

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5122713号  
(P5122713)

(45) 発行日 平成25年1月16日(2013.1.16)

(24) 登録日 平成24年11月2日(2012.11.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 Q 1/68 A

G 01 N 33/574 (2006.01)

G 01 N 33/574 A

請求項の数 33 (全 80 頁)

(21) 出願番号 特願2001-570846 (P2001-570846)  
 (86) (22) 出願日 平成13年3月27日 (2001.3.27)  
 (65) 公表番号 特表2003-532389 (P2003-532389A)  
 (43) 公表日 平成15年11月5日 (2003.11.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/009918  
 (87) 国際公開番号 WO2001/073133  
 (87) 国際公開日 平成13年10月4日 (2001.10.4)  
 審査請求日 平成20年3月27日 (2008.3.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/192,229  
 (32) 優先日 平成12年3月27日 (2000.3.27)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 301055505  
 トマス ジェファーソン ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア 191  
 07-6799, フィラデルフィア、ロー  
 カスト ストリート 1020  
 (74) 代理人 100089705  
 弁理士 社本 一夫  
 (74) 代理人 100076691  
 弁理士 増井 忠式  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100080137  
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌細胞を同定およびターゲティングするための組成物および方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

転移性結腸直腸癌細胞あるいは原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞について個体をスクリーニングするインピトロ方法であって、個体からの腸外組織および/または体液の試料を検査して、該試料中の細胞が CDX 2 を発現しているか判定する工程を含み、その際、CDX 2 の発現は試料中に転移性結腸直腸癌細胞あるいは原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞がある可能性を指示するものである方法。

## 【請求項 2】

細胞による CDX 2 の発現を、遺伝子転写生成物の存在を検出することにより判定する、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

細胞による CDX 2 の発現を、試料と遺伝子転写体またはそれから形成された cDNA を選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

細胞による CDX 2 の発現を、試料と CDX 2 遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

試料が体液である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

20

試料が血液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

試料がリンパ組織および／またはリンパ液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

試料がリンパ節試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

個体が結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと以前に診断されたことがある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

個体が結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと以前に診断され、かつそれに対する処置を受けたことがある、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 11】

転移性結腸直腸癌細胞あるいは原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞について個体をスクリーニングするインビトロ方法であって、個体からの腸外組織および／または体液の試料を検査して、該試料中に C D X 2 遺伝子転写または翻訳生成物が存在するか判定する工程を含み、その際、該試料中の C D X 2 遺伝子転写または翻訳生成物の存在はその個体が試料中に

転移性結腸直腸癌細胞あるいは原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞を有する可能性を指示するものである方法。

【請求項 12】

個体からの腸外組織および／または体液の試料を検査して、該試料中に C D X 2 遺伝子転写生成物が存在するか判定する工程を含む、請求項 1 1 に記載の方法。 20

【請求項 13】

C D X 2 遺伝子転写生成物の存在を、試料と C D X 2 遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A を選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

C D X 2 遺伝子翻訳生成物の存在を、試料と C D X 2 遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 15】

試料が体液である、請求項 1 1 に記載の方法。 30

【請求項 16】

試料が血液である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 17】

試料がリンパ組織および／またはリンパ液である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 18】

試料がリンパ節試料である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 19】

個体が結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと以前に診断されたことがある、請求項 1 1 に記載の方法。 40

【請求項 20】

個体が結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと以前に診断され、かつそれに対する処置を受けたことがある、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 21】

結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞を有する疑いがある患者から採取した腫瘍細胞が結腸直腸、胃または食道の腫瘍細胞であることを確認するインビトロ方法であって、腫瘍細胞が C D X 2 を発現するか判定する工程を含み、その際、C D X 2 の発現は該腫瘍細胞が胃または食道の腫瘍細胞であることを指示するものである方法。

【請求項 22】

腫瘍細胞による C D X 2 の発現を、C D X 2 の遺伝子転写生成物の存在の検出により判 50

定する、請求項 2 1 に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

腫瘍細胞による C D X 2 の発現を、腫瘍細胞からの m R N A またはそれから形成された c D N A と C D X 2 遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A を選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項 2 1 に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

腫瘍細胞による C D X 2 の発現を、腫瘍細胞からのタンパク質と C D X 2 遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項 2 1 に記載の方法。

10

**【請求項 2 5】**

個体において胃組織の試料における C D X 2 転写体または翻訳生成物の存在を検出する方法であって、胃組織の試料を検査して C D X 2 転写体または翻訳生成物の存在を検出する工程を含み、その際、胃試料中における C D X 2 転写体または翻訳生成物の存在は胃癌を指示するものである方法。

**【請求項 2 6】**

胃組織の試料を検査して該試料中に C D X 2 遺伝子転写生成物が存在するか判定する工程を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

C D X 2 遺伝子転写生成物の存在を、試料と C D X 2 遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A を選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項 2 6 に記載の方法。

20

**【請求項 2 8】**

C D X 2 遺伝子翻訳生成物の存在を、試料と C D X 2 遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項 2 6 に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

個体において食道組織の試料における C D X 2 転写体または翻訳生成物の存在を検出する方法であって、食道組織の試料を検査して C D X 2 転写体または翻訳生成物の存在を検出する工程を含み、その際、食道試料中における C D X 2 転写体または翻訳生成物の存在は食道癌を指示するものである方法。

30

**【請求項 3 0】**

食道組織の試料を検査して該試料中に C D X 2 遺伝子転写生成物が存在するか判定する工程を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

C D X 2 遺伝子転写生成物の存在を、試料と C D X 2 遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A を選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項 3 0 に記載の方法。

**【請求項 3 2】**

C D X 2 遺伝子翻訳生成物の存在を、試料と C D X 2 遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項 2 9 に記載の方法。

40

**【請求項 3 3】**

結腸直腸癌、胃癌および / または食道癌を伴う個体を診断するための、下記のいずれかを含むキット：

a ) C D X 2 遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A を選択的に増幅するポリメラーゼ連鎖反応プライマーを含む容器；

ならびに下記のうち 1 又はそれより多く：

陽性 P C R アッセイ対照試料を含む容器、

陰性 P C R アッセイ対照試料を含む容器、

試料を入手および / または処理するための指示書、

P C R 診断アッセイを実施するための指示書、ならびに

50

P C R 診断アッセイの陽性結果および / または陰性結果を表わす写真または図 ; あるいは

b ) C D X 2 遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体を含む容器 ;

ならびに下記のうち 1 又はそれより多く :

陽性免疫アッセイ対照試料を含む容器、

陰性免疫アッセイ対照試料を含む容器、

試料入手および / または処理するための指示書、

免疫診断アッセイを実施するための指示書、ならびに

免疫診断アッセイの陽性結果および / または陰性結果を表わす写真または図。

#### 【発明の詳細な説明】

10

#### 【0001】

##### 発明の分野

本発明は、消化管の癌細胞、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌ならびに転移性結腸直腸癌を検出するためのインビトロ診断方法、ならびにそのような方法を実施するためのキットおよび試薬に関する。本発明は、消化管由来の腫瘍、特に原発性および転移性の胃および食道の腫瘍ならびに転移性結腸直腸腫瘍のインビオイメージングおよび処置のための化合物および方法に関する。本発明は、ターゲティングした遺伝子療法組成物、アンチセンス組成物および薬物組成物、それらを調製および使用するための方法および組成物に関する。本発明は、消化管の癌細胞、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌ならびに転移性結腸直腸癌に対する予防用および治療用ワクチン、ならびにそれらを調製および使用するための組成物および方法に関する。

20

#### 【0002】

##### 発明の背景

本出願は、米国仮特許出願 60/192,229 (2000 年 3 月 27 日出願) (それを本明細書に援用する) の優先権を主張する。

#### 【0003】

本出願は、米国特許 U S P 5,518,888 (1996 年 5 月 21 日発行)、U S P 5,601,990 (1997 年 2 月 11 日発行)、U S P 6,060,037 (2000 年 4 月 26 日発行)、U S P 5,962,220 (1999 年 10 月 5 日発行) および U S P 5,879,656 (1999 年 3 月 9 日発行) (それらを本明細書に援用する)、ならびに米国特許出願 09/180,237 (1997 年 3 月 12 日出願) (それを本明細書に援用する) の優先権を主張する。

30

#### 【0004】

消化管由来の癌、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌ならびに転移性結腸直腸癌を伴う個体をスクリーニング、診断およびモニターするための試薬、キットおよび方法が求められている。由来の分からぬ癌が消化管由来であることを同定および確認するための、また組織および癌試料を分析して消化管由来の癌を同定および確認し、かつそのような癌細胞の転移レベルを判定するための試薬、キットおよび方法が求められている。結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞を特異的にターゲティングしうる組成物が求められている。結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞に特異的に結合しうるイメージング剤が求められている。結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞をイメージングするための改良法が求められている。結腸直腸、胃癌および食道癌の細胞に特異的に結合しうる療法薬が求められている。原発性および / または転移性の胃癌または食道癌あるいは転移性結腸直腸癌に罹患している疑いがある個体を治療するための改良法が求められている。結腸直腸癌、胃癌および食道癌を処置するためのワクチン組成物が求められている。結腸直腸癌、胃癌および食道癌を治療および予防するためのワクチン組成物が求められている。結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞へ療法薬、アンチセンス化合物および他の薬物を特異的に運搬しうる療法薬が求められている。

40

#### 【0005】

##### 発明の概要

50

本発明はさらに、個体が消化管由来の癌、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌ならびに転移性結腸直腸癌を伴うか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。本発明は、個体からの非結腸直腸組織および体液の試料を検査して、結腸以外の試料中の細胞が S I、C D X 1 または C D X 2 のうち 1 又はそれより多く（それぞれ、正常な結腸細胞、ならびに結腸直腸、胃および食道の腫瘍細胞が発現する）を発現しているか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。結腸直腸管の外側の試料中に S I、C D X 1 もしくは C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くまたは S I、C D X 1 もしくは C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くが存在することは、S I、C D X 1 または C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの発現の指標であり、かつその個体が転移性の結腸癌（colon cancer）あるいは原発性または転移性の胃癌および／または食道癌に罹患している可能性がある証拠である。10 結腸直腸癌に罹患している疑いがある患者において結腸直腸管の外側の試料中に S I、C D X 1 もしくは C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くまたは S I、C D X 1 もしくは C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くが存在することは、その個体が転移性結腸直腸癌に罹患しているという結論を支持する。転移性結腸直腸癌の診断を下すかまたは確認することができる。胃癌または食道癌に罹患している疑いがある患者において結腸直腸管の外側の試料中に S I、C D X 1 もしくは C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くまたは S I、C D X 1 もしくは C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くが存在することは、その個体が原発性および／または転移性の胃癌または食道癌に罹患しているという結論を支持する。原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の診断を下すかまたは確認することができる。20

#### 【0006】

本発明はさらに、腫瘍細胞が結腸直腸、胃または食道に由来するか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。本発明は、癌に罹患している個体が結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患しているか否かを診断するためのインビトロ方法に関する。本発明は、個体からの腫瘍試料を検査して、結腸直腸、胃または食道の腫瘍細胞が発現する S I、C D X 1 または C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くをその腫瘍細胞が発現しているか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。患者から得た試料中に S I、C D X 1 もしくは C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くまたは S I、C D X 1 もしくは C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くが存在することは、S I、C D X 1 または C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多く発現の指標であり、かつその個体が結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患している可能性がある証拠である。30 結腸直腸、胃または食道の腫瘍である疑いがある腫瘍において、S I、C D X 1 もしくは C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くまたは S I、C D X 1 もしくは C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くが存在することは、それらの腫瘍が結腸直腸癌、胃癌または食道癌であるという結論、および結腸直腸癌、胃癌または食道癌の診断を支持する。

#### 【0007】

本発明はさらに、本発明方法を実施するためのインビトロキット、ならびにそのような本発明のインビトロキットにおける構成要素として有用な試薬および組成物に関する。

#### 【0008】

本発明はさらに、原発性および転移性の胃および食道の腫瘍ならびに転移性結腸直腸腫瘍のイメージング方法、ならびに原発性および転移性の胃および食道の腫瘍ならびに転移性結腸直腸腫瘍に罹患している疑いがある個体の処置方法であって、その個体に本発明による医薬組成物を投与する工程を含み、その際、組成物またはコンジュゲート化合物が原発性および／または転移性の胃または食道の腫瘍ならびに転移性結腸直腸腫瘍癌に罹患しているヒトの療法用または診断用として有効な量で存在する方法に関する。40

#### 【0009】

本発明はさらに、原発性および転移性の胃および食道の腫瘍細胞ならびに転移性結腸直腸腫瘍細胞へ有効物質を運搬する方法であって、原発性および／または転移性の胃または食道の腫瘍あるいは転移性結腸直腸癌を伴う個体に、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤、および表面に S I リガンドを含むリポソームおよびそれに封入された有効成分を50

含む非コンジュゲート組成物を含む医薬組成物を投与する工程を含む方法に関する。

【0010】

本発明はさらに、S I、C D X 1 または C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くの少なくとも 1 つのエピトープを含むタンパク質を含む死滅または不活化した結腸直腸、胃または食道の腫瘍細胞；およびそれを含むワクチンに関する。ある態様において、死滅または不活化した細胞または粒子は、S I、C D X 1 または C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くを含む。ある態様において、死滅または不活化した細胞または粒子は、八プテン化されている。

【0011】

本発明はさらに、結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患している個体の処置方法、および結腸直腸癌、胃癌または食道癌を発症しやすい個体の処置方法に関する。本発明方法は、そのような個体に有効量のそのようなワクチンを投与することを提供する。本発明はさらに、そのようなワクチンを免疫療法薬として利用することに関する。

10

【0012】

本発明は、転移性癌の診断に有用な組織特異的分子マーカーを単離するための方法に関する。本発明の 1 態様は、起源組織から到達組織 (destination tissue) または体液へ転移した腫瘍細胞の検出に有用な分子マーカーを同定する方法である。本方法は下記の工程を含む：起源組織細胞集団において、起源組織の最終分化 (terminal differentiation) に関連する転写因子の活性をダウンレギュレートし；ダウンレギュレートされた起源細胞集団の発現プロフィールを、対照の起源細胞集団の発現プロフィールと比較し；対照の起源細胞集団において発現しているがダウンレギュレートされた起源細胞集団においては発現していない候補マーカーを同定し；そして対照の起源細胞集団、癌の起源細胞集団、および到達細胞集団における候補マーカーの発現を比較し、その際、対照の起源細胞集団および癌の起源細胞集団において発現しているが到達細胞集団においては発現していない候補マーカーは、起源組織から到達組織へ転移した癌の検出のための有用なマーカーである。本方法は、分子マーカーを単離する追加工程を含むことができる。本方法は、起源組織の最終分化に関連する遺伝子の調節領域に結合する転写因子を同定する追加工程を含むこともできる。

20

【0013】

好みしい態様の説明

30

定義

本明細書中で用いる用語 "S I" は、正常な結腸直腸細胞、ならびに原発性および転移性の結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞が発現する細胞タンパク質であって、スクラーゼ-イソマルターゼとしても知られるタンパク質を表わすものとする。

【0014】

本明細書中で用いる用語 "C D X 1" は、正常な結腸直腸細胞、ならびに原発性および転移性の結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞が発現する細胞タンパク質 C D X 1 を表わすものとする。

【0015】

本明細書中で用いる用語 "C D X 2" は、正常な結腸直腸細胞、ならびに原発性および転移性の結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞が発現する細胞タンパク質 C D X 2 を表わすものとする。

40

【0016】

本明細書中で、用語 "S I、C D X 1 または C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くの機能性フラグメント" 中に用いる用語 "機能性フラグメント" は、全長配列をもつ核酸分子と関連した機能をもつ S I、C D X 1 または C D X 2 遺伝子転写体フラグメントを表わすものとする。たとえば、機能性フラグメントはオリゴヌクレオチドもしくは核酸プローブ、プライマー、アンチセンスオリゴヌクレオチドもしくは核酸分子、またはコード配列として使用できる。

【0017】

50

ヒトS Iタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、Chantret, I., et al., Ann. Hum. Genet., 52 (Pt 1), 57-61 (1988)およびGenBank寄託No. NM001041に示されている；それら両者を本明細書に援用する。

【0018】

CDX1タンパク質のアミノ酸配列およびCDX1遺伝子転写体のヌクレオチド配列は、GenBank寄託No. XM003791に示されている；これを本明細書に援用する。

【0019】

CDX2タンパク質のアミノ酸配列およびCDX2遺伝子転写体のヌクレオチド配列は、Mallio, G.V., et al., 1991, Int. J. Cancer, 74 (1) : 35-44およびGenBank寄託No. U51096に示されている；それら両者を本明細書に援用する。

【0020】

本明細書中で、用語”S I、CDX1またはCDX2タンパク質の機能性フラグメント”中に用いる用語”機能性フラグメント”は、全長配列をもつS I、CDX1またはCDX2タンパク質と同じ機能をもつS I、CDX1またはCDX2タンパク質フラグメントを意味する。たとえばS Iタンパク質の免疫原機能性フラグメントは、抗S I抗体が認識するエピトープを含む。S Iのリガンド結合機能性フラグメントは、S Iタンパク質を認識して結合するリガンドに結合しうる構造を形成する配列を含む。

10

【0021】

本明細書中で用いる用語”抗S Iタンパク質抗体が認識するエピトープ”は、抗S Iタンパク質抗体が特異的に認識するエピトープを表わす。

本明細書中で用いる用語”抗CDX1タンパク質抗体が認識するエピトープ”は、抗CDX1タンパク質抗体が特異的に認識するエピトープを表わす。

【0022】

本明細書中で用いる用語”抗CDX2タンパク質抗体が認識するエピトープ”は、抗CDX2タンパク質抗体が特異的に認識するエピトープを表わす。

20

本明細書中で用いる用語”抗体”は、完全無傷の抗体、ならびにそのFabフラグメントおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントを表わすものとする。完全無傷の抗体には、モノクローナル抗体、たとえばネズミモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体が含まれる。

30

【0023】

本明細書中で用いる用語”S Iリガンド”は、S Iタンパク質に特異的に結合する化合物を表わすものとする。S Iに結合する抗体はS Iリガンドである。S Iリガンドはタンパク質、ペプチドまたは非ペプチドであってよい。

【0024】

本明細書中で用いる用語”有効物質”は、療法薬またはイメージング剤である化合物を表わすものとする。

本明細書中で用いる用語”放射安定性”は、放射性崩壊を生じない化合物、すなわち放射性でない化合物を表わすものとする。

40

【0025】

本明細書中で用いる用語”療法薬”は、化学療法薬、毒素、放射線療法薬、ターゲティング剤または放射線増感剤を表わすものとする。

本明細書中で用いる用語”化学療法薬”は、細胞と接触した場合および/または細胞に取り込まれた場合に細胞に影響を及ぼす化合物、たとえば細胞死をもたらし、細胞分裂を阻害し、または分化を誘発する化合物を表わすものとする。

【0026】

本明細書中で用いる用語”毒素”は、細胞と接触した場合および/または細胞に取り込まれた場合に細胞死を起こす化合物を表わすものとする。

50

本明細書中で用いる用語”放射線療法薬”は、細胞と接触した場合および／または細胞に取り込まれた場合に細胞死を起こす放射性核種を表わすものとする。

【0027】

本明細書中で用いる用語”ターゲティング剤”は、他の化合物が結合しうる化合物または他の化合物と反応しうる化合物を表わすものとする。ターゲティング剤は、ターゲティング剤と結合した化学療法薬、毒素、酵素、放射線療法薬、抗体またはイメージング剤を細胞へ運搬するのに使用でき、および／または共投与した有効物質を変換その他の形で変化もしくは増強させるのに使用できる。ターゲティング剤は細胞へ局在化させる第1物質を構成する部分を含み、これが第2物質と接触した際に、目的活性をもつ第3物質に変換されるか、または第2物質を目的活性をもつ物質に変換してもよい。その結果、局在化した物質は癌細胞が目的活性をもつ物質に曝露されるのを促進する。

10

【0028】

本明細書中で用いる用語”放射線増感剤”は、イオン化放射線の傷害作用に対する細胞の感受性を高める物質を表わすものとする。放射線増感剤は、より低い線量の放射線を照射してもなお療法有効線量が付与されるのを可能にする。

【0029】

本明細書中で用いる用語”イメージング剤”は、検出できる化合物を表わすものとする。本明細書中で用いる用語”S I 結合部分”は、コンジュゲート化合物のS Iリガンド構成部分を表わすものとする。

【0030】

本明細書中で用いる用語”有効部分”は、コンジュゲート化合物の有効物質構成部分を表わすものとする。

20

本明細書中で用いる用語”コンジュゲート化合物”および”コンジュゲート組成物”は互換性をもって用いられ、S I結合部分および有効部分を含み、S Iに結合しうる化合物を表わすものとする。本発明によるコンジュゲート化合物は、S Iリガンドを構成する部分および有効物質を構成する部分を含む。したがって本発明のコンジュゲート化合物は、S Iに特異的に結合でき、かつ療法薬またはイメージング剤である部分を含む。コンジュゲート組成物は、架橋剤および／または上記部分間のスペーサーとして用いられる分子を含むことができる。

【0031】

30

本明細書中で用いる用語”架橋剤(cross linker, cross linking agent)”、“コンジュゲート剤”、“結合剤”、“縮合剤”および”二官能性架橋剤”は互換性をもって用いられ、S Iリガンドと有効物質に結合することによりコンジュゲート化合物を形成するために用いられる分子基を表わすものとする。

【0032】

本明細書中で用いる用語”結腸直腸癌”は、結腸直腸癌が小腸より下方の腸管(すなわち大腸(結腸)：盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸およびS状結腸を含む；ならびに直腸)の細胞の癌を特徴とする医学的状態であると定める、十分に受け入れられた医学的定義を含むものとする。さらに、本明細書中で用いる用語”結腸直腸癌”は、十二指腸および小腸(空腸および回腸)の細胞の癌を特徴とする医学的状態をさらに含むものとする。本明細書中で用いる結腸直腸癌の定義は一般的医学的定義より広いが、十二指腸および小腸の細胞もS I、CDX 1およびCDX 2を含有するのでこのように定められる。

