foster City, CA) を用いて、製造者の指示によって実施してもよい。抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて所望する抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドを生成させてもよい。

【 0 1 2 3 】

1 . 抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドをコードする D N A の単離

抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドをコードする D N A は、抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド m R N A を保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製された c D N A ライブラリーから得ることができる。従って、ヒト抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド D N A は、ヒトの組織から調製された c D N A ライブラリーから簡便に得ることができる。また抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法 (例えば、自動核酸合成) により得ることもできる。

ライブラリーは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ (少なくとも約 2 0 - 8 0 塩基のオリゴヌクレオチド等) によってスクリーニングできる。選択されたプローブによる c D N A 又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えば Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法は、P C R 法を使用するものである [Sambrook 等, 上掲; Dieffenbach 等, PCR Primer : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)] 。

【 0 1 2 4 】

c D N A ライブラリーをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるよう十分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内の D N A とのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³² P 標識 A T P のような放射線標識、ピオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲の Sambrook らに示されている。

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、GenBank らの公共データベース又は他の個人の配列データベースに寄託され利用可能となっている他の周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内の又は完全長配列に渡っての (アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの) 配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、c D N A に逆転写されていない m R N A の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrook 等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用して、選択された c D N A 又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。

【 0 1 2 5 】

2 . 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、p H 等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Appoa

10

20

30

40

50

ch, M. Butler 編 (IRL Press, 1991) 及び上掲の Sambrook 等に見出すことができる。

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、 $CaCl_2$ 、 $CaPO_4$ 、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲の Sambrook 等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw 等, *Gene*, 23:315(1983) 及び 1989 年 6 月 29 日公開の国際公開 89/05859 に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham 及び van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第 4,399,216 号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen 等, *J. Bact.*, 130:946 (1977) 及び Hsiao 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、DNA を細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown 等, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) 及び Mansour 等, *Nature*, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

【0126】

ここに記載のベクターに DNA をクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌 K12 株 MM294 (ATCC 31446)；大腸菌 X1776 (ATCC 31537)；大腸菌株 W3110 (ATCC 27325) 及び K5772 (ATCC 53635) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌 (*E. coli*)、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチリス (*B. subtilis*) 及びバチルス・リチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989 年 4 月 12 日発行の DD266710 に記載されたバチルス・リチェニフォルミス 41P)、シュドモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株 W3110 は、組換え DNA 生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株 W3110 を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌 W3110 株 1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌 W3110 株 9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r* を有する大腸菌 W3110 株 27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r* を有する大腸菌 W3110 株 37D6；非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を持つ 37D6 株である大腸菌 W3110 株 40B4；及び 1990 年 8 月 7 日発行の米国特許第 4946783 号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えば PCR 又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0127】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞傷害剤 (例えば、毒素) と結合し、その免疫コンジュゲートそのものが腫瘍細胞の破壊において有効性を示す場合など、特にグリコシル化及び Fc エフェクター機能が不要ない場合に、細菌で

産生させることができる。完全長抗体は、血液循環でより長い半減期を有する。大腸菌での産生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号(Carter等)、米国特許第5789199号(Joly等)、及び翻訳開始部位(TIR)及び発現と分泌を最適化するシグナル配列を記載している米国特許第5840523号(Simmons等)を参照のこと。これら特許は、ここに参考文献として取り入れられている。発現の後、抗体は、大腸菌細胞ペーストから可溶性分画へ分離し、例えば、アイソタイプによってプロテインA又はGカラムを介して精製することができる。最終精製は、例えば、CHO細胞で発現させた抗体を精製するための工程と同じようにしておこなうことができる。

【0128】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗TAS K抗体又はTAS Kポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 90: 140 [1981]; 1985年5月2日公開の欧州特許第139383号); クリュイペロミセス宿主(*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4943529号; Fler等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)), 例えばクリュイペロミセスラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, *J. Bacteriol.*, 154(2): 737-742 [1983]), クリュイペロミセス・フラギリス(*K. fragilis*) (ATCC 12424), クリュイペロミセス・ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC 16045), クリュイペロミセス・ウィケラミイ(*K. wickeramii*) (ATCC 24178), クリュイペロミセス・ワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56500), クリュイペロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilarm*) (ATCC 36906; Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)), クリュイペロミセス・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びクリュイペロミセス・マルキシアナス(*K. marxianus*); ヤロウイア(*yarrowia*) (欧州特許第402226号); ピシア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第183070号; Sreekrishna等, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマ・レーシア(*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244234号); アカパンカピ(Case等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日公開の欧州特許第394538号); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolyposcladium*) (1991年1月10日公開の国際公開91/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス(Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984])及びアスペルギルス・ニガー(Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C1化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピシア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

【0129】

グリコシル化抗TAS K抗体又はTAS Kポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。非脊椎動物細胞の例には、植物細胞、例えば綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの細胞培養と同様に、ショウジョウバエS2及びヨトウ(*spodoptera*) Sf9等の昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルス株及び変異体、及びヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*) (幼虫(caterpillar))、ネッタシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キロショウジョウバエ(ショウジョウバエ)、及びカイコ等の宿主に対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。種々のトランスフ

10

20

30

40

50

エクシオン用のウイルス株、例えばオートグラフィア・カルフォルニカ(*Autographa californica*) NPVのL-1変異株、カイコNPVのBm-5株が公に入手でき、このようなウイルスは、本発明に係るウイルスとして、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養(組織培養)した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)で形質転換させたサル腎CV1細胞株; ヒト胚芽腎細胞株(293又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された293細胞, Graham等, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); ベビーハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/ -DHFR(CHO, Urlaub等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); サル腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト頸管腫瘍細胞(HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI細胞(Mather等, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); MRC 5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝臓癌細胞(Hep G2)である。

宿主細胞は、抗TAS K抗体又はTAS Kポリペプチド生成のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選出し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修正した通常の栄養培地で培養される。

【0130】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

抗TAS K抗体又はTAS Kポリペプチドをコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の1つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

TAS Kは直接的に組換え手法によって生成されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される抗TAS K抗体又はTAS Kポリペプチド-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスターゼ、ペニシリナーゼ、1ppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクリュイベロミセス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5010182号に記載されている)、又は酸ホスフォターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C. albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日公開の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0131】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点 (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又は B P V) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしており、例えばパシリの D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、D H F R あるいはチミジンキナーゼのように、抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型 D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖された D H F R 活性に欠陥のある C H O 株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド Y R p 7 に存在する t r p 1 遺伝子である [Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979); Kingsman等, Gene, 7:141(1979); Tschemper等, Gene, 10:157(1980)]。t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C 番号 4 4 0 7 6 あるいは P E P 4 - 1 のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【 0 1 3 2 】

発現及びクローニングベクターは、通常、抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド-コード化核酸配列に作用可能に結合し、m R N A 合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Chang等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許第 3 6 , 7 7 6 号]、及びハイブリッドプロモーター、例えば t a c プロモーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた抗 T A S K 抗体、或いは T A S K ポリペプチドをコードする D N A と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘導的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチクロム C、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第 7 3 6 5 7 号に更に記載されている。

【 0 1 3 3 】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗 T A S K 抗体又は T A S K ポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開の英国特許第 2 2 1 1 5 0 4 号)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウィ

10

20

30

40

50

ルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による抗TASK抗体又はTASKポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、抗TASK抗体又はTASKポリペプチドコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、抗TASK抗体又はTASKポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養での抗TASK抗体又はTASKポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei等, *Nature*, 281:40-46 (1979); 欧州特許第117060号; 及び欧州特許第117058号に記載されている。

【0134】

4. 宿主細胞の培養

本発明の抗TASK抗体又はTASKポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM),シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes等, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国特許再発行第30985号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン(商品名)薬)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0135】

5. 遺伝子増幅/発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンプロット法[Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、直接的に試

料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果、表面での二本鎖の形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量化する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列TASKポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はTASK DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

10

【0136】

6. 抗TASK抗体及びTASKポリペプチドの精製

抗TASK抗体及びTASKポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X100)を用いて又は酵素的切断により膜から引き離すことができる。抗TASK抗体及びTASKポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

抗TASK抗体及びTASKポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及び抗TASK抗体及びTASKポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定の抗TASK抗体又はTASKポリペプチドの性質に依存する。

20

30

【0137】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第1段階として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter等、*Bio/Technology* 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

40

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等、*J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 [1983])。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨されている(Guss等、*EMBO J.* 5: 15671575

50

[1986])。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物とを含む混合物に、約2.5-4.5のpHでの溶離バッファーを用いて、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度(例えば、約0-0.25M塩)で実施される。

【0138】

J. 製薬製剤

本発明に係る抗TASK抗体、TASK結合オリゴペプチド、TASK siRNA、TASK結合有機分子及び/又はTASKポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド、siRNA又は有機分子を、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th版, Osol, A. 編. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、酢酸、Tris、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液;アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤;防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド;ヘキサメトニウムクロライド;ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド;フェノール、ブチル又はベンジルアルコール;メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;及びm-クレゾールなど);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質;ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー;グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸;グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物;EDTA等のキレート剤;トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー;スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖;ポリソルベート等の界面活性剤;ナトリウムなどの塩形成対イオン;金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体);及び/又はトゥイーン(TWEEN)(登録商標)、プルロニクス(PLURONICS)(登録商標)、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは5-200mg/mlの間、好ましくは10-100mg/mlの間の濃度の抗体で構成される。

【0139】

ここでの製剤は、また、治療すべき特定の徴候の必要に応じて一以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。例えば、抗TASK抗体、TASK結合オリゴペプチド、TASK siRNA、又はTASK結合有機分子に加えて、一つの製剤に、例えば、TASKポリペプチド上の異なるエピトープと結合する第二抗TASK抗体、又は特定の癌の成長に影響を与える成長因子のような何らかの他の標的に対する抗体を含めることは望ましい。あるいは、又はさらに、この組成物は、更に化学療法剤、細胞障害剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、及び/又は心臓保護剤を含んでもよい。このような分子は、意図する目的にとって有効な量の組み合わせで適切に存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセ

10

20

30

40

50

ル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通じた濾過により容易に達成される。

【0140】

K. 抗TAS K抗体、TAS K結合オリゴペプチド、TAS K siRNA及びTAS K結合有機分子を用いる診断及び治療

癌におけるTAS K発現を定量するために、種々の診断アッセイが利用可能である。一実施態様では、TAS Kポリペプチド過剰発現は、免疫組織化学(IHC)によって分析される。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をIHCアッセイへ供してもよいし、次のようなTAS Kタンパク質染色強度基準と合致させてもよい：

スコア0 - 染色が観察されないか、又は膜染色が腫瘍細胞の10%未満で観察される。

スコア1+ - わずかに/弱く認知できる程度の膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて検出される。細胞はそれらの膜の一部のみが染色される。

スコア2+ - 弱いないしは中程度の完全な膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて観察される。

スコア3+ - 中程度から強い完全な膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて観察される。

TAS Kポリペプチド発現に関して0又は1+スコアの腫瘍は、TAS Kが過剰発現していないことを特徴付けるものであるのに対し、2+又は3+スコアの腫瘍はTAS Kが過剰発現していることを特徴付ける。

【0141】

別に、又は付加的に、FISHアッセイ、例えばINFORM(登録商標)(Ventana, Arizonaから販売)又はPATHVISION(登録商標)(Vysis, Illinois)を、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織で実施して、腫瘍におけるTAS K過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。

TAS K過剰発現又は増幅は、インビボ診断アッセイを使用して評価することができ、例えば検出される分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位元素又は蛍光標識)が付けられた分子(例えば抗体、オリゴペプチド又は有機分子)を投与し、標識の局在化について患者を外部スキャンする。

上に記載したように、本発明の抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は有機分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、TAS Kポリペプチドを発現している癌の診断及び染色にとって有用である(例えば、ラジオイメージングで)。他の細胞の精製の段階として、混合細胞の集団からTAS K発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、また、例えば、ELISA又はウェスタンブロットにおいて、インビトロでTAS Kポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からTAS Kポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【0142】

現在、癌の段階に応じて、癌の治療には、次の治療：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療の一つ、又はそれらを組合せたものが含まれる。抗TAS K抗体

、オリゴペプチド、s i R N A又は有機分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望されている。本発明の腫瘍標的化抗T A S K抗体、オリゴペプチド、s i R N A又は有機分子は、疾患の初期診断時及び再発中におけるT A S K-発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗T A S K抗体、オリゴペプチド、s i R N A又は有機分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射線標識された化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び/又は放射線治療と組み合わせてもよく、使用してもよい。抗T A S K抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、従来の治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来の治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パクリタキセル)、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した一又は複数の化学療法剤による治療と組合せて、癌患者に抗T A S K抗体、オリゴペプチド又は有機分子を投与することができる。特に、パクリタキセル及び改変誘導体との組合せ治療が考えられる(例えば、欧州特許第0600517号を参照のこと)。抗T A S K抗体、オリゴペプチド又は有機分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施態様では、抗T A S K抗体、オリゴペプチド、s i R N A又は有機分子は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(P D R)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

10

20

【0143】

特定の一実施態様では、細胞障害剤に結合した抗T A S K抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有する毒素コンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、T A S Kタンパク質に結合した免疫コンジュゲートは細胞によりインターナリゼーションし、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性における免疫コンジュゲートの治療的効果が向上する。好ましい実施態様では、細胞障害剤は、癌細胞内の核酸を標的とするか、又はこれに干渉する。このような細胞障害剤の例は、上述されており、メイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼ及びD N Aエンドヌクレアーゼを含む。

30

抗T A S K抗体、オリゴペプチド又は有機分子又はその毒素コンジュゲートは、公知の方法、例えばボラス、もしくは一定時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、くも膜下腔内、経口、局所的、又は吸入経路により、ヒトの患者に投与される。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の静脈内又は皮下投与が好ましい。

他の治療計画を抗T A S K抗体、オリゴペプチド又は有機分子の投与と組合せてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の医薬製剤を使用する同時投与、及び好ましくは両方(又は全ての)活性剤が同時にその生物学的活性を働かせる時間があるいずれかの順での連続投与が含まれる。このような組合せ治療により、結果として相乗的治療効果が生じることが好ましい。

40

【0144】

また、特定の癌に関連した他の腫瘍抗原に対する抗体の投与と共に、抗T A S K抗体又は抗体群、オリゴペプチド又は有機分子の投与を組合せることが望ましい。

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗T A S K抗体(又は抗体類)、オリゴペプチド又は有機分子と一又は複数の化学療法剤又は成長阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素及びヒドロキシ尿素タキサン類(hydroxyureataxanes)(例えばパクリタキセル及びドキセタキセル)及び/又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、

50

又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。

抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、抗ホルモン化合物；例えばタモキシフェン等の抗エストロゲン化合物；抗プロゲステロン、例えばオナプリストン(onapristone)(欧州特許第616812号を参照)；又は抗アンドロゲン、例えばフルタミドを、このような分子に対して既知の用量で組合せてもよい。治療される癌がアンドロゲン非依存性癌である場合、患者は予め抗アンドロゲン治療を受け、癌がアンドロゲン非依存性になった後、抗TASK抗体、オリゴペプチド又は有機分子(及び場合によってはここに記載した他の薬剤)を患者に投与してもよい。

