

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 532407

(P2003 - 532407A)

(43)公表日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00		48/00	4 C 0 8 4
39/395		A 6 1 P 3/14	4 C 0 8 5
48/00		5/18	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 62数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 582383(P2001 - 582383)

(86)(22)出願日 平成13年5月11日(2001.5.11)

(85)翻訳文提出日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/05413

(87)国際公開番号 W001/085784

(87)国際公開日 平成13年11月15日(2001.11.15)

(31)優先権主張番号 MI2000A001056

(32)優先日 平成12年5月12日(2000.5.12)

(33)優先権主張国 イタリア(IT)

(71)出願人 イスティトゥト ナツィオナーレ ペル
ロ ストゥディオ エ ラ クラ デイ
トゥモリ

ISTITUTO NAZIONALE
PER LO STUDIO E L
A CURA DEI TUMORI

イタリア共和国,ミラノ,ヴィア ヴェネジ
アン 1番地

(72)発明者 ドラガーニ トマーゾ ア
イタリア イ - 20131 ミラノ ヴィア ボ
ルポーラ 156

(74)代理人 特許業務法人特許事務所サイクス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多型イソ型 P T H r P 蛋白質をコードするポリヌクレオチド、コードされた蛋白質、及びそれらの治療的適用

(57)【要約】

ここに記載するものは、P T H r P 蛋白質の2つの変異体をコードする、P T H r P 蛋白質をコードする遺伝子の、対立遺伝子蛋白質の、配列番号2に相当する多型ドメインを含み、かつ第一多型位置を含む第一ポリヌクレオチドの、第二多型ドメインを含み、かつ配列番号7に相当する第二ポリヌクレオチドの2つの多型イソ型の同定であり、動物及びヒト及び遺伝的に修飾された細胞及びヒト以外の動物における腫瘍の危険性を決定するための、これら遺伝子、対立遺伝子、又はポリヌクレオチドの使用も記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に相当する多型ドメインTSXPSEを含むPTHrP蛋白質変異体又はPTHrP変異体のフラグメントをコードするポリヌクレオチド。

【請求項2】 配列番号3の496位に相当する多型ヌクレオチドを含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 前記多型ドメインが、オステオスタチンをコードする領域内に含まれる、請求項1-2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 前記多型ヌクレオチドが、C(シトシン)であり、配列番号2に相当する多型ドメインを含むPTHrP蛋白質又はそのフラグメントをコードする、請求項1-3に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 多型ヌクレオチドが、CCT、CCC、CCA、及びCCGからなる群から選択されるコドン中に含まれ、かつ配列番号2の多型プロリンをコードする、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 配列番号3に相当するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項7】 配列番号5の成熟蛋白質又は配列番号2のドメインを含むそのフラグメントをコードする請求項1-6に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】 配列番号7に相当する多型ドメインASSGLLYPを含むPTHrP蛋白質変異体又はPTHrP変異体のフラグメントをコードするポリヌクレオチド。

【請求項9】 配列番号8の454位、471位、及び472位に相当する多型ヌクレオチドを含む請求項8に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】 前記多型ドメインが、オステオスタチンをコードする領域内に含まれる、請求項8-9に記載のポリヌクレオチド。

【請求項11】 前記ポリヌクレオチドが、多型ヌクレオチドを含み、かつ配列番号7に相当するドメインを含む蛋白質PTHrP又はそのフラグメントをコードする、請求項9-10に記載のポリヌクレオチド。

【請求項12】 配列番号8に相当するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

ド。

【請求項13】 配列番号10の成熟蛋白質又はその一部をコードする、配列番号7のドメインを含む請求項8-12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項14】 PTHrP蛋白質又はそのフラグメントをコードする、配列番号2の多型ドメインTSXPSE及び配列番号7の多型ドメインASSGLLDYPを含むポリヌクレオチド。

【請求項15】 配列番号2のドメインを含む蛋白質PTHrP又はそのフラグメントをコードするPthlh遺伝子の対立遺伝子変異体。

【請求項16】 配列番号4又は配列番号5に相当する蛋白質をコードする請求項15に記載の対立遺伝子変異体。

【請求項17】 オステオスタチンをコードする、請求項15に記載された対立遺伝子変異体。

【請求項18】 配列番号3の496位に相当する多型塩基を含む対立遺伝子変異体。

【請求項19】 配列番号3に相当する対立遺伝子変異体。

【請求項20】 配列番号7に相当するドメインを含むPTHrP蛋白質又はそのフラグメントをコードするPthlh遺伝子の対立遺伝子変異体。

【請求項21】 配列番号9又は配列番号10の蛋白質をコードする請求項20に記載の対立遺伝子変異体。

【請求項22】 オステオスタチンをコードする請求項20に記載の対立遺伝子変異体。

【請求項23】 配列番号8の454位、471位、472位に相当する多型塩基を含む対立遺伝子変異体。

【請求項24】 配列番号8の配列を含む対立遺伝子変異体。

【請求項25】 請求項18に記載の対立遺伝子変異体及び請求項23に記載の対立遺伝子変異体を含む対立遺伝子変異体。

【請求項26】 動物又はヒトから単離されることを特徴とする請求項1-14に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-25に記載の対立遺伝子変異体。

【請求項27】 前記動物が哺乳動物である、請求項26に記載されたようなポ

リヌクレオチド又は変異体。

【請求項28】 前記哺乳動物がマウスである、請求項26に記載されたようなポリヌクレオチド又は変異体。

【請求項29】 配列番号2の多型ドメインを含むPTHrP蛋白質又はそのフラグメント。

【請求項30】 多型アミノ酸が、何らかの疎水性アミノ酸である、請求項29に記載の蛋白質又はフラグメント。

【請求項31】 前記多型アミノ酸がプロリンである、請求項29-30に記載の蛋白質又はフラグメント。

【請求項32】 前記フラグメントがオステオスタチンである、請求項29-31に記載の蛋白質又はフラグメント。

【請求項33】 配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号10からなる群から選択される少なくとも1つの配列を含む蛋白質又はフラグメント。

【請求項34】 前記フラグメントがオステオスタチンである、請求項33に記載の蛋白質。

【請求項35】 配列番号2の多型ドメイン及び配列番号7の多型ドメインを含むPTHrP蛋白質又はそのフラグメント。

【請求項36】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチドへ、又は請求項15-25に記載の対立遺伝子変異体若しくはその相補性鎖とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。

【請求項37】 配列番号2のドメイン及び/または配列番号7のドメインを含むペプチドをコードする多型Pthlh遺伝子の存在を決定するためのプローブとしての、請求項36に記載されたようなオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項38】 動物又はヒト検体における、配列番号2のドメイン及び/若しくは配列番号7のドメインを含むPTHrP蛋白質又はそのフラグメントをコードするPthlh遺伝子の多型の同定方法であって、

- 検体から生物学的試料を得て、
- 試料を分析して前記多型Pthlh対立遺伝子変異体を同定する段階を含む方

法。

【請求項39】 ポリヌクレオチド若しくは核酸配列、又は配列番号2に相当する多型ドメイン及び/若しくは配列番号7に相当するドメインを含むPTHrP蛋白質若しくはそのフラグメントの同定及び/又は決定するためのキットであって、

(a) 少なくとも1つの前記多型ドメインを含むPTHrP蛋白質又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドの領域の増幅のためのプライマーを含む第一容器；及び

(b) 少なくとも1つの前記多型を決定するためのオリゴヌクレオチドプライマーを含む第二容器を含むキット。

【請求項40】 腫瘍及び/若しくは悪性カルシウム過剰血の進行の素質、並びに/又はそれらの予後の評価のインビトロ診断のための方法であって、動物又はヒト検体における、前記腫瘍又はカルシウム過剰血と関連する、請求項15-25に規定されたPthlh対立遺伝子変異体の有無の同定を含む方法。

【請求項41】 腫瘍及び/若しくは悪性カルシウム過剰血の進行の素質、並びに/又はそれらの予後の評価のインビトロ診断のための方法であって、動物又はヒト検体における、前記腫瘍又はカルシウム過剰血と関連する、請求項29-35に規定されたPTHrP蛋白質又はそのフラグメントの有無の同定を含む方法。

【請求項42】 前記腫瘍が、皮膚癌又は肺癌である、請求項40-41に記載の方法。

【請求項43】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-25に記載されたような変異体との、動物又はヒト細胞のトランスフェクション、及び前記細胞の培養中の成長のための方法。

【請求項44】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-25に記載の変異体との、ヒト以外の動物の胚幹細胞のトランスフェクション、及び前記細胞の移植のための方法。

【請求項45】 前記細胞が、組織特異的プロモーターの導入によってトランスフェクトされる、請求項43-44に記載されたような方法。

【請求項46】 請求項1-14に記載されたポリヌクレオチド又は請求項15-25に記載された変異体によって遺伝的に形質転換された動物又はヒト細胞。

【請求項47】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-25に記載された対立遺伝子変異体とトランスフェクトされた、ヒト以外の動物の胚幹細胞。

【請求項48】 組織特異的プロモーターによって更に修飾されることを特徴とする請求項46-47に記載された細胞培養物又は細胞。

【請求項49】 請求項1-14に記載されたポリヌクレオチド又は請求項15-25に記載された遺伝子の対立遺伝子変異体の挿入によって修飾されたヒト以外の形質転換動物の調製方法。

【請求項50】 前記ヒト以外の形質転換動物が、組織特異的プロモーターによって修飾され、かつ配列番号2及び/または配列番号7のドメインを含むペプチドをコードするP t h l h遺伝子を特異的組織中で発現する、請求項49に記載の方法。

【請求項51】 前記動物の幹細胞をトランスフェクトする段階を含み、かつ前記遺伝子、対立遺伝子又はポリヌクレオチドが、成長した動物中で活性化される、請求項50に記載のヒト以外の動物の調製方法。

【請求項52】 請求項50-51に記載された方法によって得られるヒト以外の形質転換動物。

【請求項53】 ノックインアニマルであることを特徴とする請求項51の方法によって得られる動物。

【請求項54】 P t h l h遺伝子又は配列番号2及び/若しくは配列番号7の多型ドメインを含むペプチドをコードするDNA配列を遮断し、かつ不活性化するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項55】 治療に役立つものとして使用するための請求項36及び54に記載されたオリゴヌクレオチド。

【請求項56】 抗腫瘍薬剤の調製のための請求項55に記載されたオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項57】 悪性カルシウム過剰血の治療のための薬剤の調製のための請求

項55に記載されたオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項58】 PTHrP蛋白質又はそのフラグメントを遮断し、かつ不活性化するための、配列番号2及び/または配列番号7の多型ドメインを含む抗体又はペプチドフラグメント。

【請求項59】 前記多型フラグメントがオステオスタチンである、請求項58に記載の抗体又はペプチドフラグメント。

【請求項60】 治療に役立つものとして使用するための請求項58に記載の抗体又はペプチドフラグメント。

【請求項61】 抗腫瘍薬剤の調製のための請求項60に記載の抗体又はペプチドフラグメントの使用。

【請求項62】 悪性カルシウム過剰血の治療のための薬剤の調製のための請求項60に記載の抗体又はペプチドフラグメントの使用。

【請求項63】 請求項54 - 55に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び/または請求項58 - 60に記載の抗体若しくはペプチド、及び少なくとも1つの許容され得る薬学的添加剤を含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

発明の分野

本発明は、PTHrP蛋白質（副甲状腺ホルモン関連蛋白質）をコードする遺伝子の対立遺伝子型の同定、コードされた蛋白質、及び腫瘍の分野におけるそれらの治療的適用に関する。

【0002】

従来技術

腫瘍の進行は、未だに完全に知られていない分子及び細胞イベントを含む、複雑な多面的(multi-phase)プロセスである。遺伝的及び環境的因子は、実験的動物モデルにおいて明らかに観察されるように、腫瘍発生の調節に関連する。

遺伝的要素に関する例が示されていて、そこでは、独立した遺伝子の特異的対立遺伝子によってコードされる生成物間の相互作用が腫瘍の進行を制御するようである。

従って、動物又はヒトにおける病状(pathologies)と相関する新たな多型対立遺伝子型の研究が関心を引いている。

腫瘍の予防及び治療の新たな方法を確認するために、これらの遺伝子の同定及びそれらの作用機構の理解は、特に重要である。

【0003】

本発明は、副甲状腺ホルモン（PTHrP）と相関するペプチドをコードするPthlh遺伝子の2つの多型対立遺伝子型に関する。

Pthlh遺伝子（副甲状腺ホルモン様ホルモン）は、副甲状腺ホルモン群に属するPTHrPペプチドをコードする。

PTHrP蛋白質（副甲状腺ホルモン関連蛋白質）は、カルシウム過剰血(hypercalcemia)を招き、軟骨の成長及び骨の形成に関連し、組織及び細胞型の大部分で発現される。それに対して、副甲状腺ホルモンは、副甲状腺でしか見られない。

PTHrP蛋白質は、組織内の局所的メッセンジャーであるのに対し、副甲状腺ホルモンは、全身的(systemic)機能を有する。

【0004】

更に、PTHrP蛋白質は、細胞成長若しくは分化(differentiation)の刺激又は抑制に関連し、特異的なタイプの細胞の成長を阻害又は刺激する(ストレウラー(Strewler) G.J., 疾病のメカニズム(Mechanism of disease), New England Journal Med., 342:177-185, 2000)。