40

【0033】

本明細書中で用いる用語”胃癌”は、胃癌が胃細胞の癌を特徴とする医学的状態であると定める、十分に受け入れられた医学的定義を含むものとする。

本明細書中で用いる用語”食道癌”は、食道癌が食道細胞の癌を特徴とする医学的状態であると定める、十分に受け入れられた医学的定義を含むものとする。

【0034】

本明細書中で用いる用語”転移”は、身体の1つの臓器または部分に由来する癌細胞が身体の他の部分へ再配置して増殖し続けるプロセスを表わすものとする。転移した細胞はそ

50

の後、腫瘍を形成し、これがさらに転移する可能性がある。したがって転移は、癌が最初に起きた身体部分から身体の他の部分へ拡散することを表わす。

#### 【0035】

本明細書中で用いる用語”転移性結腸直腸癌細胞”は、転移した結腸直腸癌細胞を表わすものとする。転移性結腸直腸癌細胞は、十二指腸、小腸（空腸および回腸）、大腸（結腸）（盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸およびS状結腸を含む）ならびに直腸以外の身体部分に局在する。

#### 【0036】

本明細書中で用いる用語”転移性胃癌細胞”は、転移した胃癌細胞を表わすものとする。  
転移性胃癌細胞は、胃以外の身体部分に局在する。

10

本明細書中で用いる用語”転移性食道癌細胞”は、転移した結腸直腸癌細胞を表わすものとする。転移性食道癌細胞は、食道以外の身体部分に局在する。

#### 【0037】

本明細書中で用いる用語”非結腸直腸試料”および”腸外試料”は互換性をもって用いられ、結腸直腸以外の供給源からの組織または体液の試料を表わすものとする。ある好ましい態様において、非結腸直腸試料はリンパ節などの組織の試料である。ある好ましい態様において、非結腸直腸試料は由来が未確認の腺癌である腸外組織の試料である。ある好ましい態様において、非結腸直腸試料は血液試料である。

#### 【0038】

本明細書中で用いる”由来が未確認の腺癌に罹患した個体”は、由来が明確に同定されていない腫瘍を伴う個体を表わすものとする。

20

本明細書中で用いる”結腸直腸癌、胃癌または食道癌を発症しやすい疑いがある個体”は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌を発症する特別なリスクをもつ個体を表わすものとする。結腸直腸癌、胃癌または食道癌を発症する特別なリスクをもつ個体の例は、その家族歴が家族構成員の結腸直腸癌、胃癌もしくは食道癌の平均発症率より高い個体、および／または既に結腸直腸癌、胃癌もしくは食道癌を発症し、効果的な処置を受け、したがって再発および反復のリスクに直面している個体である。

#### 【0039】

本明細書中で用いる用語”アンチセンス組成物”および”アンチセンス分子”は互換性をもって用いられ、DNAまたはRNAにハイブリダイズして転写または翻訳が起きるのを阻害および／または阻止することにより転写または翻訳を調節する化合物を表わすものとする。アンチセンス分子には、核酸分子ならびにその誘導体および類似体が含まれる。アンチセンス分子は、アンチセンス分子が核酸分子またはその誘導体もしくは類似体であるか否かに関係なく、相補的ヌクレオチド配列が行うのと同じ様式でDNAまたはRNAにハイブリダイズする。アンチセンス分子は、その発現が癌に関連する遺伝子の転写または翻訳を阻害または阻止することができる。

30

#### 【0040】

本明細書中で用いる用語”S1免疫原”は、S1タンパク質もしくはそのフラグメント、またはそれらもしくはそれらのハプテン化生成物を含むタンパク質、少なくとも1つのS1エピトープを示す細胞および粒子、ならびに少なくとも1つのS1エピトープを示すハプテン化した細胞およびハプテン化した粒子を表わすものとする。

40

#### 【0041】

本明細書中で用いる用語”CDX1免疫原”は、CDX1タンパク質もしくはそのフラグメント、またはそれらもしくはそれらのハプテン化生成物を含むタンパク質、少なくとも1つのCDX1エピトープを示す細胞および粒子、ならびに少なくとも1つのCDX1エピトープを示すハプテン化した細胞およびハプテン化した粒子を表わすものとする。

#### 【0042】

本明細書中で用いる用語”CDX2免疫原”は、CDX2タンパク質もしくはそのフラグメント、またはそれらもしくはそれらのハプテン化生成物を含むタンパク質、少なくとも1つのCDX2エピトープを示す細胞および粒子、ならびに少なくとも1つのCDX2エ

50

ピトープを示すハプテン化した細胞およびハプテン化した粒子を表わすものとする。

**【0043】**

本明細書中で用いる用語 "組換え発現ベクター" は、適切な宿主に導入した場合にそのタンパク質をコードするコード配列の発現を指令するのに必要な遺伝子エレメントを含有するプラスミド、ファージ、ウイルス粒子または他のベクターを表わすものとする。コード配列は、必要な調節配列に機能可能な状態で結合している。発現ベクターは周知であり、容易に入手できる。発現ベクターの例には、プラスミド、ファージ、ウイルスベクターおよび他の核酸分子、または宿主細胞を形質転換してコード配列の発現を促進するのに有用なビヒクルを含有する核酸分子が含まれる。

**【0044】**

本明細書中で用いる用語 "非正統的(非相同的)転写 (illegal legitimate transcription)" は、他の組織からの細胞における組織特異的遺伝子の低レベル発現またはバックグラウンド発現を表わすものとする。したがって非正統的転写現象により、他の組織における組織特異的転写体に対するmRNAのコピーが産生される。遺伝子発現の検出に用いる検出方法の感度が非正統的転写の検出に十分なほど高ければ、対照アッセイおよび/または定量アッセイおよび/または他の手段で陰性試料における非正統的転写による転写の発現レベルを差し引いて、非正統的転写による偽陽性の発生を排除しなければならない。あるいは非正統的転写により存在するSI、CDX1またはCDX2遺伝子転写体のうち1又はそれより多くを検出せずに、試料中におけるSI、CDX1またはCDX2遺伝子のうち1又はそれより多くの発現の証拠を検出することができる。これは、非正統的転写のため存在する、バックグラウンドとして存在するSI、CDX1またはCDX2遺伝子転写体のうち1又はそれより多くを検出するのに十分な感度をもたない方法を用いて達成される。

10

**【0045】**

S I

結腸直腸、胃または食道の細胞に由来する癌は、SI、CDX1およびCDX2を発現する。そのような腫瘍がSI、CDX1およびCDX2を発現することにより、このタンパク質およびそのmRNAは腸外組織および血液中に癌細胞が存在することの特異的バイオマーカーとなりうる。実際にこの特徴により、RT-PCR分析によるSI、CDX1またはCDX2 mRNA検出は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌患者の病期を判定し、再発性疾患の証拠を血中に求めるために術後の患者を追跡し、また結腸直腸癌、胃癌または食道癌を検出するための、診断検査となりうる。さらに、有効物質をインビボで腫瘍細胞へ運搬するために、有効物質にコンジュゲートしたりガンドでSIをターゲティングすることができる。

20

**【0046】**

米国特許USP5,518,888(1996年5月21日、Waldmannに発行)、国際特許出願PCT/US94/12232(1994年10月26日出願)、米国特許出願08/467,920(1995年6月6日出願)および米国特許出願08/583,447(1996年1月5日出願)(それらをそれぞれ本明細書に援用する)には、有効化合物を運搬するためにST受容体(グアニリンシクラーゼCまたはGCCとも呼ばれる)をターゲティングすることにより転移性結腸直腸腫瘍をターゲティングしうることが開示されている。腸管の外側の細胞に結腸直腸癌のマーカーとしてのST受容体が存在すると、転移性結腸直腸腫瘍を伴う個体をスクリーニング、同定および処置できる。ST受容体を利用して、結腸直腸細胞への遺伝子療法薬およびアンチセンス化合物の運搬をターゲティングすることもできる。

30

**【0047】**

米国特許USP5,601,990(1997年2月11日、Waldmannに発行)、国際特許出願PCT/US94/12232(1994年10月26日出願)およびPCT/US97/07467(1997年5月2日出願)(それらをそれぞれ本明細書に援用する)には、腸管の外側から得た組織および体液の試料中にST受容体発現の証拠を検

40

50

出することが転移性結腸直腸癌の指標になると開示されている。

【0048】

国際特許出願 PCT/US97/07565 (1997年5月2日出願) (本明細書に援用する)には、SI受容体と反応する抗体でターゲティングできるエピトープを含む免疫原を、予防用および治療用の抗-転移性結腸直腸癌組成物として有用なワクチン組成物に使用できることが開示されている。

【0049】

正常な結腸細胞のほか、原発性および転移性の結腸癌、胃癌および食道癌の細胞もSI、CDX1およびCDX2を発現することが見いだされた。正常な胃および食道の細胞はSI、CDX1およびCDX2を発現しない。10したがって本発明は、転移性結腸癌ならびに原発性および転移性の胃癌および食道癌を伴う患者の診断、病期判定および術後監視のための特異的な分子診断マーカーとしてのSI、CDX1およびCDX2の使用を提供する。

【0050】

分子技術を用いるSI、CDX1およびCDX2の発現検出、たとえばRT-PCR(これに限定されない)を用いて患者を診断および病期判定し、外科処置後再発および/または寛解を追跡することができ、かつ結腸直腸癌、胃癌および食道癌の発症について正常者をスクリーニングできる。

【0051】

SI、CDX1およびCDX2は正常な腸細胞にのみ発現するという点で特異である。20腸を内張りしている粘膜細胞は互いに密な接合により結合し、血流中への腸内容物の通過および腸内腔への血流成分の通過に対するバリヤーを形成している。したがって、SI発現細胞が先端に位置するためそれらの細胞は循環系から隔離され、これにより身体の残りの部分から分離され、本質的に身体の“外側”にあると考えられる。したがって、身体の残りの部分は腸管の“外側”とみなされる。腸管の“外側”に投与した組成物は、正常にSI、CDX1およびCDX2を発現する細胞のみから隔離および分離した状態を維持する。逆に、腸管の外側の組織から採取した組織試料は、正常であればSI、CDX1およびCDX2を発現する細胞を含まない。

【0052】

結腸直腸癌に罹患している個体において、癌細胞はしばしばSI、CDX1およびCDX2を産生および表示する細胞に由来し、これらの癌細胞はSI、CDX1およびCDX2を産生し続ける。結腸直腸癌細胞はSI、CDX1およびCDX2を発現することが認められた。同様に、胃癌および食道癌の細胞もSI、CDX1およびCDX2を発現する。30

【0053】

結腸直腸腫瘍細胞によるSI、CDX1およびCDX2の発現は、インビトロでのスクリーニング、モニタリングおよび病期判定のための検出可能なターゲット、ならびにイメージングおよび処置のための有効物質を含むコンジュゲート組成物のインビボ運搬のためのターゲットを提供する。SI、CDX1およびCDX2は、転移性結腸直腸癌に対する予防または転移性結腸直腸癌を伴う個体の治療に使用できるワクチンのターゲットとしても使用できる。40

【0054】

胃または食道の腫瘍細胞によるSI、CDX1およびCDX2発現は、インビトロでのスクリーニング、モニタリングおよび病期判定のための検出可能なターゲット、ならびにイメージングおよび処置のための有効物質を含むコンジュゲート組成物のインビボ運搬のためのターゲットを提供する。SI、CDX1およびCDX2は、原発性および転移性の胃癌および食道癌に対する予防、または原発性および転移性の胃癌および食道癌を伴う個体の治療に使用できるワクチンのターゲットとしても使用できる。

【0055】

インビトロ診断薬

本発明のある態様によれば、患者および患者試料をスクリーニング、診断および分析して50

腸管の外側の細胞による S I、 C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの発現の証拠を検出するためのインビトロ方法が提供される。その際 S I 発現は、転移性結腸直腸癌または原発性もしくは転移性の胃癌もしくは食道癌を示唆する。転移性結腸直腸癌または原発性もしくは転移性の胃癌もしくは食道癌を伴う疑いがある患者において、腸管の外側の細胞による S I、 C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの発現は転移性結腸直腸癌または原発性もしくは転移性の胃癌もしくは食道癌の指標であり、そのような患者の診断、モニタリングおよび病期判定に利用できる。さらに本発明は、患者および患者試料をインビトロでスクリーニングおよび分析して腸管の外側の細胞による S I、 C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの発現の証拠を検出するのに有用な方法、組成物およびキットに関する。その際、 S I、 C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くを発現する細胞の存在は、その腫瘍が結腸直腸癌または胃癌もしくは食道癌に由来することを示唆または確定する。本発明の他の態様においては、転移性結腸直腸癌または原発性もしくは転移性の胃癌もしくは食道癌の細胞を視覚化するのに有用な組成物、キットおよび方法が提供される。

#### 【 0 0 5 6 】

インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の高リスク群に属する個体、たとえば限局性疾患および / または転移性疾患を伴うと診断された個体、ならびに / あるいはその疾患に遺伝的関連をもつ個体のモニタリングに使用できる。インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の治療を受けている個体および / または受けたことがある個体のモニタリングに使用して、その癌が転移しているかどうかを判定できる。インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の治療を受けている個体および / または受けたことがある個体のモニタリングに使用して、その癌が排除されたかどうかを判定できる。インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、そのほかの発症しやすい個体、すなわち遺伝子スクリーニングおよび / または家族歴により遺伝的素因があると同定された個体のモニタリングに使用できる。遺伝学的理の進歩、ならびに技術および疫学の発達により、胃癌または食道癌の発症について個体がもつ確率の判定およびリスク評価が可能となった。家族健康歴および / または遺伝子スクリーニングを用いると、ある個体が結腸直腸癌、胃癌または食道癌を含めた特定の型の癌を伴う確率を推定できる。特定の型の癌を発症する素因があると同定された個体をモニタリングまたはスクリーニングして、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の証拠を検出することができる。そのような証拠が発見されると、その疾患を克服するために早期処置を行うことができる。したがって、結腸直腸癌、胃癌または食道癌を発症するリスクのある個体を同定し、そのような個体から試料を採取する。本発明は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患した血族を含めた家族歴をもつと同定された個体のモニタリングに特に有用である。同様に、本発明は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと診断された個体、特に腫瘍の治療を受け、摘出され、および / または他の寛解を経験した個体（結腸直腸癌、胃癌または食道癌の治療を受けた個体を含む）のモニタリングにも特に有用である。

#### 【 0 0 5 7 】

インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、腫瘍の分析に使用できる。S I、 C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの発現は細胞タイプのマーカーであり、由来が確認されていない腺癌の由来が結腸直腸癌、胃癌または食道癌である可能性を示唆する。S I、 C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの発現の検出は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の初期診断の補助、またはそのような診断の確認にも利用できる。本発明の組成物、方法およびキットを用いて、結腸直腸癌、胃癌または食道癌由来であると思われる腫瘍をそうであると確認できる。

#### 【 0 0 5 8 】

本発明のインビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、キットおよび方法を用いて、胃または食道からの組織試料を分析し、原発性の胃癌または食道癌を同定できる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 5 9 】**

本発明のインビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、キットおよび方法を用いて、結腸からの組織試料を分析し、腸組織への原発性結腸直腸癌の浸潤度を検出できる。

**【 0 0 6 0 】**

本発明によれば、S I、C D X 1 または C D X 2 S I 遺伝子転写体またはタンパク質に結合する化合物が提供される。身体の正常組織は、腸管細胞以外は C D X 1 および C D X 2 転写体またはタンパク質をもたない。S I、C D X 1 および C D X 2 の発現は細胞タイプのマーカーであり、腸外試料中の結腸直腸癌、胃癌または食道癌の同定に有用である。

**【 0 0 6 1 】**

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織および体液試料または腫瘍試料をスクリーニングして、S I、C D X 1 および C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くの存否を同定できる。E L I S A アッセイおよびウェスタンプロット法などの方法を実施して、S I、C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くが試料中に存在するか判定できる。

10

**【 0 0 6 2 】**

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織試料および体液試料または腫瘍試料をスクリーニングして S I 遺伝子転写体の存否を検出することにより、結腸直腸管の外側の細胞が S I、C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くを発現しているか同定できる。S I、C D X 1 および C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くまたはそれから形成された c D N A の存在は、P C R 増幅、分枝鎖オリゴヌクレオチド法、ノーザンプロット法 (m R N A )、サザンプロット法 (c D N A ) またはオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションなどの方法により判定できる。

20

**【 0 0 6 3 】**

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織試料または腫瘍試料からの細胞を検査して、S I、C D X 1 および C D X 2 タンパク質のうち 1 又はそれより多くの存否を同定できる。組織切片について免疫組織化学的プロット法などの方法を実施して、試料中に S I、C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くが存在するか判定できる。

**【 0 0 6 4 】**

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織試料または腫瘍試料からの細胞を検査して S I 遺伝子転写体の存否を検出することにより、結腸直腸管の外側の細胞に S I、C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くが発現しているか判定できる。組織切片からの細胞中における S I、C D X 1 および C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くまたはそれから形成された c D N A の存在は、i n s i t u ハイブリダイゼーションなどの方法により判定できる。

30

**【 0 0 6 5 】**

非結腸直腸組織試料および体液試料中、または非結腸直腸組織試料からの細胞における S I、C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの存在は、胃癌または食道癌の可能性を示唆する。腫瘍試料中または腫瘍細胞における S I、C D X 1 および C D X 2 のうち 1 又はそれより多くの存在は、その腫瘍が結腸直腸、胃または食道に由来する可能性を示唆する。非結腸直腸組織試料および体液試料中、または非結腸直腸組織試料からの細胞における S I、C D X 1 および C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くの存在は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の可能性を示唆する。腫瘍試料中または腫瘍細胞における S I、C D X 1 および C D X 2 遺伝子転写体のうち 1 又はそれより多くの存在は、その腫瘍が結腸直腸、胃または食道に由来する可能性を示唆する。

40

**【 0 0 6 6 】**

試料は切除組織、または穿刺生検を含めた生検材料から得ることができる。外科病理学的検査のための組織切片標本は凍結でき、標準法により作製できる。組織切片についての免疫組織化学的検査および i n s i t u ハイブリダイゼーション結合アッセイは、固定した細胞において実施される。腸外試料を標準法、たとえば超音波処理、機械的破壊または

50

化学的細胞溶解（界面活性剤溶解など）によりホモジナイズできる。体液、たとえば血液、尿、リンパ液、脳脊髄液、羊水、膿液、精液および便などの試料中の腫瘍試料をスクリーニングして、それらの腫瘍が結腸直腸、胃または食道に由来するかどうかを判定することも考慮される。

#### 【0067】

非結腸直腸組織試料は、結腸直腸管（すなわち小腸より下方の腸管（すなわち大腸（結腸）：盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸およびS状結腸を含む；ならびに直腸）、さらに十二指腸および小腸（空腸および回腸））、以外の任意の組織から得ることができる。結腸直腸管以外のすべての組織の正常細胞は、S I、C D X 1およびC D X 2を発現しない。したがって、S I、C D X 1およびC D X 2タンパク質またはS I、C D X 1およびC D X 2遺伝子転写体が非結腸直腸試料中に検出されると、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞が存在する可能性が示唆される。ある好ましい態様において、組織試料はリンパ節である。10

#### 【0068】

組織試料は、生検針の使用を含めた外科的標準法により得ることができる。当業者には、S I、C D X 1およびC D X 2のうち1又はそれより多くについて検査しうる多様な被験試料が容易に理解され、組織試料を得る方法も自明であろう。

#### 【0069】

S Iの存在をスクリーニングするために、組織試料を周知の方法、たとえば超音波処理、機械的破壊、化学的細胞溶解（界面活性剤溶解など）またはその組合せによりホモジナイズし、または他の形で調製できる。20

#### 【0070】

体液試料の例には、血液、尿、リンパ液、脳脊髄液、羊水、膿液および精液が含まれる。ある好ましい態様においては、体液試料として血液を用いる。体液試料から、たとえば遠心により細胞を単離できる。当業者には、S I、C D X 1およびC D X 2のうち1又はそれより多くについて検査しうる多様な被験試料が自明であろう。試料は注射器またはスワブにより体液を採取する方法などにより得ができる。当業者には、被験試料を得るために他の方法が自明であろう。

#### 【0071】

血液試料を用いるアッセイにおいては、血球から血漿を分離してもよい。血漿をS I、C D X 1およびC D X 2のうち1又はそれより多くについてスクリーニングすることができる。これには、腫瘍細胞からS I、C D X 1およびC D X 2のうち1又はそれより多くが開裂または脱落した場合に血中へ放出されたトランケート形タンパク質も含まれる。ある態様においては、血球画分を結腸直腸、胃または食道の腫瘍細胞の存在についてスクリーニングする。ある態様においては、血球画分中に存在するリンパ球をスクリーニングする；これは、血球を溶解し、血球が抱き込んだ胃または食道の腫瘍細胞が存在した結果として存在する可能性のあるS I、C D X 1およびC D X 2タンパク質のうち1又はそれより多くまたはS I、C D X 1およびC D X 2遺伝子転写体のうち1又はそれより多くの存在を検出することによる。ある好ましい態様においては、試料からm R N Aを単離する前に、市販の免疫カラムによりC D 3 4 + 細胞を分離する。3040

#### 【0072】

本発明の態様には、S I、C D X 1およびC D X 2遺伝子転写体を検出するスクレオチド配列ベースの分子分析により試料がS I、C D X 1およびC D X 2発現細胞を含有するか判定する種々の方法が含まれる。このためには、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）法、分枝鎖オリゴヌクレオチド法、ノーザンプロット法、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法およびin situハイブリダイゼーション法を含めた幾つかの異なる方法を利用できる。

#### 【0073】

本発明は、S I、C D X 1およびC D X 2遺伝子転写体の同定方法に用いるオリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー、ならびにそれらの構成要素を含む診断キットに関する50

。

【 0 0 7 4 】

S I 遺伝子転写体を検出するための m R N A 配列ベースの方法にはポリメラーゼ連鎖反応法、分枝鎖オリゴヌクレオチド法、ノーザンおよびサザンプロット法、*in situ*ハイブリダイゼーション法ならびにオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 5 】

本明細書に記載する方法は本発明を実施する方法を例示するためのものであり、本発明の範囲を限定するためのものではない。非結腸直腸試料中の S I 、 C D X 1 および C D X 2 遺伝子転写体の存在を検出するための他の配列ベースの方法も、本発明により採用できるものとする。 10