10

【0145】

しばしば、心臓保護剤(治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益なことである。上述した治療疾患に加えて、抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び/又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗TASK抗体、オリゴペプチド又は有機分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の適切な用量は、上記のような治療される疾患の種類、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機分子を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は有機分子の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は静脈注入又は皮下注射により投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、体重1kg当たり約1µgないし50mg(例えば0.1-15mg/kg/用量)の抗体を患者への最初の投与量の候補とすることができる。投薬計画は、約4mg/kgの初期負荷量、続いて1週間に約2mg/kgの維持用量の抗TASK抗体を投与することからなるとよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約1µg/kgから100mg/kgあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

20

30

【0146】

抗体タンパク質の患者への投与の他に、本出願は遺伝子治療による抗体の投与を考察する。抗体をコードする核酸の投与は「抗体を治療的有効量で投与する」という表現に含まれる。例えば、遺伝子治療を用いた細胞内抗体の産生に関する、1996年3月14日に公開された国際公開第96/07321号を参照のこと。

核酸(場合によってはベクター内に含まれたもの)を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常は抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する(米国特許第4892538号及び第5283187号参照)。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

40

50

【0147】

現在好まれているインビボ核酸移入技術は、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス）、及び脂質ベースの系（例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである）での形質移入を含む。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson等、Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、国際公開第93/25673号及びそこに引用された参考文献も参照。

本発明の抗TASK抗体は、ここでの「抗体」の定義により包含される様々な形態であってよい。よって、抗体には、完全長又は無傷抗体、抗体断片、天然配列抗体又はアミノ酸変異体、ヒト化、キメラ又は融合抗体、免疫コンジュゲート、及びそれらの機能的断片が含まれる。融合抗体において、抗体配列は異種ポリペプチド配列に融合している。抗体はFc領域が修飾されて、所望のエフェクター機能を提供することができる。以下の段落に詳細に記載されるように、適切なFc領域と共に、細胞表面に結合したそのままの抗体は、例えば抗体-依存性細胞障害(ADCC)を介して又は補体依存性細胞障害において補体を補充することにより、又は他のいくつかのメカニズムにより、細胞毒性を誘導し得る。また、副作用及び治療による合併症を最小にするようにエフェクター機能を除去又は低減することが望ましい場合には、所定の他のFc領域が使用される。

一実施態様では、抗体は、本発明の抗体と同じエピトープとの結合に関して競合するか、又はこれに実質的に結合する。また、本発明の抗TASK抗体の生物学的特徴を有する抗体、特にインビボ腫瘍ターゲティング及び任意の細胞増殖阻害又は細胞障害特性を含むものが考察される。

上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

【0148】

本抗TASK抗体、オリゴペプチド及び有機分子は、哺乳動物におけるTASK-発現癌の治療又は一又は複数の癌の徴候の緩和に有用である。このような癌には、前立腺癌、尿道癌、肺癌、乳癌、結腸癌及び卵巣癌、特に前立腺癌腫、腎細胞癌腫、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺細胞の扁平癌腫、及び胸膜中皮腫が含まれる。癌には、上述した任意の転移性癌が含まれる。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物においてTASKポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。好ましい実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、インビボ又はインビトロで細胞のTASKポリペプチドに結合して、TASK-発現腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の成長を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸の抗TASK抗体(いかなる薬剤にも結合していない)が含まれる。細胞傷害性又は細胞成長阻害特性を有する裸の抗体は、細胞障害剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞障害剤と抗体とを結合させ、以下に記載するような免疫コンジュゲートを形成させることによって、細胞障害特性を抗TASK抗体に付与することができる。この細胞障害剤又は成長阻害剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばカリケアマイシン又はメイタンシノイド、及びそれらの類似物又は誘導体が好ましい。

【0149】

本発明は、本発明の抗TASK抗体、オリゴペプチド、siRNA又は有機分子と担体を含む組成物を提供する。癌の治療のために、組成物はその治療の必要性に応じて患者に投与することができ、ここで組成物は免疫コンジュゲート又は裸の抗体として存在する一又は複数の抗TASK抗体を含むし得る。さらなる実施態様においては、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含む成長阻害剤又は細胞障害剤とこれらの抗体、オリゴペプチド又は有機分子を組合せて含むこともできる。また本発明は、本発明の抗TASK抗体、オリゴペプチド又は有機分子と担体を含む製剤も提供する。一実施態様において、製剤は製薬的に許容可能な担体を含む治療用製剤である。

本発明の他の態様は、抗TASK抗体をコードする単離された核酸分子である。H及びL鎖、特に高頻度可変領域残基をコードする核酸、天然配列抗体及び変異体をコードする鎖、該抗体の修飾体及びヒト化形態を含む。

10

20

30

40

50

本発明は、抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は有機分子を治療的有効量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるTAS Kポリペプチド-発現癌の治療又は癌の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(急性)又は慢性的に、又は間欠的に投与することができる。また、TAS Kポリペプチド-発現細胞の成長を阻害し、該細胞を殺す方法も提供される。

本発明は少なくとも一つの抗TAS K抗体、オリゴペプチド、s i R N A又は有機分子を含有するキット又は製造品も提供する。抗TAS K抗体、オリゴペプチド、s i R N A又は有機分子を含有するキットは、例えばTAS K細胞殺傷アッセイ、細胞からのTAS Kポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、TAS Kの単離及び精製のためには、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有することができる。インビトロにおけるTAS Kの検出及び定量化、例えばE L I S A又はウエスタンブロットにおける抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されて提供され得る。

【0150】

L. 製造品及びキット

本発明の他の実施態様は、抗TAS K発現癌の治療に有用な物質を含有する製造品である。この製造品は容器と容器に付与又は添付されるラベル又はパッケージ挿入物を含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成されてよい。容器は、癌の状態の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は有機分子である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌の治療のために使用されることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、癌患者に抗体、オリゴペプチド又は有機分子組成物を投与する際の注意書きをさらに含む。製造品はさらに、製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水(B W F I)、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0151】

種々の目的、例えばTAS K発現細胞殺傷アッセイ、細胞からのTAS Kポリペプチドの精製又は免疫沈降に有用なキットも提供される。TAS Kポリペプチドの単離及び精製において、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むことが可能である。インビトロにおけるTAS Kポリペプチドの検出及び定量化、例えばE L I S A又はウエスタンブロットのための抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むキットを提供することもできる。製造品と同様、キットも容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。容器には少なくとも一つの本発明の抗TAS K抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有する組成物が収容されている。希釈液及びバッファー、コントロール抗体等を収容する付加的な容器を具備していてもよい。ラベル又は能書は、組成物についての記載、並びに意図するインビトロ又は診断での使用に関する注意書きを提供するものである。

【0152】

M. TAS Kポリペプチド及びTAS K-ポリペプチドコード核酸の用途

TAS Kポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(又はそれらの相補鎖)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA、s i R N A及びDNAプローブの生成において種々の用途を有している。また、TAS Kコード化核酸は、ここに記載される組換え技術によるTAS Kポリペプチドの調製に有用であり、これらTAS Kポリペ

チドは、例えば、ここで記載の抗 T A S K 抗体の調製において用途を見出し得る。

完全長天然配列 T A S K 遺伝子又はその一部は、完全長 T A S K c D N A の単離又はここに開示した天然 T A S K 配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の c D N A (例えば、T A S K の天然発生変異体又は他の種からの T A S K をコードするもの)の単離のために、c D N A ライブラリー用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約 20 ~ 約 50 塩基である。このハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列 T A S K のプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から判定され得る。例えば、スクリーニング法は、T A S K 遺伝子のコード化領域を周知の D N A 配列を用いて単離して約 40 塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、³²P 又は ³⁵S 等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン/ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識され得る。本発明の T A S K 遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒト c D N A、ゲノム D N A 又は m R N A のライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーにプローブがハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術を、以下の実施例において更に詳細に記載する。本出願に開示されている任意の E S T 配列は、ここに開示している方法を利用して、同じようにプローブとして用い得る。

【0153】

T A S K コード核酸の他の有用な断片には、標的 T A S K m R N A (センス)又は T A S K D N A (アンチセンス)配列と結合できる一本鎖核酸配列(R N A 又は D N A のいずれか)を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、T A S K D N A のコード化領域の断片を含む。そのような断片は、一般的には少なくとも約 14 ヌクレオチド、好ましくは約 14 から 30 ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードする c D N A 配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen (Cancer Res. 48:2659, 1988)及び van der Kroij等 (BioTechniques 6:958, 1988)に記載されている。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T A S K タンパク質の発現を阻止するのに用いられ、それら T A S K タンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖 - ホスホジエステル骨格(又は他の糖結合、国際公開 91/06629 に記載のもの等)を有するオリゴヌクレオチドを更に含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インピボで安定であるが(つまり、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【0154】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開 90/10048 に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄-媒介 D N A トランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチ

ドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インピボ又はエキソピボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2(M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター(国際公開90/13641参照)を含む。

【0155】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開91/04753に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開90/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は、通常は少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

【0156】

あるいは、二重鎖RNAを産生させることができる。30ヌクレオチド長以下の二重鎖RNAは細胞内に導入されると特異的遺伝子の発現を阻害する。この機構はRNA媒介干渉(RNAi)として知られており、試薬として使用される小(30ヌクレオチド以下)RNAはsiRNAとして知られている。TASK干渉RNAは既知の方法を使用して同定し合成することができる(Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003), 国際公開2003056012及び国際公開2003064621)。siRNAは、標的遺伝子の発現が症状又は疾患を緩和するであろう症状で遺伝子発現の量を低減させるのに有用である。

また、プローブをPCR技術に用いて、密接に関連したTASKコード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、TASKをコードするヌクレオチド配列は、そのTASKをコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイトハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖分析、及びライブラリーでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び

10

20

30

40

50

染色体の特定領域にマッピングすることができる。

【0157】

T A S Kのコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合(例えば、T A S Kがレセプターである場合)、T A S Kは、結合相互作用に関わっている他のタンパク質又は分子を同定するためのアッセイに使用することができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。また、このような結合性相互作用に含まれるタンパク質は、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターT A S Kは関連するリガンドの単離に使用できる。スクリーニングアッセイは、天然T A S K又はT A S Kのレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計してよい。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイを含み、それらアッセイを特に小分子薬剤候補を同定することに適したものにす。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

また、T A S K又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、T A S KをコードするcDNAは、T A S KをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、T A S KをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4736866号や第4870009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのT A S K導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたT A S Kをコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はT A S KをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0158】

あるいは、T A S Kの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたT A S Kをコードする変更ゲノムDNAと、T A S Kをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、T A S Kをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するT A S K「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、T A S KをコードするcDNAは、確立された技術に従い、T A S KをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。T A S KをコードするゲノムDNAの一部を欠失させたり、組み込みをモニターするために使用する選択性マーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターを胚幹細胞株に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性乳母動物に移植

10

20

30

40

50

し、期間において「ロックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ロックアウト動物は、TASKポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状态及びその病理的状态の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

また、TASKポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が細胞内に導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている(Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【0159】

生細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技術は、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リボソーム媒介トランスフェクションである(Dzau等, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リボソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコルの概説については、Anderson等, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

ここに記載したTASKポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列データに基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、目下のところ新規な染色体マーカーの同定の必要である。本発明の各TASK核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また、本発明のTASKポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングの診断に使用でき、本発明のTASKポリペプチドは、その他の組織と比較して一つの組織において、好ましくは同じ組織型の正常組織と比較して疾患性組織において特異的に発現する。TASK核酸分子には、PCR、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【0160】

この発明は、TASKポリペプチド(アゴニスト)を模倣、又はTASKポリペプチド(アンタゴニスト)の効果を防ぐものを同定するための化合物をスクリーニングする方法を含む。アンタゴニスト薬候補に関するスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされたTASKポリペプチドと結合又は複合化する、さもなければコードされているポリペプチドと他の細胞タンパク質の相互作用を妨害する化合物、例えば

、細胞からのT A S Kポリペプチドの発現を阻害するものを含む化合物を同定するように設計されている。そのようなスクリーニングアッセイには、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイが含まれ、それらアッセイを特に小分子薬剤候補の同定に適したものにす。

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、そして細胞ベースアッセイを含む、当該分野で良く特徴付けられている種々の形式でおこなうことができる。

アンタゴニストに関する全てのアッセイは、薬候補をここで同定された核酸によってコードされているT A S Kポリペプチドと、これら両成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間にわたって接触させることを必要とする点で共通である。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるT A S Kポリペプチド又は薬候補が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をT A S Kポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきT A S Kポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体の使用によって検出できる。

【0161】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子によってコードされる特定のT A S Kポリペプチドと結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーのカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature(London), 340, :245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)]に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌G A L 4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はD N A結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がG A L 4のD N A結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。G A L 1-1 a c Zリポーター遺伝子のG A L 4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したG A L 4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定のタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【0162】

ここで同定されたT A S Kポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる:通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞内又は細胞外成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及

10

20

30

40

50

び時間で調製される。候補化合物の結合阻害能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合(複合体形成)は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなくコントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

アンタゴニストを検定するために、T A S Kポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、T A S Kポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がT A S Kポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、T A S Kポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合T A S Kポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。T A S Kポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したT A S Kポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドバニング及びF A C Sソーティングにより同定できる。Coligan等, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、ここではポリアデニル化R N AがT A S Kポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このR N Aから生成されたc D N Aライブラリがプールに分配され、C O S細胞又は他のT A S Kポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したT A S Kポリペプチドへ曝露する。T A S Kポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、対話型サブプール化及び再スクリーニング法を用いてサブプールを調製して再形質移入し、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0163】

レセプター同定の代替的方法として、標識したT A S Kポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をP A G Eで分離し、X線フィルムに曝す。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロシーケンシングを施してよい。マイクロシーケンシングから得たアミノ酸配列は、推定結合対をコードする遺伝子を同定するc D N Aライブラリーをスクリーニングするディジェネレートオリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識T A S Kポリペプチドとともにインキュベートする。ついで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとT A S Kポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってT A S Kポリペプチドの作用を競合的に阻害するT A S Kポリペプチドの変異形態であってもよい。

他の潜在的なT A S Kポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスR N A又はD N A作成物であり、例えば、アンチセンスR N A又はD N A分子は、標的m R N Aにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することによりm R N Aの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、三重螺旋形成又はアンチセンスD N A又はR N Aを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのD N A又はR N Aへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟T A S Kポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分

10

20

30

40

50

は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(三重螺旋 - Lee等, Nucl. Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooney等, Science, 241: 456 (1988); Dervan等, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それによりTASKポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリダイゼーションしてmRNA分子のTASKポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、TASKポリペプチドの産生を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

10

【0164】

潜在的アンタゴニストは、TASKポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりTASKポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、ついでヌクレオチド鎖切断的開裂により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、国際公開97/33551(1997年9月18日公開)を参照。

20

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグステイン(Hoogsteen)塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのかなり大きな伸張を必要とする。さらなる詳細は、例えば、上掲のPCT公報の国際公開97/33551を参照。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

30

【0165】

単離されたTASKポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組換え的にTASKポリペプチドを生成するために、ここで用いることが可能である。次に、生成されたTASKポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗TASK抗体を生成するために用いることが可能である。

ここで同定されるTASKポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、癌を含む種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

40

TASKポリペプチドが細胞内にあるので、内部移行抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞中に搬送するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び/又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1つ以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害剤のような

50

その機能を高める薬剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【実施例】

【0166】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体の中で特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【0167】