少なくとも3つのフラグメントにおけるPTHrPの幅広い分布及びその処理は、この蛋白質が、いくつかの生物学的機能に関連すること(involverment)を示唆する。3つのフラグメントは、それぞれ、“PTH-類似”アミノ末端領域、“中心領域”、及びカルボキシ末端領域又は“オステオスタチン(osteostatin)”と表される。オステオスタチンは、ペプチドフラグメント107-139に相当する(ストレウラー(Strewler), 2000)。

【0005】

異なる動物及びヒトのPthlh遺伝子及びPTHrP蛋白質が、従来技術において知られている。例えば、しばしば野生型配列(w.t.)と呼ばれる、マウスのPthlh遺伝子及びPTHrP蛋白質が、マンギン(Mangin) M. ら, Gene 95, (2), 195-202, 1995に示されている(ジーンバンク(Gene Bank)のアクセス番号はNM_008970)(前者のアクセス番号はM60057.1); ラットのものはヤスダ(Yasuda) T. ら, Mol. Endocrinol. 3, 518-525, 1989に(ゲンバンク(Genbank)のアクセス番号 NM_012636); イヌのものはロソル(Rosol) T. J. ら, Gene 160 (2), 241-243, 1995に(アクセス番号U15593)、ヒトのものはセーダ(Thiede) M.A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (13), 4605-4609, 1988(アクセス番号 ゲンバンク (GenBank) NM_002820)に示されている。

【0006】

発明の要約

本発明の発明者(authors)は、驚くべきことに、動物又はヒトにおいて、腫瘍、特に皮膚癌及び肺癌の進行に関連する、Pthlh遺伝子の野生型があることを見出した。

そこで、本発明の第一の態様は、Pthlh遺伝子の多型をもたらす(responsible)ヌクレオチド塩基を含み、かつ腫瘍の進行に関連する多型PTHrP蛋白質

質をコードするポリヌクレオチドに関する。

より詳しくは、前記ポリヌクレオチドは、P t h l h 遺伝子（配列番号1）の多型ドメインと隣接する部位を含み、かつ第一多型ドメイン T S X P S L E（配列番号2）を含む多型 P T H r P 蛋白質又はそのフラグメントをコードする。ここで、Xは、何らかのアミノ酸であり、挿入(insertion)又は削除(deletion)であることができ、T (T h r) は、I (l l e) であることもでき、かつ多型アミノ酸は、P (P r o) であり、又は別の疎水性アミノ酸であることもできる。

【0007】

本発明によるポリヌクレオチドは、配列番号3の496位に相当する多型ヌクレオチドを含む。それにもかかわらず、この位置(numeric position)は、様々な動物の種及びヒトの種における配列によって明らかに変化するであろうし、本発明の範囲内に含まれる。

より詳しくは、本発明による第一の多型(単一のヌクレオチド多型又はSNP)は、塩基Cに相当し、P t h l h 遺伝子の多型Cは、スレオニン(T h r) に代えて、プレ蛋白(pre-protein) (未成熟蛋白質) (配列番号4)の166位のアミノ酸プロリン(P r o) 有するイソ型(isoform) P T H r P 蛋白質をコードするので、本発明による多型型の遺伝子及び蛋白質の両者は、それぞれ、P t h l h^{P r o}及びP T H r P^{P r o}と一般に表されるであろう。それにもかかわらず、多型ヌクレオチドの位置は、異なる動物種及び人種(human races)の配列によって変化するであろうし、本出願の範囲内に含まれる。

【0008】

本発明はまた、配列番号2の多型ドメインを含むP T H r P^{P r o}蛋白質又はそのフラグメント、特に、オステオスタチンという語で示されるフラグメントをコードするポリヌクレオチドに関する。

【0009】

別の態様によれば、本発明は、第二多型アミノ酸ドメイン（配列番号7）を含むポリヌクレオチドにも関する。ここで、P t h l h 遺伝子の多型塩基は、配列番号6の4位、21位、及び22位に相当する。より正確には、以下の塩基：配列番号6のT (4 位)、T (2 1 位)、T (2 2 位) は、本発明の多型に相当す

る。

より詳しくは、前記ポリヌクレオチドは、P t h l h 遺伝子（配列番号6）の第二多型ドメインに隣接するヌクレオチドを含み、かつ第二多型ドメインA S S G L L D Y P（配列番号7）を含む多型P T H r P 蛋白質又はそのフラグメントをコードする。

【0010】

本発明によるポリヌクレオチドは、配列番号8の454位、471位、472位に相当する多型塩基を含む。それにもかかわらず、その位置は、様々な動物及びヒトの種の配列によって明らかに変化するであろうし、本発明の範囲内に含まれる。

より詳しくは、本発明に記載された第二多型は、P T H r P 蛋白質の3つのアミノ酸の置換を決定する（454位、471位、472位における）3つのヌクレオチドの置換に相当し、それにより、アミノ酸セリン（S e r）を152位へ運び、プレ蛋白（未成熟蛋白質）（配列番号9）の157位のアミノ酸であるアスパラギン酸及び158位のアミノ酸T y r を、それぞれアミノ酸A l a（152）、G l u（157）、及びA s p（158）の代わりに運ぶので、本発明による多型型中の遺伝子及び蛋白質の両者は、それぞれP t h l h^{S e r A s p T y r}及びP T H r P^{S e r A s p T y r}と一般に表されるであろう。それにもかかわらず、その位置は、様々な動物及びヒトの種における配列によって変化するであろうし、本発明の範囲内に含まれる。

【0011】

別の態様によれば、本発明は、この多型P T H r P^{S e r A s p T y r}蛋白質又はそのフラグメント、特に第二多型ドメインを含むフラグメント、オステオスタチンに関する。

【0012】

本発明はまた、P t h l h^{P r o}遺伝子及びP t h l h^{S e r A s p T y r}遺伝子を含むポリヌクレオチド、又はその遺伝子自体若しくはその相補性鎖とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、並びにP t h l h^{P r o}及びP t h l h^{S e r A s p T y r}遺伝子若しくは多型の存在を決定するためのプローブとしての前記オリゴヌクレオチドの

使用に関する。

従って、本発明は、検体(subject)、動物又はヒト中のPTHrP^{Pro}及びPTHrP^{SerAspTyr}蛋白質をそれぞれコードするPthlh^{Pro}及びPthlh^{SerAspTyr}遺伝子の多型の同定方法であって、検体から生物学的試料を得て、これらのプローブを使用してPthlh^{Pro}及びPthlh^{SerAspTyr}遺伝子又は多型を同定する段階を含む方法にも関する。

【0013】

本発明はまた、ポリヌクレオチド又は核酸配列又はPTHrP^{Pro}蛋白質をコードする遺伝子又は多型ドメインを含むそのフラグメントにおける多型を決定するためのキットであって、

(a) PTHrP^{Pro}蛋白質及び/若しくはPTHrP^{SerAspTyr}蛋白質又はそれらのそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドの領域のPCR増幅のためのプライマーを含む第一容器；及び

(b) 前記多型を決定するためのPCRプライマーを含む第二容器を含むキットに関する。

【0014】

本発明はまた、腫瘍、特に、皮膚癌又は肺の腫瘍のインビトロ診断又は素質(predisposition)のための方法であって、動物又はヒト検体中のこの腫瘍の関連するPthlh^{Pro}及びPthlh^{SerAspTyr}対立遺伝子の有無(presence or absence)を決定する段階を含む方法に関する。

【0015】

別の態様によれば、本発明は、腫瘍の進行を招くPthlh^{Pro}及びPthlh^{SerAspTyr}遺伝子の発現を、特に、多型蛋白質又は前記多型を含むそのフラグメントを遮断し得るアンチセンスオリゴヌクレオチド又は抗体及び/又はペプチドによって阻害する方法にも関する。ここで、前記フラグメントは、カルボキシ末端フラグメント又はオステオスタチンであることが好ましい。

従って、本発明はまた、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド及び/又は抗体及び/又はペプチド、並びに、好ましくは少なくとも1つの薬理的に許容され得る添加剤の存在下の、前記オリゴヌクレオチド及び/又は抗体及び/又はペプ

チドを含む薬学的組成物に関する。

【0016】

別の態様によれば、本発明は、P t h l h^{Pro}遺伝子及び/若しくはP t h l h^{SerAspTyr}遺伝子又は多型的一方又は他方又は両方を運ぶDNAフラグメントによる、動物又はヒトの細胞若しくは細胞系の修飾又はトランスフェクション(transfection)のための方法、並びにこれらのトランスフェクトされた細胞系の培養中の成長に関する。

本発明による遺伝子によってトランスフェクトされた細胞は、ヒト以外の(non-human)哺乳動物の胚幹(embryonic stem)細胞であることもでき、次いで、前記修飾された細胞の成長した動物の子宮への移植により、ヒト以外の形質転換哺乳動物(transgenic non-human mammals)が得られる。

【0017】

別の態様によれば、本発明は、P t h l h^{Pro}及び/若しくはP t h l h^{SerAspTyr}遺伝子の、又は前記多型ドメインを含むポリヌクレオチドの導入によって修飾された、ヒト以外の形質転換動物又はノックイン(knock-in)アニマルを調製するための方法に関する。

好ましくは、遺伝子又はDNA配列は、組織特異的プロモーターとともに導入されるか又は結合することができ、それにより、特異的組織中で、P t h l h遺伝子の多型変異体的一方又は両方の発現が引き起こされるか、又は特異的条件下でその活性化が引き起こされる。

従って、本発明は、この態様によって得られるヒト以外の形質転換動物に関する。

【0018】

図面の説明

図1

実施例2に記載のようなオリゴヌクレオチドとの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション(ASO)による、マウスのP t h l h遺伝子におけるA C多型の同定。様々なマウスの種(strains)のゲノムDNAの試料は、PCR増幅され、ナイロン膜へ移され、A多型のためのオリゴヌクレオチドによって表される放

放射性ラベルされたプローブ (Thr、W.t.)、左側のパネル) 又はC多型のための対応するプローブ (Pro、右側のパネル) とハイブリダイズされた。A多型 (Thr) の存在のいくつかの例は、A4、A5 (種A/J) であり; C多型 (Pro) のものは、C7、C8である (種C57BL/6)。

【0019】

図2

トランスフェクトされていない(untransfected)NCI-H520細胞(対照)の形態と構造(morphology)を(A)に示し、Pthlh^{Thr}(w.t.)対立遺伝子によってトランスフェクトされた細胞のものを(B)に、Pthlh^{Pro}対立遺伝子によってトランスフェクトされた細胞のものを(C)に示す。

(A)の細胞は、平坦に成長し、(B)の細胞は、(A)と同様の形態と構造を有し、ところどころ紡錘状(spindle-like forms)であり、コロニー間は橋架け(bridge)パターンであるのに対し、(C)の細胞は、丸まる傾向があり(with tendency of tend pilling up)、クラスターに成長する。

【0020】

図3

この図は、ヌードマウスに接種された、トランスフェクトされていないNCI-H520細胞(対照())、Pthlh^{Pro}によってトランスフェクトされたもの()、及びPthlh^{Thr}()によってトランスフェクトされたもののインビトロの腫瘍成長の進行を示す。

データは、ヌードマウス中で成長する腫瘍の平均量±SE(標準誤差)として示されている。グラフは、Pthlh^{Pro}によってトランスフェクトされた細胞()を接種した動物は、接種から8週間で、より大きな腫瘍を有し、この時点でマウスは殺された(sacrificed)。

【0021】

図4

この図は、ウエスタンブロッティング実験を示す。

Pthlh^{Pro}(5、6、及び7列)及びPthlh^{Thr}(1及び2列)によってトランスフェクトされたNCI-H520細胞系、並びにトランスフェクトさ

れていないもの(3及び4列)は、ヒト蛋白質の38-64残基(aa)と反応し、ネズミのPTHrP蛋白質も認識する、アンチ-PTHrPヒトモノクローナル抗体(Ab-1、癌遺伝子)1µgとインキュベートされた。トランスフェクトされたPthlh遺伝子が、外因性PTHrP蛋白質を発現することができ、かつトランスフェクトされた細胞の異なる表現型が、それらの中にトランスフェクトされる、2つの異なるPthlh^{Pr°}及びPthlh^{Thr}対立遺伝子の生成物の影響によるものであることを立証し得ることが、そのアッセイにより示される。

【0022】

図5

このダイアグラムは、腫瘍を有する(tumor bearing)ヌードマウスの生存率のカプランマイヤー(Kaplan-Meier)評価を示す。ヌードマウスは、 3×10^6 個のNCI-H520細胞(Pthlh^{AlaGluAsp}又はPthlh^{SerAspTyr}がトランスフェクトされたものに相当するwt)(10マウス/群)を、左右の背面領域に2回、皮下(s.c.)注射された。(Pthlh^{AlaGluAsp}=AJ32系; Pthlh^{SerAspTyr}=M.スプレタス(spretus)SPRET/EiからのSp6系。)ログランク(Log-rank) $P = 0.0113$ は、第二多型変異体によって形質転換された細胞、Pthlh^{SerAspTyr}によってトランスフェクトされたNCI-H520細胞を有するヌードマウスが、より短い生存時間を示すことを示す。ログランクは、ログランク試験を用いることによって算出された(ペト(Peto)ら, 1976, Br. J. Cancer, 35, 1-39)。