【 0 0 7 6 】

非結腸直腸試料に由来する遺伝子材料中の遺伝子転写体を検出するための好ましい方法は、ポリメラーゼ連鎖反応( P C R )法を用いる。 P C R 法は当業者がルーティンに実施しており、診断にそれを用いることは周知であり、受け入れられている。 P C R の実施方法は、 " P C R Protocols : A Guide to Methods and Applications " , Innis , M . A . , et al . 編 , Academic Press 社 , カリフォルニア州サンディエゴ( 1990 )に示されており、これを本明細書に援用する。 P C R 法の応用は " Polymerase Chain Reaction " , Erlich , H . A . , et al . 編 , Cold Spring Harbor Laboratory Press , ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー( 1989 )に示されており、これを本明細書に援用する。 U S P 4 , 683 , 202 、 U S P 4 , 683 , 195 、 U S P 4 , 965 , 188 および U S P 5 , 075 , 216 ( これらを本明細書に援用する ) には、 P C R の実施方法が記載されている。 P C R は Perkin Elmer Cetus GENE AMP RNA P C R キット、 Part No . N 808 - 0017 を用いてルーティンに実施できる。 20

【 0 0 7 7 】

P C R 法によれば、 R N A または D N A 分子中に存在する配列にハイブリダイズする 5' および 3' プライマーを用意し、さらに遊離ヌクレオチド、およびプライマー間のヌクレオチド配列に相補的な塩基に遊離ヌクレオチドをフィルインして相補的 D N A 鎖を生成する酵素を供給することにより、 D N A 配列の多数のコピーを迅速生成できる。酵素はこれらのプライマーに隣接する相補配列をフィルインする。 5' プライマーと 3' プライマーが両方とも同一の核酸小フラグメント上のヌクレオチド配列にハイブリダイズする場合、特異的二本鎖サイズの生成物が対数的に増幅する。核酸フラグメントに単一プライマーのみがハイブリダイズする場合、直線的増幅により種々の長さの一本鎖生成物が生成する。 30

【 0 0 7 8 】

P C R プライマーは、当業者が配列情報を用いてルーティンに設計できる。 S I 遺伝子転写体のヌクレオチド配列を S E Q I D N O : 1 に示す。 C D X 1 遺伝子転写体のヌクレオチド配列を S E Q I D N O : 3 に示す。 C D X 2 遺伝子転写体のヌクレオチド配列を S E Q I D N O : 5 に示す。この方法を実施するためには、試料中の細胞から R N A を抽出し、試験するか、あるいは周知の方法および容易に入手できる出発物質を用いて c D N A を作製するのに使用する。当業者は容易に P C R プライマーを調製できる。一組のプライマーは、一般に 2 種類のプライマーを含む。抽出した m R N A またはそれから形成された c D N A について P C R を実施する場合、 S I 遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A が存在するときは、多数コピーの m R N A または c D N A が形成されるであろう。それが存在しないときは、検出できる別個の生成物は P C R により形成されないであろう。プライマーは一般に 8 ~ 50 ヌクレオチド、好ましくは約 15 ~ 35 ヌクレオチド、より好ましくは 18 ~ 28 ヌクレオチドであり、遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A と同一または相補的であり、したがってそれらにハイブリダイズする。好ましい態様において、プライマーはそれぞれ 15 ~ 35 ヌクレオチド、より好ましくは 40

18～28ヌクレオチドのフラグメントである。プライマーは増幅すべき配列にハイブリダイズしなければならない。一般的プライマーは長さ18～28ヌクレオチドであり、一般に50～60%のG+C組成をもつ。プライマーがハイブリダイズしなければならない配列にプライマー全体が相補的であることが好ましい。好ましくはプライマーは100～2000塩基対のPCR生成物を形成する。しかし50～10bp以上の生成物を形成することもできる。mRNAを鑄型として用いる場合、プライマーはmRNA配列にハイブリダイズしなければならない。cDNAを鑄型として用いる場合、プライマーはcDNA配列にハイブリダイズしなければならない。

#### 【0079】

mRNAまたはcDNAを、標準PCRプロトコルに従ってプライマー、遊離ヌクレオチドおよび酵素と混和する。この混合物が一連の温度変化を受ける。遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAが存在する場合、両プライマーが同一分子にハイブリダイズしたときは、プライマーおよび介在する相補配列を含む分子が対数的に増幅するであろう。増幅したDNAは、多数の周知の方法で容易に検出できる。遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAが存在しない場合、PCR生成物が対数的に増幅することはない。したがってPCR法は、試料中の遺伝子転写体を検出するためのきわめて容易な直接的かつ信頼性のある方法を提供する。

#### 【0080】

PCR生成物は幾つかの周知の方法で検出できる。増幅DNAの存在を検出するための好ましい方法は、PCR反応材料をゲル電気泳動により分離し、増幅DNAが存在する場合にそれを視覚化するためにゲルを臭化工チジウムで染色するものである。増幅DNAの予想サイズのサイズ標準品をゲル上に対照として流すことが好ましい。

#### 【0081】

RNAの回収量が異例に少なく、それから形成されるcDNAがごく少量であるような場合、1回目のPCR反応生成物についてPCR反応を実施することが望ましく、または必要である。すなわち、1回目のPCRで生成した増幅DNAの量が検出困難である場合、2回目のPCRを実施して1回目の増幅DNAの多数コピーのDNA配列を作製することができる。2回目のPCR反応には入れ子型プライマーセットを用いる。入れ子型プライマーセットは、1回目の反応に用いた5'プライマーの下流および3'プライマーの上流にハイブリダイズする。

#### 【0082】

本発明は、遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAを増幅するPCR法の実施のためのプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドを含む。

本発明によれば、非結腸直腸組織試料中の遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAの存在を検出する方法を実施するのに有用な診断キットを組み立てることができる。そのような診断キットは、PCR法の実施のためのプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドを含む。本発明による診断キットは、増幅DNAの存在を検出するために用いる、ゲル上に標準品として流すサイズマーカーを入れた容器を含むことが好ましい。サイズマーカーは、遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAの存在下でプライマーにより形成されるDNAと同一サイズである。あるキットにおける他の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。陽性および陰性対照を備えていてよい。

#### 【0083】

PCRアッセイは、ホモジナイズした組織試料中および体液試料の細胞中にある遺伝子転写体の検出に有用である。体液試料の血漿部分についてのPCRを用いて遺伝子転写体を検出することが考慮される。

#### 【0084】

試料がSI、CDX1またはCDX2発現細胞を含有するか判定するための他の方法は、試料から抽出したmRNAの分枝鎖オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析によ

10

20

30

40

50

る。分枝鎖オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションは、U S P 5 , 5 9 7 , 9 0 9 、 U S P 5 , 4 3 7 , 9 7 7 および U S P 5 , 4 3 0 , 1 3 8 の記載に従って実施でき、これらを本明細書に援用する。これらの特許の教示および遺伝子転写体の配列に従って試薬を設計できる。

#### 【 0 0 8 5 】

試料が S I 、 C D X 1 または C D X 2 発現細胞を含有するか判定するための他の方法は、非結腸直腸試料から抽出した m R N A のノーザンプロット分析による。ノーザンプロット分析を実施するための方法は当業者に周知であり、 S a m b r o o k , J . , et al . ( 1 9 8 9 ) M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーに記載されている。 m R N A の抽出、 m R N A の電気泳動分離、プロッティング、プローブ調製およびハイブリダイゼーションは周知の技術であり、容易に入手できる出発物質を用いてルーティンに実施できる。

#### 【 0 0 8 6 】

ポリ d T カラムを用いて m R N A を抽出し、この材料を電気泳動により分離し、そしてたとえばニトロセルロースペーパーに移す。単離した特異的フラグメント(1又は複数)から作製した標識プローブを用いて、ペーパーに固定された相補フラグメントの存在を視覚化することができる。ノーザンプロット中の m R N A の同定に有用なプローブは、遺伝子転写体に相補的なヌクレオチド配列をもつ。当業者は本明細書の配列表の配列情報を用いてそのようなプローブを設計し、あるいは遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A を単離およびクローニングしてプローブとして用いることができる。そのようなプローブは、少なくとも 1 5 ヌクレオチド、好ましくは 3 0 ~ 2 0 0 、より好ましくは 4 0 ~ 1 0 0 ヌクレオチドのフラグメントであり、全遺伝子転写体であってもよい。

#### 【 0 0 8 7 】

本発明によれば、非結腸直腸試料中の遺伝子転写体の存在をノーザンプロット分析により検出する方法を実施するのに有用な診断キットを組み立てることができる。そのような診断キットは、 m R N A にハイブリダイズするプローブとして有用なオリゴヌクレオチドを含む。プローブは放射性標識されていてもよい。本発明による診断キットは、ゲル上に標準品として流すサイズマーカーを入れた容器を含むことが好ましい。本発明による診断キットは、プローブにハイブリダイズする陽性対照を入れた容器を含むことが好ましい。あるキットにおける他の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

#### 【 0 0 8 8 】

ノーザンプロット分析は、ホモジナイズした組織試料中および体液試料の細胞中にある遺伝子転写体の検出に有用である。体液試料の血漿部分についての P C R を用いて遺伝子転写体を検出することが考慮される。

#### 【 0 0 8 9 】

遺伝子転写体の存在を検出する他の方法は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法による。オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法は当業者に周知である。要約すると、遺伝子転写体のヌクレオチド配列にハイブリダイズする特異的ヌクレオチド配列を含む検出可能なプローブを用いる。試料からの R N A またはそれから形成された c D N A を、通常は濾紙などに固定する。プローブを添加し、固定された遺伝子材料にプローブが完全に相補する場合にのみハイブリダイズしうる条件下に保持する。その条件は、固定された材料にプローブの一部のみがハイブリダイズするプローブを洗い去るのに十分なほどストリンジェントである。洗浄したフィルター上にプローブが検出されたことは、相補配列を指示する。

#### 【 0 0 9 0 】

オリゴヌクレオチドアッセイに有用なプローブは少なくとも 1 8 ヌクレオチドの相補的 D N A であり、遺伝子転写体に対する完全相補配列ほどに大きくてもよい。ある好ましい態

10

20

30

40

50

様において、本発明のプローブは30～200ヌクレオチド、好ましくは40～100ヌクレオチドである。

**【0091】**

当業者は配列表に開示された配列情報を用いて本発明に有用なプローブを設計できる。不完全相補的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンド信号を最小に抑えるために、ハイブリダイゼーション条件をルーティンに最適化できる。ある好ましい態様において、プローブは全長クローンである。プローブは、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは30～200、より好ましくは40～100ヌクレオチドのフラグメントであり、全遺伝子転写体であってもよい。

**【0092】**

本発明は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを実施するためのプローブとして有用な標識オリゴヌクレオチドを含む。本発明の標識プローブは、放射性標識ヌクレオチドで標識され、あるいは容易に入手できる非放射性検出システムにより検出される他のもので標識される。

**【0093】**

本発明によれば、本発明のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法を実施するのに有用な診断キットを組み立てることができる。そのような診断キットは、遺伝子転写体の部分をコードする標識オリゴヌクレオチドを含む。本発明によるオリゴヌクレオチド診断キットの標識プローブは、放射性ヌクレオチドで標識されていることが好ましい。本発明によるオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションベースの診断キットは、好ましくは陽性および陰性対照であるDNA試料を含む。陽性対照DNA試料は、キットのプローブに対して完全相補的なヌクレオチド配列をもつ核酸分子を含むものであり、したがってプローブはアッセイ条件下でこの分子にハイブリダイズする。陰性対照DNAは、ヌクレオチド配列がキットのプローブの配列に対して部分相補的である少なくとも1つの核酸分子を含むものである。プローブはアッセイ条件下で陰性対照DNA試料にハイブリダイズしないであろう。あるキットにおける他の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

**【0094】**

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法は、ホモジナイズした組織試料中および体液試料の細胞中にある遺伝子転写体の検出に有用である。体液試料の血漿部分についてのPCRを用いて遺伝子転写体を検出することが考慮される。

**【0095】**

本発明は、腫瘍試料を評価してそれらが結腸直腸、胃または食道に由来するか否かを判定するためのインビトロキット、ならびにそれを実施するのに有用な試薬および組成物に関する。本発明のある態様において、腫瘍試料は結腸直腸、胃もしくは食道の腫瘍または他の臓器の腫瘍を切除する外科処置を受けつつあるか、あるいはその回復期にある個体から摘出でき、あるいは生検材料であってもよい。腫瘍試料を分析して、遺伝子転写体の存否を同定する。免疫組織化学的アッセイなどの方法を実施して、腫瘍試料の細胞中にS1、CDX1および/またはCDX2が存在するか判定できる。タンパク質またはそれから形成されたcDNAをコードするmRNAの存在は、in situハイブリダイゼーション、免疫組織化学的方法およびin situ ST結合アッセイなどの方法で判定できる。

**【0096】**

in situハイブリダイゼーション法は当業者に周知である。要約すると、細胞を固定し、この固定細胞に特異的ヌクレオチド配列を含む検出可能なプローブを添加する。細胞が相補的ヌクレオチド配列を含有する場合、検出可能なプローブはそれらにハイブリダイズするであろう。

**【0097】**

オリゴヌクレオチドアッセイに有用なプローブは少なくとも18ヌクレオチドの相補的D

10

20

30

40

50

N A であり、遺伝子転写体に対する完全相補配列ほどに大きくてもよい。ある好ましい様において、本発明のプローブは 30 ~ 200 ヌクレオチド、好ましくは 40 ~ 100 ヌクレオチドである。

#### 【 0098 】

当業者は配列表に開示された配列情報を用いて、S I、C D X 1 または C D X 2 発現細胞を同定するための in situ ハイブリダイゼーション法に有用なプローブを設計できる。プローブは、好ましくは遺伝子転写体に対応するヌクレオチド配列にハイブリダイズする。不完全相補的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンド信号を最小に抑えるために、ハイブリダイゼーション条件をルーティンに最適化できる。プローブは、好ましくは全長遺伝子転写体にハイブリダイズする。プローブは、少なくとも 15 ヌクレオチド、好ましくは 30 ~ 200、より好ましくは 40 ~ 100 ヌクレオチドのフラグメントであり、遺伝子転写体であってもよく、より好ましくは遺伝子転写体の 18 ~ 28 ヌクレオチドフラグメントであってもよい。

10

#### 【 0099 】

プローブは完全相補的であり、部分相補配列には十分にはハイブリダイズしない。本発明による in situ ハイブリダイゼーションのためには、プローブは蛍光により検出できることが好ましい。一般的方法は、プローブをビオチン修飾ヌクレオチドで標識し、次いで蛍光タグ付きアビシンで検出するものである。このようにプローブ自体が蛍光標識される必要はなく、後に蛍光マーカーで検出することができる。

#### 【 0100 】

20

本発明は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを実施するのにプローブとして有用な標識オリゴヌクレオチドを含む。すなわち、それらは m R N A 配列と完全相補的であるが、ゲノム配列ではない。本発明の標識プローブは放射性標識ヌクレオチドで標識され、あるいは容易に入手できる非放射性検出システムにより検出される他のもので標識される。

#### 【 0101 】

本発明は、S I、C D X 1 または C D X 2 発現細胞を同定する in situ ハイブリダイゼーションに有用なプローブに関する。

細胞を固定し、プローブを遺伝子材料に添加する。プローブは試料中に存在する相補的核酸配列にハイブリダイズする。蛍光顕微鏡を用いてプローブをそれらの蛍光マーカーにより視覚化できる。

30

#### 【 0102 】

本発明によれば、本発明の in situ ハイブリダイゼーション法を実施するのに有用な診断キットを組み立てることができる。m R N A 配列と完全相補的であるが、ゲノム配列ではない。たとえば m R N A 配列は異なるエキソン配列を含む。本発明による in situ 診断キットの標識プローブを蛍光マーカーで標識することが好ましい。

#### 【 0103 】

S I、C D X 1 または C D X 2 を含む細胞を同定および本質的に染色するために、免疫組織化学的方法を用いることができる。そのような " 染色 " により、転移性移行を分析できる。前記のような抗 S I 抗体を固定細胞と接触させると、細胞中に存在する S I、C D X 1 または C D X 2 が抗体と反応する。抗体は検出可能に標識されており、あるいは標識された第 2 抗体または細胞を染色するプロテイン A を用いて検出される。

40

#### 【 0104 】

本明細書に記載した腫瘍切片評価方法を用いてリンパ節および他の組織の試料について組織切片を分析し、S I、C D X 1 または C D X 2 発現細胞の存在を同定できる。試料を調製および " 染色 " して S I、C D X 1 または C D X 2 発現を検出することができる。

#### 【 0105 】

結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴う疑いがある個体または発症しやすい個体から得た非結腸直腸組織または体液の試料中の S I、C D X 1 または C D X 2 の存在をそのような S I、C D X 1 または C D X 2 タンパク質への曝露に応答して産生された抗体で検出するこ

50

とによる免疫アッセイ法を、結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患している個体の診断に採用できる。さらに、腫瘍試料中のS I、C D X 1またはC D X 2の存在をそのようなS I、C D X 1またはC D X 2タンパク質への曝露に応答して産生された抗体で検出することによる免疫アッセイ法を用いて、結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患している個体を同定できる。

#### 【0106】

抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。抗体は好ましくはヒト細胞において形成されたS I、C D X 1またはC D X 2に対して産生される。免疫アッセイは周知であり、それらの設計は当業者がルーティンに実施できる。S I、C D X 1またはC D X 2に特異的に結合し、本発明の方法およびキットに有用であるモノクローナル抗体を、当業者は標準法および容易に入手できる出発物質を用いて調製できる。モノクローナル抗体の調製方法は、Harlow, E. and D. Lane (1988) ANTIBODIES: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(本明細書に援用する)に概説され、そこにはターゲットタンパク質に特異的に結合するハイブリドーマおよびモノクローナル抗体の調製について詳細な指針が示されている。抗体の代わりに、S I、C D X 1またはC D X 2翻訳生成物に特異的に結合するF a b、組換えF a b、F (a b)<sub>2</sub>、組換えF (a b)<sub>2</sub>も本発明の範囲に含まれる。

10

#### 【0107】

要約すると、S I、C D X 1またはC D X 2タンパク質をマウスに注射する。マウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞を単離し、不死化したマウス細胞と融合させる。このハイブリッド細胞、すなわちハイブリドーマを培養し、抗体を分泌する細胞を選択する。それらの抗体を分析し、S I、C D X 1またはC D X 2に特異的に結合することが認められれば、それらを産生するハイブリドーマを培養して特異的抗体を連続供給させる。

20

#### 【0108】

抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。抗体は好ましくはヒト細胞において形成されたS I、C D X 1またはC D X 2に対して産生される。

被験試料中のタンパク質の存在を検出する手段はルーティンであり、当業者は周知の方法を用いてタンパク質または抗体の存否を検出できる。タンパク質の存在を検出するための周知の方法の1つは、免疫アッセイである。当業者には、試料中のS I、C D X 1またはC D X 2タンパク質の存在を検出する免疫アッセイを実施するための多数の方法が自明である。

30

#### 【0109】

ある態様によれば、免疫アッセイは下記を含む。試料中のタンパク質を固相支持体、たとえばプラスチック表面に結合させる。次いで、S I、C D X 1またはC D X 2に選択的に結合する検出可能な抗体を添加する。検出可能な抗体が検出されたことは、S I、C D X 1またはC D X 2の存在を指示する。検出可能な抗体は標識抗体または非標識抗体のいずれであってもよい。非標識抗体は、第1抗体に特異的に結合する第2の標識抗体、または標識プロテインA(抗体と複合体形成するタンパク質)を用いて検出できる第2の非標識抗体を用いて検出できる。種々の免疫アッセイ法がImmunoassays for the 80's, A. Voller et al. 編, University Park, 1981に記載されており、これを本明細書に援用する。

40

#### 【0110】

固相支持体を被験試料と接触させる簡単な免疫アッセイを実施できる。被験試料中に存在するタンパク質はいずれも固相に結合し、特異的な検出可能な抗体調製物により検出できる。そのような手法はドットプロット、ウェスタンプロットおよびこれらに類する他のアッセイ法の本質である。

#### 【0111】

他の免疫アッセイ法はより複雑であるが、実際に卓越した結果を与える。代表的な好ましい免疫アッセイ法には、タンパク質検出のための"フォワード(forward)"アッ

50

セイが含まれる。この場合、固相支持体に結合した第1の抗タンパク質抗体を被験試料と接触させる。適切なインキュベーション期間後、固相支持体を洗浄して、結合していないタンパク質を除去する。次いで第2の別個の抗タンパク質抗体を添加する。これは、特異的タンパク質の第1抗体が認識しない部分に特異的である。第2抗体は好ましくは検出可能である。この検出可能な抗体を第1抗体により固相支持体に結合している特異的タンパク質と複合体形成させる第2インキュベーション期間後、固相支持体を再洗浄して、結合していない検出可能な抗体を除去する。あるいは第2抗体は検出可能でなくてもよい。この場合、第2抗体に結合する第3の検出可能な抗体を添加する。このタイプの”フォワードサンドイッチ”アッセイは、結合が起きたか判定する単純な有／無アッセイであってもよく、あるいは検出可能な抗体の量と対照において得た量の比較により定量的なものにすることができる。そのような”二部位”または”サンドイッチ”アッセイは、Wide, Radioimmune Assay Method, Kirkham編, E. & S. Livingstone, エдинバラ, 1970, pp. 199-206に記載されており、これを本明細書に援用する。

#### 【0112】

他のタイプのイムノメトリーアッセイ法は、いわゆる”同時”および”逆”アッセイである。同時アッセイは單一インキュベーション工程を伴い、この場合、固相支持体に結合した第1抗体、第2の検出可能な抗体、および被験試料を同時に添加する。インキュベーション終了後、固相支持体を洗浄して、結合していないタンパク質を除去する。次いで固相支持体に付随する検出可能な抗体の存在を、通常の”フォワードサンドイッチ”アッセイの場合と同様に判定する。同時アッセイは、被験試料中の抗体の検出にも同様に応用できる。

#### 【0113】

”逆”アッセイは、被験試料への検出可能な抗体の溶液の段階的添加、続いてインキュベーション期間、そして固相支持体に結合した抗体の添加、次いで追加インキュベーション期間を含む。固相支持体を常法により洗浄して、結合していないタンパク質／抗体複合体および未反応の検出可能な抗体を除去する。次いで固相支持体に結合した検出可能な抗体の測定を、”同時”および””フォワード”アッセイの場合と同様に行う。逆アッセイは、被験試料中の抗体の検出にも同様に応用できる。