実施例1：GeneExpress（登録商標）を用いた組織発現プロファイリング

他の腫瘍及び/又は正常組織に比べて対象となる特定の腫瘍組織において発現が顕著に上方制御されるポリペプチド（及びそれをコードする核酸）を同定するために、遺伝子発現情報を含む専有データベース（GeneExpress登録商標）Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD）を分析した。具体的に言うと、GeneExpress（登録商標）データベースの分析は、ジーン・ロジック・インク（Gaithersburg, MD）から入手できるGeneExpress（登録商標）データベースで使用するソフトウェア、又はGeneExpress（登録商標）データベースで使用するジェネンテック社が作成、開発した専有ソフトウェアを用いて行った。分析のポジティブヒットの評価は、例えば、正常必須組織及び/又は正常増殖性組織における組織特異性、腫瘍特異性及び発現レベルなどを含むいくつかの基準に基づく。GeneExpress（登録商標）データベースの分析により決定される組織発現プロファイルが、他の腫瘍組織及び/又は正常組織に比べて特定の腫瘍組織または腫瘍組織において高い組織発現及び顕著な発現の上方制御を示し、状況に応じて正常基本組織及び/又は正常増殖性組織において比較的低い発現を示す分子のリストは以下の通りである。しかして、以下のリストの分子が、哺乳動物の癌の診断及び治療のための優れたポリペプチドターゲットである。

分子	発現上昇が見られる腫瘍	比較対象
DNA255289(TASK110)	乳房腫瘍	正常乳房組織
DNA255289(TASK110)	大腸腫瘍	正常大腸組織
DNA255289(TASK110)	肺腫瘍	正常肺組織
DNA255289(TASK110)	リンパ腫瘍	正常リンパ組織
DNA255289(TASK110)	卵巣腫瘍	正常卵巣組織
DNA297288(TASK119)	乳房腫瘍	正常乳房組織
DNA297288(TASK119)	腎臓腫瘍	正常腎臓組織
DNA297288(TASK119)	大腸腫瘍	正常大腸組織
DNA151475(TASK120)	腎臓腫瘍	正常腎臓組織
DNA151475(TASK120)	乳房腫瘍	正常乳房組織
DNA151475(TASK120)	肺腫瘍	正常肺組織

【0168】

実施例2：TaqmanTMによるTASKの分析

最初の研究として、正常なものと腫瘍の細胞株から準備したヒトcDNAライブラリーにおけるTASK110及びTASK119の発現をTaqmanTMにより分析した。50ナノグラムの各cDNAライブラリーを使用した。

TASK110

正のプライマー：5' AGAAGTGTGCCAGCTTCAA 3'（配列番号7）

逆のプライマー：5' CTAGATAGGATGTCTTCCACTAATCTTT 3' (配列番号 8)

プローブ：5' CCAGGCATCGCCCTTAAGCC 3' (配列番号 9)

T A S K 1 1 9

正のプライマー：5' TGCCAACAGTGGATTGAGTT 3' (配列番号 10)

逆のプライマー：5' TGAAGGTTTGGCTCAGTTCA 3' (配列番号 11)

プローブ：5' TAGCTCCAAGCCTTCTCCTGCCTC 3' (配列番号 12)

【0169】

TaqMan™反応は、Taq DNAポリメラーゼ酵素の5'エキソヌクレアーゼ活性を利用して増幅をリアルタイムでモニターする蛍光PCRベースの技術である。2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR反応に特有な単位複製配列を生成する。三番目のオリゴヌクレオチド、又はプローブを設計して、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出する。このプローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長可能ではなく、レポーター蛍光色素及びクエンチャー蛍光色素で標識される。この2つの色素がプローブ上においてそれらが近接して位置する場合には、このレポーター色素からの何れのレーザー誘導発光もクエンチャー色素で消光される。増幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、テンプレートに依存した様式でプローブを切断する。この結果で生じたプローブ断片は、溶液中で解離し、遊離したレポーター色素からのシグナルは、二番目のフルオロフォアの消光効果の作用を受けない。各新規分子が合成されるとレポーター色素の一分子が遊離し、非消光レポーター色素の検出によってデータの定量的解釈の基礎が示される。TaqMan™反応の結果は、デルタ()Ct単位によって報告する。TaqMan™アッセイデータは、最初はCt、又は閾値サイクルで表される。これは、レポーターシグナルが蛍光のバックグラウンドレベルを超えて蓄積するサイクルとして定義される。Ct値は、癌の結果を正常なヒトの結果と比較する場合に、核酸試料中の特定の標的配列の開始コピーの相対数の定量的測定として用いられる。1単位は、1PCRサイクル、又は標準に対しておよそ2倍の増幅に対応し、2単位は4倍の増幅に対応し、3単位は8倍の増幅に対応する等々である。

【0170】

コントロール遺伝子の発現に対して正規化されたTASK110のTaqman™分析の結果を図7に示す。この図において、腫瘍細胞株PANC-1(膵臓)、BT549(乳房)、Hela(頸部)、786-O(腎臓)、293(腎臓)及びHEPG2(肝臓)におけるTASK110の発現を各細胞型について四角で示す。腫瘍株での発現は、菱形によって示されるように、正常な乳房及び卵巣組織における発現に対して表している。結果は、TASK110はPANC-1(膵臓)及びBT549(乳房)細胞株において高度に過剰発現し、頸癌(Hela)及び腎臓腫瘍細胞株(786-O及び293)において過剰発現するというものであった。

コントロール遺伝子の発現に対して正規化されたTASK119のTaqman™分析の結果を図8に示す。この図は、腫瘍細胞株786-O(腎臓)、A498(腎臓)、HEPG2(肝臓)、293(腎臓)、Colo201(大腸)、PANC-1(膵臓)及びHela(頸部)におけるTASK119の発現を示している。TASK119は腎臓株(786-O、A498、及び293)及び肝臓株(HEPG2)において高度に過剰発現していた。

Taqman™アッセイを、癌の発生に関与する遺伝子を特徴づけるのに広範かつ成功裏に使用した。プロトオンコジンの過剰発現は様々なヒト腫瘍において研究され、病因、診断及び予後の面で重要であると広く考えられる。Taqman™の有用性の例は次の文献：Pennica等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95(25): 14717-14722 (1998)及びBieche等、Int. J. Cancer 78:661-666 (1998)に示されている。従って、癌細胞株におけるTASK110及びTASK119の過剰発現が分かったので、これらの分子は癌の病因、診断及び予後の面を決定する診断ツールとして有用であり、TASK110及びTASK119アンタゴニストは癌の軽減に有用であろう。

【0171】

実施例 3 : T A S K のインサイツ分析

インサイツハイブリダイゼーションは、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び局在化のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現の部位を同定し、転写物の組織分布を分析し、ウイルス感染を同定かつ局在化し、特定の mRNA 合成における変化を追跡し染色体マッピングを補助するのに有用である。

インサイツハイブリダイゼーションは、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコルの最適化バージョンに従って、PCR生成 $^{-3} \text{ } ^{3} \text{P}$ リボプローブを用いて実施した。簡単に述べると、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼK (20 g / ml) で15分間37 °C で脱タンパクし、更に上掲のLu及びGillettに記載されたようにしてインサイツハイブリダイゼーションのためにプロセッシングした。 $^{-3} \text{ } ^{3} \text{P}$ UTPアンチセンスリボプローブを、各末端にT3及びT7 RNAポリメラーゼプロモーターを持つように設計したPCR産物から生成し、55 °C で終夜、組織にハイブリダイズさせた。スライドをKodak NTB2核トラックエマルジョンに浸漬して4週間さらした。

【0172】

リボプローブ合成

6.0 μl (125 mCi) の (Amersham BF1002, SA < 2000 Ci / mmol) をスピード真空乾燥させた。乾燥させた $^{-3} \text{ } ^{3} \text{P}$ UTPを含む各チューブに以下の成分を添加した: 2.0 μl の5x転写バッファー; 1.0 μl のDTT (100 mM); 2.0 μl のNTP混合物 (2.5 mM: 10 μl ; 各10 mM, GTP, CTP及びATP + 10 μl のH₂O); 1.0 μl のUTP (50 μM); 1.0 μl のRnasin; 1.0 μl のDNAテンプレート (1 μg); 1.0 μl のH₂O。

チューブを37 °C で1時間インキュベートした。1.0 μl のRQ1 DNaseを添加し、ついで37 °C で15分間インキュベートした。90 μl のTE (10 mMトリス pH 7.6 / 1 mMのEDTA pH 8.0) を添加し、混合物をDE81ペーパーにピペットした。残りの溶液をMICROCON-50限外濾過装置に入れ、12000 RPMにてHeraeus Sepatech Centrifuge 28RSでスピンさせた (6分間)。濾過装置を第2のチューブに対して反転させ、3500 RPMでスピンさせた (3分間)。最終回収スピンの後、100 μl のTEを添加した。1 μl の最終生成物をDE81ペーパーにピペットしベックマンLS5000TDシンチレーションカウンターで6 mlのBiofluor Iにてカウントした。

プローブをTBE / 尿素ゲル上で泳動した。1 - 3 μl のプローブ又は5 μl のRNA Mrk IIIを3 μl の負荷バッファーに添加した。95 °C の加熱ブロック上で3分間加熱した後、ゲルを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルをフラッシングし、試料を負荷し、180 - 250ボルトで45分間泳動した。ゲルをサララップでラップし、-70 °C 冷凍機内で補強スクリーンを持つXARフィルムに1時間から終夜露出した。

【0173】

ハイブリダイゼーション

凍結切片の前処理。スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で5分間解凍した。トレイを55 °C のインキュベータに5分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において氷上4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定し、0.5xSSCで5分間室温で洗浄した (25 mlの20xSSC + 975 mlのSQ H₂O)。0.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のプロテイナーゼK中、37 °C で10分間の脱タンパクの後 (250 mlの予備加熱RNase無しRNaseバッファー中の10 mg / mlストック12.5 μl)、切片を0.5xSSCで10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、及び100%エタノール中、各2分間脱水した。

パラフィン包埋切片の前処理。スライドを、3回のキシレン交換、100%エタノールを経て脱パラフィンし、エタノールから水まで段階的に再水和させ、SQ H₂O中に配置し、2xSSCで室温において各々5分間2回リンスした。切片を20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のプロテイナーゼK (250 mlのRNase無しRNaseバッファー中10 mg / ml

を 500 μ l ; 37 $^{\circ}$ C、15 分間) - ヒト胚組織、又は 8 x プロテイナーゼ K (250 ml の RNase バッファー中 100 μ l、37 $^{\circ}$ C、30 分間) - ホルマリン組織で脱タンパクした。続く 0.5 x SSC でのリンス及び脱水は上記のようにして実施した。

プレハイブリダイゼーション。スライドを Box バッファー (4 x SSC、50% ホルムアミド) - 飽和濾紙を裏打ちしたプラスチックボックスに並べた。組織を 50 μ l のハイブリダイゼーションバッファー (10% デキストラン硫酸、50% ホルムアミド、2 x SSC) で被覆し、42 $^{\circ}$ C で 1 - 4 時間インキュベートした。

ハイブリダイゼーション。スライド当たり 1.0 x 10⁶ cpm のプローブ及び 1.0 μ l の tRNA (50 mg/ml ストック) を 95 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり 48 μ l のハイブリダイゼーションバッファーをプローブ / tRNA 混合物に添加した。ボルテックスの後、50 μ l の ³³P 混合物をスライド上のプレハイブリッド 50 μ l に添加した。スライドを 55 $^{\circ}$ C で終夜インキュベートした。

洗浄。洗浄は、2 x 10 分間、2 x SSC、EDTA で室温で実施し (400 ml の 20 x SSC + 16 ml の 0.25 M EDTA、V_f = 4 L)、ついで RNase A 処理を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間行った (250 ml RNase バッファー中 10 mg/ml を 500 μ l - 20 μ g/ml)。スライドを 2 x 10 分間、2 x SSC、EDTA で室温において洗浄した。ストリンジェントな洗浄条件は次の通りであった: 55 $^{\circ}$ C で 2 時間、0.1 x SSC、EDTA (20 ml の 20 x SSC + 16 ml の EDTA、V_f = 4 L)。

【0174】

TASK110、TASK119 及び TASK120 の 3' セグメントに対してプローブを用いてヒトの研究を実施した。放射性標識 (³³P) - 一本鎖相補リボプローブのインビトロ転写のための鋳型として作用可能な遺伝子の部分を増幅させるために PCR プライマーを設計した。上方 PCR プライマーの 5' 末端に付加された T7 プロモーターの 27ヌクレオチド配列を認識する T7 RNA ポリメラーゼを使用する転写によって、センス (コントロール) リボプローブを生成した。下方 PCR プライマーの 5' 末端に付加された T3 プロモーターの 27ヌクレオチド配列を認識する T3 RNA ポリメラーゼを使用する転写によって、アンチセンス (実験的) リボプローブを生成した。

TASK110

5' CGCCAAATCGTTACTACTACCCCTCAAAAGCTAGAAACAGTGCCTGAAAGAAACTCCAATTTAAAATACCAGTAAAT
TCAACAGGAACAGACAAGTTAATGACAGGTGTCAATTAGCCCTGAGAGGCGGTGCCGCTCAGTGGAAATTTGGATCTCAACCA
AGCACATATGGAGGAGACTCCAAAAAGAAAGGGAGCCAAAGTGTGGGAGCCTTGAAAGGGGGTTGGATAAGGTTATCA
CTGTGCTCACCAGGAGCAAAAGGAAGGGTTCTGCCAGAGACGGGCCAGAAAGACTAAAGCTTCACTATAATGTGACTACA
ACTAGATTAGTGAATCCAGATCAACTGTTGAATGAAATAATGTCTATTCTTCCAAAGAAGCATGTTGACTTTGTACAAAA
GGGTTATACACTGAAGTGTCAAACACAGTCAGATTTTGGAAAAGTGACAATGCAATTTGAATTAGAAGTGTGCCAGCTTC
AAAAACCCGATGTGGTGGGTATCAGGAGGCAGCGG 3' (配列番号 13)

TASK119

5' GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCCGCCACCGTATCCCTGAGCCTGAGGCTGCCGTGCTCTTCCGCCAGATGG
CCACCGCCCTGGCGCACTGTCAACAGCACGGTCTGGTCTCGTGATCTCAAGCTGTGTCGCTTTGTCTTCGCTGACCGT
GAGAGGAAGAAGCTGGTGTGGGAACTGGAGGACTCCTGCGTGCTGACTGGGCCAGATGATTCCCTGTGGGACAAGCA
CGCGTGCCAGCCTACGTGGGACCTGAGATACTCAGCTCACGGCCCTCATACTCGGGCAAGGCAGCCGATGTCTGGAGCC
TGGGCGTGGCGCTTTCACCATGCTGGCCGGCCACTACCCCTTCCAGGACTCGGAGCCTGTCTCTTCCGGCAAGATC
CGCCGCGGGCCCTACGCCTTGCTGACGGCTCTCGGCCCTGCCGCTGTCTGGTTCGCTGCCTCCTTCGTCGGGAGCC
AGCTGAACGGCTCACAGCCACAGGCATCCTCCTGCACCCCTGGCTGCGACAGGACCCGATGCCCTTAGCTCCAACCCGAT
TCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTTCATAG 3' (配列番号 14)