【0023】

定義

この出願の目的のために、以下の用語は、以下のように解釈されるであろう：
 - 対立遺伝子変異体 - これは、既知の遺伝子と少なくとも1つのヌクレオチド塩基の変化によって区別される、その対立遺伝子型である；

【0024】

- Pthlh遺伝子の多型をもたらす塩基を含み、かつ多型PTHrP^{Pr°}蛋白質又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド - これは、蛋白質PTH

r P^{Pro}の多型又はそのフラグメントをもたらす多型塩基を含む、何らかのポリヌクレオチド又はヌクレオチド塩基である；

【0025】

- P t h l h 遺伝子の多型をもたらす塩基を含み、かつ多型 P T H r P^{SerAspTy}「蛋白質又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド - これは、P T H r P^{SerAspTy}」蛋白質の多型又はそのフラグメントをもたらす多型塩基を含む、何らかのポリヌクレオチド又はヌクレオチド塩基である；

【0026】

- 遺伝子を含むポリヌクレオチドと、又は遺伝子自体若しくはその相補性鎖とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド - これは、ハイブリダイゼーションによって、多型(polymorphic character)の存在を確認するためのプローブとして使用され得るヌクレオチド配列である；

【0027】

- 同系(inbred) - 全ての遺伝子が同型である動物の種；
 - 異系(outbred) - 全ての遺伝子が同型ではない動物の種；
 - ノックインアニマル - 特異的な条件において活性化され得る遺伝子によって前記動物の幹細胞をトランスフェクトすることにより得られる動物（例えば、シャストリー(Shastri) B. S., Molecular & Cellular Biochemistry, 181 (1-2): 163-79, 1998)；

【0028】

- 形質転換動物 - 遺伝子によって前記動物の幹細胞をトランスフェクトすることにより得られる動物（ハナハン(Hanahan) D., Annual Review of Genetics, 479-519, 1988)；

【0029】

- P T H r P^{Pro} - 本説明によれば、これは、第一多型アミノ酸を含む配列番号2のドメインを含むP T H r P蛋白質又はそのフラグメントである；この多型アミノ酸は、何らかの他の疎水性アミノ酸であることもできるが、プロリンによって不活性化される；

【0030】

- P t h l h^{P^{ro}} - これは、多型塩基を含み、かつ多型アミノ酸を含む配列番号2のドメインを含むP T H r P^{P^{ro}}蛋白質又はそのフラグメントをコードする遺伝子（又はそのフラグメント）である；

【0031】

- P T H r P^{SerAspTyr} - 本説明によれば、これは、第二多型ドメイン（多型アミノ酸）を含む配列番号7のドメインを含むP T H r P蛋白質又はそのフラグメントである；これらの多型アミノ酸は、セリン、アスパラギン酸及びチロシンである；

【0032】

- P t h l h^{SerAspTyr} - これは、第二多型ドメイン（多型塩基）を含み、かつ配列番号6のヌクレオチド配列を含み、若しくは配列番号7の多型アミノ酸を含む場合がある、P T H r P^{SerAspTyr}蛋白質又はそのフラグメントをコードする遺伝子（又はそのフラグメント）である；

【0033】

- S N P（単一のヌクレオチド多型） - 遺伝子の対立遺伝子型をもたらす単一の塩基。

【0034】

発明の詳細な説明

本発明の発明者は、P T H r P蛋白質のカルボキシ末端領域に位置する多型をもたらすP t h l h遺伝子の様々な対立遺伝子型を見出し、かつ、これらの対立遺伝子型が、動物及びヒトにおいて、腫瘍、特に、皮膚癌及び肺の腫瘍の進行に関連することも見出した。

【0035】

従って、第一の態様において、本発明は、第一多型ドメイン又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド、遺伝子、又はDNA配列に関する。より詳しくは、多型P t h l h遺伝子は、本発明によれば、第一多型ドメイン：T S X P S L E（配列番号2）を含むP T H r P蛋白質又はそのフラグメントをコードする。ここで、Xは、何らかのアミノ酸であるか、又は挿入若しくは削除であり、T（スレオニン）は、I（イソロイシン）であることもでき、Pは、多型アミ

ノ酸であり、かつプロリンであり、又は別の疎水性アミノ酸であることもできる。

【0036】

特に、本発明によるポリヌクレオチド(配列番号1)は、CCT、CCC、CCA、CCGからなる群から選択される多型プロリン、好ましくはCCCをコードする何らかのコードンを含む。遺伝的コードの変性(degeneration)及び特定のコードンの優先的な使用により、異なる生物中の別のものに関して、配列番号1として同定されるヌクレオチド配列は、同じ多型ドメインをコードするにもかかわらず、その中でそれが単離される生物により、又はその中でそれが発現されなければならない生物により異なることもあり、それ故、本発明に含まれる。従って、本発明は、配列番号2によって定義される蛋白質の(proteic)ドメインをコードする全ての考えられ得るオリゴヌクレオチドを含む。

【0037】

よって、本発明によるポリヌクレオチドは、配列番号3における496位に相当する多型塩基Cを含む。それにもかかわらず、この位置は、様々な動物及びヒトの種の配列によって変化し得るので、本発明は、その位置によらないが(independently of its numeric position)、それにもかかわらず、マウスの配列における496位に相当する多型塩基に関する。

【0038】

特に、マウスC3H/HeのPthlh遺伝子は、既知の型に存在するA(アデニン)に代えて、コード領域(配列番号3)の496位に多型塩基Cを含む対立遺伝子型に存在し、本説明では、しばしば、w.t.型と呼ばれる(マンギン(Mangin)ら1995, ゲンバンク(GenBank)アクセス番号NM_008970)。特に、見出された対立遺伝子型では、ThrをコードするコードンACCは、いわゆるw.t.型で、ProをコードするCCCに変化するので、多型蛋白質は、前駆体蛋白質(配列番号4)のアミノ酸166に相当する位置で、又は成熟蛋白質(配列番号5)の130位において、Thr-Proと示される非保守的な(non-conservative)多型を有する。

Thrは極性アミノ酸であるのに対してProは疎水性なので、多型は、Pt

h1h^{Pr}遺伝子のカルボキシ末端領域において、非保存的なアミノ酸の変化を引き起こす。従って、本発明は、プロリンには限定されないが、全ての疎水性のアミノ酸の態様を包含する。

【0039】

別の態様によれば、本発明は、第二多型ドメイン又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド、遺伝子、又はDNA配列に関する。より詳しくは、多型Pth1h遺伝子は、この態様によれば、PTHrP蛋白質又は第二多型ドメイン：ASSGLLDYP（配列番号7）を含むそのフラグメントをコードする。特に、本発明によるポリヌクレオチド（配列番号6）は、多型アミノ酸、よって、特に、アミノ酸セリン（Ser）（配列番号7の2位）、アスパラギン酸アミノ酸（Asp）（配列番号7の7位）、及びチロシンアミノ酸（Tyr）（配列番号7の8位）をコードする何らかのコードを含むであろう。本発明の範囲には、多型アミノ酸に関して保存的なアミノ酸の置換（及び対応するヌクレオチドの置換）も含まれる。第二多型ドメイン（配列番号7）の多型アミノ酸に関して保存的な置換の例は、8位の多型チロシンの別の芳香族アミノ酸、例えば、フェニルアラニン（Phe）又はトリプトファン（Trp）による置換である。ヌクレオチドレベルでは、本発明は、遺伝的コードの変性及び異なる生物又は種におけるいくつかのコードの優先的な使用によって引き起こされるそれら置換の全てを含む。実際は、配列番号6として同定されるヌクレオチド配列は、たとえ同じ多型ドメインASSGLLDYPをコードしても、それがそこから単離される生物又は動物の種によって異なることもあり、それ故、本発明に含まれる。従って、本発明は、配列番号7として定義される蛋白質のドメインをコードする全ての考えられ得るオリゴヌクレオチドを含む。

【0040】

特に、本発明により同定される第二多型に相当するポリヌクレオチドは、配列番号8の454位、471位、及び472位に相当する多型塩基Tを含む。それにもかかわらず、これらの位置は、動物及びヒトの種によって変化し得るので、本発明は、その位置によらず、多型塩基に関する。特に、マウスSPRET/Ei（M.スプレタス(spretus)）のPth1h遺伝子は、既知の型（マンガニ(Ma

ngini)ら 1995)に存在する、対応する位置のG (グアニン)の代わりに、前駆体蛋白質(配列番号8)をコードするDNAの454位、471位、及び472位に多型塩基Tを含む対立遺伝子型に存在する。特に、見出された対立遺伝子型では、前駆体蛋白質(配列番号9)の152位又は成熟蛋白質(配列番号10)の116位に相当するセリンをコードするコドンTCGは、既知の対立遺伝子型においてアラニンをコードするコドンGCGを置換する；前駆体蛋白質(配列番号9)の157位又は成熟蛋白質(配列番号10)の121位のアスパラギン酸をコードするコドンGATは、既知の対立遺伝子型において同じ位置でグルタミン酸をコードするコドンGAGを置換する；そして成熟前(pre-mature)蛋白質(配列番号9)の158位又は成熟蛋白質(配列番号10)の122位のチロシンをコードするコドンTACは、既知の対立遺伝子型において同じ位置でコドンGACを置換する。それ故、多型PTHrP^{SerAspTyr}蛋白質は、以下の、Ala Ser(152位又は116位)、Glu Asp(157位又は121位)、及びAsp Tyr(158位又は122位)と示される多型を有する。それにもかかわらず、本発明は、示されたアミノ酸に限定されないが、多型のものと同じ極性を有する全てのアミノ酸を含む。

【0041】

特に、第一及び第二多型に相当するドメインは、マウス中の成熟蛋白質のフラグメント107-139に相当する、オステオスタチンとして示される蛋白質のフラグメント中に、好ましくはお互いに独立に存在する。従って、PTHrP^{Pr}°及び/またはPTHrP^{SerAspTyr}蛋白質の生成を引き起こす核酸のその他の修飾の全ては、本発明の範囲内に含まれる。

従って、本発明は、多型PTHrP^{Pr}°蛋白質をコードし、及び/又は多型PTHrP^{SerAspTyr}蛋白質若しくはこれら多型を生じるこれらの一部をコードする、何らかの遺伝子又は遺伝子の一部、エクソン、ポリヌクレオチド、前記遺伝子、遺伝子の一部、又はエクソンを含むDNA配列に関する。

【0042】

本発明はまた、配列番号2及び配列番号7の多型ドメインのいずれをも含む蛋白質をコードするDNA配列に関する。

単純化のために、本発明に記載の遺伝子及び多型蛋白質は、それぞれ、先の定義に記載した意味の、 $Pthlh^{Pro}$ 、 $Pthlh^{SerAspTyr}$ 及び $PTHrP^{Pro}$ 、 $PTHrP^{SerAspTyr}$ と示されるであろう。

単純化のために、本発明の様々な態様の実施及び実験は、マウス動物モデルにおいて行われた。それにもかかわらず、本発明は、マウスに限定されず、同じ多型を有し、そして様々な理由により実験室での実験には適さない、哺乳動物、動物、及びヒトを包含する。(皮膚有棘細胞癌(cutaneous spinocellular carcinoma)に抵抗力を有する)異系Cr-Rマウス及び(皮膚有棘細胞癌にかかりやすい)Car-Sの種が、サラン(Saran)ら、Carcinogenesis, Vol. 17, n. 11. 2463-2468, 1996又はバングラジ(Bangrazi)ら、Carcinogenesis, Vol. 11, n. 10, 1711-1719, 1990に記載のように使用され、かつ得られた。これらの文献に記載されたように、これらのマウスは、9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン(DMBA)及び12-O-テトラデカノールホルボル(tetradecanoylhorbol)-13-アセテート(TPA)による二相発癌プロトコルにより処理された、様々な同系種間の適当な交雑育種(cross-breeding)の結果である。

【0043】

この研究は、チャールズ・リバー(Charles River)、カルコ(Calco)、イタリアから得られたヌードマウス(胸腺なし)、並びにジャクソン・ラボラトリーズ(Jackson Laboratories)から得られたか、又は実施例1及び2に示したようないくつかの研究所から供給された同系マウスを用いて行われた。 $Pthlh$ 遺伝子の $Pthlh^{Pro}$ 多型が、その中に皮膚癌及び肺の腫瘍の進行に関連する場所が見られた、マウスの染色体領域とともに、大きなLD(連鎖不均衡(linkage disequilibrium))を示すことがわかった。

【0044】

マウス $Pthlh^{Pro}$ 対立遺伝子による、ヒトの肺の扁平上皮癌腫系(pulmonary squamous carcinoma)のトランスフェクションにより、クラスター中で成長することができ、かつ腫瘍細胞において見られるように重なっている(piling up)、形態及び構造が変化した(with altered morphology)細胞が生成されるのに対し、トランスフェクトされていない細胞及び $Pthlh^{Thr}$ にトランスフェクト