#### 【0114】

イムノメトリーアッセイの第1成分を、タンパク質を固定化しうるニトロセルロースその他の固相支持体に添加してもよい。被験試料中におけるS I、CDX1またはCDX2の存在を検出するための第1成分は、抗体である。”固相支持体”または”支持体”とは、タンパク質を結合しうる任意の材料を表わすものとする。周知の固相支持体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトが含まれる。支持体の性質は、本発明の目的に關してはある程度可溶性であってもよく、不溶性であってもよい。支持体の形状は、ビーズのような球体、または試験管の内面もしくは棒の外面のような円筒形であってよい。あるいは、シート、試験片などのように表面が平坦であってもよい。当業者には、タンパク質を結合させるための他の多数の適切な”固相支持体”が既知であり、あるいはルーティン実験を用いてそれらを確認できるであろう。好ましい固相支持体は96ウェルマイクロタイプレートである。

#### 【0115】

S I、CDX1またはCDX2の存在を検出するために、検出可能な抗体を用いる。抗体を検出するための幾つかの方法が周知である。

抗体を検出可能に標識しうる方法のひとつは、抗体を酵素に結合させた後、その抗体を酵素免疫アッセイ(EIA)または酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、たとえば捕獲ELISAに使用することによる。次いで酵素がその基質に曝露されると基質と反応し、たとえば分光測光、蛍光測光または視覚的手段で検出できる部分を生成する。抗体を検出可能に標識するのに使用できる酵素には下記のものが含まれるが、これらに限

10

20

30

40

50

定されない：マレイン酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ。当業者には使用できる他の酵素が自明であろう。

#### 【0116】

抗体を検出可能に標識できる他の方法は放射性同位体によるものであり、次いでこれをラジオイムノアッセイ（RIA）に用いる（たとえばWork, T. S. et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, ニューヨーク, 1978 参照；本明細書に援用する）。放射性同位体は、ガンマ計数器もしくはシンチレーション計数器またはオートラジオグラフィーを用いる手段などで検出できる。本発明の目的に特に有用な同位体は、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S および<sup>14</sup>C である。好ましくは同位体は<sup>125</sup>I である。当業者には、同様に使用できる他の放射性同位体が自明であろう。

10

#### 【0117】

抗体を蛍光化合物で標識することもできる。蛍光標識抗体を適切な波長の光で照射すると、その蛍光のためその存在を検出できる。最も一般的に用いられる蛍光標識用化合物には、イソチオシアニン酸フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒドおよびフルオレサミンが含まれる。当業者には、同様に使用できる他の蛍光化合物が自明であろう。

20

#### 【0118】

抗体を蛍光発光金属、たとえば<sup>152</sup>Eu または他のランタニド系列で検出可能に標識することもできる。ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）などの金属キレート基を用いて、これらの金属をタンパク質特異的抗体に結合させることができる。当業者には、同様に使用できる他の蛍光発光金属および他の金属キレート基が自明であろう。

30

#### 【0119】

抗体を化学発光化合物への結合により検出可能に標識することもできる。化学発光標識抗体の存在は、化学反応の経過中に発せられるルミネセンスの存在を検出することにより判定される。特に有用な化学発光標識用化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマチックアリクジニウムエステル、イミダゾール、アリクジニウム塩およびシュウ酸エステルである。当業者には、同様に使用できる他の化学発光化合物が自明であろう。

#### 【0120】

同様に生物発光化合物を用いて抗体を標識できる。生物発光は生物系にみられる一種の化学発光であり、この場合、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を高める。生物発光タンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することにより判定される。標識のために重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。当業者には、同様に使用できる他の生物発光化合物が自明であろう。

40

#### 【0121】

タンパク質特異的な抗体、フラグメントまたは誘導体の検出は、たとえば検出可能な標識が放射性ガンマ線放出体である場合はシンチレーション計数器により行うことができる。あるいは、たとえば標識が蛍光物質である場合は、検出は蛍光光度計により行うことができる。酵素標識の場合、検出は酵素の基質を用いる比色法により行うことができる。基質の酵素反応の程度を同様に調製した標準品と対比した視覚比較により検出を行うこともできる。当業者には、同様に使用できる他の適切な検出方法が自明であろう。

#### 【0122】

あるロットの抗体の結合活性は周知の方法で測定できる。当業者は、ルーティン実験によ

50

り各測定のための操作可能な最適アッセイ条件を決定できるであろう。

**【 0 1 2 3 】**

陽性および陰性対照を実施でき、その場合、被験アッセイと並行して実施するアッセイにそれぞれ既知量のタンパク質を添加し、およびタンパク質を添加しない。当業者は適切な対照を実施するのに必要な知識をもっているであろう。さらに、キットはアッセイを実施するための指示書を含んでもよい。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

**【 0 1 2 4 】**

S I、C D X 1 または C D X 2 を陽性対照用試薬としてルーティンに調製できる。当業者には S I タンパク質を產生および単離しうる多様な方法が自明であろう。

10

**【 0 1 2 5 】**

抗体組成物とは、タンパク質の検出に必要な抗体または抗体類を表わす。たとえば被験試料中の S I、C D X 1 または C D X 2 を検出するために用いる抗体組成物は、S I、C D X 1 または C D X 2 に結合する第 1 抗体、およびそれぞれ第 1 または第 2 抗体に結合する第 2 または第 3 の検出可能な抗体を含む。

**【 0 1 2 6 】**

S I、C D X 1 または C D X 2 の存在について試料を検査するために、たとえば下記に述べるような標準イムノメトリーアッセイを実施できる。S I、C D X 1 または C D X 2 の特異的部分を認識する第 1 抗体を、ある体積の緩衝液中において 96 ウェルマイクロタイタープレートに添加する。プレートを結合が起きるのに十分な期間インキュベートした後、P B S で洗浄して、結合していない抗体を除去する。次いでプレートを P B S / B S A 溶液でブロックして、試料タンパク質がマイクロタイタープレートに非特異的に結合するのを防ぐ。次いで被験試料をウェルに添加し、プレートを結合が起きるのに十分な期間インキュベートする。ウェルを P B S で洗浄して、結合していないタンパク質を除去する。第 1 抗体により認識されない S I、C D X 1 または C D X 2 部分を認識する標識抗体をウェルに添加する。プレートを結合が起きるのに十分な期間インキュベートした後、P B S で洗浄して、結合していない標識抗体を除去する。次いで、結合している標識抗体の量を標準法により測定する。

20

**【 0 1 2 7 】**

被験試料中の S I、C D X 1 または C D X 2 の検出に有用なキットは、抗 S I 抗体を入れた容器、および対照を入れた容器（1 または複数）を含む。対照には、S I、C D X 1 もしくは C D X 2 を含有しない 1 つの対照試料、および / または S I、C D X 1 もしくは C D X 2 を含有する他の対照試料が含まれる。キットに用いる抗体は検出可能に標識されていれば検出できる。検出可能な抗体が標識されていない場合、それをたとえば第 2 の抗体またはプロテイン A により検出でき、あるキットではこれらを別個の容器に入れて提供してもよい。あるキットにおける追加の構成要素には、固体支持体、緩衝液、およびアッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

30

**【 0 1 2 8 】**

免疫アッセイ法は、ホモジナイズした組織試料中、および体液試料、たとえば体液試料の血漿部分または細胞中にある S I、C D X 1 または C D X 2 の検出に有用である。

40

**【 0 1 2 9 】**

ウェスタンプロット法は、非結腸直腸組織または体液中における S I、C D X 1 または C D X 2 の存在を検出することにより、胃癌または食道癌に罹患している個体の診断を補助するのに有用である。ウェスタンプロット法は、癌に罹患している個体からの腫瘍試料中における S I、C D X 1 または C D X 2 の存在を検出するのにも使用できる。ウェスタンプロット法は、試料中に S I、C D X 1 または C D X 2 が存在すればそれに結合する検出可能な抗体を用い、これによりその試料中にこの受容体が存在することを指示する。

**【 0 1 3 0 】**

ウェスタンプロット法は、S a m b r o o k , J . , e t a l . ( 1 9 8 9 ) M o l e

50

cular Cloning : A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory Press , ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーに記載されており、これを本明細書に援用する。これは免疫アッセイ法に類似し、本質的な相異は、試料を抗体に曝露する前に試料中のタンパク質をゲル電気泳動により分離し、次いで分離したタンパク質を抗体で検査する点である。ある好みの態様において、マトリックスは SDS - PAGE ゲルマトリックスであり、マトリックス中の分離したタンパク質を濾紙などのキャリヤーに移した後、抗体で検査する。前記の抗体をウェスタンプロット法にも使用できる。

#### 【 0 1 3 1 】

一般に試料をホモジナイズし、界面活性剤、たとえば Triton - X を用いて細胞を溶解する。次いでこの材料を Sambrook , J . , et al . ( 1989 ) Molecular Cloning : A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory Press , ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーの標準法により分離する。

10

#### 【 0 1 3 2 】

ウェスタンプロット法による被験試料中の SI 、 CDX 1 または CDX 2 の検出に有用なキットは、抗 SI 抗体を入れた容器、および対照を入れた容器（ 1 又は複数）を含む。対照には、 SI を含有しない 1 つの対照試料、および / または SI 、 CDX 1 もしくは CDX 2 を含有する他の対照試料が含まれる。キットに用いる抗体は検出可能に標識されていれば検出できる。検出可能な抗体が標識されていない場合、それをたとえば第 2 の抗体またはプロテイン A により検出でき、あるキットではこれらを別個の容器に入れて提供してもよい。あるキットにおける追加の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

20

#### 【 0 1 3 3 】

ウェスタンプロット法は、ホモジナイズした組織試料中、および体液試料、たとえば体液試料の血漿部分または細胞中にある SI 、 CDX 1 または CDX 2 の検出に有用である。

#### 【 0 1 3 4 】

##### インビボイメージングおよび療法薬

本発明のある態様によれば、個体における転移性結腸直腸癌ならびに原発性および / または転移性の胃または食道の腫瘍を検出、イメージングまたは処置するための組成物およびインビボ方法が提供される。

30

#### 【 0 1 3 5 】

本発明のコンジュゲート組成物を腸管の外側に投与すると、たとえば循環系に投与した場合、それらは腸管を内張りする細胞とは分離された状態を維持し、腸管の外側にある SI 発現細胞にのみ結合する。本発明のコンジュゲート組成物は正常細胞には結合しないが、転移性結腸直腸癌細胞ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌の細胞には結合する。こうして、腸管の外側に投与したコンジュゲート組成物の有効部分が、 SI 発現細胞、たとえば原発性および / または転移性の胃癌または食道癌の細胞へ運搬される。

40

#### 【 0 1 3 6 】

本発明に有用な療法用および診断用医薬組成物は、 SI 発現細胞を特異的にターゲティングするコンジュゲート化合物を含有する。これらのコンジュゲート化合物は SI に結合する部分を含み、これは身体の腸管細胞以外の正常組織の細胞には結合しない。他の組織は SI を発現しないからである。

#### 【 0 1 3 7 】

正常な結腸直腸細胞と異なり、 SI を発現する癌細胞は腸管の外側に投与した物質、たとえば循環系に投与した物質に接近できる。正常組織中の唯一の SI は腸粘膜細胞の頂端側細胞膜中に存在するので、腸管の外側に投与されるターゲティングした癌化学療法薬およびイメージング剤からは腸粘膜バリアによって効果的に隔離される。こうして、本発明

50

のコンジュゲート化合物を腸管の外側に導入することにより、たとえばコンジュゲート化合物を含む医薬組成物を循環系に投与することにより、これらの化合物で転移性結腸直腸癌ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞をターゲティングできる。

【0138】

当業者は、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体を同定できる。結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと診断された個体において、転移を疑い、転移した細胞の根絶を積極的に試みるのは異例ではなく、場合によっては標準療法である。本発明は、イメージングのための医薬組成物および方法を提供する。これにより原発性および転移性の疾患をより精確に診断できる。さらに本発明は、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異的にターゲティングおよび排除するための療法薬を含む医薬組成物および方法を提供する。さらに本発明は、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異的に排除するための療法薬を含む医薬組成物および方法を提供する。

10

【0139】

本発明のコンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および／または転移性の胃または食道の腫瘍に罹患している個体を診断または処置するのに使用できる。

【0140】

20

本発明は、コンジュゲート組成物中のS I結合部分の利用に依存する。S I結合部分は、本質的にコンジュゲート組成物の、S Iに対するリガンドとして作用する、したがってそれに特異的に結合する部分である。コンジュゲート組成物は、S I結合部分と結合した有効部分をも含む；有効部分は、細胞のイメージング、ターゲティング、中和、または死滅に有用な有効物質である。

【0141】

本発明によれば、S I結合部分はコンジュゲート組成物のS Iリガンド部分である。ある態様において、S Iリガンドは抗体である。

ある好ましい態様において、コンジュゲート化合物は抗S I抗体を含むS I結合部分を含む。

30

【0142】

S I結合部分として用いるS Iリガンドは可能な限り小さいことが好ましい。たとえばS Iリガンドは非ペプチド低分子または低分子ペプチド、好ましくは25アミノ酸未満、より好ましくは20アミノ酸未満のものである。ある態様において、コンジュゲート組成物のS I結合部分を構成するS Iリガンドは15アミノ酸未満である。10アミノ酸未満を含むS I結合ペプチド、また5アミノ酸未満を含むS I結合ペプチドを、本発明によるS I結合部分として使用できる。S I結合部分として用いられる、より大きな分子を含むものも本発明の範囲に含まれ、これにはS Iに特異的に結合する抗体などの分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0143】

40

さらにS Iリガンドは、普通は酵素によりプロセシングされる任意の周知の炭水化物基質を含むことができる。これには、酵素開裂部位により認識されるように工学的に処理されているがプロセシングに対しては抵抗性である基質が含まれる。Horris S., et al., J. Med. Chem., 29: 1038-1046 (1986) (本明細書に援用する)に、そのような化合物の例が示されている。

【0144】

S I結合部分として用いられるS Iリガンドは、多様な既知のコンビナトリアルライブラリースクリーニング法、たとえば本明細書の実施例1に示す方法で同定できる。

【0145】

ペプチドおよび非ペプチド組成物の両方を試験してそれがS Iリガンドであるか否かを判

50

定し、コンジュゲート組成物を試験してそれがS I結合活性をもつか否かを判定するアッセイ法を使用できる。S Iに特異的に結合する組成物は、S Iに結合することが分かっている抗体を用いる競合結合アッセイにより同定できる。競合結合アッセイ法は薬理学における標準法であり、入手しやすい出発物質を用いて当業者が容易に実施できる。

#### 【0146】

S Iは合成、組換え、または天然源からの単離により調製できる。

たとえば固相合成を用いる場合、保護または誘導体化したアミノ酸を保護されていないカルボキシル基またはアミノ基により不活性固体支持体に結合させる。次いでこのアミノ基またはカルボキシル基の保護基を選択的に除去し、適切に保護された相補的（アミノまたはカルボキシル）基をもつ、配列中の次のアミノ酸を混和し、既に固体支持体に結合している残基と反応させる。次いでこの新たに付加されたアミノ酸残基からアミノ基またはカルボキシル基の保護基を除去し、次のアミノ酸（適切に保護されたもの）を添加し、以下同様に操作する。目的アミノ酸がすべて適切な配列で結合した後、残りの末端基および側鎖基の保護基（および固体支持体）を逐次または同時に除去すると、最終ペプチドが得られる。本発明のペプチドは、好ましくはベンジル化またはメチルベンジル化されたアミノ酸を含まない。合成の途中でそのような保護基部分を用いてもよいが、ペプチドの使用前にそれらを除去する。他の箇所に記載するように、コンホーメーションを維持するために分子内結合を形成する追加反応が必要な場合もある。

10

#### 【0147】

S Iに対する抗体をルーティンに調製し、本発明によりS Iリガンド同定のための競合アッセイに、またはコンジュゲート化合物の出発物質として使用できる。

20

#### 【0148】

本発明によれば、有効部分は療法薬またはイメージング剤であってよい。S Iリガンドで癌細胞を特異的にターゲティングしうること、およびそのようなリガンドを多様な有効物質とコンジュゲートしうることの利点が、当業者には自明であろう。

#### 【0149】

S I結合部分にコンジュゲートした場合にS I発現細胞、たとえば胃癌または食道癌の細胞へ特異的に運搬される有効部分として有用な化学療法薬は、一般に化学合成により製造される低分子化学物質である。化学療法薬には細胞毒性および細胞分裂抑制薬物が含まれる。化学療法薬には、トランスフォーミング状態から分化状態への反転など他の作用を細胞に及ぼすもの、または細胞複製を阻害するものも含まれる。化学療法薬の例には、一般的な細胞毒性および細胞分裂抑制薬物、たとえば下記のものが含まれる：メトトレキセート（アメトブテリン）、ドキソルビシン（アドリマイシン）、ダウノルビシン、シトシニアラビノシド、エトポシド、5 - 4 フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシリ、および他のナイトロジェンマスター（たとえばシクロホスファミド）、シスプラチン、ピンデシン（および他のピンカアルカロイド）、マイトマイシン、およびブレオマイシン。他の化学療法薬には下記のものが含まれる：ピューロチオニン（purothionin、オオムギ粉オリゴペプチド）、マクロモマイシン、1 , 4 - ベンゾキノン誘導体およびトレニモン（trenimon）。

30

#### 【0150】

毒素は有効部分として有用である。毒素をS I結合部分とコンジュゲートさせると、コンジュゲート組成物はS I結合部分によりS I発現細胞、たとえば胃癌または食道癌の細胞へ特異的に運搬され、毒素部分が細胞を死滅させる。毒素は一般に、細菌、植物などを含めた種々の生物の複雑な有毒産物である。毒素の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：リシン（ricin）、リシンA鎖（リシン毒素）、シュードモナス（Pseudomonas）外毒素（PE）、ジフテリア毒素（DT）、クロストリジウム・パーフリンジエンス（Clostridium perfringens）ホスホリバーゼC（PLC）、ウシ臍臓リボヌクレアーゼ（BPR）、アメリカヤマゴボウ（pokerweed）抗ウイルスタンパク質（PAP）、アブリン（abrin）、アブリンA鎖（トウアズキ毒素）、コブラ毒因子（CVF）、ゲロニン（gelonin；GEL）、

40

50

サポリン ( s a p o r i n ; S A P ) 、 モデッシン ( m o d e c c i n ) 、 ビスキュミン ( v i s c u m i n ) およびボルケンシン ( v o l k e s i n ) 。上記のようにタンパク質毒素を S I 結合ペプチドと共に用いる場合、コンジュゲート組成物は組換え D N A 法により製造できる。要約すると、キメラ遺伝子上に S I リガンドと毒素の両方をコードする組換え D N A 分子を構築できる。このキメラ遺伝子が発現すると、S I 結合部分と有効部分を含む融合タンパク質が産生される。タンパク質毒素は非ペプチド結合により S I 結合ペプチドとコンジュゲート化合物を形成するのにも有用である。

#### 【 0 1 5 1 】

さらに、有効物質を癌の処置に利用するための他の方法がある。たとえば、S I 結合部分および有効酵素である有効部分を含有するコンジュゲート組成物を製造できる。S I 結合部分はコンジュゲート組成物を腫瘍細胞へ特異的に局在化させる。この酵素により有効薬物に変換されうる不活性プロドラッグを患者に投与する。腫瘍に局在化したプロドラッグのみが酵素により有効薬物に変換される。酵素 / プロドラッグ対の例には、アルカリ性ホスファターゼ / リン酸エトボシドが含まれる。そのような例では、アルカリ性ホスファターゼを S I 結合性リガンドにコンジュゲートさせる。コンジュゲートした化合物を投与すると、癌細胞に局在化する。リン酸エトボシド ( プロドラッグ ) と接触すると、リン酸エトボシドは化学療法薬エトボシドに変換され、癌細胞に取り込まれる。

#### 【 0 1 5 2 】

放射線増感剤は、放射線に対する細胞の感受性を高める物質である。放射線増感剤の例には、ニトロイミダゾール、メトロニダゾール ( metronidazole ) 、ミソニダゾール ( misonidazole ) が含まれる ( 参照 : DeVita , V . T . Jr . , Harrison's Principles of Internal Medicine , p . 68 , McGraw-Hill Book 社 , ニューヨーク , 1983 ; 本明細書に援用する ) 。有効部分として放射線増感剤を含むコンジュゲート化合物を投与すると、結腸直腸癌細胞ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌の細胞に局在化する。この個体を放射線照射すると、放射線増感剤が " 励起 " され、細胞を死滅させる。

#### 【 0 1 5 3 】

放射線療法またはイメージング操作に有用な医薬組成物中に放射性核種を使用できる。放射線療法において毒素として有用な放射性核種の例には、下記のものが含まれる :

#### 【 0 1 5 4 】

#### 【 化 3 】

$^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  および  $^{212}\text{B}$

#### 【 0 1 5 5 】

当業者が使用する他の放射性核種には、下記のものが含まれる :

#### 【 0 1 5 6 】

#### 【 化 4 】

$^{32}\text{P}$  および  $^{33}\text{P}$ ,  $^{71}\text{Ge}$ ,

$^{77}\text{As}$ ,  $^{103}\text{Pb}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{131}\text{Cs}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{191}\text{Os}$ ,  $^{193}\text{Mn}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,

#### 【 0 1 5 7 】

全ベータマイナスおよび / またはオージェエミッター。若干の好ましい放射性核種には  $^{90}\text{Y}$  ,  $^{131}\text{I}$  ,  $^{211}\text{At}$  、および  $^{212}\text{Pb}$  /  $^{212}\text{Bi}$  が含まれる。

本発明によれば、有効部分はイメージング剤であってもよい。イメージング剤は有用な診断手段であり、かつ癌細胞の位置を同定するのに用いられる手段である。イメージングは当業者に周知の多数の方法で実施でき、そのような方法に有用な適切なイメージング剤を周知の手段で S I リガンドにコンジュゲートさせることができる。イメージングはたとえばラジオシンチグラフィー、核磁気共鳴イメージング ( M R I ) またはコンピュータ断層撮影 ( C T スキャン ) により実施できる。最も一般的に用いられる放射性核種イメージン

10

20

30

40

50

グ剤には、放射性ヨウ素およびインジウムが含まれる。CTスキャンによるイメージングには、重金属、たとえば鉄キレートを使用できる。MRIスキャンにはガドリニウムまたはマンガンのキレートを使用できる。さらに、酸素、窒素、鉄、炭素またはガリウムの陽電子エミッターを用いる陽電子放射断層撮影法(PET)も可能である。イメージング法に有用な放射性核種の例には、下記のものが含まれる：

【0158】

【化5】

$^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Rb}/^{81\text{M}}\text{Kr}$ ,

$^{87\text{M}}\text{Sr}$ ,  $^{99\text{M}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113\text{M}}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{127}\text{Cs}$ ,  $^{129}\text{Cs}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{132}\text{I}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ および $^{206}\text{Bi}$ .