TASK120

5' GGGTGGCGAGCTGTTTGACCGCATCATGGAGCGGCTCCTACACAGAGAAGGATGCCAGCCATCTGGTGGGTCAGG
TCCTTGCGCCGCTCTCTACCTGCACAGCCTGGGGATCGTGCACCGGGACCTCAAGCCCCAAAACCTCCTGTATGCCACG
CCCTTTGAGGACTCGAAGATCATGGTCTCTGACTTTGGACTCTCCAAAATCCAGGCTGGGAACATGCTAGGCACCGCCTG

TGGGACCCCTGGATATGTGGCCCCAGAGCTCTTGGAGCAGAAACCCTACGGGAAGGCCGTAGATGTGTGGGCCCTGGGCG
 TCATCTCCTACATCCTGCTGTGTGGGTACCCCCCTTCTACGACGAGAGCGACCCTGAGCTCTTCAGCCAGATCCTGAGG
 GCCAGCTATGAGTTTGACTCTCCTTTCTGGGATGACATCTCAGAATCAGCCAAAGACTTCATCCGGCACCTTCTGGAGCG
 AGACCCCGAGAAGAGGTTACCTGCCAACAGGCCTTGGCGCACCTTTGGATCTCTGGGGACACAGCCTTCGACAGGGACA
 TCTTAGGCTCTGTCACTGAGCAGATCCGGAAGAACTTTGCTCGGACACACTGGAAGCGAGCCTTCAATGCCACCTCGTTC
 CTGC 3' (配列番号15)

【0175】

結果

TASK110のインサイツでの結果

膵臓腫瘍についてTASK110プローブを使用して実施したインサイツの分析は、浸潤管膵臓腺癌における弱い陽性シグナルを示している。その他全ての事例並びに良性膵臓組織は陰性である。腫瘍組織パネルの分析は、結腸直腸腺癌、子宮内膜腺癌、移行上皮癌、悪性リンパ腫、悪性黒色腫、肺癌、卵巣腫瘍、膵臓腺癌及び乳癌での陽性シグナルを示す。H322細胞は強い陽性で、MDA231及びMDA453細胞は弱い陽性であり、A549及びSK-MES細胞は陰性である。肺腺癌、肺扁平上皮癌及び神経内分泌腺癌には陽性シグナルがあり、正常な肺組織は一貫して陰性である。陽性シグナルは結腸直腸腺癌、胃癌、食道癌、転移性腺癌、膵臓腺癌に見られ、良性の胃腸粘膜、膵臓及び肝臓組織は一貫して陰性である。虫垂の一切片は胚中心に陽性シグナルを示す。NCIによって提供された多腫瘍パネルは、肺癌、大腸腫瘍、乳房腫瘍、悪性黒色腫、悪性リンパ腫、及び卵巣腫瘍においてTASK110に対して陽性シグナルを示す。肺腫瘍において過剰発現しているTASK110の代表例を、組織形態を示す明視野画像である図9Aに、またインサイツハイブリダイゼーションを示す図9Bに示す。これらの結果は、TASK110がある種の腫瘍型の診断に有用であり、TASK110のアンタゴニストが腫瘍、特に乳房、悪性黒色腫、大腸及び肺腫瘍の軽減に有用であることを示している。

10

20

【0176】

TASK119のインサイツでの結果

TASK119プローブを使用して実施したインサイツでは、原発性結腸直腸腺癌、腎細胞癌に強いシグナルを、乳癌試料に弱いシグナルを示していた。Ta q m a n^{T M}の結果の裏付けとして、正常な腎臓組織で実施されたインサイツは陰性であった(データは示さず)。これらの結果は、TASK119がある種の腫瘍型の診断に有用であり、TASK119のアンタゴニストが癌、特に結腸直腸腺癌及び腎臓細胞癌の軽減に有用であることを示している。

30

40

TASK120のインサイツでの結果

正常な組織では、ハイブリダイゼーションは腎臓粘膜構造に対しては弱く、非特異的バックグラウンドシグナルとして解釈される。腎臓のインサイツは、腎臓細胞癌が陽性で、シグナル強さは強い傾向があることを示している。腎臓の腫瘍の最も一般的なタイプである腎臓の明細胞癌では、TASK120ハイブリダイゼーションに対して陽性である。細胞株A498は弱いシグナルを示し、細胞株786-0、TK10、CAKI-1、ACHN、PC-3及びSN12Cは陰性である。陽性コントロール切片(HP-1739、腎臓細胞癌)は陽性である。腎臓癌におけるTASK120過剰発現の代表例を、組織形態を示す明視野画像である図10Aに、またインサイツハイブリダイゼーションを示す図10Bに示す。これは、腎臓のある種の腫瘍においてTASK120が過剰発現され、診断マーカーとして有用であり、TASK120のアンタゴニストが腎臓腫瘍の軽減に有用であることを示している。

【0177】

実施例4: siRNAによるTASK発現の調節

siRNAは、小分子又は抗体のような伝統的なアンタゴニストが失敗した遺伝子発現の調節の研究におけるツールとして有用であることが分かった。(Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003))。12から23ヌクレオチド長であるインビトロ合成二重鎖RNAが干渉RNA(iRNA)として作用し得、遺伝子発現を特異的に阻害可能である

50

(Fire A., Trends in Genetics 391:806-810 (1999))。これらの *iRNA* はその標的 *RNA* の分解を媒介することによって作用する。しかし、それらは 30ヌクレオチド長以下であるので、細胞抗ウイルス防御機構を惹起しない。そのような機構には、インターフェロン産生、宿主細胞タンパク質合成の全体的停止が含まれる。実際には、*siRNA* は合成でき、ついで *DNA* ベクター中にクローニングできる。そのようなベクターを形質移入し、高レベルで *siRNA* を発現させることができる。高レベルの *siRNA* 発現は細胞中で産生されるタンパク質の量を有意に減少させ、又は「ノックダウン」させ、よってタンパク質の過剰発現が癌のような疾患に関連していると考えられる実験において有用である。*TASK* は細胞内キナーゼであり、*TASK* の過剰発現は *TaqmanTM* 及びインサイツによって示されている。従って、*siRNA* は *TASK* タンパク質に対する有用なアンタゴニストである。

【0178】

結果

TASK110

膵臓癌細胞株 *PANC-1* は *TASK119* を内因的に過剰発現するので、これをこの実験セットにおいて使用した。*PANC-1* 細胞を、*TASK110* に対する二重鎖 21マー *RNA* オリゴ (*siTASK110*)、緑色蛍光タンパク質 (*siGFP*) を用いて形質移入し、又はモック(疑似)形質移入した。これらのオリゴを以下に掲げる。

siRNA オリゴ:

TASK110

r(CAGGCAAACAUGGAGGAU)TT = センス (配列番号 16)

TTr(GUCCGUUUGUACCUCUA) = アンチセンス (配列番号 17)

siGFP

GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU = センス (配列番号 18)

GCCGUUCGACUGGGACUUC AAG = アンチセンス (配列番号 19)

形質移入 3 日後に *RNA* を収集し、*TASK110* メッセージ対コントロール遺伝子メッセージの相対レベルを定量 *PCR* (*TaqManTM*) によって決定した。これを図 11A に模式的に示す。データは、*siRNA* の使用により *TASK110* の発現を有意に低減できることを裏付けている。

【0179】

形質移入において効果を示した *siRNA* オリゴを増殖アッセイにおいて使用した。このアッセイでは、*PANC-1* 細胞を、*siTASK110*、*siGFP* を用いて形質移入し、又はモック形質移入した。テトラゾリウム塩 3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド (*MTT*) の還元が、分光光度計によって読みとることができる青色のホルマジン生成物を生じる *MTT* 生存度アッセイを用いて、細胞の生存及び増殖を検査した。*MTT* 生存度アッセイは二週間の期間にわたる各形質移入の増殖レベルを決定するために実施した。図 11B に示すように、*siTASK110* 形質移入細胞は 6 日の培養にわたって更に低い増殖スコアを示し、14 日目までコントロールよりも低いままであった。

このアッセイと平行して、*PANC-1* 細胞を同じコンストラクトを使用して形質移入し、軟寒天成長アッセイにかけた。17 日間の軟寒天成長後に、コロニーを数えたが、*siTASK110* 形質移入細胞は図 11C に示されるように何れのコントロール細胞よりもよりゆっくと成長していた。

【0180】

腫瘍細胞株 293 (腎臓) 及び *BT459* (乳房) における *siRNA* 媒介 *TASK110* ノックダウンの効果を標準的な形質転換アッセイで評価した。細胞に次のものを形質移入した: モック、*TASK110* に対する二重鎖 21マー *RNA* オリゴ (*siTASK110* 1、2 又は 3 で、*siTASK110* (2) は上の *PANC-1* 細胞実験において使用した *siTASK110* と同一) 又は *GFP* (*siGFP*)。

siTASK110RNA オリゴ

10

20

30

40

50

s i T A S K 1 1 0 (1)

r(AACCCAAGGGUACAAGGA)TT = センス (配列番号 2 0)

TTTr(UUGGGUUCUCAUUGUUCU) = アンチセンス (配列番号 2 1)

s i T A S K 1 1 0 (2)

r(CAGGCAAACAUGGAGGAU)TT = センス (配列番号 2 2)

TTTr(GUCCGUUUGUACCUCCUA) = アンチセンス (配列番号 2 3)

s i T A S K 1 1 0 (3)

r(UACUCACUACGCCAAAUCG)TT = センス (配列番号 2 4)

TTTr(AUGAGUGAUGCGGUUAGC) = アンチセンス (配列番号 2 5)

s i T A S K 1 1 0 (C) (+ コントロール)

r(CAGGCAAGCGGUGGAGGAT)TT = センス (配列番号 2 6)

TTTr(GUCCGUUCGCCACCUCCUA) = アンチセンス (配列番号 2 7)

【 0 1 8 1 】

図 1 1 D 及び図 1 1 E において、HEK 2 9 3 細胞を形質移入 3 日後に収集し、ポリクローナル抗 T A S K 1 1 0 抗体を用いて等しく負荷した全タンパク質についてウェスタンブロットを実施した (図 1 1 D)。ついで、負荷のために正規化した p 9 0 バンドを使用して T A S K 1 1 0 の相対レベルを定量した (図 1 1 E)。この結果は、s i R N A の全てが T A S K 1 1 0 タンパク質産生の量を減少させる一方、T A S K 1 1 0 (2) s i R N A は最も阻害性であることを示している。

10

図 1 1 F 及び図 1 1 G は、形質移入 2 4 時間後に平行して実施した s i R N A 実験を示す。HEK 2 9 3 (図 1 1 F) 又は BT 5 4 9 細胞 (図 1 1 G) を 9 6 ウェルプレートにウェル当たり 2 5 0 0 細胞で播き、増殖を M T T アッセイによって定量した。これらの結果はウェスタンブロットの結果との相関を示し、タンパク質レベルが減少すればするほど、細胞成長の阻害が大きくなる。これの一例は s i T A S K 1 1 0 (2) の場合に見られ、その場合は、図 1 1 D のレーン 3 に示されるように T A S K 1 1 0 の最も強い抑制が示され、双方の細胞株において細胞増殖が最も減少した。

20

【 0 1 8 2 】

図 1 1 H 及び図 1 1 (I) は T A S K s i R N A を形質移入した HEK 2 9 3 又は BT 5 4 9 細胞の軟寒天アッセイを示している。細胞を 3 組、軟寒天に播き、1 4 - 2 8 日後に生成したコロニーの数を数え、データを、播いた細胞の数に対する生存コロニーの数として表す。

30

このデータは、s i R N A が T A S K タンパク質の発現を減少させ又は「ノックダウン」し得ることを示している。減少はウェスタンブロットでのタンパク質の減少によって示される。所定の期間にわたって T A S K タンパク質の s i R N A を減少させると、癌細胞株における細胞増殖が減少する結果となる。従って、s i R N A は T A S K タンパク質を減少させるのに有用であり、T A S K タンパク質のレベルの減少が癌細胞株の増殖の減少を引き起こす。癌は細胞増殖疾患であるので、これらの結果は、T A S K ポリペプチドのアンタゴニストが癌細胞成長の減少に有用であることを示している。癌細胞成長の減少は哺乳動物における癌の軽減に有用である。

40

【 0 1 8 3 】

T A S K 1 1 9

T A S K 1 1 9 のアンチセンス及び s i R N A 媒介ノックダウンの効果を 7 8 6 - O 腎臓腫瘍細胞株において評価した。アンチセンスノックダウンに対しては、細胞に空のベクター (ベクター) 又は T A S K 1 1 9 アンチセンスコンストラクト (T A S K 1 1 9 . A S) を形質移入した後、1 9 日間、1 μ g / m l ビューロマイシンで選択した。これらの安定な細胞プールをついで軟寒天に播いた。s i R N A ノックダウンに対しては、細胞に次のものを形質移入した：モック、T A S K 1 1 9 に対する二重鎖 2 1 マー RNA オリゴ (s i T A S K 1 1 9) 又は GFP (s i G F P)。

s i R N A オリゴ

s i T A S K 1 1 9

50

r(GCCUGAGGCUGCCGUGCUC)TT = センス (配列番号 28)

TT r(CGGACUCCGACGGCAGAG) = アンチセンス (配列番号 29)

s i G F P

GCAAGCUGACCCUGAAGUUC AU = センス (配列番号 30)

GCCGUUCGACUGGGACUUC AAG = アンチセンス (配列番号 31)

T A S K 1 1 9 (A S)

アンチセンス実験をアンチセンス方向に完全長 T A S K 1 1 9 c D N A (図 3、配列番号 3) を発現することによって実施した。

形質移入 24 時間後、細胞を軟寒天に播いた。双方の実験で、17 日後に生存コロニーの数を定量した。データは 3 組のウェルからの生存コロニーのパーセントとして表す。結果は、T A S K 1 1 9 の発現の減少による 786-0 腎臓腫瘍細胞の軟寒天成長の減少である。

10

このデータは、T A S K ポリペプチドに対する s i R N A が癌細胞の成長をインビトロで減少させることを示している。癌は細胞増殖疾患であるので、この結果は、T A S K ポリペプチドのアンタゴニストが癌細胞成長の減少に有用であることを示している。癌細胞成長の減少は癌の軽減に有用である。

【 0 1 8 4 】

T A S K 1 2 0

A 498 腎臓腫瘍細胞株における s i R N A 媒介 T A S K 1 2 0 ノックダウンの効果を形質移入 / 軟寒天成長アッセイで評価した。細胞に次のものを形質移入した：モック、又は T A S K 1 2 0 に対する 3 種の二重鎖 21 マー RNA オリゴ (s i T A S K 1 1 0 1、2 又は 3) の一つ。

20

s i R N A オリゴ

s i T A S K 1 2 0 (1) :

r(CCUCCUGUAUGCCACGCC)TT = センス (配列番号 32)

TT r(GGAGGACAUACGGUGCGGG) = アンチセンス (配列番号 33)

s i T A S K 1 2 0 (2) :

r(CGAGAGCGACCCUGAGCUC)TT = センス (配列番号 34)

TT r(GCUCUCGCGUGGACUCGAG) = アンチセンス (配列番号 35)

s i T A S K 1 2 0 (3) :

r(GCUAUGAGUUUGACUCUCC)TT = センス (配列番号 36)

TT r(CGUAUCUCAACUGAGAGG) = アンチセンス (配列番号 37)

30

形質移入 24 時間後、細胞を 3 組で軟寒天に播き、28 日後に生成コロニーの数を数えた。データは播いた細胞数に対する生存コロニーの数として図 13 に表す。形質移入 3 日後に RNA を収集し、モックレベルに対しての T A S K 1 2 0 メッセージにおける 80 - 90 % の減少を確認した (データは示さず)。