された細胞は、平坦な（単層）成長を有していた。

更に、P t h 1 h^{Pr°}細胞が接種されたヌードマウス（胸腺なし、そのため不完全な免疫系を有する）では、トランスフェクトされていない細胞又はP t h 1 h^{Thr}（w . t . 型）がトランスフェクトされた細胞が接種されたものよりも迅速に腫瘍が成長し、更に、対照のマウスより顕著に高いレベルのカルシウム循環を示した。

これらのデータは、P t h 1 h^{Pr°}及びP t h 1 h^{SerAspTyr}対立遺伝子の両方が、ネズミモデルにおける腫瘍成長及び悪性カルシウム過剰血に関連することを示す。

【0045】

ヒトの腫瘍細胞系におけるP t h 1 h^{Pr°}対立遺伝子及びP t h 1 h^{SerAspTyr}対立遺伝子の発現は、P t h 1 h^{Pr°}多型及びP t h 1 h^{SerAspTyr}多型も、ヒトの細胞において活性であることを示す。従って、本発明は、マウスに限定されず、ヒト及びヒト以外の哺乳動物のP T H r P^{Pr°}蛋白質をコードするか、又はP T H r P^{SerAspTyr}蛋白質をコードする多型変異体を含む、全てのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸配列を包含する。

【0046】

結論として、本発明は、P T H r P蛋白質又はそのフラグメントをコードし、多型ドメインT S X P S L E（配列番号2）を含む全てのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸配列、P t h 1 h遺伝子又は多型エクソンに関し、更に、P T H r P蛋白質又はそのフラグメントをコードし、多型ドメインA S S G L L D Y P（配列番号7）を含む全てのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸配列、P t h 1 h遺伝子又は多型エクソンにも関する。本発明は更に、P T H r P蛋白質又はそのフラグメントをコードし、多型ドメインA S S G L L D Y P（配列番号7）とともに、多型ドメインT S X P S L E（配列番号2）を含む全てのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸配列、P t h 1 h遺伝子又は多型エクソンに関する。

より詳しくは、第一のポリヌクレオチドは、配列番号3（マウス）の496位に相当する第一の多型位置を含み、第二のポリヌクレオチドは、配列番号8の多

型位置、454位、471位、及び472位を含む。

【0047】

本発明は更に、配列番号4若しくは配列番号5（それぞれ前駆体及び成熟蛋白質）に示した、PTHrP^{Pro}蛋白質又はその多型フラグメント、又は、ある場合には、ドメインTSXPSLE（下線を付した多型aa）を含む蛋白質（配列番号2）に関する。

本発明は更に、配列番号9若しくは配列番号10（それぞれ前駆体及び成熟蛋白質）に示した、PTHrP^{SerAspTyr}蛋白質又はその多型フラグメント、又は、ある場合には、ドメインASSGLLDYP（下線を付した多型aa）を含む蛋白質（配列番号7）に関する。

【0048】

本発明による多型対立遺伝子配列は、動物又はヒトの細胞から単離することもできる。

PTHrP^{Pro}蛋白質及び/又はPTHrP^{SerAspTyr}蛋白質は、従来技術により、動物又はヒトの細胞から始まり、順番に単離され、精製され得る。

前述し、かつ実験例により詳細に示すように、本発明による多型遺伝子及び対応するコードされた蛋白質は、腫瘍の病状、特に、皮膚癌及び肺の腫瘍に関連し、様々なタイプの腫瘍に共通の悪性カルシウム過剰血に関連する。

従って、これらの多型を有する動物及びヒトの検体の両方が、この病状を有するか、又はその傾向を有し得るので、重要な診断及び/または予防ツール(tools)として記載された多型を同定し得ることは、極めて重要である。

【0049】

更なる態様において、本発明はまた、Pthlh^{Pro}遺伝子をコードするポリヌクレオチドに、又はPthlh^{SerAspTyr}遺伝子をコードするポリヌクレオチド若しくはcDNAと、又は遺伝子自体と、又は多型を有するそれらの一部と、又はそれらの相補性鎖若しくはmRNAとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドにも関する。

【0050】

これらの多型部位を認識し得るオリゴヌクレオチドは、Pthlh^{Pro}及び/

又はP t h l h^{SerAspTyr}遺伝子、又は多型の存在を証明するためのプローブとして使用されるので、腫瘍の進行の遺伝的危険性の診断、及び/又はその予後を予想するために有用である。

従って、本発明はまた、動物又はヒトの検体において、P T H r P^{Pro}蛋白質をコードするP t h l h^{Pro}遺伝子における多型、及び/又はP T H r P^{SerAspTyr}蛋白質をコードするP t h l h^{SerAspTyr}多型の同定方法であって、検体から生物学的試料を得て、P t h l h^{Pro}遺伝子及び/又はP t h l h^{SerAspTyr}遺伝子若しくは多型を同定するために記載されたプローブを使用する段階を含む方法に関する。

本発明による方法は、腫瘍の遺伝的素質の診断、又はそれらの予後の評価のために使用され、かつ動物又はヒトの検体において、関連するP t h l h^{Pro}及び/又はP t h l h^{SerAspTyr}対立遺伝子の有無を同定する段階を含む。前記方法はまた、カルシウム過剰血状態の病因を決定するために有用である。

【0051】

本発明は更に、ポリヌクレオチド若しくは核酸配列の、又はP T H r P^{Pro}及び/若しくはP T H r P^{SerAspTyr}蛋白質をコードする遺伝子、又はそれらのフラグメントの多型を同定及び/又は決定するための診断キットであって：

(a) P T H r P^{Pro}及び/若しくはP T H r P^{SerAspTyr}蛋白質、又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドの領域を増幅するためのプライマーを含む第一容器；

(b) 前記多型又はこれら多型の1つだけを決定するためのプライマーを含む第二容器を含むキットに関する。

最適なプライマー配列は、十分確立された(well established)方法論に従って選択される。このキット及び方法論の例は、A S Oとして(with the term ASO)、文献において知られており、かつ、マネンティ(Manenti)ら、Carcinogenesis 18, 1917-1920, 1997に記載されている。

【0052】

本発明による遺伝子又はその多型フラグメント(多型を有するフラグメント)も、動物又はヒトの細胞のトランスフェクションのために使用される。

従って、本発明は、P t h l h^{Pro}遺伝子及び/又はP t h l h^{SerAspTyr}遺伝子による、動物又はヒトの細胞系若しくは第一(primary)細胞のトランスフェクション、及び前記細胞の成長のための方法に関し、更に、前記遺伝子又はDNAフラグメントによる、ヒト以外の動物の胚幹細胞のトランスフェクション、及びその後の成長した動物中の前記細胞の移植のための方法にも関する。

【0053】

本発明による遺伝子又はその多型フラグメントは、ヒト以外の形質転換動物又はノックインアニマルを調製するためにも使用され得る。特に、前記ヒト以外の形質転換動物又はノックインアニマルは、特異的組織においてP t h l h^{Pro}及び/若しくはP t h l h^{SerAspTyr}の発現をもたらすか、又は特定の条件において活性化される、組織特異的プロモーターの制御下で、遺伝子の挿入によって修飾される。

形質転換動物(ヒト以外)及びノックインアニマルの調製のための既知の技術は、例えば、ハナハン(Hanahan)D., Annual Review of Genetics, 22: 479-519, 1988 (形質転換に対して)及びシャストリー(Shastri)B. S., Molecular & Cellular Biochemistry, 181 (1-2): 163-79, 1998 (ノックインに対して)に記載のものである。

【0054】

細胞と同様に、形質転換された動物(形質転換動物)は、P t h l h遺伝子及びP T H r P蛋白質及び腫瘍及びカルシウム血レベル(calcemia levels)を有するそれらの対立遺伝子変異体の挙動及び関係を研究するための研究モデルとして有用である。

多型P t h l h^{Pro}及びP t h l h^{SerAspTyr}遺伝子並びに対応する蛋白質が、いくつかの腫瘍の発生又は開始(onset)と、及び悪性カルシウム過剰血と関連することがわかったので、治療において、この遺伝子及び/又は蛋白質を、遮断及び/又は不活性化することは非常に重要である。

従って、本発明は更に、P t h l h^{Pro}及び/若しくはP t h l h^{SerAspTyr}遺伝子、若しくはそれらの多型フラグメントを遮断又は不活性化するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、並びに/又は、P T H r P^{Pro}及び/若しくはP T

H r P^{SerAspTyr}蛋白質、若しくはそれらの多型フラグメントを遮断又は不活性化するための抗体若しくはペプチド/蛋白質に関する。従って、本発明の更なる態様は、これらの蛋白質、蛋白質フラグメント、ペプチド、抗体、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの、好ましくは抗腫瘍又は抗カルシウム過剰血薬剤として使用されるべき、薬学的組成物の調製のための使用に関する。

好ましくは、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド及び/又は抗体又はペプチドフラグメントは、オステオスタチンに相当する多型フラグメントを認識する。

従って、好ましくは、少なくとも1つの許容され得る薬学的添加剤及び/又は希釈剤(dilutant)及び/又は担体の存在下で、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド及び/又は抗体又はペプチドフラグメントを含む薬学的組成物を調製することもできる。

本発明に適用され得る、腫瘍成長の刺激を遮断するための薬学的組成物の調製のための技術は、エル・アブダイミ(El Abdaimi) K., ら, Cancer Research, 59 (14): 3325-8, 1999及びファルゾン(Falzon) M., Molecular & Cellular Endocrinology, 127 (1): 99-108, 1997に記載のものである。

【0055】

本発明に含まれる配列を説明するために、配列表を示す。

【0056】

【実施例】

ここで、以下に、特定の態様により、本発明を説明するが、本発明は実施例に限定されない。

実施例1：多型遺伝子P t h 1 h^{Pr°}の同定

3匹の同系の成長したマウス、A / J、B a l b / c JとC 3 H / H e Jを、ジャクソン・ラボラトリーズ(Jackson Laboratories)(バー・ハーバー(Bar Harbor), Me)から得た。

これらの動物から肺を除去し、ウルトラスペック(Ultraspex)(登録商標)キット(バイオテクス(Biotechx), ヒューストン(Houston) テキサス(Texas))のプロトコルに従って、そのmRNAを抽出した。

対応する全長DNAの合成は、MMTV RT(ギブコ(Gibco)-BRL)により行われ

た。

マウスのPthlh遺伝子(アクセス番号NM_008970としてゲンバンク(GenBank)に登録、マンギン(Mangin)ら)をコードする全体領域は、その肺のmRNAからPCRにより増幅され、およそ200-400bp(塩基対)の長さのフラグメントは、ABI377シーケンサー(パーキンエルマー(Perkin Elmer),ロシュ(Roche))を用いて直接配列決定された(又は、それらはpCRIIベクター;インビトロゲン(Invitrogen),サンディエゴ(San Diego),カリフォルニア(California)でサブクローンされた)。

独立したPCR産物によって得られた配列の組み合わせは、得られるべき様々な種に対するコンセンサス(consensus)配列を作り出すことを可能にした。次いで、これらの配列を、互いに比較した。マウスA/J及びBalb/cJは、Thr(Pthlh^{Thr})対立遺伝子を有するのに対し、マウスC3H/HeJは多型Pthlh^{Pro}対立遺伝子を有することがわかった。

結論として、Pthlh遺伝子のPthlh^{Pro}対立遺伝子変異体は、496位(配列番号3)においてC多型を有することがわかった。このC多型は、前駆体蛋白質(配列番号4)の166番目のアミノ酸の、及び成熟蛋白質(配列番号5)の130位におけるThr-Proの変化を生じさせる。

【0057】

【表1】

3種の同系マウスにおけるヌクレオチド多型の分析

系統	496番ヌクレオチド
A/J 及び Balb/cJ	A
C3H/HeJ	C

【0058】

実施例2:異なるマウスの種に関するPthlh^{Thr}(w.t.)及びPthlh^{Pro}対立遺伝子の分布 以下の表2に記載されているように、75の異なるマウスの種が、Pthlh^{Thr}及びPthlh^{Pro}対立遺伝子の分布を調べるために試験された。

マウス又はゲノムDNAは、ジャクソン・ラボラトリーズ(Jackson Laboratories)(バー・ハーバー(Bar Harbor), Me)、I. ナカシマ(Nakashima)博士(名古屋大学、ナゴヤ(Nagoya), 日本)(O20/A)、M. ニシムラ(Nishimura)博士(浜松医科大学(Hamamatsu University School of Medicine)、ハママツ(Hamamatsu)、日本)(STS/A)、及びM. マンデル(Mandel)博士(NCI, ベセスダ(Bethesda), MD, 米国)(NGP/N)から得た。

アミノ酸配列における変化を決定するヌクレオチドの違いの存在が、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション(ASO)(マネンティ(Manenti) G., ら, 1997)を通して確認された。

これらのマウスのゲノムDNAは、標準的な方法で脾臓から抽出された(ゲノミックスキット(Genomix kit), タレント(Talent), トリエステ(Trieste), イタリア)。