10

【0159】

コンジュゲート組成物は非免疫原性であるか、または免疫原性がきわめて低いことが好ましい。したがって、SI結合部分は低分子で免疫原性が少ないかまたは非免疫原性のペプチドまたは非ペプチドであることが好ましい。SI結合部分は、ヒト化もしくは靈長類化された抗体、またはヒト抗体であってよい。

【0160】

SIリガンドは、当業者が多大な実験なしに容易に実施しうる多様な周知の方法で有効物質にコンジュゲートされる。SIリガンドを有効物質にコンジュゲートさせるために用いられる方法は、SIリガンドおよび有効物質の分子の性質に依存する。SIリガンドと有効物質をコンジュゲートさせて単一分子を形成した後、そのコンジュゲート分子がそれらの部分の活性を保持しているかを確認するためにアッセイを行うことができる。前記の競合結合アッセイ法を用いて、SI結合部分がコンジュゲート化合物としてその結合活性を保持することを確認できる。同様に、有効物質の各タイプについての種々のアッセイ法を用いて、有効部分の活性を試験することができる。放射性核種はコンジュゲーションに関係なくそれらの活性、すなわち放射能を保持する。毒素、薬物およびターゲティング剤などの有効物質に関しては、非コンジュゲート形のこれらの化合物の活性を証明する標準アッセイ法を用いて、活性が保持されていることを確認できる。

20

【0161】

コンジュゲーションは、SIリガンドと有効物質の間で直接行ってもよく、あるいは結合用の中間分子基をSIリガンドと有効物質の間に付与してもよい。架橋剤は、各部分に結合部位を付与することによりコンジュゲーションを促進するのに特に有用である。架橋剤は、一方が他方の活性を妨害するのを防ぐために、これらの部分を互いに分離するスペーサーとして作用する追加分子基を含むことができる。

30

【0162】

当業者は周知の方法を用いてSIリガンドを化学療法薬にコンジュゲートさせることができる。たとえばMagerstadt, M., Antibody Conjugates and Malignant Disease (1991) CRC Press, 米国 Boca Raton, pp. 110 - 152 (本明細書に援用する)には、種々の細胞分裂抑制薬物を抗体のアミノ酸にコンジュゲートさせる方法が教示されている。そのような反応は、適切なリンカーを用いてSIリガンド(抗SI抗体を含む)に化学療法薬をコンジュゲートせるのに適用できる。癌の処置に現在用いられている大部分の化学療法薬は、タンパク質と直接架橋できる官能基をもつ。たとえばメトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、シスプラチン、ビンデシン、マイトイシンおよびブレオマイシン上には遊離アミノ基があり、一方メトトレキセート、メルファンおよびクロラムブシリ上には遊離カルボン酸基がある。これらの官能基、すなわち遊離アミノ基および遊離カルボン酸基は、多様なホモ二官能性およびヘテロ二官能性架橋剤のターゲットであり、これらの薬物を抗体の单一遊離アミノ基に直接架橋させることができる。たとえば遊離アミノ基をもつSIリガンドを、遊離アミノ基をもつ有効物質、たとえばメトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、シスプラチン、ビンデシン、マイトイシンおよびブレオマイシン、またはアルカリ性ホスフ

40

50

アターゼ、またはタンパク質もしくはペプチドベースの毒素に架橋するための方法のひとつは、好ましくは炭素鎖スペーサーをもつホモ二官能性スクシンイミジルエステル、たとえばスペリン酸ジスクシンイミジル( Pierce 社、イリノイ州ロックフォード)を用いる。開裂性のコンジュゲート化合物が必要な場合、3,3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオナート; Pierce 社)を用いて同プロトコルを使用する。

#### 【0163】

ペプチドまたはタンパク質である S I リガンドをペプチドベースの有効物質、たとえば毒素にコンジュゲートさせるためには、標準ペプチド合成または組換え DNA 法により、S I リガンドおよび毒素を单一の融合タンパク質として製造できる。標準ペプチド合成及び組換え DNA 法は両方とも当業者がルーティンに実施できる。あるいは、2 種類のペプチド、すなわち S I リガンドペプチドとペプチドベースの毒素を別個のペプチドとして製造および / または単離し、そして架橋剤によりコンジュゲートさせることもできる。化学療法薬を含有するコンジュゲート組成物に関しては、S I 結合ペプチドの受容体結合機能を保持しつつこの分子の単一遊離アミノ基を修飾できることを、S I 結合ペプチドと毒素のコンジュゲーションに利用できる。

#### 【0164】

当業者は周知の方法を用いて S I リガンドを放射性核種にコンジュゲートさせることができる。たとえば Magerstadt, M. (1991), Antibody Conjugates and Malignant Disease, CRC Press, フロリダ州 Boca Raton; および Barchel, S.W. and Rhodes, B.H. (1983) Radioimaging and Radiotherapy, Elsevier, ニューヨーク州ニューヨーク(それぞれを本明細書に援用する)には、種々の療法用および診断用放射性核種を抗体のアミノ酸にコンジュゲートさせる方法が教示されている。

#### 【0165】

本発明は、本発明のコンジュゲート化合物および医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は当業者が配合できる。適切な医薬用キャリヤーは、この分野の標準参考文献である Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol に記載されており、これを本明細書に援用する。本発明方法を実施するに際し、本発明のコンジュゲート化合物を単独で、または他の診断薬、療法薬または添加剤と組み合わせて使用できる。そのような添加剤には、賦形剤、たとえば着色剤、安定剤、浸透圧調節剤および抗菌薬が含まれる。医薬組成物は好ましくは無菌であり、かつ発熱物質を含有しない。

#### 【0166】

本発明のコンジュゲート組成物は、たとえば医薬的に許容できる非経口ビヒクリと共に液剤、懸濁液剤または乳剤として配合できる。そのようなビヒクリの例は、水、生理食塩水、リングル液、デキストロース溶液、および 5 % ヒト血清アルブミンである。リポソームも使用できる。ビヒクリは、等張性を維持する添加剤(たとえば塩化ナトリウム、マンニトール)および化学的安定性を維持する添加剤(たとえば緩衝剤および保存薬)を含有してもよい。配合物は常法により滅菌される。たとえば注射による投与に適した非経口組成物は、1.5 重量% の有効成分を 0.9 % 塩化ナトリウム溶液に溶解することにより調製される。

#### 【0167】

本発明による医薬組成物は、1 回量または多数回量として投与できる。本発明の医薬組成物は、個々の療法薬として、または他の療法と組み合わせて投与できる。本発明の療法薬を通常の療法と組み合わせて、逐次または同時に投与できる。

#### 【0168】

本発明の医薬組成物は、コンジュゲート化合物をターゲット細胞に到達させうる任意の手段で投与できる。ある態様において、投与経路には静脈内、動脈内、腹腔内、腫瘍が存在する臓器の血液供給中への局所投与、または腫瘍自体への直接投与よりなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れるものが含まれる。コンジュゲート化合物は、術中スプレーのほか、クモ膜下（髄腔内）、脳室内、定位(stereotacticaly)、肝内（たとえば門脈を経て）、吸入により、および胸膜内に投与できる。静脈内投与が好ましい投与様式である。これを注入ポンプの補助により達成してもよい。

#### 【0169】

投与量は下記のような要因に応じて異なる：有効部分の性質；コンジュゲート組成物の性質；薬物動態特性；投与の様式および経路；レシピエントの年齢、健康状態および体重；症状の性質および程度；併用処置の種類；ならびに処置の頻度。

#### 【0170】

コンジュゲート化合物は1又はそれより多くのSI分子を含む細胞を特異的にターゲティングするので、化学療法薬または毒素を含むコンジュゲート化合物は、コンジュゲートしていない有効物質としてこれらの化学療法薬または毒素を投与する場合に使用する量より少ない用量で、好ましくは最高100倍少ない量の有効物質を含有する用量で投与される。ある態様においては、化学療法薬または毒素を含むコンジュゲート化合物は、コンジュゲートしていない有効物質として投与される化学療法薬または毒素の用量より10～100倍少ない量の有効物質を含有する用量で投与される。適切な用量を判定するために、化合物の量を重量ではなくモルで測定することが好ましい。この方法では、異なるSI結合部分の重量変動が計算に影響を及ぼすことがない。本発明のコンジュゲート組成物においてSI結合部分と有効部分が1：1の比率であるとすれば、コンジュゲートしていない化合物の投与モル数と比較して少ないモル数、好ましくは最高100倍少ないモル数のコンジュゲート化合物を投与すればよい。10

#### 【0171】

一般に化学療法薬コンジュゲートを多数回の分割量で静脈内投与する。

一般に、静脈内最高20g／回のメトトレキセートがコンジュゲートしていない形で投与される。メトトレキセートを本発明のコンジュゲート化合物の有効部分として投与する場合、用量は10～100倍少なくなる。たとえば各コンジュゲート化合物が1つのSI結合部分に対して1モルのメトトレキセートをコンジュゲートしているとすれば、コンジュゲート化合物の全投与量中には約0.2～2.0gのメトトレキセートが存在し、したがって投与される。ある態様においては、コンジュゲート化合物の全投与量中に約200mg～2gのメトトレキセートが存在し、したがって投与される。20

#### 【0172】

イメージング剤として有用な医薬組成物中において放射性同位体である有効部分に結合したSI結合部分を含むコンジュゲート組成物を投与するために、各SI結合部分が1つの放射性有効部分に結合しているものとする。放射性同位体の投与量はその放射性同位体に依存する。当業者は、有効部分として用いるその放射性核種の比放射能およびエネルギーに基づいて、コンジュゲート化合物の投与量を容易に決定できる。一般に1回当たり0.1～100ミリキュリー、好ましくは1～10ミリキュリー、最も一般的には2～5ミリキュリーのイメージング剤が投与される。たとえばSI結合部分および放射性部分を含むコンジュゲート化合物を含むイメージング剤として有用な本発明による医薬組成物は、0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは1～10ミリキュリー、ある態様において好ましくは2～5ミリキュリー、ある態様においてより好ましくは1～5ミリキュリーを含む。投与量の例には下記のものが含まれる： $^{131}\text{I}$  = 1回当たり0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは1～10ミリキュリー、ある態様においては2～5ミリキュリー、ある態様においては約4ミリキュリー； $^{111}\text{In}$  = 1回当たり0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは1～10ミリキュリー、ある態様においては1～5ミリキュリー、ある態様においては約2ミリキュリー； $^{99\text{m}}\text{Tc}$  = 1回当たり0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは5～75ミリキュリー、ある態様においては10～50ミリキュリー、ある態様においては約27ミリキュリー。Wessels B.W. and R.D.Rogus (1984) Med. Phys., 11: 638およびKwok, C.S., et al. (1985) Med. P40

h y s . , 1 2 : 4 0 5 ( 両者を本明細書に援用する ) には、診断用および療法用コンジュゲートに関する詳細な用量計算が示されており、放射性コンジュゲート化合物を含有する本発明の医薬組成物の調製に際してこれを採用できる。

**【 0 1 7 3 】**

本発明の 1 様様は、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体の処置方法に関する。そのような個体は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤ならびに S I 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含む医薬組成物をその個体に投与することにより処置でき、その際、有効部分は放射安定性療法薬である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤、ならびに S I 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は放射安定性有効物質であり、 S I 結合部分は抗体である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤、ならびに S I 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は下記よりなる群から選択される放射安定性有効物質である：メトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5 - 4 フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシル、シスプラチン、ビンデシン、マイトイシン、ブレオマイシン、ピューロチオニン、マクロモマイシン、1 , 4 - ベンゾキノン誘導体、トレニモン、リシン、リシン A 鎖、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、クロストリジウム・パーフリンジェンスホスホリパーゼ C 、ウシ臍臓リボヌクレアーゼ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、アブリン A 鎖、コブラ毒因子、ゲロニン、サボリン、モデッシン、ビスキュミン、ボルケンシン、アルカリ性ホスファターゼ、ニトロイミダゾール、メトロニダゾールおよびミソニダゾール。処置される個体は、転移した結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと診断され、あるいは原発性の結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと診断され、まだ何らかの転移が検出されていない場合は前向処置を受けていてもよい。本発明の医薬組成物は、療法有効量のコンジュゲート組成物を含有する。療法有効量は、その個体に致死的な副作用を与えることなく癌細胞に細胞毒性または細胞分裂抑制作用を及ぼすのに有効な量である。

**【 0 1 7 4 】**

本発明の 1 様様は、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体の処置方法に関する。そのような個体は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤ならびに S I 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含む医薬組成物をその個体に投与することにより処置でき、その際、有効部分は放射性である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤、ならびに S I 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は放射性有効物質であり、 S I 結合部分は抗体である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤、ならびに S I 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は下記よりなる群から選択される放射性物質である：

**【 0 1 7 5 】**

**【 化 6 】**

$^{47}\text{Sc}$ ,  $^{57}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,

$^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{B}$ ,  $^{32}\text{P}$  および  $^{33}\text{P}$ ,  $^{71}\text{Ge}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{103}\text{Pb}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{131}\text{Cs}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{191}\text{Os}$ ,  $^{193}\text{MPt}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{32}\text{P}$  and  $^{33}\text{P}$ ,  $^{71}\text{Ge}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{103}\text{Pb}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{131}\text{Cs}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{191}\text{Os}$ ,  $^{193}\text{MPt}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,

**【 0 1 7 6 】**

全ベータマイナスおよび / またはオージェエミッター。処置される個体は、転移した癌を

10

20

30

40

50

伴うと診断され、あるいは局在性癌を伴うと診断され、そして、まだ検出されていない何らかの転移が存在しうる場合に前向処置を受けていてもよい。本発明の医薬組成物は、療法有効量のコンジュゲート組成物を含有する。療法有効量は、その個体に致死的な副作用を及ぼすことなく転移性結腸直腸癌ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞に細胞毒性または細胞分裂抑制作用を引き起こすのに有効な量である。本発明の組成物を原発性腫瘍中へ腫瘍内注射してもよい。

## 【0177】

本発明の1態様は、原発性または転移性の結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体において、放射線イメージング法により転移性結腸直腸癌ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞を検出する方法に関する。個体は、原発性の胃または食道の腫瘍を伴う疑いがあってもよく、S Iに結合するイメージング剤を個体に投与することによりその診断を確認できる。胃または食道における局在化を検出することにより、腫瘍をイメージングできる。個体は、転移した結腸直腸癌、胃癌または食道癌に罹患していると診断されていてもよく、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤ならびにS I結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物（有効部分は放射性である）を含む医薬組成物をその個体に投与し（好ましくは静脈内投与による）、局在化した放射能の蓄積または凝集の存在（S Iを含む細胞の存在を指示する）を検出することにより、その転移した結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞を検出できる。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤、ならびにS I結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は放射性物質であり、S I結合部分は抗体である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリヤーまたは希釈剤ならびにS I結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は下記よりなる群から選択される放射性物質である：放射性重金属、たとえば鉄キレート、放射性ガドリニウムまたはマンガンキレート、酸素、窒素、鉄、炭素またはガリウムの陽電子エミッター、

## 【0178】

## 【化7】

$^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Rb}$ / $^{81}\text{Mg}$ ,  $^{87}\text{MSr}$ ,  $^{99}\text{MTc}$ ,  
 $^{111}\text{In}$ ,  $^{113}\text{Mn}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{127}\text{Cs}$ ,  $^{129}\text{Cs}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{132}\text{I}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ および $^{206}\text{Bi}$

## 【0179】

処置される個体は、転移した結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと診断され、あるいは局在性の結腸直腸癌、胃癌または食道癌を伴うと診断され、そして、まだ検出されていない何らかの転移が存在しうる場合に前向処置を受けていてもよい。本発明の医薬組成物は、療法有効量のコンジュゲート組成物を含有する。診断有効量は、その個体に致死的な副作用を及ぼすことなく、S Iを含む細胞のある身体部位を検出できる量である。

## 【0180】

## 光力学的イメージングおよび療法

本発明のある態様によれば、S I結合部分を光活性化したイメージング剤または療法薬にコンジュゲートさせる。Maier A., et al., Lasers in Surgery and Medicine, 26: 461 - 466 (2000)（本明細書に援用する）には、光力学的療法の例が示されている。QLT社（プリティッシュコロンビア州バンクーバー）は、S Iリガンドに結合しうる感光性有効物質を販売している。そのようなコンジュゲート化合物を光力学的療法およびイメージングプロトコルに用いて、S I結合したコンジュゲート物質を活性化し、こうして腫瘍細胞へターゲティングすることができる。ある態様においては、コンジュゲート化合物を術中スプレーとして適用し、次いで光照射して、S I発現細胞に結合している化合物を活性化する。

## 【0181】

ある態様において、光力学的物質は発蛍光団またはポルフィリン類である。ポルフィリンの例には、ヘマトポルフィリン誘導体（HPD）およびポルフィマーナトリウム（porphyrin）

10

20

30

40

50

fimer sodium) (Photofrin; 登録商標) が含まれる。第2世代の感光剤はBPDベルテポルフィン(verteporfin)である。ある態様において、発蛍光団はテトラメチルロタミンである。レーザーは一般にポルフィリンを活性化するのに用いられる主な光源である。発光ダイオード(LED)および蛍光光源も場合により用いられる。

【0182】

術中スプレーのほか、コンジュゲート化合物をクモ膜下(髄腔内)、脳室内、定位(stereotactically)、肝内(たとえば門脈を経て)、吸入により、および胸膜内に投与できる。

【0183】

胃癌または食道癌の細胞全般をターゲティングした薬物運搬

本発明の他の態様は、SIを含む細胞、たとえば転移性結腸直腸癌ならびに原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞へ療法薬を運搬するSIリガンドを含む非コンジュゲート組成物およびコンジュゲート組成物に関する。ある態様において、療法薬は薬物または毒素、たとえば下記のものである: メトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5-4フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシリ、シスプラチニン、ビンデシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、ピューロチオニン、マクロモマイシン、1,4-ベンゾキノン誘導体、トレニモン、リシン、リシンA鎖、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、クロストリジウム・パーフリンジエンスホスホリパーゼC、ウシ臍臓リボヌクレアーゼ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、アブリンA鎖、コブラ毒因子、ゲロニン、サポリン、モデッシン、ビスキュミン、ボルケンシン、アルカリ性ホスファターゼ、ニトロイミダゾール、メトロニダゾールおよびミソニダゾール。遺伝子材料を癌細胞へ運搬して、免疫系がターゲティングしうる抗原を産生させ、あるいは細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害するタンパク質を産生させる。ある態様においては、SIリガンドを用いて、欠損している内因性遺伝子の代替となる核酸分子をコードする核酸または療法タンパク質をコードする核酸を運搬する。ある態様においては、本発明の組成物を遺伝子療法プロトコルに使用し、遺伝子欠損の補充に必要および/または望まれる遺伝子材料を個体へ運搬する。

【0184】

ある態様においては、SIリガンドを運搬ビヒクルと結合させ、またはそれに取り込ませ、これによりその運搬ビヒクルを特異的ターゲティング運搬ビヒクルに変換する。たとえばSI結合ペプチドをウイルス粒子の外部に組み込ませ、そのウイルスをSI保有細胞特異的ウイルスにすることができる。同様に、ウイルスのコートタンパク質が活性SI結合ペプチドを含有する融合タンパク質として産生され、これがウイルス粒子の外側に露出するかまたは他の形で接近可能となるように工学的に処理し、これによりそのウイルスをSI保有細胞特異的ウイルスにすることもできる。ある態様においては、SIリガンドをリポソームに組込ませ、または他の形で取り込ませ、その際SIリガンドがリポソームの外側に露出するかまたは他の形で接近可能となり、これによりそのリポソームをSI保有細胞へ特異的にターゲティングさせることもできる。

【0185】

本発明のこの態様におけるコンジュゲート組成物または非コンジュゲート組成物中の有効物質は、薬物、毒素または核酸分子である。核酸はRNAまたは好ましくはDNAである。ある態様において核酸分子は、細胞中に存在すると望ましくないタンパク質の産生が阻害されるアンチセンス分子であるか、あるいはそのアンチセンス配列をコードする。ある態様において核酸分子は、細胞中に存在すると望ましくないタンパク質の産生が阻害されるリボザイムをコードする。ある態様において核酸分子は、細胞において産生されるのが望ましいタンパク質またはペプチドをコードする。ある態様において核酸分子は、ターゲティングした細胞中で有効な遺伝子の機能性コピーをコードする。核酸分子は、細胞におけるコード配列発現に必要な調節エレメントに機能可能な状態で結合していることが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0186】

リポソームは脂質からなる小胞である。S I 保有細胞において発現するのが望まれるタンパク質をコードする遺伝子構築体を、これらの小胞の中心に導入する。この小胞の外殻がS I リガンドを含む。L i p o s o m e s , V o l . 1 , 2 , 3 , C R C P r e s s 社, フロリダ州 Boca Raton (本明細書に援用する)には、外殻に抗体を含有するリポソーム封入有効物質の調製が示されている。本発明においては、S I リガンド、たとえば抗 S I 抗体を外殻と結合させる。内側の有効物質と共に S I リガンドをリポソームのマトリックス中に含む非コンジュゲート組成物には、S I リガンドが好ましくは抗体である組成物が含まれる。