このデータは、T A S K ポリペプチドの発現を減少させることが軟寒天における細胞成長を減少させる効果を有していることを示している。従って、細胞中の T A S K ポリペプチドのレベルを減少させるアンタゴニストは癌細胞の成長を遅らせるのに有用であろう。癌は細胞増殖疾患であるので、細胞増殖の減少は癌を軽減させるのに有用である。

40

【 0 1 8 5 】

実施例 5 : T A S K 1 1 0 の遺伝子増幅

この実施例は、T A S K 1 1 0 遺伝子が或る種の細胞株のゲノムで増幅されることを示す。増幅は遺伝子産物の過剰発現を伴い、ポリペプチドが膵臓、腎臓、大腸、肺、乳房及び他の癌のような或る種の癌において治療的介入の有用な標的であることを示している。治療薬は、T A S K 1 1 0 ポリペプチドのアンタゴニストの形態、例えば T A S K 1 1 0 ポリペプチドに対するマウス - ヒトキメラ、ヒト化又はヒト抗体、あるいは有機小分子であってよい。

様々な癌細胞株からゲノム DNA を単離した。DNA は、例えば蛍光的に、正確に定量化される。ネガティブコントロールとして、プールした正常な健常個体の細胞から DNA

50

を単離し、健常個体における遺伝子コピーのアッセイコントロールとして使用した。5'ヌクレアーゼアッセイ(例えばTaqManTM)及び実時間定量的PCR(例えば、ABI Prizm 7700 Sequence Detection SystemTM(Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA))を、或る種の癌で潜在的に増幅される遺伝子の発見に使用した。結果は、TASK110をコードするDNAがスクリーニングされた癌細胞株の何れかで過剰提示されるか否かを決定するために使用した。

【0186】

TaqManTMの結果はデルタ()Ct単位で報告した。1単位は1PCRサイクル又は正常に対して約2倍の増幅に相当し、2単位は4倍、3単位は8倍増幅等々に相当する。定量化はプライマー及びTASK110コード化遺伝子から誘導したTaqManTM蛍光プローブを用いて得た。最も独特の核酸配列を含むと思われる、最もスプライシングされたイントロンを持たないと思われるTASK110の領域が、プライマー及びプローブ誘導、例えば3'-非翻訳領域のために好ましい。遺伝子増幅分析に使用されるプライマー及びプローブ(正、逆及びプローブ)の配列は次の通りであった:

TASK110(1)

正のプライマー:5'AGAAGTGTGCCAGCTTCAAA3'(配列番号38)

逆のプライマー:5'CTAGATAGGATGTCTTCCACTAATCTTT3'(配列番号39)

プローブ:5'CCAGGCATCGCCCTTAAGCC3'(配列番号40)

TASK110(i2)

正のプライマー:5'CAAAGTTTGAGATACACTATCATGGTT3'(配列番号41)

逆のプライマー:5'CAAGCCAAATTTTCCTAGAAGTT3'(配列番号42)

プローブ:5'TCCTTCAGCTAGACATTGGATAACAAGCAGC3'(配列番号43)

GAPDH

正のプライマー:5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC3'(配列番号44)

逆のプライマー:5'GAAGATGGTGATGGGATTTTC3'(配列番号45)

プローブ:5'CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC3'(配列番号46)

SPF31

正のプライマー:5'GCACCTTAGGAAGCCCCTTC3'(配列番号47)

逆のプライマー:5'TCCCTGTCTTATCTGGGCCTT3'(配列番号48)

プローブ:5'CTCGCTTCTGGGTGTGCTCCCTTC3'(配列番号49)

HMA D2

正のプライマー:5'GGTTGGACAAAGTATTAACCTCAGATGG3'(配列番号50)

逆のプライマー:5'GACTTGATTGGTGAAGCTTTATGACA3'(配列番号51)

プローブ:5'ATCCCTTCAGTGCCTTGCTCAAGC3'(配列番号52)

【0187】

5'ヌクレアーゼアッセイ反応は蛍光PCRベースの技術であり、実時間での増幅監視のためのTaqDNAポリメラーゼ酵素の5'エキソヌクレアーゼ活性を使用する。PCR反応に典型的な単位複製配列の生成に2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。第3のオリゴヌクレオチド、又はプローブは、2つのPCRプライマーの間に位置する核酸配列を検出するために設計した。プローブはTaqDNAポリメラーゼ酵素により非伸展性であり、レポーター蛍光染料及び消光剤蛍光染料で標識される。2つの染料がプローブ上に接近して位置する場合、レポーター染料からのレーザー誘導発光は消光染料によって消光される。増幅反応の間、プローブはTaqDNAポリメラーゼ酵素によりテンプレート依存方式で切断される。得られたプローブ断片は溶液中に解離し、放出されたレポーター染料からのシグナルは第2のフルオロホアからの消光効果を受けない。レポーター染料の一分子は、合成された各新規分子について遊離せしめられ、非消光レポーター染料の検出がデータの定量的解釈の基礎を提供する。

5'ヌクレアーゼ法は、ABI Prizm 7700TMシークエンス検出装置などの実時間定量的PCR装置で実施される。システムは温度サイクル器、レーザー、電荷結合素子(CCD)カメラ及びコンピュータからなる。システムは温度サイクル器上で96ウェ

10

20

30

40

50

ル形態の試料を増幅させる。増幅中に、レーザー誘導蛍光シグナルは光ファイバーケーブルで96の全ウェルに集められ、CCDで検出される。システムは機器の操作及びデータの分析のためのソフトウェアを含む。

5'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初はCt又は閾値サイクルで表現される。これは、レポーターシグナルが蛍光のバックグラウンドを越えて蓄積されるサイクルとして定義される。Ct値は、癌DNAの結果を正常なヒトDNAの結果と比較する場合において核酸試料における特定の標的配列の起始コピー相対数の定量的尺度として使用される。

【0188】

DNA調製：

DNAは培養した細胞株、原発腫瘍、正常ヒト血液から調製した。単離は、全てQiagenTMからの、精製キット、バッファセット及びプロテアーゼを用い、製造者の指示と下記に従って実施した。

細胞培養溶解：

細胞を洗浄し、チップ当たり 7.5×10^8 の濃度でトリブシン化し、4℃で5分間1000rpmで遠心分離してペレット化し、ついで1/2容量のPBS再遠心で洗浄した。ペレットを3回洗浄し、懸濁細胞を回収して2xPBSで洗浄した。ついで細胞を10mLのPBSに懸濁させた。バッファC1を4℃で平衡化させた。QiagenTMプロテアーゼを6.25mLの冷ddH₂Oで最終濃度20mg/mLまで希釈して4℃で平衡化させた。10mLのG2バッファを、QiagenTMRNAseAストック(100mg/mL)を200µg/mLの最終濃度まで希釈して調製した。

バッファC1(10mL、4℃)及びddH₂O(40mL、4℃)を、ついで10mLの細胞懸濁物に添加し、反転させて混合し、氷上で10分間インキュベートした。細胞核をBeckmanスイングパケットロータで4℃において2500rpmで15分間遠心分離することによりペレット化した。上清を捨て、核をボルテックスしながら2mLのバッファC1(4℃)及び6mLのddH₂Oに懸濁し、4℃において2500rpmで15分間2回目の遠心分離を実施した。ついで核を残りのバッファ中にチップ当たり200µLを用いて再懸濁した。G2バッファ(10mL)を懸濁した核に添加しながら緩いボルテックスを適用した。バッファ添加が完了したら、強いボルテックスを30秒間適用した。Qiagenプロテアーゼ(200µL上記のように調製)を添加し、50℃で60分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した(例えば、さらに30-60分間インキュベートし、4℃で10分間3000xgでペレット化する)。

【0189】

透明化溶解物の精製：

(1)ゲノムDNAの単離：

ゲノムDNAを10mLのQBTバッファで平衡化した(最大チップ調製当たり1試料)。QF溶離バッファを50℃で平衡化した。試料を30秒間ボルテックスし、ついで平衡化チップに負荷して重力により排液した。チップを2x15mLのQCバッファで洗浄した。DNAを、30mLのシラン化したオートクレーブ30mLCorex管に15mLのQFバッファ(50℃)で溶離した。イソプロパノール(10.5mL)を各試料に添加し、管をパラフィルム(Parafilm)TMで被覆し、DNAが沈殿するまで繰り返し反転させて混合した。試料を、SS-34ロータで4℃において15000rpmで10分間遠心分離してペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨て、10mLの70%エタノール(4℃)を添加した。試料を、SS-34ロータで4℃において10000rpmで10分間遠心分離して再度ペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨てた。ついで管を乾燥棚の各面に置き、37℃で10分間乾燥させたが、使用の過剰乾燥には注意した。

乾燥後、ペレットを1.0mLのTE(pH8.5)に溶解し、50℃に1-2時間置いた。試料を4℃に終夜保持して溶解を続けた。ついでDNA溶液を、ツベルクリンシリンジ上に26ゲージの針を具備する1.5mL管に移した。DNAを剪断するために移行

を5×繰り返した。ついで試料を50 に1-2時間置いた。

【0190】

(2) ゲノムDNAの定量及び遺伝子増幅アッセイのための調製：

各管のDNAレベルを1：20希釈(5µl DNA + 95µl ddH₂O)での標準的なA₂₆₀、A₂₈₀分光分析により、Beckman DU640TM分光光度計の0.1ml石英キュベットを用いて定量した。A₂₆₀/A₂₈₀比率は1.8-1.9の範囲であった。ついで各DNA試料をTE(pH8.5)中に約200ng/mlまで希釈した。最初の材料が高濃度(約700ng/µl)である場合、材料を50 に再懸濁するまで数時間置いた。

ついで、希釈した材料(20-600ng/ml)に対して、製造者の指示を以下のように変更して蛍光DNA定量化を実施した。これは、Hoeffer DyNA Quant 200TM蛍光計を約15分間暖めて実施した。Hoechst染料作業溶液(#H33258、10µl、使用の12時間以内に調製)を100mlの1×TNEバッファーに希釈した。2mlキュベットを蛍光計溶液で満たし、機械に配し、機械をゼロ調節した。pGEM3Zf(+)(2µl)を2mlの蛍光計溶液に添加して200単位で校正した。ついで、さらに2µlのpGEM3Zf(+)DNAを試験し、400+/-10単位で読みを確認した。ついで各試料を少なくとも3回読んだ。3試料が互いに10%以内であることが見られたとき、それらの平均をとり、この値を定量化値として用いた。

ついで、蛍光測定で決定した濃度を、各試料をddH₂O中に10ng/µlまで希釈するのに用いた。これは、1回のTaqManTMプレートアッセイについて全てのテンプレート試料について同時に行い、500-1000アッセイを実施するのに十分な材料で行った。試料は、TaqmanTMプライマー及びプローブ、及び正常なヒトDNAを含む単一プレート上のコントロール遺伝子及び非テンプレートコントロールで3通り試験した。試験DNAから減算した正常ヒトDNAのCt値が+/-1Ctの場合に希釈試料を用いた。希釈したロット定性化ゲノムDNAを、1.0mlアリコートで-80 にて保存した。続いて遺伝子増幅アッセイに使用するアリコートは、4 で保存した。各1mlのアリコートは、8-9プレート又は64回の試験に十分である。

【0191】

結果

TASK110の相対的コピー数を、TASK110遺伝子のエキソン18(TASK110(1))及びイントロン2(TASK110(i2))に特異的なプローブ及びプライマーを使用する定量的PCRで評価した。乳癌細胞株BT549、腎臓癌細胞株786及び膵臓癌細胞株PANC-1におけるTASK110の増幅倍の値を図14に報告する。コントロール遺伝子GAPDH、RPL19、SPF31及びhMAD2を用いて、増幅のベースラインを1の値に設定した。TASK110はこのベースラインに対して評価すると、PANC-1細胞で有意に増幅された。

TaqmanTMアッセイを、癌の発生に関与する遺伝子の特徴づけるのに広範かつ成功裏に使用した。プロトオンコジーンの過剰発現は様々なヒト腫瘍において研究され、病因、診断及び予後の面で重要であると広く考えられる。TaqmanTMの有用性の例は次の文献：Pennica等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95(25): 14717-14722 (1998)及びBieche等、Int. J. Cancer 78:661-666 (1998)に示されている。膵臓腫瘍由来の細胞におけるTASK110の増幅のため、腫瘍生成及び/又は腫瘍成長において有意な役割を果たしている可能性が非常に高い。その結果、TASK110タンパク質に対するアンタゴニストは癌の軽減に有用であろう。

【0192】

実施例6：ハイブリダイゼーションプローブとしてのTASKの使用

以下の方法は、哺乳動物における腫瘍の存在の診断などのため、ハイブリダイゼーションプローブとしてTASKをコードするヌクレオチド配列を使用することについて記載するものである。

本明細書で開示した全長又は成熟TASKのコード配列を含むDNAを、ヒト組織cD

10

20

30

40

50

NAライブラリーまたはヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同DNA (TASKの自然発生変異体をコードするものなど) に関してスクリーニングを行うためのプローブとして使用することもできる。

ハイブリダイゼーション及び両方のライブラリーDNAを含むフィルターの洗浄は、以下の高ストリンジェンシー条件下で行われる。放射標識TASK由来プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%のホルムアミド、5×SSC、0.1%のSDS、0.1%のピロリン酸ナトリウム、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、2×デンハート液、及び10%の硫酸デキストラン溶液において、42℃で20時間行われる。フィルターの洗浄は、0.1×SSC及び0.1%のSDSの水溶液において、42℃で行われる。

完全長天然配列TASKをコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAは、ついで、当該分野で知られている標準的な技法を用いて同定することができる。

【0193】

実施例7：大腸菌中でのTASKの発現

本実施例では、大腸菌中での組換え発現によるTASKの非グリコシル化型の調製について例証する。

最初に、選択されたPCRプライマーを用いて、TASKをコードするDNA配列を増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含むべきである。様々な発現ベクターを使用することができる。適切なベクターの例は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性の遺伝子を含むpBR322 (大腸菌由来; Bolivar等, Gene, 2:95 (1977)を参照) である。ベクターは制限酵素による消化を受け、脱リン酸化される。その後、PCR増幅配列をベクターに連結する。ベクターは、抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリヒス(polyhis)リーダー(最初の6のSTIIコドン、ポリヒス(polyhis)配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、TASKコード領域、転写ターミネーター、及びargU遺伝子をコードする配列を含むことが好ましい。

その後、ライゲーション混合液を用いて、上掲のSambrookらに記載された方法により、選択された大腸菌株を形質転換させる。LB平板上での生育能により形成転換体を識別した後、抗生物質耐性コロニーを選択する。制限分析及びDNA配列決定により、プラスミドDNAを単離し、確認することができる。

抗生物質を添加したLBブロスのような液体培地中で、選択されたクローンを一晩培養することができる。続いて、一晩培養した液をより大規模な培地に接種するために使用してもよい。その後、細胞を所望の光学密度になるまで培養し、その間に発現プロモーターを作動させる。

数時間以上、細胞を培養した後、細胞を遠心分離により集菌することができる。遠心分離により得られる細胞ペレットを、当技術分野で公知の様々な薬剤を用いて可溶化することができ、その後、この可溶化TASKタンパク質を、タンパク質の強い結合を許容する条件下で金属キレートカラムを用いて精製することができる。