多型を含むDNAフラグメントは、プライマー: 5' - ACA AAGAACA GCCACTCAA - 3' (配列番号11)と、5' - ACAGTACCTTAA GCTGGGC - 3' (配列番号12)を用いてPCR増幅され、ナイロン膜に移された。

【0059】

ThrをコードするコドンACCに対して特異性を有する15bp(15量体)のオリゴヌクレオチド(5' - AGCGAGGTCCTGGAG - 3') (配列番号13)及びProをコードする多型CCCに対するオリゴヌクレオチド(5' - CTCCAGGCCCTCGCT - 3') (配列番号14)は、ガンマ³²P-dATPにより5'末端を標識され、再度、上述のマネンティ(Manenti)に記載のASO法に従って、ハイブリダイズされた。見出された多型の結果に関するASO技術の結果を図1に示す。

放射能写真撮影の信号を、画像分析装置(ホスファーマイメジャー(Phosphor Imager), マスターイメージ(Master Image), ファルマシア(Pharmacia))を用いて測定、定量した。得られた信号の比に基づいて、遺伝子型は、二つの対立遺伝子のうちの一つに属すると考えられた。この実験の実施を容易にするために、この割り当て(allocation)のためにソフトウェアが用いられた。

以下の表2は、異なる種のマウスにおけるPro又はThr多型の関連性を示す。

【0060】

【表2】

異なるマウスの系統の関数としてのPthlh^{Pro}及びPthlh^{Thr}対立遺伝子の分布パターン

種	種の数	Pthlh対立遺伝子
AKR/J, AU/SsJ, C3H/HeJ, C57BL/10J, C57BL/6J, C57BLKS/J, C57BR/cdJ, C57L/J, C58/J, CALB/Rk, CE/J, DBA/1J, DBA/2J, IDH2/Ei, KK/H1J, LDH2/Ei, LG/J, MOLC/Rk, MOLD/Rk, MOLF/Ei, MOLG/Dn, NON/LtJ, NZB/B1NJ, NZO/H1J, NZW/LacJ, PL/J, SB/Le, SF/CamEi, SJL/J, SK/CamEi, SKIVE/Ei, WB/Re, YBR/Ei	33	Pro
129/J, A/J, BALB/cBy, BDP/J, BUB/BnJ, CASA/Rk, CAST/Ei, CBA/CaJ, DDY/Jc1, FVB/NJ, I/LnJ, LP/J, M.caroli, M.pahari, MA/MyJ, NGP/N, NOD/LtJ, NOR/LtJ, O20/A, P/J, PANCEVO/Ei (M. ホルトウラノス(hortulanos)), PERA/Rk, PERC/Ei, Peru Atteck/Ei, RBF/DnJ, RF/J, RIIS/J, SEA/GnJ, SEC/1ReJ, SI/Co1, SM/, SOD1/Ei, SPRET/Ei (M. スプレタス(spretus)), ST/bJ, STS/A, SWR/J, TIRANO/Ei, WSB/Ei, ZALENDE/Ei	39	Thr

【0061】

実施例3：Pthlh遺伝子及びその対立遺伝子変異体による細胞のトランスフェクション、肺腫瘍及びカルシウム過剰血とPthlh^{Pro}遺伝子との関連性細胞系のトランスフェクション

ウルトラスペック(Ultrasec) (登録商標) キット(バイオテクス(Biotecx), ヒューストン(Houston) テキサス(Texas))のプロトコルに従って、マウスA/J及びC3H/Heの肺から抽出された全RNAの1µgを用いて、Pthlh遺伝子をコードする領域が逆転写された。

cDNAの合成は、MMTV RT(ギブコ(Gibco) - BRL)により行われ、用いられたプライマーは、5' - TCAGCAGCACCAAGATACA - 3' (配列番号15)であった。

逆転写(RT)反応の生成物のアリコートは、ATGコドンの40bp上流に位置する前方のプライマー(5' - CTGATTCTACACAAGTCC - 3') (配列番号16)を用いてPCR増幅された。反対のプライマーは、TGA終止コドンから41bp下流に位置していた(5' - AAATCCTGTAACGTGTCC - 3') (配列番号17)。

【0062】

増幅されたフラグメントは、真核生物のクローニングベクターpCR3.1(インビトロゲン(Invitrogen))でサブクローンされ(TA-クローニング)、サイトメガウイルス(CMV)プロモーターの制御下に置かれた。

2つの異なる種に属するクローンされた配列は、PCR反応の間にDNA-ポリメラーゼ酵素によって導入された何らかの考えられ得る突然変異を含むクローンの使用を避けるために、再度配列決定された。

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションズ(American Type Culture Collections), ロックビル(Rockville), MD (ATCC)から得られたヒトの肺腫瘍細胞(ヒトの肺の扁平上皮細胞系)NCI-H520は、上記で得た、マウスPth1h^{Pro}及びPth1h^{Thr}対立遺伝子を含む組換えベクターpCR3.1によってトランスフェクトされた。トランスフェクションの2日後に、1mg/mlのG418(ゲンタマイシン)を含む選択培地において、トランスフェクトされたクローンが選択された。

トランスフェクトされた細胞の成長を、図2に示す。トランスフェクトされていないNCI-H520細胞の形態と構造を(A)に示し、Pth1h^{Pro}によってトランスフェクトされた細胞のものを(C)に、Pth1h^{Thr}によってトランスフェクトされた細胞のものを(B)に示す。

Pth1h^{Pro}によってトランスフェクトされたNCI-H520細胞は、積み重なりクラスターを形成するように成長した(C)のに対し、トランスフェクトされていない細胞はインビトロで平らに成長した(A)。Pth1h^{Thr}によってト

ランスフェクトされた細胞(B)は、ときおり紡錘状の形状やコロニー間で橋架けパターンを示す(A)とよく似た形態と構造を有する。

これらの結果により、P t h 1 h^{Pr°}によってランスフェクトされた細胞は、腫瘍に典型的な、未分化かつ不規則な成長をすることが立証される。

【0063】

インビトロ腫瘍成長の実例

ヌードマウス(胸腺なし)は、チャールズ・リバー(Charles River)から得られた。

2つのグループの20匹のマウスに、それぞれP t h 1 h^{Pr°}又はP t h 1 h^{Thr}を含む 3×10^6 個のNCI-H520細胞を、左右背部において、腹膜レベルで皮下(s.c.)に接種させた。

15匹のマウスに、同じ方法を用いて、代わりに 3×10^6 個のランスフェクトされていないNCI-H520細胞(対照)を接種させた。

マウスに生じた腫瘍の直径を、週ごとに測定した。処置の開始から8週間後に、腫瘍を切除し、緩衝液で処理したホルマリンに固定し、パラフィンに包埋し、切片に切断し、ヘマトキシリンとエオシンによって染色した。

腫瘍は、これらの細胞系から予想されるように、ランスフェクトされたP t h 1 h対立遺伝子のタイプとは無関係に、ほとんど分化していない扁平上皮癌細胞の形態及び構造を有していた。

P t h 1 h^{Pr°}によってランスフェクトされた腫瘍細胞のインビトロの成長率は、ランスフェクトされていない対照細胞よりも($P = 0.009$)、かつP t h 1 h^{Thr}によってランスフェクトされた細胞よりも($P < 0.001$)、大幅に速かった。

実際に、P t h 1 h^{Pr°}によってランスフェクトされた細胞は大きな腫瘍を生じる。この理由から、接種から8週間後には、マウスは殺され、図3に示すように、実験を終了した。

これらの結果から、インビトロの腫瘍細胞の増殖と、P t h 1 h^{Pr°}対立遺伝子との関連性が立証される。

P t h 1 h^{Pr°}によって形質転換された細胞を接種させたヌードマウスにおい

て、及び通常の対立遺伝子($Pthlh^{Thr}$)によって形質転換された細胞を接種させた対照マウスにおいて、血中の電解質の濃度を測定した。得られたデータを表3に示す。

【0064】

【表3】

異なる対立遺伝子を有する細胞を接種させたヌードマウスの血中電解質濃度

対立遺伝子	n*	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Cl ⁻
$Pthlh^{Thr}$	7	156.7±0.9	4.77±0.27	0.71±0.08	112.9±0.8
$Pthlh^{Pro}$	7	154.9±1.2	5.99±0.67	1.17±0.08	113.9±0.7

n*:腫瘍を有するマウスの数

【0065】

表3で示したデータは、 $Pthlh^{Pro}$ 対立遺伝子型によってトランスフェクトされた細胞を接種させたヌードマウスにおいては、血液内のナトリウム、カリウム及び塩素の濃度について大きな違いは観察されなかったこと、及びそれら濃度は対照と同程度であることを示す。その代わりに、カルシウム濃度においては、対照とより十分に高い、大きな違いが観察される。同じことが、第二の多型によってトランスフェクトされた細胞を接種させたマウスを用いて行われた。表5を参照のこと。

【0066】

PTHrP^{Pro}蛋白質の存在の実証

上述のように得られた細胞系におけるPTHrP^{Pro}蛋白質の存在を、ウェスタンブロッティングを用いて調べた。

上述のように $Pthlh$ 対立遺伝子によってトランスフェクトされた対照細胞から得られた蛋白質抽出物(800 µg)を、ヒト蛋白質のアミノ酸残基38-64と反応し、さらにネズミのPTHrP蛋白質(Ab-1、癌遺伝子)を認識する、抗ヒトモノクローナル抗体PTHrP 1 µgと混合した。

この実験は、トランスフェクトされた $Pthlh$ 遺伝子は、外因性PTHrP蛋白質を発現することができることを示し、このことは、トランスフェクトされ

た細胞の異なる表現型は、そこに導入された二つの異なる P t h 1 h^{P^r°}及び P t h 1 h^{T^hr}対立遺伝子の効果によるものであることを立証する。

【0067】

実施例4：皮膚癌と P t h 1 h^{P^r°}遺伝子の関連性

C a r - S マウス（皮膚有棘細胞癌にかかりやすい）及び C a r - R（皮膚有棘細胞癌に抵抗力を有する）は、バングラジ(Bangrazi)ら, Carcinogenesis, Vol 111, n.10, 1711-1719, 1990にあるように得られた。これらの動物を、13世代（N13）にわたって、4週間の間、1.0gの12-O-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート（TPA）の塗布を2週に1回(two weekly)行って処置した。

最後の処置から2日後に、マウスを殺し、皮膚を切除して凍結させた。

19匹のC a r - Rマウス及び19匹のC a r - SマウスのゲノムDNAを、標準的な方法(ゲノミックスキット(Genomix kit), タレント(Talent), トリエステ(Trieste), イタリア)を用いて脾臓から抽出した。全RNAは、ウルトラスペック(Ultraspec)（登録商標）キット(バイオテクス(Biotecx), ヒューストン(Houston) TX)によって皮膚から調製された。

前述の実施例で述べたようにASO法を用いて行われた多型の分析は、皮膚癌に対する感受性（S）と抵抗性（R）に対して表現型的に(phenotypically)選択されたマウスの系において、表4に示したように、P t h 1 h^{P^r°}対立遺伝子は、19匹のC a r - Sマウスのうちの18匹においてホモ接合(homozygosis)のレベルで存在しているのに対し、P t h 1 h^{T^hr}対立遺伝子は、19匹のC a r - Rマウス全てにおいて、ホモ接合で存在していることを示した。

【0068】

【表4】

皮膚癌に対してそれぞれ抵抗性又は感受性という表現形質で選択された、Car-R及びCar-SマウスにおけるPthlh^{Pro}及びPthlh^{Thr}対立遺伝子の分布パターン

異系マウスの系	染色体の数 ¹	
	Pthlh ^{Pro}	Pthlh ^{Thr}
Car-R	0	38
Car-S	37	1

¹ $-\log P = 19.9$ フィッシャーの(Fisher's)直接確率検定(exact test)

【0069】

結論として、上記に示した実施例に基づいて、Pthlh^{Pro}のアミノ酸多型は、皮膚癌に対する感受性について大きなLD(連鎖不均衡)($-\log P = 19.9$)を示したことがわかった。

Pthlh対立遺伝子と腫瘍に対する素因との間のLDを、フィッシャーの直接確率検定を用いて評価した。有意性の値は、P値の負の対数($-\log P$)への変換(マネンティ(Manenti) G.ら, Genome Res. 9, 639-646, 1999)により示された。

【0070】

実施例5: 多型Pthlh^{SerAspThr}の同定及び特徴付け

Pthlh^{SerAspThr}対立遺伝子は、本質的には実施例3で述べたように、SPRET/Eiマウスからの全RNAのレトロトランスクリプション(retrotranscription)によってクローン化された。

cDNA合成及びPCRフラグメントクローニングは、Pthlh^{Pro}及びPthlh^{Thr}対立遺伝子について述べたように行われたが、SPRET/Ei(M. スプレントス(spretus))の正常な肺のcDNAから開始され、実施例3と同じプライマーが用いられた。

NCI-H520(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションズ(American Type Culture Collections), ロックヴィル(Rockville), MD)細胞は、配列番号9に相当するマウスのPthlh^{SerAspThr}対立遺伝子をコードする配列を