## 【0187】

ある態様においては、癌細胞への正常コピー数の p 5 3 腫瘍サプレッサー遺伝子の運搬が、S I リガンドを用いてこの遺伝子療法薬をターゲティングさせることにより達成される。p 5 3 腫瘍サプレッサー遺伝子の変異は、多くの癌の発症に主要な役割を果たすと思われる。この疾患を克服する方法のひとつは、変異数のこの遺伝子を発現している癌細胞へ正常コピー数のこの遺伝子を運搬するものである。正常な p 5 3 腫瘍サプレッサー遺伝子を含む遺伝子構築体を、S I リガンドを含むリポソームに取り込ませる。この組成物は腫瘍へ運搬される。S I リガンドは正常遺伝子を含有するリポソームを特異的にターゲティングおよび方向づけして、p 5 3 腫瘍サプレッサー遺伝子の変異により生じた病変を補正する。遺伝子構築体の作製は当業者が容易になしうる。本発明によれば、本発明のS I リガンドを用いることにより、そのような構築体を特異的にターゲティングさせることができる。本発明の組成物は、運搬ビヒクルと結合したS I リガンド、たとえば抗 S I 抗体、および腸管の細胞において産生することが望まれるタンパク質のコード配列がその細胞における発現に必要な調節配列に結合した遺伝子構築体を含む。腸管の細胞が取り込むためには、組成物を経口または浣腸により投与する。これにより組成物は腸管に進入し、S I を含む細胞と接触する。運搬ビヒクルはS I リガンドによりS I と結合し、ビヒクルが細胞にインターナリゼーションされ、あるいは他の形で有効物質 / 遺伝子構築体が細胞に取り込まれる。インターナリゼーションされると、構築体はその個体に療法効果をもたらすことができる。

## 【0188】

## アンチセンス

本発明は、アンチセンス化合物を結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞へ特異的に運搬し、これにより望ましくない遺伝子発現が起きている細胞における遺伝子発現を停止させ、そのような発現が起きていない細胞には不都合な影響を及ぼさない手段を提供することにより結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞を予防および治療するのに有用な、組成物、キットおよび方法を提供する。

## 【0189】

本発明のコンジュゲート組成物は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞を含めたS I 発現細胞をターゲティングするのに有用である。本発明のコンジュゲート組成物は非結腸直腸由来の細胞には結合しない。S I を含まない非結腸直腸細胞は、本発明のコンジュゲート組成物を取り込まない。正常な結腸直腸細胞はS I を含み、本発明組成物を取り込むであろう。本発明は、アンチセンス組成物を正常および癌性の結腸直腸細胞ならびに胃癌または食道癌の細胞へ運搬する組成物および方法を提供する。

## 【0190】

本発明は、正常および癌性の結腸直腸細胞ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌の細胞を化合物の有効部分に曝露し、それらの細胞のみがコンジュゲート化合物により影響される、細胞特異的方法を提供する。S I 結合部分は正常および癌性の結腸直腸細胞ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌の細胞に結合する。コンジュゲート化合物がこれらの細胞に結合するとインターナリゼーションされ、分子のアンチセンス部分を含めたコンジュゲート化合物の運搬が行われる。正常な結腸直腸細胞中にコンジュゲート化合物が存在してもそれらの細胞には影響を与えない。コンジュゲート

10

20

30

40

50

化合物の有効部分を構成するアンチセンス分子が相補的である癌関連遺伝子は、発現していないからである。しかし結腸直腸癌細胞の場合、コンジュゲート化合物の有効部分を構成するアンチセンス分子が相補的である癌遺伝子が発現している。結腸直腸癌細胞中にコンジュゲート化合物が存在すると、癌細胞の転写または翻訳を阻害または阻止する作用をし、トンラスフォームした表現型はこれにより減少し、または排除される。

#### 【0191】

本発明を利用して、原発性および／または転移性の結腸直腸癌、胃癌または食道癌を克服し、正常な結腸細胞中にトンラスフォームした表現型が出現するのを阻止できる。したがって本発明は治療にも予防にも利用できる。

#### 【0192】

当業者は、胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体を容易に同定できる。胃癌または食道癌を伴うと診断された個体において、転移を疑い、転移細胞の根絶を積極的に試みるのは標準療法である。本発明は、転移性結腸直腸癌細胞ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異的にターゲティングおよび排除するための医薬組成物および方法を提供する。さらに本発明は、転移性結腸直腸癌細胞ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異的に排除するための療法薬を含む医薬組成物および方法を提供する。

10

#### 【0193】

本発明は、コンジュゲート組成物中にS I結合部分を使用することに依存する。S I生成物結合部分は本質的にコンジュゲート組成物の一部であり、S Iに対するリガンドとして作用し、したがってこれらの受容体に特異的に結合する。コンジュゲート組成物は、S I結合部分と結合した有効部分をも含有する；有効部分は、その発現が癌に関連する遺伝子の転写または翻訳による発現を阻害または阻止するのに有用なアンチセンス組成物である。

20

#### 【0194】

本発明によれば、有効部分はアンチセンス組成物である。特に、コンジュゲート化合物の有効部分を構成するアンチセンス分子は結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞のDNAまたはRNAにハイブリダイズし、そのDNAまたはRNAの転写または翻訳が起きるのを阻害および／または阻止する。アンチセンス組成物は核酸分子、その誘導体または類似体であってよい。アンチセンス組成物の化学的性質は、発現を阻害または他の形で阻止すべきDNAまたはRNAに相補的な、核酸分子もしくは修飾核酸分子、またはDNAまたはRNA分子を模倣した官能基をもつ非核酸分子がもつ性質であってよい。アンチセンス組成物は、その発現が結腸直腸癌、胃癌または食道癌に関する遺伝子、すなわち癌関連遺伝子の転写または翻訳を阻害または阻止する。

30

#### 【0195】

点変異の挿入、およびK-rasおよびH-rasの欠失が多くの腫瘍において同定されている。癌遺伝子HER-2/ERBB-2、HER-1/ERBB-1、HRAS-1、C-MYCおよび抗-癌遺伝子p53、RB1の変化の特性は複雑である。

#### 【0196】

ラットモデルにおける化学的発癌により、転写調節および増殖を仲介する癌遺伝子fosにおける点変異が証明された。参照：Alexander, R J, et al., N-メチル-N-ニトロソ尿素により誘導されたラット結腸腫瘍における癌遺伝子変化，American Journal of the Medical Sciences, 303(1) : 16-24, 1992, 1月；これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

40

#### 【0197】

ラットモデルにおける化学的発癌により、癌遺伝子ablにおける点変異が証明された。参照：Alexander, R J, et al., N-メチル-N-ニトロソ尿素により誘導されたラット結腸腫瘍における癌遺伝子変化，American Journal of the Medical Sciences, 303(1) : 16-24, 1992, 1月；これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

50

2年1月。

**【0198】**

MYCは、転写および増殖の調節において役割をもつ癌遺伝子である。mycに対するエキソンIIの翻訳開始領域に相補的な15塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドを、結腸直腸癌細胞と共にインキュベートした。このアンチセンス分子は結腸直腸癌細胞の増殖をdos依存性様式で阻害した。興味深いことに、このオリゴヌクレオチドの取込みは低かった(0.7%)。正常な第5染色体を結腸直腸癌細胞に移した場合もmyc発現が調節され、増殖が低下した。これらのデータは、mycの調節に重要な腫瘍サプレッサー遺伝子がこの染色体に含まれることを示唆する。

**【0199】**

新規タンパク質チロシンホスファターゼG1が同定された。結腸直腸腫瘍細胞においてこのタンパク質をコードするmRNAの検査により、これはこれらの細胞において点変異および欠失を受け、これらの細胞の増殖特性において役割をもつ可能性があることが明らかになった。Takekawa, M., et al., タンパク質チロシンホスファターゼG1遺伝子の染色体位置決定およびヒト結腸癌細胞における異常転写体の特性解明, FEB Letters, 339(3):222-8, 1994年2月21日;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

**【0200】**

ガストリンは、PKAが仲介するサイクリックAMP依存性機序により、結腸癌細胞の増殖を調節する。特定のPKAクラスの調節サブユニットに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドが、結腸癌細胞においてサイクリックAMPの増殖促進作用を阻害した。参照: Bold, R.J., et al., ヒト結腸癌の実験的遺伝子療法, Surgery, 116(2):189-95; 考察195-6, 1994年8月、およびYokozaki, H., et al., サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼのRIアルファサブユニットを欠如するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドはヒト癌細胞の増殖阻害を誘発する, Cancer Research, 53(4):868-72, 1993年2月15日;これら両者を本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

**【0201】**

CRIPTOは大部分の結腸直腸癌腫瘍において発現する上皮増殖因子関連遺伝子である。CRIPERO mRNAの5'末端に対するアンチセンスホスホリコエートオリゴデオキシヌクレオチドは、インビトロおよびインビボでCRIPERO発現を有意に低下させ、結腸直腸腫瘍細胞の増殖を阻害した。Ciardiello, F., et al., アンチセンスRNAおよびオリゴデオキシヌクレオチドによるヒト結腸癌細胞におけるCRIPERO発現および腫瘍形成性の阻害, Oncogene, 9(1):291-8, 1994年1月;これら両者を本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

**【0202】**

多くの癌細胞がトランスフォーミング増殖因子アルファを分泌する。TGFアルファmRNAに対する23ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、結腸直腸癌細胞のDNA合成および増殖の両方を阻害した。Sizeland, AM, Burgess, AW, アンチセンストラנסフォーミング増殖因子アルファオリゴヌクレオチドはオートクリン刺激による結腸直腸癌細胞系の増殖を阻害する, Molecular Biology of the Cell, 3(11):1235-43, 1992年11月;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

**【0203】**

オリゴヌクレオチド、その誘導体および類似体を含めたアンチセンス組成物、コンジュゲーションプロトコル、ならびに転写および翻訳の阻害のためのアンチセンス方式は、全般的に下記に記載されている; Antisense Research and Applications, Crooke, S. and B. Lebleu編, CRC Press

10

20

30

40

50

s社, フロリダ州 Boca Raton, 1993; Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Blackburn, G. and M. J. Gait編, IRL Press社, Oxford University Press社, ニューヨーク, 1990; およびOligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Eckstein, F. 編, IRL Press社, Oxford University Press社, ニューヨーク, 1991; これらをそれぞれ本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

#### 【0204】

本発明のアンチセンス分子は、結腸直腸癌遺伝子のフラグメントに相補的な配列を含む。  
10 参照: Ullrich et al., EMBO J., 1986, 5: 2503; これを本明細書に援用する。

#### 【0205】

本発明のコンジュゲート組成物中の有効部分を構成することができるアンチセンス組成物には、ホモピリミジン類から形成されるオリゴヌクレオチドが含まれる; これはDNA二重らせんの主溝中のホモプリンの局部伸長を認識してこれらに結合し、三重らせんを形成する。参照: Helen, C. and Touleme, JJ., アンチセンス、センスおよび抗遺伝子核酸による特異的な遺伝子発現調節, Biochem. Biophys. Acta, 1049: 99 - 125, 1990; これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。三重らせんの形成は、その遺伝子がRNAポリメラーゼにより転写を受ける能力を妨害するであろう。myc特異的オリゴヌクレオチドを用いて三重らせん形成が観察された。参照: Cooney, M., et al., Science, 241: 456 - 459; これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

#### 【0206】

イントロンとエキソンの境界にある配列に相補的なDNAまたはRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、それらの遺伝子の新たに生成する核RNA転写体が転写のためにmRNAに成熟するのを阻止することができる。

#### 【0207】

特定の遺伝子に相補的なアンチセンスRNAは、tat遺伝子に対するmRNAとハイブリダイズしてその翻訳を阻止できる。アンチセンスRNAを、インビトロ合成した”そのまま使用できる”RNAとして細胞に供給してもよく、あるいは細胞中へ安定に形質転換したアンチセンス遺伝子として供給し、これが転写に際してアンチセンスRNAを生成してもよい。mRNAとのハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズした分子がRNAse Hで分解され、および/または翻訳複合体の形成が阻害される。いずれの場合も本来の遺伝子の生成物を産生できない。

#### 【0208】

DNAまたはRNAのアンチセンス配列を細胞へ運搬できる。これらの分子が特異的配列を認識する能力を損なうことなく、その安定性を延長し、機能を改善するために、幾つかの化学修飾が開発された。これらには下記のものが含まれる: DNaseによる分解に対するそれらの抵抗性を高めること: ホスホトリエステル、メチルホスホナート、ホスホロチオエート、アルファ-アノマーが含まれる; 種々のインターラーション剤、たとえばプソラレン(psoralen)類への共有結合によりターゲットに対するそれらの親和性を高めること; およびポリリシンを含めた種々の基へのコンジュゲーションにより細胞による取込みを高めること。これらの分子は、mRNA中にコードされる特異的配列を認識し、それらのハイブリダイゼーションにより翻訳を阻止し、これらのメッセージの破壊を増加させる。

#### 【0209】

本発明のコンジュゲート組成物は、新生トランスフォーメーションを引き起こす遺伝子の発現を終止させるための特異的かつ有効な手段を提供する。S1はリガンド誘発性エンド

10

20

30

40

50

サイトーシスを受け、コンジュゲート化合物を細胞の細胞質へ運搬できる。

【0210】

S I 結合部分は、アンチセンス組成物、たとえば応答誘発活性をもつ核酸に直接コンジュゲートする。たとえばMYCに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、抗S I 抗体に直接コンジュゲートする。CD4受容体に結合するペプチドを用いてこれが実施された。参考：Cohen, J R 編, Oligodeoxynucleotides : Anti sense Inhibitors of Gene Expression. Topics in Molecular and Structural Biology, CRC Press社, Boca Raton, 1989;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。正確な主鎖およびその合成は明記されておらず、十分に確立した技術から選択できる。合成には化学的コンジュゲーション、またはF MOC化学を用いる固相合成によるキメラ分子の直接合成を伴う。参考：Haralambidis, J., et al. (1987) Tetrahedron Lett., 28: 5199 - 5202;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。あるいはペプチド - 核酸コンジュゲートを、固相合成によるペプチド - ペプチド核酸キメラとして、固相合成により直接合成できる。Nielsen, P E, et al. (1994), DNA 鑄型鎖に結合したペプチド核酸による配列特異的転写停止, Gene, 149: 139 - 145;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0211】

ある態様においては、ポリリシンを核酸への非共有結合様式で本発明のコンジュゲート組成物に複合体形成させ、細胞の細胞質へのこれらの分子の運搬を高めるのに使用できる。さらに、ペプチドおよびタンパク質をポリリシンに共有結合様式でコンジュゲートさせ、このコンジュゲートを複合体非共有結合様式で核酸と複合体形成させて、特異性および細胞への核酸の取り込み効率をさらに高めることができる。このように、確立した方法でS Iリガンドをポリリシンに化学的にコンジュゲートさせる。ポリリシン - S I 翻訳生成物リガンドコンジュゲートを任意の核酸と複合体形成させることができる。たとえば、ポリリシン - オロソムコイドコンジュゲートを用いて、オロソムコイド受容体を発現している肝癌細胞に遺伝子含有プラスミドを特異的に発現させた。この方法を用いて全遺伝子またはオリゴヌクレオチドを運搬できる。たとえば、これは望ましくない遺伝子（たとえばMYC、ras）の発現を終止させ、あるいは喪失または欠失した遺伝子（たとえばhMSH2、hMLH1、hPMS1 および hPMS2）の機能を代替する可能性をもつ。

【0212】

好ましい態様によれば、My c はコンジュゲート組成物中のアンチセンス分子により発現が阻害される遺伝子として作用する。S I 結合部分は、エキソンIIの翻訳開始領域に相補的な15塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドをmy cへ運搬するために用いられる。MYCに対する15塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドはCollins, J F, Herman, P, Schuch, C, Bagby, G C, Jr., Journal of Clinical Investigation, 89(5): 1523 - 7, 1999年5月の報告に従って合成される。ある態様においては、先に報告されたようにコンジュゲート組成物をポリリシンにコンジュゲートさせる。Wu, G Y and Wu, C H (1988), インビトロでのHep G2肝癌細胞へのed遺伝子運搬の証明, Biotech. 27: 887 - 892;これを本明細書に援用する。

【0213】

コンジュゲート組成物を、キメラ分子として固相合成により直接合成できる。ピコモルまたはナノモル濃度のこのコンジュゲートがインビトロで結腸直腸細胞においてMYC合成を抑制する。

【0214】

アンチセンス分子は、好ましくは長さ5 ~ 50ヌクレオチド、より好ましくは5 ~ 25ヌクレオチド、ある態様においては10 ~ 15ヌクレオチドのヌクレオチド配列にハイブリ

10

20

30

40

50

ダイズする、すなわち相補的である。

【0215】

さらに、本発明方法を達成する前記において同定した配列内の不適正塩基対であって、その不適正塩基対配列が癌遺伝子配列に実質的に相補的なものも、本発明の範囲内であるとみなされる。癌遺伝子配列に対する実質的相補性をもたらす不適正塩基対は、本発明の開示によれば当業者に自明であろう。これらのオリゴ体を修飾してもよく、修飾しなくてもよい。

【0216】

結腸直腸癌、胃癌または食道癌が局在性および／または転移性の場合、療法用の組成物および方法を用いてそれらの癌を克服できる。個体に療法有効量のコンジュゲート化合物を投与する。療法有効量は、その個体に致死的な副作用を与えることなく癌細胞に細胞毒性または細胞分裂抑制作用を及ぼすのに有効な量である。療法有効量のコンジュゲート組成物を投与された個体は、療法有効量を投与されなかった個体がもつリスクと比較して、結腸直腸癌、胃癌または食道癌を排除する機会が増す。10

【0217】

局在性の結腸直腸癌、胃癌または食道癌を処置するために、療法有効量のコンジュゲート組成物をその局在性腫瘍と接触するように投与する。たとえばコンジュゲート化合物を経口または腫瘍内投与できる。経口用または直腸用の製剤は Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, 1990, Mack Publishing社, ペンシルベニア州イーストンに記載されており、これを本明細書に援用する。20

【0218】

本発明による医薬組成物は、1回量または多数回量として投与できる。本発明の医薬組成物は、個々の療法薬として、または他の療法と組み合わせて投与できる。本発明の療法薬を通常の療法と組み合わせて、逐次または同時に投与できる。

【0219】

本発明は、哺乳動物においてアンチセンス化合物を正常および癌性の結腸直腸細胞、ならびに胃癌または食道癌の細胞へ運搬し、癌遺伝子の発現を阻害する方法に関する。本方法は、癌細胞のDNAまたはmRNAのある領域に相補的な配列をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドにコンジュゲートしたSI結合部分を含む有効量のコンジュゲート組成物を、哺乳動物に投与することを含む。30

【0220】

コンジュゲート化合物を、意図する投与経路および標準的医療に関して選択した医薬的に許容できるキャリヤーとの混合物として哺乳動物に投与できる。投与量は、患者の体重および臨床状態との関連で設定される。本発明のコンジュゲート組成物は、哺乳動物が未分化細胞および／または異常な表現型の細胞を含まなくなるのに十分な期間投与される。療法においては、トランスフォームした細胞が増殖するのを阻害するのに十分な期間治療を延長し、患者の癌を処置および克服するためにコンジュゲート組成物を他の化学療法薬と組み合わせて投与してもよい。

【0221】

本発明のコンジュゲート化合物を単独で、または他の化合物と組み合わせて本発明方法に使用できる。投与量は、同様に患者の年齢、体重および臨床状態などの要因に依存するであろう。参照：Gennaro, Alfonso編, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, 1990, Mack Publishing社, ペンシルベニア州イーストン。40

【0222】

治療用および予防用ワクチン

本発明は、転移性結腸直腸癌細胞ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞に対して個体を保護するための、ならびに転移性結腸直腸癌細胞ならびに原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞をもつ個体を治療するための、予防用お50

および治療用ワクチンに関する。

**【0223】**

本発明によれば、S I、C D X 1またはC D X 2はそれに対する防御または治療のための免疫応答を誘発しうるターゲットとして作用する。具体的には、S I、C D X 1またはC D X 2に対する免疫応答を誘発するワクチンを提供する。本発明には下記のワクチン技術が含まれるが、これらに限定されない：

1) DNAワクチン、すなわちS I、C D X 1またはC D X 2由来の少なくとも1つのエピトープをコードするDNAを個体の細胞に投与し、そこでエピトープが発現し、免疫応答のターゲットとして作用する；

2) 感染性ベクター仲介ワクチン、たとえば組換えアデノウイルス、ワクシニア、サルモネラ(Salmonella)およびBCG；これらにおいて、ベクターはS I、C D X 1またはC D X 2タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープをコードする遺伝子情報を保有し、したがって感染性ベクターが個体に投与されるとエピトープが発現し、免疫応答のターゲットとして作用する；

3) 死細胞または不活化ワクチン；a) S I、C D X 1またはC D X 2タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを提示する死細胞または不活化したウイルス粒子を含み、そしてb) 個体に投与された際に免疫応答のターゲットとして作用する；

4) ハプテン化した死細胞または不活化ワクチン；a) S I、C D X 1またはC D X 2タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを提示する死細胞または不活化したウイルス粒子を含み、b) 免疫原性を高めるためにハプテン化され、そしてc) 個体に投与された際に免疫応答のターゲットとして作用する；

5) サブユニットワクチン、すなわちS I、C D X 1またはC D X 2タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを含むタンパク質分子を含有するワクチン；ならびに

6) ハプテン化したサブユニットワクチン；a) S I、C D X 1またはC D X 2タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを含むタンパク質分子を含有し、かつb) 免疫原性を高めるためにハプテン化されている。

**【0224】**

本発明は、それに対する治療用および予防用免疫応答を誘発しうる免疫原エピトープを含むタンパク質またはコードする核酸分子を個体に投与することに関する。それらのエピトープは、一般に少なくとも6～8アミノ酸の長さである。したがって本発明のワクチンは、S Iタンパク質由来の少なくとも6～8アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含む。本発明のワクチンは、少なくとも10～1000アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。本発明のワクチンは、少なくとも25～500アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。本発明のワクチンは、少なくとも50～400アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。本発明のワクチンは、少なくとも100～300アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。

**【0225】**

本発明は、転移性結腸直腸癌細胞ならびに原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞をもつことが分かっている個体を処置するための組成物および方法に関する。転移性結腸直腸癌ならびに原発性および/または転移性の胃癌または食道癌は、当業者が本明細書に記載の方法または当技術分野で受け入れられている臨床および実験室病理学的プロトコルを用いて診断できる。本発明は、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患していると診断された個体の処置に有用な免疫療法ワクチンを提供する。本発明の免疫療法ワクチンは、他の療法と組み合わせて投与できる。

**【0226】**

本発明は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌を発症しやすい疑いがある個体において転移性結腸直腸癌ならびに原発性および/または転移性の胃癌または食道癌を阻止するための組成物および方法に関する。そのような個体には、その家族病歴が家族構成員の結腸直腸癌