【0194】

TASKは、以下の手段を用いて、大腸菌においてポリヒス(poly-His)タグ形で発現されてもよい。最初に、選択されたPCRプライマーを用いて、TASKをコードするDNAを増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位と、効果的かつ信頼性の高い翻訳開始、金属キレートカラムによる急速な精製、及びエンテロキナーゼに伴うタンパク質分解除去をもたらす他の有用な配列とを含む。その後、菌株52に基づく宿主大腸菌を形質転換するのに使用される発現ベクター(W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq))に、PCR増幅されたポリヒス(poly-His)タグ配列を連結する。まず、形質転換体を、3~5のO.D.600(O.D.600 of 3-5)に達するまで、カルベニシリン50mg/mlを含むLBにおいて30℃で振とう培養する。その後、培養液をCRAP培地(3.57gの(NH₄)₂SO₄、0.71

10

20

30

40

50

gのクエン酸ナトリウム二水和物、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母エキス、5.36gのSheffield hycase SFの500ml水溶液、110mMのMPOS (pH7.3)、0.55% (w/v) グルコース及び7mMのMgSO₄を混合して調製)で50~100倍希釈し、30度でおおよそ20~30時間、振とう培養する。試料を取り除き、SDS-PAGE分析により発現を確認し、バルク培養液を遠心分離し、細胞を沈殿させる。細胞ペレットは、精製及びリフォールディングするまで冷凍する。

0.5~1L発酵物由来の大腸菌ペースト(6~10gペレット)を、7Mのグアニジン、20mMのTris緩衝液(pH8)の10体積(w/v)に再懸濁する。固体の亜硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを、それぞれ最終濃度が0.1M及び0.02Mになるように添加し、溶液を4度で一晩攪拌する。この工程により、亜硫酸化(Sulfitolization)によりブロックされる全システイン残基を有する変性タンパク質が生じる。この溶液をベックマン(Beckman)超遠心機で40000rpmで30分間、遠心分離する。上清を3~5体積の金属キレートカラム緩衝液(6Mグアニジン、20mM Tris、pH7.4)で希釈し、0.22ミクロンフィルターで濾過して浄化する。浄化された抽出物を、金属キレートカラム緩衝液で平衡化したQiaGen Ni-NTA金属キレートカラム5ml上に添加する。50mMのイミダゾール(Calbiochem、Utrolグレード)を含む追加緩衝液(pH7.4)でカラムを洗浄する。250mMのイミダゾールを含む緩衝液でタンパク質を溶出させる。所望のタンパク質を含む画分をプールし、4度で貯蔵する。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて算出された吸光係数を用いて、280nmにおける吸光度により推定される。

【0195】

タンパク質は、20mMのTris(pH8.6)、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAを含む新たに調製されたリフォールディング緩衝液に試料をゆっくりと希釈することにより、リフォールディングされる。リフォールディング体積は、最終濃度が50~100マイクログラム/mlの間になるように選択される。リフォールディング溶液を、4度で12~36時間、静かに攪拌する。リフォールディング反応は、最終濃度0.4%(pHは約3)になるまでTFAを添加することにより抑えられる。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターで濾過し、アセトニトリルを最終濃度2~10%になるまで添加する。0.1%のTFAを含む移動相緩衝液を用いて、アセトニトリル10~80%の濃度勾配で溶出しながら、Poros R1/H逆相カラムで、リフォールディングされたタンパク質をクロマトグラフにかける。A280吸光度を有する一定量の画分をSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、同質のリフォールディングタンパク質を含む画分をプールする。一般に、多くのタンパク質において正しくリフォールディングされた種は、その種が逆相樹脂との相互作用から保護される疎水性内部を有して最も小型であるため、最低濃度のアセトニトリルで溶出される。凝集した種は、たいてい比較的高いアセトニトリル濃度で溶出される。この逆相段階は、所望の形のタンパク質から異常なフォールディング構造のタンパク質を除くのに加え、試料のエンドトキシンも取り除く。

所望のフォールディング構造のTASKポリペプチドを含む画分をプールし、溶液に対する穏やかな室素流によりアセトニトリルを除去する。タンパク質は、透析、または製剤用緩衝液で平衡化したG25 Superfine (Pharmacia)樹脂を用いたゲルろ過により、20mMのHepes(pH6.8)、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%マンニトールに処方され、滅菌濾過される。

本明細書で開示されたTASKポリペプチドのある種のもので、この技法を用いて成功裏に発現され、精製された。

【0196】

実施例8：哺乳動物細胞におけるTASKの発現

本実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現による潜在的グリコシル化型TASKの調製について説明する。

10

20

30

40

50

ベクター p R K 5 (1 9 8 9 年 3 月 1 5 日 公 開 の E P 3 0 7 2 4 7 を 参 照) を 発 現 ベ ク ター として 使用 する。 場 合 に よ っ て は、 上 掲 の S a m b r o o k 等 に 記 載 さ れ る よ う な ラ イ ゲー シ ョ ン 法 を 用 い て、 T A S K D N A を 挿 入 さ せ る た め に 選 択 さ れ た 制 限 酵 素 で T A S K D N A を p R K 5 に 連 結 する。 得 ら れ た ベ ク ター は p R K 5 - T A S K と 呼 ば れ る。

一 実 施 態 様 で は、 選 択 さ れ た 宿 主 細 胞 は 2 9 3 細 胞 で あ っ て よ い。 ヒ ト 2 9 3 細 胞 (A T C C C C L 1 5 7 3) は、 ウ シ 胎 仔 血 清 と、 任 意 で 栄 養 素 及 び / 又 は 抗 生 物 質 を 添 加 し た D M E M な の 培 地 の 組 織 培 養 平 板 で 集 密 培 養 さ れ る。 約 1 0 μ g の p R K 5 - T A S K D N A を、 V A R N A 遺 伝 子 (Thimmappaya 等, Cell, 31:543 (1982)) を コー ド する 約 1 μ g の D N A に 混 合 し、 1 m M の T r i s - H C l、 0 . 1 m M の E D T A、 0 . 2 2 7 M の C a C l ₂ の 5 0 0 μ l に 溶 解 する。 この 混 合 液 に 5 0 m M の H E P E S (p H 7 . 3 5)、 2 8 0 m M の N a C l、 1 . 5 m M の N a P O ₄ の 5 0 0 μ l を 滴 下 し て 加 え、 2 5、 1 0 分 間 で 沈 殿 を 形 成 さ せ る。 この 沈 殿 を 懸 濁 し、 2 9 3 細 胞 に 添 加 し、 3 7 $^{\circ}$ C で 約 4 時 間、 静 置 する。 培 養 培 地 を 吸 引 除 去 し、 2 0 % グ リ セ ロ ール P B S 溶 液 2 m l を 3 0 秒 間 添 加 する。 そ の 後、 無 血 清 培 地 で 2 9 3 細 胞 を 洗 浄 し、 新 鮮 培 地 を 添 加 し、 細 胞 を 約 5 日 間 イン キュ ベー ト する。

ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン の 約 2 4 時 間 後、 培 養 培 地 を 取 り 除 き、 (単 独 の) 培 養 培 地、 又 は 2 0 0 μ C i / m l の ³⁵S - シ ス テ イン 及 び 2 0 0 μ C i / m l の ³⁵S - メ チ オ ニ ン を 含 む 培 養 培 地 で 置 き 換 え る。 1 2 時 間 の イン キュ ベー ト 後 に、 順 化 培 地 を 得、 ス ピ ン フ ィ ル ター で 濃 縮 し、 1 5 % の S D S ゲ ル 上 に 添 加 する。 処 理 さ れ た ゲ ル を 乾 燥 し、 T A S K ポ リ ペ プ チ ド の 存 在 を 示 す た め に 選 択 さ れ た 時 間 の 間、 フ ィ ル ム に さ ら し て も よ い。 ト ラ ン ス フ ェ ク ト さ れ た 細 胞 を 含 む 培 養 液 は、 さ ら に (血 清 を 含 ま な い 培 地 で) 培 養 さ れ て も よ く、 そ の 培 地 は、 選 択 さ れ た バ イ オ ア ッ セ イ に よ り 試 験 さ れ る。

【 0 1 9 7 】

別 の 技 法 と し て、 S o m p a r y r a c 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575(1981) に 記 載 さ れ る 硫 酸 デ キ ス ト ラ ン 法 を 用 い て、 T A S K を 2 9 3 細 胞 に 一 時 的 に 導 入 し て も よ い。 2 9 3 細 胞 を ス ピ ナー フ ラ ス コ で 最 大 密 度 に 培 養 さ せ、 7 0 0 μ g の p R K 5 - T A S K D N A を 添 加 する。 最 初 に、 ス ピ ナー フ ラ ス コ か ら 遠 心 分 離 に よ り 細 胞 を 濃 縮 し、 P B S で 洗 浄 する。 D N A - デ キ ス ト ラ ン 沈 殿 物 を、 細 胞 ペ レ ッ ト 上 で 4 時 間 イン キュ ベー ト する。 細 胞 を 2 0 % グ リ セ ロ ール で 9 0 秒 間 処 理 し、 培 養 培 地 で 洗 浄 し、 組 織 培 養 培 地、 つ ま り 5 μ g / m l の ウ シ イ ン ス リ ン 及 び 0 . 1 μ g / m l の ウ シ ト ラ ン ス フ ェ リ ン を 含 む ス ピ ナー フ ラ ス コ に 再 び 入 れ る。 約 4 日 後、 順 化 培 地 を 遠 心 分 離 し、 細 胞 及 び 破 片 を 除 去 する た め に ろ 過 する。 そ の 後、 発 現 さ れ た T A S K を 含 む 試 料 を、 透 析 及 び / 又 は カ ラ ム ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー な の 任 意 の 選 択 さ れ た 方 法 で 濃 縮 及 び 精 製 する こ と が 可 能 である。

他 の 実 施 態 様 で は、 T A S K を C H O 細 胞 で 発 現 さ せ る こ と が 可 能 である。 C a P O ₄ 又 は D E A E デ キ ス ト ラ ン な の 既 知 の 試 薬 を 用 い て、 p R K 5 - T A S K を C H O 細 胞 に ト ラ ン ス フ ェ ク ト する こ と が 可 能 である。 上 記 に 述 べ た よ う に、 細 胞 培 養 液 を イン キュ ベー ト し、 培 地 を 培 養 培 地 (単 独)、 ま た は ³⁵S - メ チ オ ニ ン な の 放 射 性 標 識 を 含 む 培 養 培 地 で 置 き 換 え る こ と が 可 能 である。 T A S K ポ リ ペ プ チ ド の 存 在 を 測 定 後、 血 清 を 含 ま な い 培 地 で 培 養 培 地 を 置 き 換 え て も よ い。 好 ま し く は、 培 養 液 を 約 6 日 間 イン キュ ベー ト し て 順 化 培 地 を 得 る。 発 現 さ れ た T A S K を 含 む 培 地 を、 任 意 の 選 択 さ れ た 方 法 で 濃 縮 及 び 精 製 する こ と が 可 能 である。

エ ピ トー プ タ グ T A S K も 宿 主 C H O 細 胞 で 発 現 さ せ て よ い。 T A S K を p R K 5 ベ ク ター か ら サ ブ ク ロ ー ン 化 し て も よ い。 この サ ブ ク ロ ー ン 挿 入 物 を、 バ キ ュ ロ ウ イ ル ス の 発 現 ベ ク ター に ポ リ ヒ ス (p o l y - h i s) タ グ な の 選 択 さ れ た エ ピ トー プ タ グ と フ レ ーム 単 位 で 融 合 さ せ る P C R に か け る こ と が 可 能 である。 そ の 後、 ポ リ ヒ ス (p o l y - h i s) タ グ T A S K 挿 入 物 を、 安 定 ク ロ ー ン の 選 択 の た め に D H F R な の 選 択 マー カー を 含 む S V 4 0 推 進 ベ ク ター に サ ブ ク ロ ー ン 化 する こ と が 可 能 である。 最 後 に、 C H O 細 胞 を S V 4 0 推 進 ベ ク ター で (上 記 に 述 べ た よ う に) ト ラ ン ス フ ェ ク ト する こ と が 可 能 である。 発 現 を 確 認 する た め に、 上 記 の よ う に 標 識 を 行 っ て も よ い。 そ の 後、 発 現 さ れ た ポ リ ヒ ス (p

oly - His) タグ TASK を含む培養培地を、 Ni^{2+} キレートアフィニティークロマトグラフィーなどの任意の選択された方法で濃縮及び精製することができる。

【0198】

TASK を、一時的発現方法により CHO 細胞及び / 又は COS 細胞、あるいは他の安定的な発現方法により CHO 細胞で発現させてもよい。

以下の手法を用いて、CHO 細胞の安定した発現が実現する。タンパク質が IgG 作製物 (イムノアドヘシン) として発現され、IgG 作製物では、各タンパク質の可溶体 (例えば細胞外ドメイン) をコードする配列が、ヒンジ、CH2 及び CH2 ドメインを含む IgG 1 不変領域配列に融合し、かつ / あるいはポリヒス (poly - His) タグ形である。

10

PCR 増幅後に、Ausubel 等, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997) に記載されるような標準的な技法を用いて、各 DNA を CHO 発現ベクターにサブクローン化する。CHO 発現ベクターは、cDNA を都合よく輸送させるのに相性の良い対象 DNA の 5' 及び 3' 制限部位を有するように作製される。CHO 細胞における発現に使用されるベクターは、Lucas 等, Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779(1996)) に記載されており、対象の cDNA 及びジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の発現を推進する SV40 初期プロモーター / エンハンサーを使用する。DHFR 発現により、トランスフェクションに続くプラスミドの安定維持のための選択が可能になる。

12 種の微生物の所望のプラスミド DNA を、市販のトランスフェクション試薬の Superfect (登録商標) (Qiagen)、Dospere (登録商標) または Fugene (登録商標) (Boehringer Mannheim) を用いて、約 1000 万の CHO 細胞に導入する。細胞を上掲の Lucas 等に記載されるように培養する。以下に記述する更なる培養及び産生のために、約 3×10^7 細胞をアンプルに入れて冷凍する。

20

【0199】

プラスミド DNA を含むアンプルを、水浴内に置いて解凍させ、ボルテックスにより混合する。内容物を、10 ml の培地を含む遠心分離チューブにピペットで移し、1000 rpm で 5 分間、遠心分離させる。上清を吸引し、細胞を 10 ml の選択培地 (0.2 μm ダイアフィルターで濾過した 5% のウシ胎仔血清を添加した 0.2 μm フィルターで濾過した PS20) に再懸濁する。その後、細胞を 90 ml の選択培地を含む 100 ml スピナーで一定量にする。1 ~ 2 日後、150 ml の選択培養培地を注いだ 250 ml スピナーに細胞を移し、37 °C でインキュベートする。更に 2 ~ 3 日後に、250 ml、500 ml 及び 2000 ml スピナーに 3×10^5 細胞 / ml で接種する。細胞培地は、遠心分離により新鮮培地で交換し、産生培地に再懸濁される。任意の適切な CHO 培地を使用してもよいが、1992 年 6 月 16 日発行の米国特許第 5122469 号に記載される産生培地を実際に使用してもよい。3L 産生スピナーに 1.2×10^6 細胞 / ml で接種する。0 日目に細胞数、pH が測定される。1 日目に、スピナーをサンプリングし、ろ過空気の散布を開始する。2 日目に、スピナーをサンプリングし、温度を 33 °C に移し、30 ml の 500 g / l グルコース及び 0.6 ml の 10% 消泡剤 (例えば、35% ポリジメチルシロキサン乳液、ダウ・コーニング 365 Medical Grade Emulsion) を加える。産生の間中、pH を約 7.2 に保持するため必要に応じて調節する。10 日後、または生菌率が 70% を下回るまでに、細胞培養液を遠心分離及び 0.22 μm フィルターでろ過することにより集菌する。濾液を 4 °C で貯蔵するか、又は直ちに精製のためにカラムにかける。