含む、組換え pCR3.1 発現ベクターの直線化 (linearized) DNA 1.5 - 7.5 μ g によって、スーパーフェクト (Superfect) (登録商標) 剤 (キアゲン (Qiagen)) を用いてトランスフェクトされた。トランスフェクトされたクローンは、1 mg/ml G418 (ゲンタマイシン) を含む選択培地において、トランスフェクションの2日後に選択された。PthrP 蛋白質 (Sp6) を発現するクローンが選択され、10匹のヌードマウスの皮下 (s.c.) に注射された。

【0071】

ヌードマウスに、多型対立遺伝子 Pthlh^{SerAspThr} 又は w.t. 対立遺伝子 Pthlh^{Thr} のいずれかによってトランスフェクトされた NCI-H520 細胞 3×10^6 個を、左右背部領域の皮下 (s.c.) に二度注射した。腫瘍の直径は毎週測定され、s.c. 腫瘍を有するマウスから、電解質分析のために、血液試料が集められた。電解質分析のために、10匹のヌードマウスの更なる対照群が、 6×10^6 個の (w.t.) Pthlh^{Thr} によってトランスフェクトされた (一箇所) NCI-H520 細胞の皮下 (s.c.) に注射を受けた。血液試料を、s.c. 腫瘍を有するマウスから集め、ヘパリンコートされたマイクロチューブに入れた。血漿電解質濃度を、チバ-クローニング (Ciba-Corning) 865 ガスアナライザー (Gasanalyser) によって決定した。具合が悪くなったときにマウスを殺した。

【0072】

Pthlh^{SerAspThr} 対立遺伝子によってトランスフェクトされた NCI-H520 細胞のインビトロの成長パターンは、Pthlh^{Thr} によってトランスフェクトされた NCI-H520 細胞のものと類似していた。しかし、トランスフェクトされた Pthlh^{SerAspThr} 対立遺伝子は、腫瘍を有するヌード (nuce) マウスのより高い死亡率と関連していた (図5、 $P = 0.0113$ 、ログランク試験)。確かに、Pthlh^{SerAspThr} 対立遺伝子によってトランスフェクトされた NCI-H520 細胞を注射されたヌードマウス10匹中、5匹だけが、腫瘍注射の109日 (16週間) 後に依然として生存していたのに対して、Pthlh^{Thr} によってトランスフェクトされた NCI-H520 細胞を注射されたヌードマウス10匹中、10匹が、同じ期間生存していた ($P = 0.016$ 、フィッ

シャーの直接確率検定)。

【0073】

【表5】

腫瘍を有するヌードマウスにおける血漿電解質濃度

トランスフェクトされたPthlh対立遺伝子 ¹	腫瘍を有するマウスの数	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻
w. t. Thr ¹⁶⁶	7	156.7 ± 0.9	4.77 ± 0.27	0.71 ± 0.08	112.9 ± 0.8
Pro ¹⁶⁶	7	154.9 ± 1.2	5.99 ± 0.67	1.17 ± 0.08 ²	113.9 ± 0.7
Ser ¹⁵² Asp ¹⁵⁷ Thr ¹⁵⁸	8	156.1 ± 2.8	4.44 ± 0.27	1.76 ± 0.24 ²	113.0 ± 1.5

¹ s. c. 腫瘍を有するマウスにおいて分析された血漿電解質濃度 (mM) (Pthlh^{Thr}又はPthlh^{Pro}によってトランスフェクトされたNCI-H520細胞、6 × 10⁶細胞/動物 一箇所注射; Pthlh^{SerAspThr}によってトランスフェクトされたNCI-H520細胞、6 × 10⁶細胞/動物、二箇所注射)

対照ヌードマウス4匹における血漿電解質濃度のバックグラウンドは: Na⁺, 136.9 ± 4.4; K⁺, 4.81 ± 0.46; Ca²⁺, 0.86 ± 0.24; Cl⁻, 106.5 ± 5.3。

² P < 0.01 t-検定分析 (t-test analysis) 対Ala¹⁵²Glu¹⁵⁷Asp¹⁵⁸Thr¹⁶⁶ (Pthlh^{Thr}, w. t.)

【0074】

表5の電解質分析により、Pthlh^{Thr}対立遺伝子によってトランスフェクトされたNCI-H520を有するヌードマウスと比べた、Pthlh^{SerAspThr}対立遺伝子によってトランスフェクトされたNCI-H520腫瘍細胞を有するヌードマウスにおける、高カルシウム血レベルが示された (表5、P < 0.0

1 t - 検定分析)。M. スプレタス(spretus)由来のP t h 1 h^{SerAspThr}対立遺伝子は、トランスフェクトされたヒトNCI - H 5 2 0 腫瘍細胞において、癌調節(modifier)効果を示した。癌調節活性は、腫瘍を有するマウスにおける低い生存率と高カルシウム血レベルに関連していた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例2に記載のようなオリゴヌクレオチドとの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション(ASO)による、マウスのP t h 1 h 遺伝子におけるA C 多型の同定を示す。

【図2】 トランスフェクトされていないNCI - H 5 2 0 細胞(対照)の形態と構造(A)、P t h 1 h^{Thr}(w.t.)対立遺伝子によってトランスフェクトされた細胞のもの(B)、P t h 1 h^{Pro}対立遺伝子によってトランスフェクトされた細胞のもの(C)を示す。

【図3】 ノードマウスに接種された、トランスフェクトされていないNCI - H 5 2 0 細胞(対照())、P t h 1 h^{Pro}によってトランスフェクトされたもの()、及びP t h 1 h^{Thr}()によってトランスフェクトされたもののインビトロの腫瘍成長の進行を示す。

【図4】 ウエスタンブロッティング実験を示す。

【図5】 腫瘍を有するノードマウスの生存率のカプランマイヤー(Kaplan-Meier)評価を示すダイアグラムである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Istituto Nazionale per lo Studio e la cura dei Tumori

<120> Polynucleotides encoding for polymorphic isoforms of the PTHrP protein, the encoded proteins and their therapeutic applications thereof

<130> PTHrP polymorphic variants

<140>

<141>

<150> MI2000A001056

<151> 2000-05-12

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223> 1st polymorphic region. The 1st polymorphism relates to the change in the 4th codon (ACN in wild type) to CCN. Any codon is acceptable in 3rd position.

<400> 1

acc tcc agg ccc tcg ctg gag

Thr Ser Arg Pro Ser Leu Glu

1

5

21

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Thr Ser Arg Pro Ser Leu Glu

1

5

<210> 3

<211> 528

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(528)

<223> 1st polymorphic PthTh(pro) variant. Polymorphic nucleotide: C in position 496, determining the

presence of proline in position 166 of the PTHrP precursor.

```

<400> 3
atg ctg cgg agg ctg gtt cag cag tgg agt gtc ctg gta ttc ctg ctc 48
Met Leu Arg Arg Leu Val Gln Gln Trp Ser Val Leu Val Phe Leu Leu
  1                    5                    10                    15

agc tac tcc gtg ccc tcc cgc ggg cgt tcc gtg gag ggg ctt gcc cgc 96
Ser Tyr Ser Val Pro Ser Arg Gly Arg Ser Val Glu Gly Leu Gly Arg
                    20                    25                    30

agg ctc aaa cgc gct gtg tct gaa cat cag cta ctg cat gac aag gcc 144
Arg Leu Lys Arg Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly
                    35                    40                    45

aag tcc atc caa gac ttg cgc cgc cgt ttc ttc ctc cac cat ctg atc 192
Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile
                    50                    55                    60

ggc gag atc cac aca gcc gaa atc aga gct acc tcc gag gtg tcc ccc 240
Ala Glu Ile His Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro
  65                    70                    75                    80

aac tcc aaa cct gct ccc aac acc aaa aac cac ccc gtg cgg ttt ggg 288
Asn Ser Lys Pro Ala Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly
                    85                    90                    95

tca gac gat gag ggc aga tac cta act cag gaa acc aac aag gtg gag 336
Ser Asp Asp Glu Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu
                    100                    105                    110

acg tac aaa gaa cag cca ctc aag aca ccc ggg aag aag aag aaa ggc 384
Thr Tyr Lys Glu Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly
                    115                    120                    125

aag cct ggg aaa cgc aga gaa cag gag aaa aag aag cga agg act cgg 432
Lys Pro Gly Lys Arg Arg Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg
                    130                    135                    140

tct gcc tgg cca agc aca gct gcg agt ggc ctg ctt gag gac ccc ctg 480
Ser Ala Trp Pro Ser Thr Ala Ala Ser Gly Leu Leu Glu Asp Pro Leu
                    145                    150                    155                    160

ccc cac acc tcc agg ccc tcc ctg gag ccc agc tta agg acc cat tga 528
Pro His Thr Ser Arg Pro Ser Leu Glu Pro Ser Leu Arg Thr His
                    165                    170                    175

<210> 4
<211> 175
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Leu Arg Arg Leu Val Gln Gln Trp Ser Val Leu Val Phe Leu Leu
  1                    5                    10                    15

```

Ser Tyr Ser Val Pro Ser Arg Gly Arg Ser Val Glu Gly Leu Gly Arg
 20 25 30
 Arg Leu Lys Arg Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile
 50 55 60
 Ala Glu Ile His Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro
 65 70 75 80
 Asn Ser Lys Pro Ala Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly
 85 90 95
 Ser Asp Asp Glu Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu
 100 105 110
 Thr Tyr Lys Glu Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Gly
 115 120 125
 Lys Pro Gly Lys Arg Arg Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg
 130 135 140
 Ser Ala Trp Pro Ser Thr Ala Ala Ser Gly Leu Leu Glu Asp Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro His Thr Ser Arg Pro Ser Leu Glu Pro Ser Leu Arg Thr His
 165 170 175

<210> 5

<211> 139

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(139)

<223> mature PTHrP - 1st polymorphic variant.
 Polymorphic aminoacid : proline in position 130.

<400> 5

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1 5 10 15
 Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
 20 25 30
 Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro Asn Ser Lys Pro
 35 40 45
 Ala Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly Ser Asp Asp Glu
 50 55 60
 Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu Thr Tyr Lys Glu
 65 70 75 80

<400> 8
 atg ctg cgg agg ctg gtt cag cag tgg agt gtc ctg gta ttc ctg ctc 48
 Met Leu Arg Arg Leu Val Gln Gln Trp Ser Val Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

agc tac tcc gtg ccc tcc cgc ggg cgt tcg gtg gag ggg ctt ggc cgc 96
 Ser Tyr Ser Val Pro Ser Arg Gly Arg Ser Val Glu Gly Leu Gly Arg
 20 25 30

agg ctc aaa cgc gct gtg tct gaa cat cag cta ctg cat gac aag ggc 144
 Arg Leu Lys Arg Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly
 35 40 45

aag tcc atc caa gac ttg cgc cgc cgt ttc ttc ctc cac cat ctg atc 192
 Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile
 50 55 60

ggg gag atc cac aca gcc gaa atc aga gct acc tcg gag gtg tcc ccc 240
 Ala Glu Ile His Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro
 65 70 75 80

aac tcc aaa cct gct ccc aac acc aaa aac cac ccc gtg cgg ttt ggg 288
 Asn Ser Lys Pro Ala Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly
 85 90 95

tca gac gat gag ggc aga tac cta act cag gaa acc aac aag gtg gag 336
 Ser Asp Asp Glu Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu
 100 105 110

acg tac aaa gaa cag cca ctc aag aca ccc ggg aag aag aag aaa ggc 384
 Thr Tyr Lys Glu Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly
 115 120 125

aag cct ggg aaa cgc aga gaa cag gag aaa aag aag cga agg act cgg 432
 Lys Pro Gly Lys Arg Arg Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg
 130 135 140

tct gcc tgg cca agc aca gct tcg agt ggc ctg ctt gat tac ccc ctg 480
 Ser Ala Trp Pro Ser Thr Ala Ser Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Pro Leu
 145 150 155 160

ccc cac acc tcc agg acc tcg ctg gag ccc agc tta agg acg cat tga 528
 Pro His Thr Ser Arg Thr Ser Leu Glu Pro Ser Leu Arg Thr His
 165 170 175

<210> 9
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Mus spretus

<400> 9
 Met Leu Arg Arg Leu Val Gln Gln Trp Ser Val Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Ser Val Pro Ser Arg Gly Arg Ser Val Glu Gly Leu Gly Arg
 20 25 30

Arg Leu Lys Arg Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly
 35 40 45

Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile
 50 55 60

Ala Glu Ile His Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro
 65 70 75 80

Asn Ser Lys Pro Ala Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly
 85 90 95

Ser Asp Asp Glu Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu
 100 105 110

Thr Tyr Lys Glu Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly
 115 120 125

Lys Pro Gly Lys Arg Arg Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg
 130 135 140

Ser Ala Trp Pro Ser Thr Ala Ser Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Pro Leu
 145 150 155 160

Pro His Thr Ser Arg Thr Ser Leu Glu Pro Ser Leu Arg Thr His
 165 170 175

<210> 10

<211> 139

<212> FRT

<213> Mus spretus

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(139)

<223> mature PTHrP - 2nd polymorphic variant.