10

20

30

40

50

、胃癌もしくは食道癌の平均発症率より高い個体、および／または既に結腸直腸癌、胃癌もしくは食道癌を発症し、効果的な処置を受け、したがって再発および反復のリスクに直面している個体が含まれる。そのような個体には、結腸直腸癌、胃癌または食道癌（局在性の結腸直腸癌、胃癌または食道癌のみ、または局在性かつ転移性のものが含まれる）を伴うと診断され、切除その他の処置を受けた個体が含まれる。本発明のワクチンは、転移性結腸直腸癌ならびに原発性および転移性の胃癌または食道癌を阻止および克服するために、発症しやすい個体に予防的に投与できる。

#### 【0227】

本発明は、そのようなワクチンの有効成分である組成物または有効成分を構成するのに必要な組成物、有効成分を含有するそのような組成物を製造する方法、ならびにワクチンを製造および使用する方法に関する。 10

#### 【0228】

本発明は、S I 遺伝子転写体またはそのフラグメントを含む組換えベクター（発現ベクターを含める）に関する。本発明は、S I、C D X 1またはC D X 2タンパク質またはその機能性フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む組換えベクター（発現ベクターを含める）に関する。 20

#### 【0229】

本発明は、そのようなベクターを含む宿主細胞、およびそのような組換え細胞を用いてS I、C D X 1またはC D X 2タンパク質を製造する方法に関する。 20

本発明は、単離したS I、C D X 1またはC D X 2遺伝子転写体、および単離したS I、C D X 1またはC D X 2タンパク質、およびそれらのタンパク質に特異的な単離した抗体、およびそれらの抗体を産生するハイブリドーマに関する。 20

#### 【0230】

本発明は、単離したS I、C D X 1またはC D X 2およびその機能性フラグメントに関する。したがって本発明のある態様は、S I、C D X 1またはC D X 2の少なくとも1つのエピトープを含む単離したタンパク質に関する。 20

#### 【0231】

本発明のある態様は、それらの免疫原性を高めるためにハプテン化された単離した前記タンパク質に関する。すなわち本発明のある態様は、少なくとも1つのS I、C D X 1またはC D X 2エピトープを含むハプテン化されたタンパク質に関する。 30

#### 【0232】

したがって本発明のある態様は、少なくとも1つのS I、C D X 1またはC D X 2エピトープを含むタンパク質をコードする単離した核酸分子に関する。 30

裸のDNAワクチンがP C T / U S 9 0 / 0 1 5 1 5に記載されており、これを本明細書に援用する。他にリポソーム仲介DNA伝達、マイクロプロジェクトを用いるDNA運搬（U S P 4 , 9 4 5 , 0 5 0 , 1 9 9 0年7月31日、Sanfordらに発行；これを本明細書に援用する）、およびエレクトロポレーションを用いるDNA運搬の利用が教示されている。それぞれの場合、DNAは細菌において産生されるプラスミドDNAであってよく、これを単離し、処置すべき動物に投与する。プラスミドDNA分子は動物細胞により取り込まれ、そこで目的タンパク質をコードする配列が発現する。こうして産生されたタンパク質は、その動物に治療または予防効果を与える。 40

#### 【0233】

治療用および／または予防用の免疫作用を個体に及ぼす核酸分子を個体の細胞へ運搬するための、ウイルスベクターを含めたベクターその他の手段も周知である。ワクシニアウイルスベクターを用いる組換えワクチンは、たとえばU S P 5 , 0 1 7 , 4 8 7 ( 1 9 9 1 年5月21日、Stunnenbergらに発行；これを本明細書に援用する)に開示されている。

#### 【0234】

場合により、患者から得た腫瘍細胞を死滅させ、または不活化し、ワクチン製剤として投与する。Berd et al . , 1986年5月, Cancer Research , 50

46:2572-2577、およびBerd et al., 1991年5月, Cancer Research, 51:2731-2734(これらを本明細書に援用する)には、腫瘍細胞ベースのワクチン製剤の製造および使用が記載されている。本発明のある態様によれば、黒色腫細胞の代わりに結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞を用いて、Berdらの文献に記載された方法および技術を適用する。

#### 【0235】

たとえば実験用試薬またはサブユニットワクチンの成分として有用な単離した翻訳生成物およびそのフラグメントの製造および使用は周知である。当業者は、SI、CDX1もしくはCDX2遺伝子転写体、またはSI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントをコードするその特異的部分を単離できる。単離すると、標準法および容易に入手できる出発物質を用いて、その核酸分子を発現ベクターに挿入できる。

10

#### 【0236】

組換え発現ベクターは、SI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントをコードする核酸分子コードするかあるいはSI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントを含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。本発明の組換え発現ベクターは、宿主を形質転換して、本発明の単離タンパク質を製造するための組換え発現系を作製するのに有用である。

#### 【0237】

本発明は、SI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントをコードするかあるいはSI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントを含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する組換え発現ベクターを含む宿主細胞に関する。タンパク質産生のために周知の組換え発現系に用いる宿主細胞は周知であり、容易に入手できる。宿主細胞の例には、細菌細胞、たとえば大腸菌(E. coli)、酵母細胞、たとえばサツカロミセス・セレビシエ(S. cerevisiae)、昆虫細胞、たとえばS. frugiperda、ヒト以外の哺乳動物の組織培養細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、およびヒト組織培養細胞、たとえばHeLa細胞が含まれる。

20

#### 【0238】

本発明は、本発明のタンパク質をコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターを含む、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物に関する。組換えタンパク質の産生に有用なヒト以外のトランスジェニック哺乳動物は周知であり、トランスジェニック動物の作製に必要な発現ベクターおよび技術も周知である。一般にトランスジェニック動物は、SI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントをコードするかあるいはSI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントを含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列が哺乳動物細胞特異的プロモーターに機能可能な状態で結合した組換え発現ベクターを含む。これによりコード配列は哺乳動物細胞においてのみ発現し、こうして発現した組換えタンパク質を動物の乳汁から回収する。

30

#### 【0239】

ある態様において、当業者はたとえば周知の技術を用いてそのようなDNA分子を本明細書に記載するような周知の発現系に用いる市販の発現ベクターに挿入することができる。

#### 【0240】

40

SI、CDX1もしくはCDX2またはその機能性フラグメントをコードするかあるいはSIまたはその機能性フラグメントを含むタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターを用いて、適合する宿主を形質転換し、次いでこの外来DNAの発現が起きる条件下で宿主を培養および維持する。こうして產生された本発明のタンパク質を、適宜、当業者に既知のとおり培養物から細胞溶解により、または培地から回収する。SI、CDX1もしくはCDX2またはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質を、そのタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて精製する方法は周知である。特定のタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、周知の技術および容易に入手できる出発物質により、天然源からこのタンパク質を精製できる。そのような抗体を用いて、組換えDNA法によりタンパク質を製造する際に得られる材料からこのタンパク質を精製することもできる。本発

50

明は、1又はそれより多くのS I、C D X 1もしくはC D X 2翻訳生成物上に存在するエピトープまたはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質に結合する、抗体に関する。S I、C D X 1またはC D X 2上に存在するエピトープに結合する抗体は、アフィニティークロマトグラフィーなど周知の方法でこのタンパク質を天然源または組換え発現系のいずれから単離および精製するのも有用である。免疫アフィニティー法は、一般にW a l d m a n e t a l . , 1 9 9 1 , M e t h o d s o f E n z y m o l . , 1 9 5 : 3 9 1 - 3 9 6 に記載されており、これを本明細書に援用する。抗体は、試料中のそのようなタンパク質の存在を検出し、細胞がそのタンパク質を発現しているかどうかを判定するのに有用である。抗体の調製、ならびに完全無傷の抗体、F a b フラグメントおよびF ( a b )<sub>2</sub> フラグメントのタンパク質構造、ならびにそのような分子をコードする遺伝子配列の組立ては周知であり、たとえばH a r l o w , E . a n d D . L a n e ( 1 9 8 8 ) A N T I B O D I E S : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーに記載されており、これを本明細書に援用する。

#### 【 0 2 4 1 】

本発明のある態様においては、ヒト以外のトランスジェニック動物を作製する。本発明によるトランスジェニック動物は、S I、C D X 1もしくはC D X 2またはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質をコードするヌクレオチドを、哺乳動物特異的プロモーターの調節制御下に含む。当業者は、標準法、たとえばU S P 4 , 8 7 3 , 1 9 1 ( 1 9 8 9 年 1 0 月 1 0 日、W a g n e r に発行) およびU S P 4 , 7 3 6 , 8 6 6 ( 1 9 8 8 年 4 月 1 2 日、L e d e r に発行) ( 両者を本明細書に援用する) に教示される方法を用いて、S Iもしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質を產生するトランスジェニック動物を作製できる。好ましい動物はヤギおよびげっ歯類、特にラットおよびマウスである。

#### 【 0 2 4 2 】

これらのタンパク質を組換え法で製造するほか、自動ペプチド合成装置を用いてS I、C D X 1もしくはC D X 2またはそのフラグメント(もしくはそのフラグメント)またはそれを含むタンパク質を製造することもできる。そのような技術は当業者に周知であり、置換基をもつ誘導体がD N A コードによるタンパク質產生では得られない場合には有用である。

#### 【 0 2 4 3 】

ある態様において、サブユニットワクチンを構成するタンパク質、または死細胞もしくは不活化ワクチンの細胞もしくは粒子をハプテン化して、免疫原性を高めることができる。場合により、ハプテン化は、S I、C D X 1もしくはC D X 2またはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質に、より大きな分子構造体をコンジュゲーションするものである。場合により、有効なワクチン製剤を製造する手段として患者から得た腫瘍細胞を死滅させてハプテン化する。S Iもしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質を形成および表示する遺伝子情報を付与した他の細胞、たとえば細菌または真核細胞を死滅させ、有効ワクチン成分として用いる場合、それらの細胞をハプテン化して免疫原性を高める。ハプテン化は周知であり、容易に実施できる。

#### 【 0 2 4 4 】

細胞全般、特に腫瘍細胞のハプテン化方法は、B e r d e t a l . , 1 9 8 6 年 5 月 , C a n c e r R e s e a r c h , 4 6 : 2 5 7 2 - 2 5 7 7 、およびB e r d e t a l . , 1 9 9 1 年 5 月 , C a n c e r R e s e a r c h , 5 1 : 2 7 3 1 - 2 7 3 4 に記載されており、これを本明細書に援用する。他のハプテン化プロトコルはM i l l e r e t a l . , 1 9 7 6 , J . I m m u n o l . , 1 1 7 ( 5 : 1 ) : 1 5 9 1 - 1 5 2 6 に示されている。

#### 【 0 2 4 5 】

本発明によるハプテン化した免疫原の製造に用いるのに適したハプテン化組成物および方法には、下記の米国特許に記載されるものが含まれ、これらをそれぞれ本明細書に援用す

10

20

30

40

50

る：U S P 5 , 0 3 7 , 6 4 5 ( 1 9 9 1 年 8 月 6 日 , S t r a h i l e v i t z に発行 ) ; U S P 5 , 1 1 2 , 6 0 6 ( 1 9 9 2 年 5 月 1 2 日 , S h i o s a k a らに発行 ) ; U S P 4 , 5 2 6 , 7 1 6 ( 1 9 8 5 年 7 月 2 日 , S t e v e n s に発行 ) ; U S P 4 , 3 2 9 , 2 8 1 ( 1 9 8 2 年 5 月 1 1 日 , C h r i s t e n s o n らに発行 ) ; および U S P 4 , 0 2 2 , 8 7 8 ( 1 9 7 7 年 5 月 1 0 日 , G r o s s に発行 ) 。ペプチドワクチン、および本発明の免疫原の修飾に適用できるペプチド免疫原性増強方法も、F r a n c i s et al . , 1 9 8 9 , M e t h o d s o f E n z y m o l . , 1 7 8 : 6 5 9 - 6 7 6 に記載されており、これを本明細書に援用する。S a d et al . , 1 9 9 2 , I m m u n o l o g y , 7 6 : 5 9 9 - 6 0 3 ( 本明細書に援用する ) には、ゴナドトロピン放出ホルモンをジフテリアトキソイドにコンジュゲートすることによる免疫療法ワクチンの製造方法が教示されている。S I 免疫原を同様にコンジュゲートさせて、本発明の免疫療法ワクチンを製造できる。M a c L e a n et al . , 1 9 9 3 , C a n c e r I m m u n o l o g y I m m u n o t h e r . , 3 6 : 2 1 5 - 2 2 2 ( 本明細書に援用する ) には、免疫療法ワクチンを製造するためのコンジュゲーション法が記載されており、これを本発明の免疫療法ワクチンの製造に適用できる。ハプテンはキー ホールリンペットヘモシアニンであり、これを免疫原にコンジュゲートさせることができる。  
10

## 【 0 2 4 6 】

本発明のある態様によるワクチンは、免疫原と共に医薬的に許容できるキャリヤーを含む。医薬配合物は周知であり、そのようなタンパク質を含む医薬組成物は当業者がルーティンに配合できる。医薬的に許容できる適切なキャリヤーは、この分野の標準参考文献であるR e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , A . O s o l に記載されており、これを本明細書に援用する。本発明は、医薬的に許容できるキャリヤーおよび免疫原を含む注射用医薬組成物に関する。免疫原は、好ましくは無菌であり、無菌の医薬キャリヤーと混和される。  
20

## 【 0 2 4 7 】

たとえばある態様においては、S I 、C D X 1 もしくはC D X 2 またはそのフラグメント（もしくはそのフラグメント）またはそれを含むタンパク質を、医薬的に許容できるビヒクリルと一緒に液剤、懸濁液剤、乳剤または凍結乾燥粉末として配合できる。そのようなビヒクリルの例は、水、生理食塩水、リングル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび非水性ビヒクリル、たとえば固定油も使用できる。ビヒクリルまたは凍結乾燥粉末は、等張性を維持する添加剤（たとえば塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性を維持する添加剤（たとえば緩衝剤および保存薬）を含有してもよい。配合物は常法により滅菌される。  
30

## 【 0 2 4 8 】

注射用組成物は、免疫原を希釈剤、たとえば無菌水、電解質 / デキストロース、植物性脂肪油、脂肪エステル、またはポリオール、たとえばプロピレングリコールおよびポリエチレングリコール中に含むことができる。注射剤は無菌でありかつ発熱物質を含まないものでなければならない。

## 【 0 2 4 9 】

本発明のワクチンは、認識および免疫原応答誘発のために免疫原物質を身体の免疫系に提示しうる任意の手段で投与できる。医薬組成物を非経口的に、すなわち静脈内、皮下、筋肉内に投与できる。  
40

## 【 0 2 5 0 】

投与量は、各物質の薬力学的特性、ならびにその投与様式および経路；レシピエントの年齢、健康状態および体重；症状の性質および程度、併用処置の種類、処置の頻度、ならびに目的とする効果など、既知の要因に応じて異なるであろう。防御または療法に有効な免疫応答を誘発する量の免疫原を運搬させる。当業者はその範囲および最適投与量をルーティン方法で容易に決定できる。

## 【 0 2 5 1 】

以下の実施例は説明のためのものであり、本発明を限定するためのものではない。

### 【0252】

#### 実施例

前記のように、S I 結合部分は S I リガンドであり、抗体、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは非ペプチドであってよい。ペプチドおよび非ペプチド S I リガンドは周知の技術で同定できる。

### 【0253】

この 10 年で、受容体とリガンド、たとえば S I と抗 S I 抗体の特異的な高親和性相互作用は、リガンドの三次元コンホメーション空間、およびリガンド結合に関する分子領域の相補的三次元立体配置に基づくことが認められるようになった。さらに、多様な天然アミノ酸、非天然アミノ酸および有機分子のアレイを、直線構造は天然リガンドに関係ないがコンホメーション空間が天然リガンドの三次元構造に似た立体配置にオーガナイズでき、したがって高い親和性および特異性で受容体が認識することが認められるようになった。さらに、当業者がこれらの天然アミノ酸、非天然アミノ酸および有機化合物のアレイの大規模ライブラリーを形成し、受容体の天然リガンドと無関係であるがその受容体と高い親和性および特異性で相互作用する各化合物を予想同定しうる技術が文献に記載されている。したがって、S I 抗体と構造的には関係がないが S I に特異的かつ緊密に結合しうる天然アミノ酸、非天然アミノ酸または有機化合物のアレイを当業者が同定するのは比較的容易な作業である。

### 【0254】

ペプチドである S I リガンドを同定するために、当業者はランダムペプチドライブラリーをスクリーニングするためのいずれか周知の方法を、S I に結合するペプチドの同定に使用できる。最も基本的な方法においては、ターゲットに結合するペプチドを単離して配列決定する。ある方法では、各ランダムペプチドを、そのランダムペプチドのコード配列を含む核酸分子に結合させる。それぞれコード配列が結合したランダムペプチドを S I と接触させ、S I に結合していないペプチドを除去する。次いで、この S I に結合したペプチドのコード配列を含む核酸分子を用いてそのペプチドのアミノ酸配列を決定し、そのペプチドを大量に製造する。固体支持体上にペプチドライブラリーを調製することもでき、その際、支持体上の空間位置は特定の合成に対応し、したがって特定のペプチドに対応する。そのような方法ではしばしば写真平板法様の工程を用いて多様なペプチドライブラリーを固体支持体上に作製し、支持体上の空間アドレスにより配列を決定できる。

### 【0255】

固体支持体上の有機化合物ライブラリーの作製法は、非ペプチド化合物、たとえばオリゴヌクレオチドおよび糖類のコンビナトリアルライブラリー作製にも利用できる。固体支持体上のペプチドライブラリーの場合と同様に、支持体上の空間位置は特定の合成に対応し、したがって特定の化合物に対応する。そのような方法ではしばしば写真平板法様の工程を用いて多様な化合物ライブラリーを固体支持体上に作製し、支持体上の空間アドレスから化合物を製造した合成スキームを判定できる。合成スキームが同定されると、その化合物の構造を知ることができる。

### 【0256】

G a l l o p et al . , 1994 , J . M e d i c a l C h e m i s t r y , 37 : 1233 ( 本明細書に援用する ) には、ランダムペプチドライブラリーをスクリーニングし、そのようなライブラリーからターゲットタンパク質に結合するペプチドを同定するための種々の方法のうち幾つかが概説されている。当業者はこれらの教示に従って、ペプチドでありかつ S I 特異的結合部分として有用である S I 特異的リガンドを同定できる。

### 【0257】

ファージ粒子上に表示されるペプチドおよびタンパク質は、G a l l o p ら ( 前掲 ) に記載されている。細菌の感染に用いるバクテリオファージの表面タンパク質をコードする遺伝子にランダム核酸アレイを挿入して、ランダムヌクレオチドアレイによりコードされる

10

20

30

40

50

ペプチドを表面に発現するファージを生成することができる。ペプチドを表示するこれらのファージを利用して、それらのペプチドが特定のタンパク質、受容体、抗体などに結合しうるか判定できる。ペプチドの同定は、そのペプチドを発現するファージから得た組換えDNAの配列決定により実施できる。この方法で1ライブラリー中に多数アレイのペプチドを得ることができる（最高10<sup>9</sup>個のユニークペプチド）。この方法を用いて、血小板上のフィブリノーゲン受容体に結合するがこの受容体の天然リガンドとは配列相同性のない新規な結合ペプチドが同定された（Smith et al., 1993, Gene, 128: 37；本明細書に援用する）。同様に、この方法はMHCクラスII受容体に結合するペプチド（Hammer et al., 1993, Cell, 74: 197；本明細書に援用する）およびカペロニン受容体に結合するペプチド（Blond-Elg uindi et al., 1993, Cell, 75: 717；本明細書に援用する）の同定に応用された。  
10

## 【0258】

プラスミド上に表示されるペプチドはGalllopら（前掲）に記載されている。この方法で、ペプチドライブラリーをコードするランダムオリゴヌクレオチドを特定のプラスミド上に発現させることができる；その発現は特定のプロモーター（たとえばlacオペロン）の制御下にある。これらのペプチドは、lac Iタンパク質に結合した融合タンパク質として、lacオペロンの制御下に発現する。この融合タンパク質はプラスミド上のlacオペレーターに特異的に結合し、したがってそのランダムペプチドはそれをコードする特異的DNAエレメントと結合する。この方法で、融合タンパク質に結合したDNAのPCRにより、ペプチドの配列を演繹できる。溶液相中のこれらのタンパク質をスクリーニングして、それらが特定の受容体に結合するか判定できる。この方法を用いて、特定の酵素に対する新規な基質が同定された（Schatz, 1993）。

## 【0259】

前記方法の変法であって、同様にGalllopら（前掲）に記載される、プラスミド上のペプチドライブラリーをコードするランダムオリゴヌクレオチドを無細胞系で発現させる方法も使用できる。この方法では、ランダムオリゴヌクレオチドアレイを含む分子DNAライブラリーを構築し、次いでこれを細菌のインビトロ転写/翻訳系で発現させることができる。リガンドの同定は、目的mRNAを含有する新生鎖ペプチド/ポリソーム複合体を、受容体を含むアフィニティー樹脂上で精製し、次いでRT-PCRで増幅させた後に配列決定することにより行われる。この方法を用いると、大規模ライブラリーを形成できる（最高10<sup>11</sup>個の組換え体）。ダイノルフィンに対して特異的に形成された抗体を認識するペプチドがこの方法で同定された（Cull et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1865；本明細書に援用する）。  
30

## 【0260】

受容体に対してスクリーニングするためのペプチドライブラリーを化学合成により形成できる。たとえば、Galllopら（前掲）に記載される多重ペプチド合成方法を用いて、多数の多様なペプチドが同時形成された。ある応用例では、ポリアクリルアミドマイクロタイタープレート上で標準的固相Merrifield合成によりランダムペプチドを形成し（マルチピン（multipin）合成）、次いで受容体結合に対して競合する能力について標準的競合結合アッセイによりスクリーニングする（Wang et al., 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett., 3: 447；本明細書に援用する）。実際に、この方法でサブスタンスP受容体に対する新規な結合ペプチドが同定された（Wangら、前掲）。同様に、固体支持体樹脂のバッグを順に各種アミノ酸と共にインキュベートして種々のペプチドのアレイを形成する”ティーバッグ”法を用いる多重ペプチド合成により、ペプチドライブラリーを構築できる（Galllopら、前掲）。この方法を用いて、インテグリン受容体に結合するペプチド（Ruggeri et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5708；本明細書に援用する）およびニューロペプチドY受容体に結合するペプチド（Beck-Sickinger et al., 1990, Int. J. Peptide Protein, 50

n Res., 36 : 522 ; 本明細書に援用する)が同定された。

**【0261】**

一般に、コンビナトリアルライブラリーの形成および有用性は下記に依存する：(1)多様な構築ブロックアレイを形成する方法、(2)目的とする機能をもつアレイメンバーの同定方法、および(3)そのメンバーの構造をデコンボリューションする方法。これらの条件を満たす幾つかの方法が決定された。