30

40

ポリヒス (poly - His) タグ作製物に関して、Ni - NTA カラム (Qiagen) を用いてタンパク質を精製する。精製前に、イミダゾールを 5 mM 濃度になるまで順化培地に添加する。順化培地は、0.3 M の NaCl 及び 5 mM のイミダゾールを含む 20 mM の HEPES (pH 7.4) 緩衝液で平衡化した 6 ml の Ni - NTA カラムに、4 °C で流速 4 ~ 5 ml / 分で注ぎ込む。添加後、カラムを追加の平衡化緩衝液で洗浄し、0.25 M のイミダゾールを含む平衡化緩衝液でタンパク質を溶出させる。続いて、25 ml の G25 Superfine (Pharmacia) カラムを用いて、高純化タンパク質を、10 m

50

MのHepes、0.14MのNaCl及び4%マンニトール(pH6.8)を含む保存用緩衝液に脱塩させ、-80で貯蔵する。

以下のようにしてイムノアドヘシン(Fc含有)作製物を順化培地から精製する。順化培地を、20mMのリン酸Na緩衝液(pH6.8)で平衡化させた5mlのプロテインAカラム(Pharmacia)に注ぎ込む。添加後、100mMのクエン酸(pH3.5)で溶出する前に、カラムを平衡化緩衝液で十分に洗浄する。1mlの画分を275µlの1MのTris緩衝液(pH9)を含むチューブに回収することにより、溶出されたタンパク質を直ちに中和する。続いて、ポリヒス(poly-His)タグタンパク質に関して、上述のように高純化タンパク質を保存用緩衝液に脱塩させる。均一性をSDSポリアクリルアミドゲル、及びエドマン分解によるN末端アミノ酸配列決定により評価する。

10

本明細書で開示されるTASKポリペプチドの所定のものが、この技法を用いて首尾よく発現され、精製された。

【0200】

実施例9：酵母中でのTASKの発現

以下の方法は、酵母中でのTASKの組換え発現について述べるものである。

最初に、ADH2/GAPDHプロモーターからTASKを細胞内で生成または分泌させるための酵母発現ベクターを構築する。TASKをコードするDNA及びプロモーターを、TASKの細胞内発現を導くために、選択されたプラスミドの適切な制限酵素部位に挿入する。分泌については、TASKをコードするDNAを、TASKの発現のために、(必要であれば)ADH2/GAPDHプロモーター、天然TASKシグナルペプチドあるいは他の哺乳動物シグナルペプチド、あるいは、例えば酵母ファクターまたは転化酵素分泌シグナル/リーダー配列及びリンカー配列と共に、選択されたプラスミドにクローン化することができる。

20

その後、酵母AB110株などの酵母細胞を上述の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地で培養することができる。10%トリクロロ酢酸を用いた沈殿化、ならびにSDS-PAGEによる分離及びクマシーブルー染料を用いたゲル染色により、形質転換酵母の上清を分析することができる。

続いて、培地を遠心分離して選択されたカートリッジフィルターを用いて濃縮することにより発酵培地から酵母細胞を取り除いて、組換えTASKを単離し、精製することができる。選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いて、TASKを含む濃縮液をさらに精製してもよい。

30

本明細書で開示されるTASKポリペプチドの所定のものが、この技法を用いて成功裏に発現され、精製された。

【0201】

実施例10：バキュロウイルス感染昆虫細胞中でのTASKの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるTASKの組換え発現について述べるものである。

TASKをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクター内に含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグはポリヒス(poly-his)タグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域のような)を含む。pVL1393(Novagen)などの市販のプラスミドから得られるプラスミドなど、様々なプラスミドを使用してもよい。簡単に言えば、TASKをコードする配列、あるいはタンパク質が細胞外である場合、膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列または成熟タンパク質をコードする配列などのTASKをコードする配列の所望の部分、5'及び3'領域に相補的なプライマーを用いてPCRにより増幅する。5'プライマーは、(選択された)制限酵素部位の脇側を組み込んでもよい。その後、生成物を選択された制限酵素で消化し、発現ベクターにサブクローン化する。

40

リポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて、上記のプラスミドをBaculogold(商標)ウイルスDNA(PharMingen)と共に、スポドプテラフルギペルタ(Spodoptera frugiperda)('Sf9')細胞(ATCC CRL1711)にトラン

50

スフェクトすることにより、組換えバキュロウイルスを得る。28 で4～5日間インキュベートした後、放出されたウイルスを集菌し、さらなる増幅に使用する。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly等, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford University Press (1994)に記載されるように実施される。

【0202】

その後、発現されたポリヒス (poly-his) タグT A S Kを、例えば以下のようにNi²⁺キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。Rupert等、Nature, 362:175-179 (1993)に記載されるように、組換えウイルス感染Sf9細胞から抽出液を調製する。簡単に言えば、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用緩衝液(25 mlのHepes (pH 7.9)、12.5 mMのMgCl₂、0.1 mMのEDTA、10%のグリセロール、0.1%のNP-40、0.4 MのKCl)に再懸濁し、氷上で20秒間、2回の超音波処理を行う。超音波処理物を遠心分離により取り除き、上清を添加緩衝液(50 mMのホスフェート、300 mMのNaCl、10%のグリセロール、pH 7.8)で50倍に希釈し、0.45 μmフィルターで濾過する。Ni²⁺NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)をカラム体積5 mlで調製し、25 mlの水で洗浄し、25 mlの添加緩衝液で平衡化する。ろ過される細胞抽出液を、毎分0.5 mlでカラムにかける。カラムを、画分回収が開始されるポイントであるベースラインA₂₈₀に添加緩衝液で洗浄する。次に第2の洗浄緩衝液(50 mMのホスフェート、300 mMのNaCl、10%のグリセロール、pH 6.0)で洗浄し、非特異的結合タンパク質を溶出させる。A₂₈₀ベースラインに再到達後、第2の洗浄緩衝液における0～500 mMのイミダゾール勾配により、カラムを展開する。1 mlの画分を回収し、SDS-PAGE及び銀染色法、又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)にNi²⁺NTAを結合させるウエスタンブロットで分析する。溶出したHis₁₀タグT A S Kを含む画分をプールし、添加緩衝液に対して透析する。

10

20

別法として、既知のクロマトグラフィー法、例えばプロテインAまたはプロテインGカラムクロマトグラフィーなどを用いて、IgGタグ(又はFcタグ)T A S Kの精製を行うことができる。

本明細書で開示されるT A S Kポリペプチドの所定のものがこの技法を用いて首尾よく発現され、精製された。

【0203】

実施例11: T A S Kに結合する抗体の調製

本実施例は、T A S Kに特異的に結合することが可能なモノクローナル抗体の調製について説明する。

モノクローナル抗体を生成する技法は、当技術分野で知られており、例えばGoding(上掲)に記載されている。使用してもよい免疫原には、精製されたT A S K、T A S Kを含む融合タンパク質、及び細胞表面で組換えT A S Kを発現する細胞などがある。免疫原は、過度の実験なしに当業者により選択されうる。

T A S K免疫原をフロイント完全アジュバントで乳化し、1～100マイクログラムから所定の量を皮下または腹腔内に注入して、Balb/cなどのマウスを免疫化する。別法として、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)で乳化し、動物の後足パッドに注射する。その後、10～12日後に、選択されたアジュバントで乳化した追加免疫原で免疫化マウスを強化する。その後、数週間、マウスを追加免疫処理注射で強めてもよい。抗T A S K抗体を検出するため、ELISA分析試験用に、定期的に眼窩の後部出血でマウスから血清試料を得てもよい。

40

適切な抗体価を検出した後、抗体「陽性」動物にT A S Kを最終静脈注射することができる。3～4日後に、マウスを処分し、脾臓細胞を得る。その後、脾臓細胞を、ATCC番号CRL 1597から得られるP3X63AgU.1などの選択されたマウス骨髄腫細胞系に(35%ポリエチレングリコールを用いて)融合する。この融合により、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害する、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン)培地を含む96ウエル組織培養プレートに蒔くこ

50

とが可能なハイブリドーマ細胞が作り出される。

T A S K に対する反応性から E L I S A にてハイブリドーマ細胞を選び出す。T A S K に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」ハイブリドーマ細胞の決定は、当業者の技量範囲内にある。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系の B a l b / c マウスに腹腔内注射し、抗 T A S K モノクローナル抗体を含む腹水を作り出すことができる。別法として、組織培養フラスコまたはローラーボトルでハイブリドーマ細胞を培養することができる。腹水で産生されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈殿後のゲル排除クロマトグラフィーにより実行することができる。別法として、プロテイン A またはプロテイン G に対する抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーを用いることができる。

10

ここに開示された T A S K ポリペプチドの所定のものに対する抗体がこの技法を使用して成功裏に産生された。

【0204】

実施例 12：特異的抗体を用いた T A S K ポリペプチドの精製

天然又は組換え T A S K ポリペプチドを、タンパク質精製の当該分野における様々な標準技法で精製してもよい。例えば、対象の T A S K に特異的な抗体を用いて、プロ T A S K ポリペプチド、成熟 T A S K ポリペプチド、あるいはプレ T A S K ポリペプチドを、免疫親和性クロマトグラフィーで精製する。一般には、抗 T A S K ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合することにより、免疫親和性カラムを構築する。

ポリクローナル免疫グロブリンを、硫酸アンモニウムを用いた沈殿化、又は固定化プロテイン A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) における精製により免疫血清から調製する。同様に、硫酸アンモニウムによる沈殿化、または固定化プロテイン A におけるクロマトグラフィーにより、マウス腹水からモノクローナル抗体を調製する。部分的に精製された免疫グロブリンを、C n B r 活性化 S E P H A R O S E (商標) (Pharmacia LKB Biotechnology) などのクロマトグラフィー樹脂に共有結合させる。製造者の指示書に従って、抗体を樹脂に結合させ、樹脂をブロックし、派生樹脂を洗浄する。

20

この免疫親和性カラムは、可溶性の T A S K ポリペプチドを含む細胞から分画調製することにより、T A S K ポリペプチドの精製に使用される。この調製は、界面活性剤の添加による分画遠心法から得られる全細胞または細胞内画分の可溶化、あるいは当技術分野でよく知られるその他の方法に基づく。別法として、細胞が生育する培地に、シグナル配列を含む可溶性の T A S K ポリペプチドを有用な量で分泌させてもよい。

30

可溶性 T A S K ポリペプチドを含む調製液は、免疫親和性カラムに通され、T A S K ポリペプチドの選択吸着を起こす条件(例えば界面活性剤の存在する高イオン強度の緩衝液)下でカラムを洗浄する。その後、抗体/T A S K ポリペプチド結合を阻害する条件(例えば pH 約 2 ~ 3 などの低 pH 緩衝液、あるいは尿素またはチオシアン酸イオンなど高濃度のカオトロップ)下でカラムを溶出し、T A S K ポリペプチドを回収する。

【0205】

実施例 13：薬剤スクリーニング

本発明は、T A S K ポリペプチド又はその結合断片を任意の種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。そのような試験に用いられる T A S K ポリペプチド又は断片は、溶液中の遊離状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの一方法は、T A S K ポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイにおいてスクリーニングされる。そのような細胞は、生存可能又は固定化形態の何れかにおいて、標準的な結合アッセイに使用できる。例えば、T A S K ポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定とができる。あるいは、試験する試薬によって生ずる T A S K ポリペプチドとその標的細胞又は標的レセプターとの間の複合体形成における減少を試験することもできる。

40

しかして、本発明は、T A S K ポリペプチド関連疾病又は疾患に影響を与えうる薬剤又

50

は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬を T A S K ポリペプチド又は断片に接触させ、(i) 試薬と T A S K ポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は (i i) T A S K ポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、当該技術でよく知られた方法でアッセイすることを含む。これらの競合結合アッセイでは、T A S K ポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、有離の T A S K ポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、有離又は未複合の標識の量が、特定の試薬が T A S K ポリペプチドに結合するか又は T A S K ポリペプチド / 細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開された W O 8 4 / 0 3 5 6 4 に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。T A S K ポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物は T A S K ポリペプチドと反応して洗浄される。結合した T A S K ポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製した T A S K ポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。更に、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

また、本発明は、T A S K ポリペプチドに結合可能な中和抗体が T A S K ポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイに使用されることも考慮する。この方法において、抗体は、T A S K ポリペプチドで一又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【0206】

実施例 14：腫瘍スクリーニング

T A S K ポリペプチドに対するアンタゴニストをヌードマウスモデルによってインビボにて決定することができる。細胞株中に高レベルの T A S K ポリペプチドを生じさせるために十分量の T A S K ポリペプチド発現プラスミドを哺乳動物細胞に形質移入することができる。既知数の過剰発現細胞をヌードマウスの脇腹に皮下注射することができる。十分な時間をかけて腫瘍が成長し、可視でき、測定できる（典型的には 2 - 3 mm 直径）ようになったところで、そのマウスを潜在的な T A S K アンタゴニストで処置できる。有益な効果が生じたかどうかを決定すべく、腫瘍をパーニアノギスでミリメートル単位で測定し、腫瘍負荷を計算する： $\text{腫瘍重量} = (\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ (Geran等, (1972) Cancer Chemotherapy Rep., 3 1-104)。ヌードマウス腫瘍モデルは、腫瘍成長速度及び用量依存的な形での可能な抗腫瘍剤による腫瘍成長速度の減少を評価するための再現性のあるアッセイである。例として、プロテインキナーゼ C 阻害剤である化合物 3 1 7 6 1 5 - H C L はこのモデルを使用して抗腫瘍効果を有していることが見出された (Teicher等, (2002) Can Chemo Pharm 49: 69-77)。

【0207】

上記の文書による明細書は、当業者による本発明の実施を十分可能にするものであると考えられる。本発明は、寄託された実施品が本発明のある態様の一つの例証として意図されているため、寄託された作成物により範囲が制限されるのではなく、機能的に均等であるあらゆる作成物は本発明の範囲内にある。本明細書中の材料の寄託は、本明細書内に記載された説明が、その最良の態様を含む本発明の任意の態様の実施を可能にするのに不十分なことを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して特許請求の範囲を制限するものであると解釈するべきではない。実際に、本明細書で示され記載されたものに加えて、本発明の様々な変更が、上記の説明により当業者には明白であり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0208】

【図 1】配列番号 1 がここで「DNA 2 5 5 2 8 9」と命名されたクローンである、T A S K 1 1 0 c D N A のヌクレオチド配列 (配列番号 1) を示す。

【図2】図1に示す配列番号1のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図3】配列番号3がここで「DNA297288」と命名されたクローンである、TASK119 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。

【図4】図3に示す配列番号3のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図5】配列番号5がここで「DNA151475」と命名されたクローンである、TASK120 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号5)を示す。