Polymorphic aminoacids: Ser in position 116, Asp
 in pos. 121, Tyr in pos. 122

<400> 10

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
 20 25 30

Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro Asn Ser Lys Pro
 35 40 45

Ala Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly Ser Asp Asp Glu
 50 55 60

Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu Thr Tyr Lys Glu
 65 70 75 80

Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly Lys Pro Gly Lys
 85 90 95

Arg Arg Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp Pro
 100 105 110

Ser Thr Ala Ser Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Pro Leu Pro His Thr Ser
 115 120 125

Arg Thr Ser Leu Glu Pro Ser Leu Arg Thr His
 130 135

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11
 acaaagaaca gccactcaa 19

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12
 acagtacctt aagctgggc 19

<210> 13
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13
 agcgaggctc tggag 15

<210> 14
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14
 ctccaggccc tcgct 15

<210> 15

<211> 19
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15
tcagcagcac caagataca 19

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

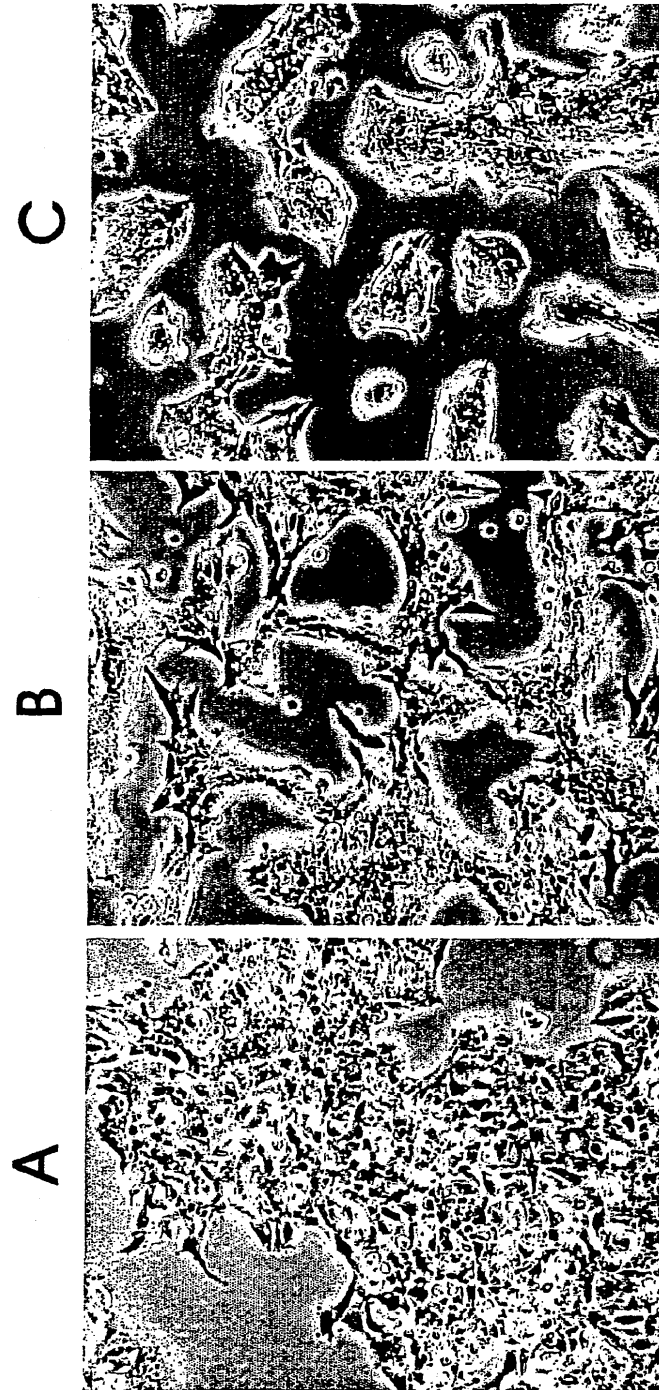
<400> 16
ctgattocta cacaagtcc 19

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Mus musculus

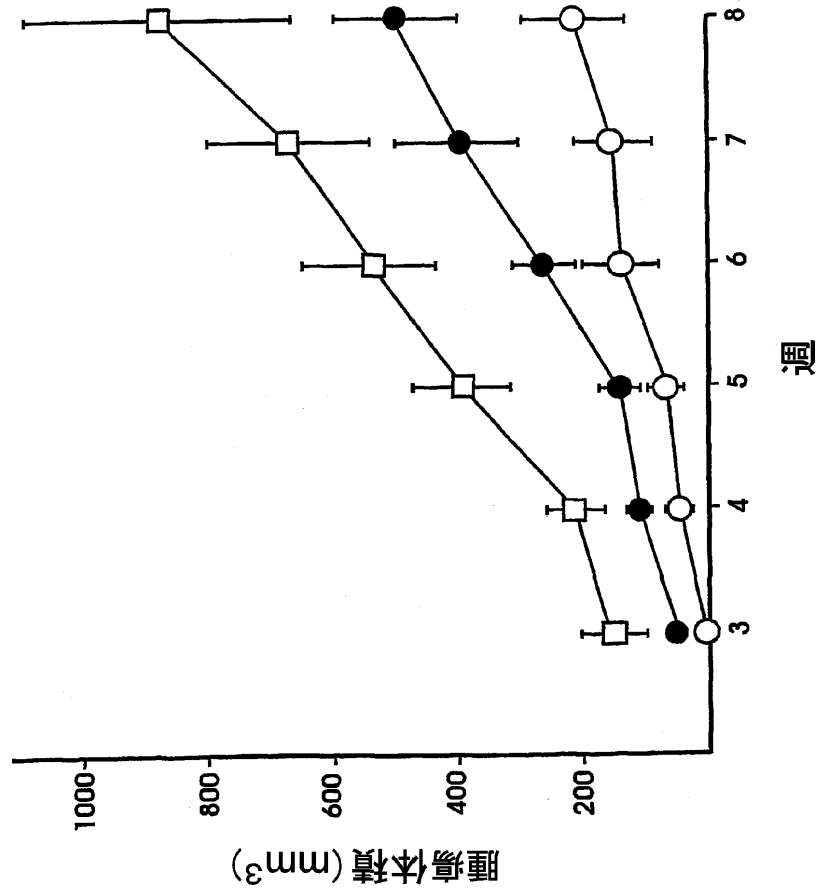
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17
aaatcctgta acgtgtcc 18

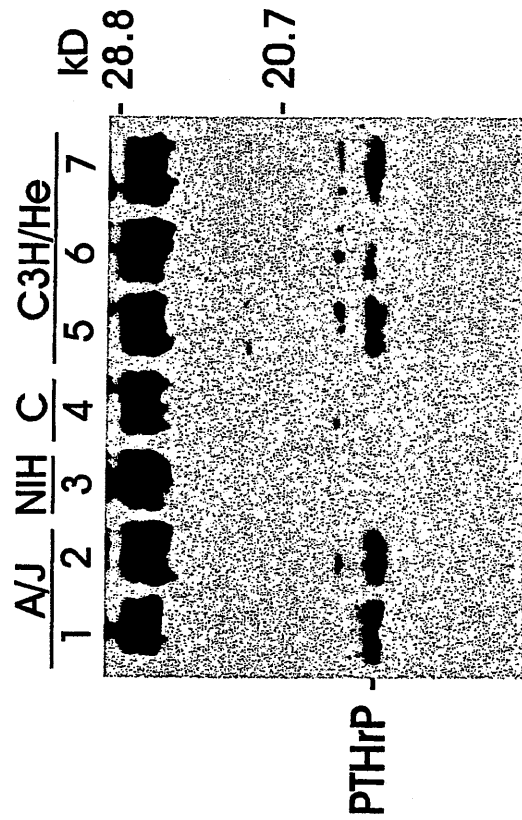
【图2】



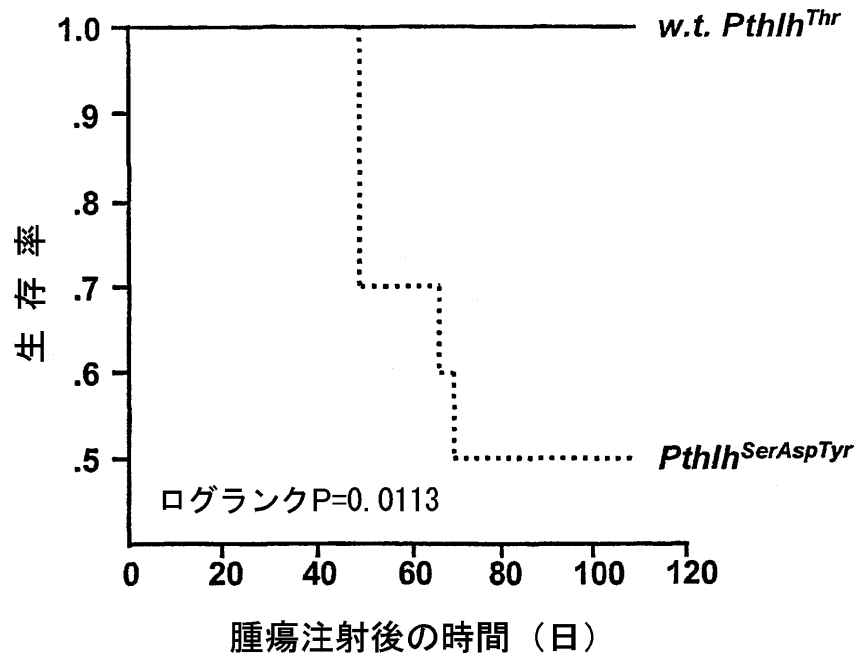
【圖3】



【図4】



【図5】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成14年8月1日(2002.8.1)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 配列番号2に相当する多型ドメインTSXPSEを含む多型PTHrP(副甲状腺関連蛋白質)又はその変異体のフラグメントをコードするポリヌクレオチド。

【**請求項2**】 配列番号3の496位に相当する多型ヌクレオチドを含む請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項3**】 前記多型ドメインが、オステオスタチンをコードする領域内に含まれる、請求項1-2に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項4**】 前記多型ヌクレオチドが、C(シトシン)であり、かつ前記ポリヌクレオチドが、配列番号2に相当する多型ドメインを含む多型PTHrP又はそのフラグメントをコードする、請求項1-3に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項5**】 多型ヌクレオチドが、CCT、CCC、CCA、及びCCGからなる群から選択されるコドン中に含まれ、かつ配列番号2の多型プロリンをコードする、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項6**】 配列番号3に相当するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【**請求項7**】 配列番号5の蛋白質又は配列番号2のドメインを含むそのフラグメントをコードする請求項1-6に記載のポリヌクレオチド。

【**請求項8**】 多型ドメインASSGLLYP(配列番号7)を含む多型PTHrP又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド。

【**請求項9**】 配列番号8の454位、471位、及び472位に相当する多型ヌクレオチドを含む請求項8に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】 前記多型ドメインが、オステオスタチンをコードする領域内に含まれる、請求項8-9に記載のポリヌクレオチド。

【請求項11】 前記ポリヌクレオチドが、多型ヌクレオチドを含み、かつ配列番号7に相当するドメインを含む多型PTHrP又はそのフラグメントをコードする、請求項9-10に記載のポリヌクレオチド。

【請求項12】 配列番号8に相当するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項13】 配列番号10の成熟蛋白質又はその一部をコードする、配列番号7のドメインを含む請求項8-12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項14】 多型PTHrP又はそのフラグメントをコードする、配列番号2の多型ドメインTSXPSE及び配列番号7の多型ドメインASSGLLDYPを含むポリヌクレオチド。

【請求項15】 配列番号2のドメインを含む多型PTHrP又はそのフラグメントをコードするPthlh遺伝子の対立遺伝子変異体。

【請求項16】 配列番号4又は配列番号5又は多型オステオスタチンに相当する蛋白質をコードする請求項15に記載の対立遺伝子変異体。

【請求項17】 配列番号3の496位に相当する多型塩基を含む対立遺伝子変異体。

【請求項18】 配列番号3に相当する対立遺伝子変異体。

【請求項19】 配列番号7に相当するドメインを含む多型PTHrP又はそのフラグメントをコードするPthlh遺伝子の対立遺伝子変異体。

【請求項20】 配列番号9又は配列番号10の蛋白質をコードするか、又は多型オステオスタチンをコードする、請求項19に記載の対立遺伝子変異体。

【請求項21】 配列番号8の454位、471位、472位に相当する多型塩基を含む対立遺伝子変異体。

【請求項22】 配列番号8の配列を含む対立遺伝子変異体。

【請求項23】 請求項17に記載の、及び請求項21に記載の対立遺伝子変異体を含む対立遺伝子変異体。

【請求項24】 動物又はヒトから単離されることを特徴とする請求項1-14

に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-23に記載の対立遺伝子変異体。

【請求項25】 前記動物が哺乳動物である、請求項24に記載されたポリヌクレオチド又は変異体。

【請求項26】 前記哺乳動物がマウスである、請求項24に記載されたポリヌクレオチド又は変異体。

【請求項27】 配列番号2の多型ドメインを含む多型PTHrP又はそのフラグメント。

【請求項28】 多型アミノ酸が、何らかの疎水性アミノ酸である、請求項27に記載の蛋白質又はフラグメント。

【請求項29】 前記多型アミノ酸がプロリンである、請求項27-28に記載の蛋白質又はフラグメント。

【請求項30】 前記フラグメントがオステオスタチンである、請求項27-29に記載の蛋白質又はフラグメント。

【請求項31】 配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号10からなる群から選択される少なくとも1つの配列を含む蛋白質又はフラグメント。