【図6】図5に示す配列番号5のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号6)を示す。

10

【図7】TASK110についてなされたTaqmanTM(タックマン)実験の分析を示す。

【図8】TASK119についてなされたTaqmanTM実験の分析を示す。

【図9A】肺腫瘍試料について実施されたTASK110インサイトハイブリダイゼーションの結果を示す。

【図9B】肺腫瘍試料について実施されたTASK110インサイトハイブリダイゼーションの結果を示す。

【図10A】腎臓腫瘍試料について実施されたTASK120インサイトハイブリダイゼーションの結果を示す。

【図10B】腎臓腫瘍試料について実施されたTASK120インサイトハイブリダイゼーションの結果を示す。

20

【図11A】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11B】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11C】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11D】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11E】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11F】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11G】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11H】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

【図11I】siRNA実験でのTASK110発現の調節を示す。

30

【図12】siRNA実験でのTASK119発現の調節を示す。

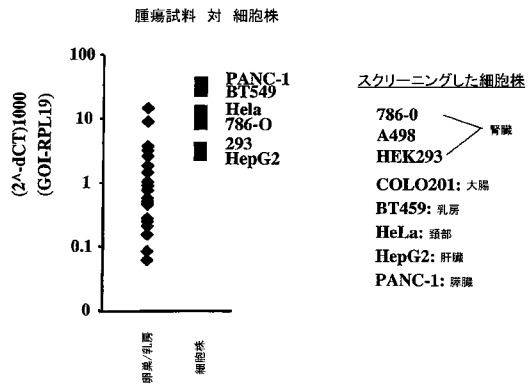
【図13】siRNA実験でのTASK120発現の調節を示す。

【図14】TaqmanTMによって分析したTASK110のゲノム増幅を示す。

【図15】細胞培養における低血糖状態に対するTASK120の応答を示す。

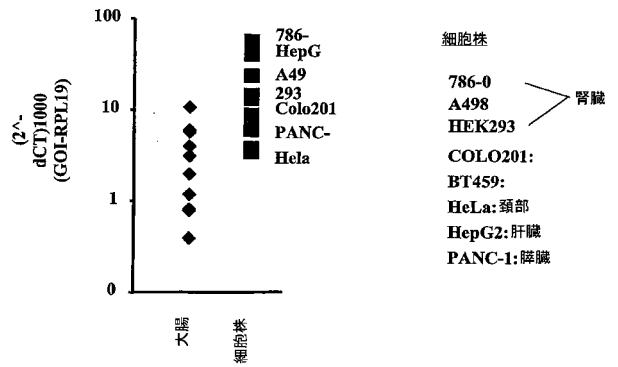
【 図 7 】

TASK110 発現データ



【 図 8 】

TASK119 発現: 腫瘍試料 対 細胞株



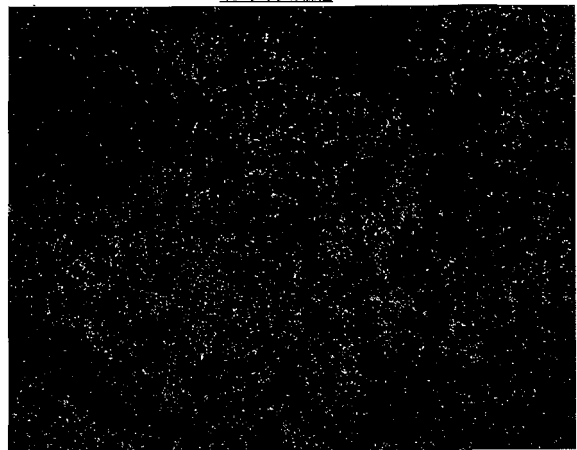
【 図 9 A 】

インサイツの肺癌

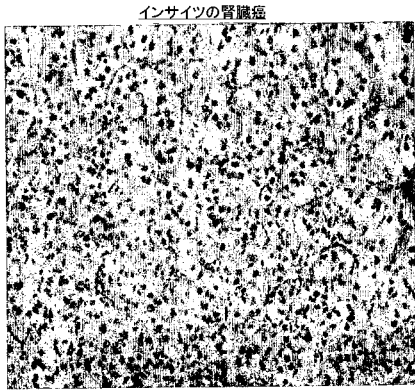


【 図 9 B 】

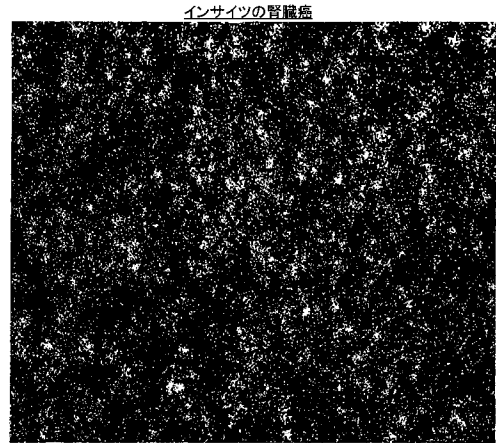
インサイツの肺癌



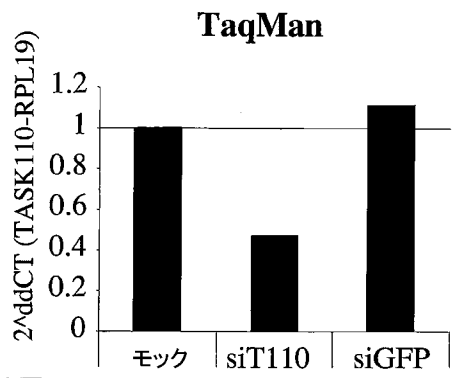
【図10A】



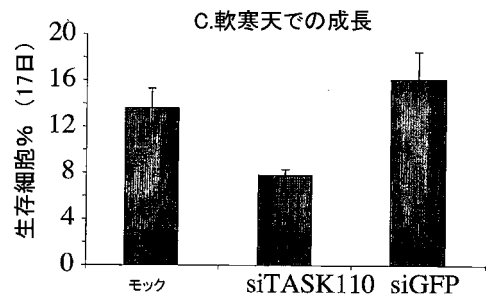
【図10B】



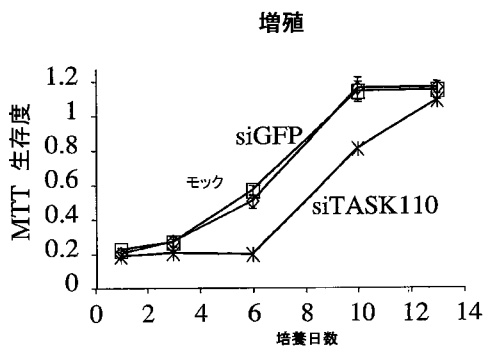
【図11A】



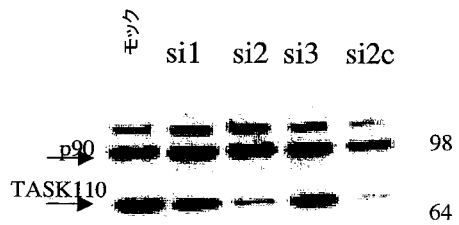
【図11C】



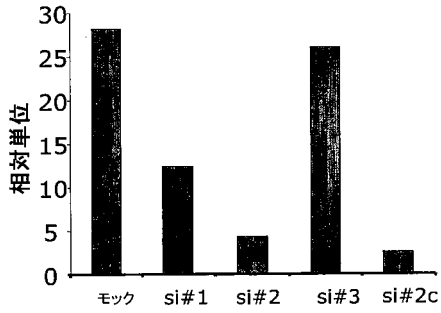
【図11B】



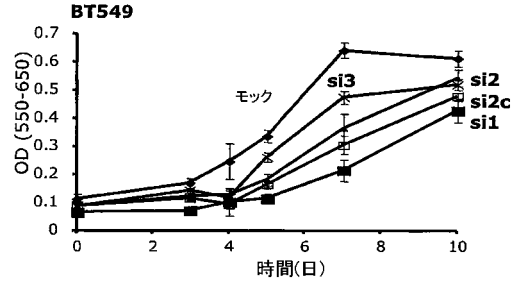
【図11D】



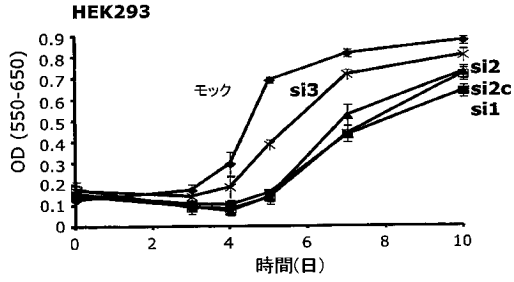
【 図 1 1 E 】



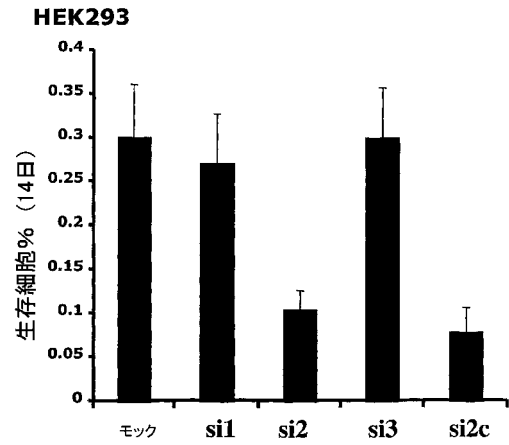
【 図 1 1 G 】



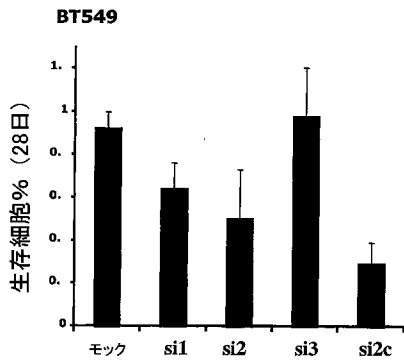
【 図 1 1 F 】



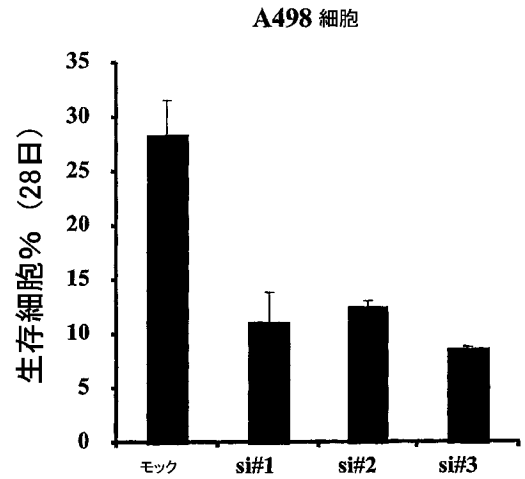
【 図 1 1 H 】



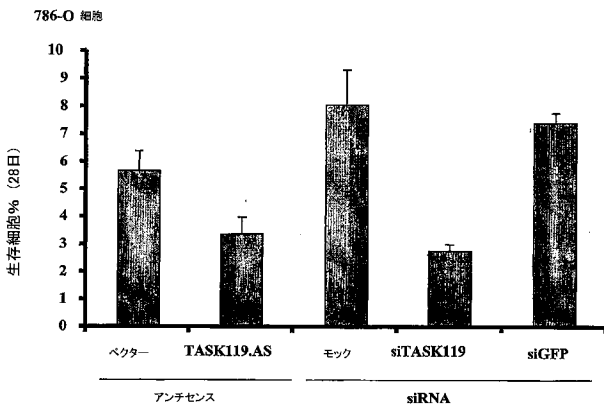
【 図 1 1 I 】



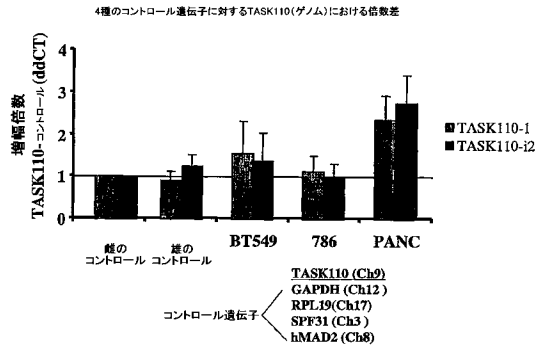
【 図 1 3 】



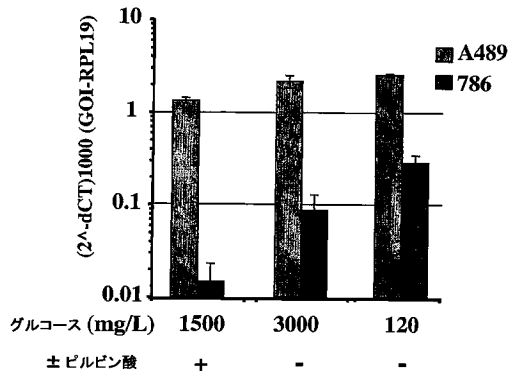
【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 配列表 】

2010131015000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 P	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
C 0 7 K 14/82 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/32	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 K 31/7036 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 31/7036	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 デソーヴェージ, フレデリック ジェイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, シューティング ス
 ター アイル 1 8 7

(72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルスボロー, サウスダウン コート 3 5

(72)発明者 ツァン, ツォーミン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, トーラス ドライブ
 8 7 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 CA04 CA07 DA02 DA06 DA12 EA02 EA04
 FA02 GA01 GA11 HA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36
 QX02
 4B064 AG27 AG31 CA19 CA20 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA72X AA91X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
 CA44 CA46
 4C084 AA17 NA14 ZB26
 4C085 AA14 AA16 AA26 AA27 BB01 BB11 CC23 DD61 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 CB22 EA07 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 CA41 DA76 DA86 EA28 EA50
 FA72 FA74

【外国語明細書】

2010131015000001.pdf

2010131015000002.pdf

2010131015000003.pdf

2010131015000004.pdf

专利名称(译)	用于诊断和治疗肿瘤的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2010131015A	公开(公告)日	2010-06-17
申请号	JP2009293524	申请日	2009-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	デービスデビッドピー デソーヴェージフレデリックジェイ ウッドウィリアムアイ ツァンツオーミン		
发明人	デービス, デビッド ピー. デソーヴェージ, フレデリック ジェイ. ウッド, ウィリアム, アイ. ツァン, ツオーミン		
IPC分类号	C12N15/09 A61B10/00 A61K39/395 A61K31/713 A61K45/00 A61P35/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C07K16/46 C12Q1/68 A61K31/537 A61K31/7036 C12P21/08 G01N33/53 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K38/00 C07H21/04 C07K1/00 C07K14/47 C07K16/30 C07K16/40 C12N1/15 C12N9/12 C12Q1/02 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P13/08 A61P13/10 A61P15/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C12N9/12 C12N9/1205 C12N2310/14		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61B10/00.T A61K39/395.T A61K31/713 A61K45/00 A61K39/395.P A61P35/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.102 C12P21/02.C C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C07K16/46 C12Q1/68.A A61K31/537 A61K31/7036 C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/113.130.Z C12N15/13 C12N15/63.Z C12N5/12 C12Q1/686.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/DD61 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/CB22 4C086/EA07 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/410166 2002-09-11 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供进一步的诊断和治疗剂，其能够检测哺乳动物中肿瘤的存在并有效抑制肿瘤细胞的生长。与一种或多种类型的正常非癌细胞相比，在一种或多种类型的癌细胞中更高度表达的各种细胞多肽（及其编码核酸或其片段）。该多肽被称为肿瘤相关激酶多肽（“TASK”多肽），有望成为治疗和诊断哺乳动物癌症的有效靶标。同样，分离的核酸分子具有编码肿瘤相关抗原靶向多肽或其片段（“TASK”多肽）的核苷酸序列。[选择图]无