【請求項32】 前記フラグメントがオステオスタチンである、請求項31に記載の蛋白質。

【請求項33】 配列番号2の多型ドメイン及び配列番号7の多型ドメインを含む多型PTHrP又はそのフラグメント。

【請求項34】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチドにおける、又は請求項15-23に記載の対立遺伝子変異体若しくはそれらの相補性鎖における多型ドメインのハイブリダイゼーションを特異的に認識し得るオリゴヌクレオチド。

【請求項35】 配列番号2のドメイン及び/または配列番号7のドメインを含むペプチドをコードする多型Pthlh遺伝子の存在を決定するためのプローブとしての、請求項34に記載されたオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項36】 動物又はヒト検体における、配列番号2のドメイン及び/若しくは配列番号7のドメインを含む多型PTHrP又はそのフラグメントをコードするPthlh遺伝子の多型の同定方法であって、

- 検体から生物学的試料を得て、
- 試料を分析して前記多型 P t h l h 対立遺伝子変異体を同定する段階を含む方法。

【請求項37】 ポリヌクレオチド若しくは核酸配列、又は配列番号2に相当する多型ドメイン及び/若しくは配列番号7に相当するドメインを含む P T H r P 蛋白質若しくはそのフラグメントの同定及び/又は決定するためのキットであって、

(a) 少なくとも1つの前記多型ドメインを含む多型 P T H r P 蛋白質又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドの領域の増幅のためのプライマーを含む第一容器；及び

(b) 少なくとも1つの前記多型を決定するためのオリゴヌクレオチドプライマーを含む第二容器を含むキット。

【請求項38】 腫瘍及び/若しくは悪性カルシウム過剰血の進行の素質、並びに/又はそれらの予後の評価のインビトロ診断のための方法であって、動物又はヒト検体における、前記腫瘍又はカルシウム過剰血と関連する、請求項15-23に規定された P t h l h 対立遺伝子変異体の有無の同定を含む方法。

【請求項39】 腫瘍及び/若しくは悪性カルシウム過剰血の進行の素質、並びに/又はそれらの予後の評価のインビトロ診断のための方法であって、動物又はヒト検体における、前記腫瘍又はカルシウム過剰血と関連する、請求項27-33に規定された P T H r P 蛋白質又はそのフラグメントの有無の同定を含む方法。

【請求項40】 前記腫瘍が、皮膚癌又は肺癌である、請求項38-39に記載の方法。

【請求項41】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-23に記載の変異体との、動物又はヒト細胞のトランスフェクション、及び前記細胞の培養中の成長のための方法。

【請求項42】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-23に記載の変異体との、ヒト以外の動物の胚幹細胞のトランスフェクション、及び前記細胞の移植のための方法。

【請求項43】 前記細胞が、組織特異的プロモーターの導入によってトランスフェクトされる、請求項41-42に記載されたような方法。

【請求項44】 請求項1-14に記載されたポリヌクレオチド又は請求項15-23に記載された変異体によって遺伝的に形質転換された、単離された動物又はヒト細胞。

【請求項45】 請求項1-14に記載のポリヌクレオチド又は請求項15-23に記載された対立遺伝子変異体とトランスフェクトされた、単離されたヒト以外の動物の胚幹細胞。

【請求項46】 組織特異的プロモーターによって更に修飾されることを特徴とする請求項44-45に記載された細胞培養物又は単離された細胞。

【請求項47】 請求項1-14に記載されたポリヌクレオチド又は請求項15-23に記載された遺伝子の対立遺伝子変異体の挿入によって修飾されたヒト以外の形質転換動物の調製方法。

【請求項48】 前記ヒト以外の形質転換動物が、組織特異的プロモーターによって修飾され、かつ配列番号2及び/または配列番号7のドメインを含むペプチドをコードするP t h 1 h 遺伝子を特異的組織中で発現する、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 前記動物の幹細胞をトランスフェクトする段階を含み、かつ前記遺伝子、対立遺伝子又はポリヌクレオチドが、成長した動物中で活性化される、請求項48に記載のヒト以外の動物の調製方法。

【請求項50】 請求項48-49に記載された方法によって得られるヒト以外の形質転換動物。

【請求項51】 ノックインアニマルであることを特徴とする請求項49の方法によって得られる動物。

【請求項52】 多型P t h 1 h 遺伝子又は配列番号2及び/若しくは配列番号7の多型ドメインを含むペプチドをコードするDNA配列を特異的に遮断し、かつ不活性化するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド(ただし、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下の配列: 5' T G A A C C A G C G A C C G C A A G C A Aを有さない)。

【請求項53】 治療に役立つものとして使用するための請求項34及び52に記載されたオリゴヌクレオチド。

【請求項54】 抗腫瘍薬剤の調製のための請求項53に記載されたオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項55】 悪性カルシウム過剰血の治療のための薬剤の調製のための請求項53に記載されたオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項56】 多型PTHrP又はそのフラグメントを特異的に遮断し、かつ不活性化するための、配列番号2及び/または配列番号7の多型ドメインを含む抗体又はペプチドフラグメント。

【請求項57】 前記多型フラグメントがオステオスタチンである、請求項56に記載の抗体又はペプチドフラグメント。

【請求項58】 治療に役立つものとして使用するための請求項56に記載の抗体又はペプチドフラグメント。

【請求項59】 抗腫瘍薬剤の調製のための請求項58に記載の抗体又はペプチドフラグメントの使用。

【請求項60】 悪性カルシウム過剰血の治療のための薬剤の調製のための請求項58に記載の抗体又はペプチドフラグメントの使用。

【請求項61】 請求項52-53に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び/または請求項56-58に記載の抗体若しくはペプチド、及び少なくとも1つの許容され得る薬学的添加剤を含む薬学的組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PC1/EP 01/05413
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/635 C12N15/11 C12Q1/68 C12N15/B7 C12N5/10 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKEUCHI S ET AL: "Molecular cloning of the chicken melanocortin 2 (ACTH)-receptor gene" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 1403, no. 1, 27 May 1998 (1998-05-27), pages 102-108, XP004277793 ISSN: 0167-4889 figure 2	1,2,26,33
X	WO 97 04312 A (ICN PHARMACEUTICALS) 6 February 1997 (1997-02-06) the whole document	58-63
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 November 2001		Date of mailing of the international search report 18/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Armando Ia, E

2

Form PGT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/05413

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KANJI S ET AL: "PASSIVE IMMUNIZATION WITH ANTI-PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN MONOCLONAL ANTIBODY MARKEDLY PROLONGS SURVIVAL TIME OF HYPERCALCEMIC NUDE MICE BEARING TRANSPLANTED HUMAN PTHRP-PRODUCING TUMORS"</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS + INDEXES, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 8, no. 7, 1994, pages 849-860, XP002916419 ISSN: 0009-2258 the whole document</p>	58-63
X	<p>BOUIZAR Z ET AL: "POLYMERASE CHAIN REACTION ANALYSIS OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN GENE EXPRESSION IN BREAST CANCER PATIENTS AND OCCURRENCE OF BONE METASTASES"</p> <p>CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 53, 1 November 1993 (1993-11-01), pages 5076-5078, XP002051653 ISSN: 0008-5472</p>	36,37
Y	<p>page 5076, right-hand column, paragraph 3</p>	40,41
X	<p>SUVA ET AL: "A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: Cloning and expression"</p> <p>SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 237, no. 21, 21 August 1987 (1987-08-21), pages 893-896, XP002124870 ISSN: 0036-8075</p>	36,37
Y	<p>page 896, left-hand column, paragraph 13</p>	40,41
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Acc. Nr. AW540230, 10 March 2000 (2000-03-10) TANAKA T.S. ET AL.: "C0130B06-3 Mouse E7.5 Extraembryonic Portion cDNA Library Mus musculus cDNA clone C0130B06 3', mRNA sequence." XP002182610 the whole document</p>	1-5,7, 15,17, 26-28,54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 01/05413

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Acc. Nr. AW538757, 10 March 2000 (2000-03-10) TANAKA T.S. ET AL.: "C0111D11-3 Mouse E7.5 Extraembryonic Portion cDNA Library Mus musculus cDNA clone C0111D11 3', mRNA sequence." XP002182611 the whole document	1-5,7, 15,17, 26-28,54
X	AKINO K. ET AL.: "Antisense inhibition of parathyroid hormone-related peptide gene expression reduces malignant pituitary tumor progression and metastases in the rat." CANCER RES. , vol. 56, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 77-86, XP001018866 the whole document	36,37, 54-57,63
X	SATO K ET AL.: "Passive immunization with anti-parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody markedly prolongs survival time of hypercalcemic nude mice bearing transplanted human PTHrP-producing tumors." J. BONE MIN. RES. , vol. 8, no. 7, July 1993 (1993-07), pages 849-860, XP001022517 the whole document	58-63
P,X	MANENTI G. ET AL.: "A cancer modifier role for parathyroid hormone-related protein." ONCOGENE, vol. 19, 9 November 2000 (2000-11-09), pages 5324-5328, XP001022504 the whole document	1-7, 15-19, 26-34, 36-43,46
A	MENENTI G. ET AL.: "Predisposition to lung tumorigenesis" TOXICOL. LETTERS, vol. 112-113, 15 March 2000 (2000-03-15), pages 257-263, XP001022350	
A	STREWLER G J: "THE PHYSIOLOGY OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US, vol. 342, no. 3, 20 January 2000 (2000-01-20), pages 177-185, XP001033728 ISSN: 0028-4793	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/05413

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MANENTI G. ET AL.: "Association of chromosome 12p genetic polymorphism with lung adenocarcinoma risk and prognosis." CARCINOGENESIS, vol. 18, no. 10, 1997, pages 1917-1920, XP001037562 -----	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 36, 37, 58-63 (all partially)

Present claims 36, 37, 38-63 relate to an extremely large number of possible compounds (oligonucleotides and peptide fragments which are not characterized by structural features). Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the antibodies blocking or inactivating PTHrP.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/05413

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9704312	A	06-02-1997	
		AU 6172196 A	18-02-1997
		EP 0871883 A1	21-10-1998
		JP 2000513201 T	10-10-2000
		WO 9704312 A1	06-02-1997

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	3/14	A 6 1 P	35/00	
	5/18	C 0 7 K	14/635	
	35/00		16/26	
C 0 7 K	14/635	C 1 2 Q	1/68	A
	16/26	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 Q	1/68		33/566	
G 0 1 N	33/53		33/574	Z
	33/566	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/574	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F
 , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,
 M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G
 M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z
 , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z ,
 M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M ,
 A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B
 Z , C A , C H , C N , C O , C R , C U , C Z , D E
 , D K , D M , D Z , E C , E E , E S , F I , G B ,
 G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I
 N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C
 , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D ,
 M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P
 L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K
 , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G ,
 U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 マネンティ ジャコモ
 イタリア イ - 25038 ロヴァト ヴィア
 ルドーネ 1

F タ-ム (参考) 4B024 AA01 AA11 BA01 CA03 CA06
 DA02 DA03 EA04 FA02 GA11
 HA12 HA17
 4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ45 QR08
 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
 4C084 AA01 AA13 DB32 NA14 ZB26
 ZC06
 4C085 AA13 CC21
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
 DA30 DA75 EA28 FA72 FA74

专利名称(译)	编码多态性同种型PTHrP蛋白的多核苷酸，编码的蛋白质及其治疗应用		
公开(公告)号	JP2003532407A	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	JP2001582383	申请日	2001-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	主席发球台到国立碳粉莱斯佩尔损失对音频鳃类日常森		
申请(专利权)人(译)	Isutituto佩尔国立俄罗斯工作室è拉班代Tumori		
[标]发明人	ドラガーニトマーゾア マネンティジャコモ		
发明人	ドラガーニトマーゾア マネンティ ジャコモ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/14 A61P5/18 A61P35/00 C07K14/635 C07K16/26 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/635 A01K2217/05 A61K39/00 A61K48/00		
FI分类号	A01K67/027 A61K39/395.D A61K48/00 A61P3/14 A61P5/18 A61P35/00 C07K14/635 C07K16/26 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.Z C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/CA03 4B024/CA06 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ45 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA13 4C084/DB32 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZC06 4C085/AA13 4C085/CC21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	102000900845244 2000-05-12 IT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了PTHrP蛋白，编码PTHrP蛋白的基因的两个等位基因变体，等位基因蛋白的两个等位基因变体，其包含对应于SEQ ID NO：2的多态性结构域和第一个多态性位置 第一多核苷酸包含第二多态结构域，并且是对应于SEQ ID NO：7的第二多核苷酸的两个多态同种型的鉴定，动物和人以及基因修饰的细胞和 还描述了使用这些基因，等位基因或多核苷酸确定非人类动物的肿瘤风险。

3種同系マウスにおけるヌクレオチド多型の分析

系統	496番ヌクレオチド
A/J 及び Balb/cJ	A
C3H/HeJ	C