**【0262】**

以下に、本発明によるSIRIGANDの同定方法に使用できるライブラリー形成方法を記載する：

前記方法の変法を用い、一組の化学構築ブロックのメンバー、たとえばアミノ酸を可能なすべての組合せで互いに結合させることにより、多様な分子種のライブラリーを形成できる(Galllopら、前掲)。ある方法では、固体支持体上で生長しつつあるアミノ酸鎖に、活性化したモノマーの混合物を各サイクルで結合させる。これは多価合成系である。

**【0263】**

スプリット合成は、各反応において単一構築ブロックのみを含有する生長しつつある鎖をインキュベートすることを伴う(Galllopら、前掲)。結合後、すべての反応からの樹脂を混合し、次の結合工程に各反応物を配分する。これらの方法で、スクリーニングのためのn<sup>x</sup>個の異なるペプチドの確率的コレクションが得られる。ここでnは構築ブロック数、xは反応サイクル数である。

**【0264】**

あるいは、1又はそれより多くの位置に既知のアミノ酸を含有するが残りはランダムである分子アレイを形成できる(Galllopら、前掲)。これらは限定されたライブラリーを与え、これスクリーニングして目的活性をもつメンバーを求める。これらのメンバーが同定されると構造を決定し、特定されたアミノ酸を含む他の位置と共にこの構造を再生し、スクリーニングする。この反復法により最終的に、受容体のコンホメーション結合ポケットを認識するのに最適なペプチドが得られる。

**【0265】**

さらに、アレイはペプチド形成アミノ酸に限定されず、線状および非線状の有機分子アレイに拡大できる(Gordon et al., 1994, J. Medical Chemistry, 37: 1385; 本明細書に援用する)。実際に、ランダムアレイの無機構築ブロックのライブラリーを形成するためにこの方法を用いて、7回膜貫通受容体に結合するリガンドが同定された(Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem., 37: 2678; 本明細書に援用する)。

**【0266】**

合成後に修飾して側鎖基および結合を変更し、それらと受容体の相互作用を調べるための”デザイナー”アレイを得ることができるライブラリーが、現在構築中である(Ostresh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 11138; 本明細書に援用する)。”ライブラリーからライブラリー”を形成するこの方法をペプチドライブラリーの完全メチル化に適用し、グラム陽性細菌に対する選択的抗微生物活性をもつ化合物が得られた。

**【0267】**

特異的なアミノ酸構造アレイではなく、薬理学的モチーフのアレイを発現するライブラリーも構築できる(Sepetov et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 5426; 本明細書に援用する)。この方法は、受容体に対する特異的親和性をもつ構造モチーフを同定するためのものであり、構造活性関係を規定するライブラリーを用いてこれをさらに詳細に修飾できる。モチーフライブラリーを検索して”ライブラリーのライブラリー”を形成するこの方法を用いると、初期ライブラリー検査においてスクリーニングに必要な成分メンバー数が少なくなる。

**【0268】**

10

20

30

40

50

以下に、ランダムに形成された分子のライブラリーから本発明によるS Iリガンドを同定する方法を記載する：

受容体と相互作用するライブラリー成分を、固体支持体に固定化した受容体への結合により同定できる（G o r d o nら、前掲）；

それらを、溶液相中のコグネイト受容体への結合に対して天然リガンドと競合する能力により同定することもできる（G o r d o nら、前掲）；

それらの成分を固体支持体に固定化した場合、成分を可溶性受容体に結合させることにより同定できる（G o r d o nら、前掲）。

#### 【0269】

受容体を結合するライブラリーメンバーが同定されると、構造を同定して作業に用いる、または他の類似体を開発して構造活性関係を研究するのに用いる大量を形成するために、そのメンバーの構造をデコンボリューション（演繹）しなければならない。以下に、本発明による潜在S Iリガンドと同定された分子の構造を演繹するためのデコンボリューション方法を記載する。

#### 【0270】

ペプチドライブラリーをバクテリオファージ粒子の表面に発現させることができ（G a l l o pら、前掲）。受容体と相互作用するペプチドが同定されると、ファージからそのD N Aを単離し、P C Rによりその配列を決定することにより、その構造を演繹できる。

#### 【0271】

L a c オペロンの制御下でプラスミド上に発現したライブラリーをデコンボリューションできる。これらのペプチドは、そのペプチドをコードするプラスミド上のl a cオペロンと特異的に相互作用するl a c Iタンパク質と融合しているからである（G a l l o pら、前掲）。l a c Iタンパク質に結合したプラスミドを単離し、P C Rによりヌクレオチドおよびペプチドの配列を演繹することにより、構造を演繹できる。

#### 【0272】

プラスミド上に発現するライブラリーを、転写／翻訳系を用いて無細胞系で発現させることもできる（G a l l o pら、前掲）。このパラダイムでは、受容体と相互作用するタンパク質を、それが結合しているリボソームおよびm R N Aと共に単離する。このペプチドの配列を、結合しているm R N AのR T - P C Rにより演繹する。

#### 【0273】

ライブラリー構築体を写真平板法と連結し、支持体アレイ内のその位置を判定することにより、ライブラリーのいずれのメンバーの構造も演繹することができる（G a l l o pら、前掲）。メンバーの精確な位置により構造情報を演繹できるので、この方法はポジショナルアドレッサビリティー（p o s i t i o n a l a d d r e s s a b i l i t y）と呼ばれる。

#### 【0274】

ライブラリーを同定可能な他の分子のアレイで標識することにより、ライブラリーのメンバーを同定することもできる（O h l m e y e r et al . , 1 9 9 3 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 1 0 9 2 2 、本明細書に援用する；およびG a l l o pら、前掲）。この方法は、ペプチドとその配列をコードするファージプラスミドを結合させる前記方法の変法である。ある方法は、そのペプチドの逐次合成歴をコードするヌクレオチドのアレイを用いる。たとえば、生長しつつあるペプチドにヌクレオチドを逐次結合させ、P C Rにより復号して、結合したペプチドの構造を求めることができる。あるいは、そのペプチドの逐次合成歴をコードする有機低分子のアレイを、配列決定可能な標識として使用できる。たとえば生長しつつあるペプチドにヌクレオチドを逐次結合させ、P C Rにより復号して、結合したペプチドの構造を求めることができる。あるいは、そのライブラリーメンバーの逐次合成歴をコードする有機低分子のアレイを配列決定可能な標識として使用できる。

#### 【0275】

最後に、アミノ酸配列分析によりライブラリーのメンバーの構造を直接決定できる。

10

20

30

40

50

以下の特許（それぞれ本明細書に援用する）には、ランダムペプチドまたは非ペプチドライブラーの作製方法、およびそれらのライブラーをスクリーニングしてターゲットタンパク質に結合する化合物を同定する方法が記載されている。本発明に用いるS Iは、これらの特許に従って形成およびスクリーニングされるペプチドおよび非ペプチドリガンドの同定に用いられるターゲットとなりうる。

**【0276】**

U S P 5 , 2 7 0 , 1 7 0 ( 1 9 9 3 年 1 2 月 1 4 日、 S c h a t z らに発行 ) および U S P 5 , 3 3 8 , 6 6 5 ( 1 9 9 4 年 8 月 1 6 日、 S c h a t z らに発行 ) ( 両者を本明細書に援用する ) は、ペプチドライブラーおよびスクリーニング方法に関するものであり、これらを用いて S I リガンドを同定できる。 10

**【0277】**

U S P 5 , 3 9 5 , 7 5 0 ( 1 9 9 5 年 3 月 7 日、 D i l l o n らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、予め定めた抗原に結合するタンパク質の製造方法に関する。これらの方法を用いて S I リガンドを製造できる。

**【0278】**

U S P 5 , 2 2 3 , 4 0 9 ( 1 9 9 3 年 6 月 2 9 日、 L a d n e r らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、新規な結合タンパク質を目的とした開発に関する。その開示に従ってこれらのタンパク質を製造およびスクリーニングして、 S I リガンドを同定できる。

**【0279】**

U S P 5 , 3 6 6 , 8 6 2 ( 1 9 9 4 年 1 2 月 2 2 日、 V e n t o n らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、有用なペプチドの形成およびスクリーニング方法に関する。そこに記載の方法を用いて S I リガンドを同定できる。 20

**【0280】**

U S P 5 , 3 4 0 , 4 7 4 ( 1 9 9 4 年 8 月 2 3 日、 K a u v a r らに発行 ) ならびに U S P 5 , 1 3 3 , 8 6 6 、 U S P 4 , 9 6 3 , 2 6 3 および U S P 5 , 2 1 7 , 8 6 9 ( これらをそれぞれ本明細書に援用する ) を用いて、 S I リガンドを同定できる。

**【0281】**

U S P 5 , 4 0 5 , 7 8 3 ( 1 9 9 5 年 4 月 1 1 日、 P i r r u n g らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、ポリマーアレイの大規模写真平板法固相合成に関する。その教示を用いて S I リガンドを同定できる。 30

**【0282】**

U S P 5 , 1 4 3 , 8 5 4 ( 1 9 9 2 年 9 月 1 日、 P i r r u n g らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、ポリペプチドの大規模写真平板法固相合成およびその受容体結合スクリーニングに関する。

**【0283】**

U S P 5 , 3 8 4 , 2 6 1 ( 1 9 9 5 年 1 月 2 4 日、 W i n k l e r らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、機械的に指示したフローパターンを用いるきわめて大規模な固定化ポリマー合成に関する。そのような方法は S I リガンドの同定に有用である。

**【0284】**

U S P 5 , 2 2 1 , 7 3 6 ( 1 9 9 3 年 1 月 2 2 日、 C o o l i d g e らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、免疫アフィニティ法を用いるペプチドおよびオリゴヌクレオチドの逐次合成に関する。そこに記載の方法を用いて S I リガンドを同定できる。 40

**【0285】**

U S P 5 , 4 1 2 , 0 8 7 ( 1 9 9 5 年 5 月 2 日、 M c G a l l らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、オリゴヌクレオチドその他の生物ポリマーを空間アドレス指定可能な状態で表面に固定化することに関する。そこに記載の方法を用いて S I リガンドを同定できる。

**【0286】**

U S P 5 , 3 2 4 , 4 8 3 ( 1 9 9 4 年 6 月 2 8 日、 C o d y らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、多重同時合成のための装置に関する。そこに開示される装置および方法を用いて多重の化合物を製造し、スクリーニングして、 S I リガンドを同定できる。 50

## 【0287】

U S P 5 , 2 5 2 , 7 4 3 ( 1 9 9 3 年 1 0 月 1 2 日、 B a r r e t t らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、 抗リガンドを空間アドレス指定可能な状態で表面に固定化することに関する。 そこに記載の方法および組成物を用いて S I リガンドを同定できる。

## 【0288】

U S P 5 , 4 2 4 , 1 8 6 ( 1 9 9 5 年 6 月 1 3 日、 F o d e r らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、 きわめて大規模な固定化ポリマー合成に関する。 そこに記載のオリゴヌクレオチド合成方法を用いて S I リガンドを同定できる。

## 【0289】

U S P 5 , 4 2 0 , 3 2 8 ( 1 9 9 5 年 5 月 3 0 日、 C a m p b e l l らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、 ホスホナートエステルの合成方法に関する。 こうして製造されるホスホナートエステルをスクリーニングして、 S I リガンドである化合物を同定できる。 10

## 【0290】

U S P 5 , 2 8 8 , 5 1 4 ( 1 9 9 4 年 2 月 2 2 日、 E l l m a n らに発行 ; 本明細書に援用する ) は、 固体支持体上でのベンゾジアゼピン化合物の固相およびコンビナトリアル合成に関する。 それらの方法および化合物を用いて S I リガンドを同定できる。

## 【0291】

前記のように、 S I リガンドは抗体およびそのフラグメントであってもよい。 実際に、 これらの受容体のユニークな決定因子に対して産生された抗体はそのタンパク質 ( このタンパク質のみ ) を認識し、 その結果、 新規な診断薬および療法薬をこのユニークなマーカーへ指向させるのに使用できる特異的ターゲティング分子として作用しうる。 さらに、 これらの抗体を用いて生物試料中の S I またはそのフラグメントの存在を同定できる。 20

## 【0292】

実施例 2 : 転移性癌の診断に有用な分子マーカーを同定するための発現プロファイリングの使用

癌は世界的に重大な保健上の問題である。 癌は細胞の無制御な増殖および拡散である。 多くの癌のため、 隣接組織または離れた組織への転移の結果、 生理的障害が生じ、 しばしば死に至る。 原発性腫瘍を早期診断し、 かつその転移を診断できれば、 腫瘍性疾患の効果的処置に著しい貢献となる。

## 【0293】

診断時の病期は癌患者の予後を決定する最も重要な要因の 1 つであり、 この疾患のアジュvant 化学療法の役割を決定する。 病期判定は予後および療法上重要なので、 癌細胞の浸潤を検出するためにリンパ節の精確な組織病理学的評価がきわめて重要である。 癌転移の特定診断は、 現在は正常組織との組織学的および細胞学的類似性により行われている。 癌細胞はしばしばそれらの正常な起源細胞の表現型特性を保持する。 30

## 【0294】

しかし一般的なリンパ節鏡検は方法論的に限界がある。 他の細胞タイプから 1 個の腫瘍細胞、 または腫瘍細胞小塊ですら識別するのが困難であり、 感度に限界がある。 各リンパ節からの組織切片をわずか数個検査する標準法では各検体の > 9 9 % が観察から除外され、 サンプリング誤差が導入される可能性がある。 これらの限界は I 期および I I 期結腸直腸癌患者の再発頻度を考慮すれば明らかである。 自明のこととして、 これらの患者は治癒切除した時点では腸外疾患をもたない。 しかし粘膜 ( I 期 ) に限定した病変について 1 0 ~ 3 0 % 、 腸壁 ( I 期 ) に限定した病変について 3 0 ~ 5 0 % の再発率が報告されている。 40

## 【0295】

少数の腫瘍細胞を検出するための別法が病期判定に適用された。 これには、 系列組織切片の綿密な観察、 腫瘍特異的変異を検出するための P C R 、 免疫組織化学的検査、 および腫瘍トランスフォーメーションを生じた細胞に特異的に発現するバイオマーカーを検出するための R T - P C R が含まれる ( S loane , 1 9 9 5 , L a n c e t , 3 4 5 : 1 2 5 5 - 6 ; A b a t i and L i o t t a , 1 9 9 6 , C a n c e r , 7 8 : 1 0 - 6 6 ) 。 ある結腸直腸癌の研究で、 これらの方高感度法による病期判定と疾患の関連が認 50

められた。しかし、系列切片作製労力と経費がかかること、変異と腫瘍トランスフォーメーションに均一な関連性がないこと、および多くのバイオマーカーに特異性がないことにより、これらの方法の適用性には限界がある。

#### 【 0 2 9 6 】

したがって、大多数の転移性腫瘍が均一に発現する容易に検出できる分子マーカーがあれば、転移の検出および疾患の病期判定に有用であろう。特に必要なものは、組織および／または体液中の転移性腫瘍細胞の検出に有用な分子マーカーを単離する方法である。そのような方法は理想的には、処理量が多く、確立された確実なプロトコルを用いるものであろう。

#### 【 0 2 9 7 】

本発明の 1 態様は、転移性腫瘍細胞の検出に有用な分子マーカーを同定および特性解明する方法に関する。最も一般的には、腫瘍細胞の検出に用いる分子マーカーは、細胞の過剰増殖状態の結果として特異的に発現する転写体またはタンパク質である。これに対し、本発明方法により同定および特性解明される分子マーカーは、最終分化した組織において発現し、腫瘍細胞に特異的ではない。腫瘍細胞は、それらの起源組織の最終分化に関連する遺伝子を発現し続ける。これらの遺伝子の転写体は理想的には、到達組織、たとえばリンパ節へ転移した腫瘍細胞の検出に適するものである。起源組織特異的マーカーは、到達組織にあるはずがないからである。これらの分子マーカーは起源組織に特異的であって、特定の腫瘍に特異的ではないので、それらは起源組織から転移した多くの腫瘍を幅広く認識する。

10

#### 【 0 2 9 8 】

転移性腫瘍細胞の検出に有用な分子マーカーを同定する方法により”候補”となる組織特異的分子マーカーを同定し、これらの候補マーカーのうちどれが転移性癌の検出に適するかを判定する。目的とする起源組織の最終分化に関連する組織特異的マーカーは下記により解明される：起源組織の最終分化に関連する転写因子の活性をダウンレギュレートし、ダウンレギュレートされた起源細胞の発現プロフィールを変化していない対照の起源細胞の発現プロフィールと比較し、発現が転写因子のダウンレギュレーションに関連してアップレギュレートまたはダウンレギュレートされることにより組織特異的マーカーの候補である転写体またはタンパク質を同定する。組織特異的マーカー候補の発現を、対照の起源組織、その起源組織に由来する腫瘍、および生検のための到達組織において比較する。対照の起源組織および腫瘍において発現しているが到達組織においては発現していない候補マーカーが、転移性腫瘍細胞の検出に有用なマーカーである。

20

#### 【 0 2 9 9 】

本明細書中で用いる用語”最終分化 ( t e r m i n a l d i f f e r e n t i a t i o n ) ”は、それ以上の分化は起き得ない細胞または組織の分化状態を表わす。

30

#### 【 0 3 0 0 】

本発明の起源組織は、腫瘍細胞が最初に出現した最終分化したいずれかの身体組織である。”出現した”とは、腫瘍細胞に関連する過剰増殖性表現型を細胞に付与することを意味する。起源組織は、好ましくはそれから癌細胞が転移する可能性の最も高い組織である。好ましい態様において、組織は哺乳動物のものであり、最も好ましい態様においては組織はヒトのものである。好ましい態様において、起源組織には結腸直腸、腸、胃、肝臓、口、食道、咽喉、甲状腺、皮膚、脳、腎臓、脾臓、胸部、頸、卵巣、子宮、精巣、前立腺、骨、筋肉、膀胱および肺が含まれるが、これらに限定されない。本発明方法には樹立した細胞系を用いるのが特に有利である。特に好ましい細胞系は最終分化した起源組織の細胞であり、これには胚組織細胞系および不死化細胞系が含まれる ( Y e a g e r a n d R e d d e l , 1 9 9 9 , C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l o g y , 1 0 : 4 6 5 - 4 6 9 ) 。特に好ましい細胞系には T 8 4 、 C a c o 2 、 H T 2 9 、 S W 4 8 0 、 S W 6 2 0 、 N C I H 5 0 8 、 S W 1 1 1 6 、 S W 1 4 6 3 、 H e p G 2 、 H S 7 6 6 T および H e L a が含まれるが、これらに限定されない。これらおよび他の起源組織細胞系が A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ( バージニア州

40

50

マナッサス)から入手でき、また市販されている。

**【0301】**

癌の起源組織は、起源組織中に出現する腫瘍から単離される。癌細胞は、患者から腫瘍を摘出することにより得られる。樹立した腫瘍組織集団、すなわち腫瘍細胞の細胞系を本発明方法に使用するのが有利である。目的とする癌細胞系には、T84、Caco2、HT29、SW480、SW620、NCI-H508、SW1116、SW1463、HepG2、HS766TおよびHeLaが含まれるが、これらに限定されない。これらの細胞系および他の有用な細胞系がAmerican Type Culture Collection(バージニア州マナッサス)から入手でき、また市販されている。

**【0302】**

本発明の到達組織は、転移性腫瘍細胞を検出するために生検できるいすれかの組織または体液である。転移性腫瘍細胞を蓄積する傾向のある幾つかの身体組織が当業者に周知であり、これらの組織が到達組織として好ましい。しかし到達組織は任意の身体組織であってよい。特に重要な到達組織にはリンパ節、血液、脳脊髄液および骨髄が含まれるが、これらに限定されない。他の起源組織細胞系がAmerican Type Culture Collection(バージニア州マナッサス)から入手でき、また市販されている。好ましくは、生検組織または切除組織を到達組織として用いる。

**【0303】**

本発明方法に用いる転写因子は、起源組織の最終分化に関連する転写因子である。そのような多数の転写因子が当業者に既知である。好ましい態様において、転写因子は好ましい起源組織の最終分化に関連する。好ましい態様において、転写因子には下記のものが含まれるが、これらに限定されない: Cdx2(腸)(Mallio, G.V., et al., 1997, Int J Cancer, 74:35-44; GenBank寄託No. BF591065)、STAT5(胸部)(Hou, J., et al., 1995, Immunity, 2:321-329; GenBank寄託No. L41142)、NKX3.1(前立腺)(GenBank寄託No. AF247704)、GBX2(前立腺)(Lin, X., et al., 1996, Genomics, 31:35-342; GenBank寄託No. NMU13219)、FREAC-2(肺)(Pierrou, S., et al., 1994, EMBO J., 13:5002-5012; GenBank寄託No. U13220)、Pit1(甲状腺)(Wu, W., et al., 1998, Nat Genet, 18:147-9; GenBank寄託No. NM006261)、HNF4(肝臓)(Chartier, F.L., et al., 1994, Gene, 147:269-272; Kritis, A.A., et al., 1996, Gene, 173:275-80; GenBank寄託No. X76930, X87870, X87872, X87871)、LFB1(肝臓)(Bach, I., et al., 1990, Genomics, 8:155-164; GenBank寄託No. NM000545)、IPF1(脾臓)(Stoffel, M., et al., Genomics, 28:125-126; GenBank寄託No. NM000209, U30329)、Isl1(脾臓)(Wang, M. and Drucker, D.J., 1994, Endocrinology, 134:1416-1422; GenBank寄託No. XM003669, NM002202)およびMyoD(筋肉)(Pearson-White, S.H., 1991, Nucleic Acids Res., 19:1148; GenBank寄託No. X56677);これらをすべて本明細書に援用する。

**【0304】**

本発明方法は、ある態様においてはさらに最終分化に関連する転写因子遺伝子を同定する工程を含む。これらの追加工程は、起源組織の最終分化に関連する遺伝子の調節領域に結合する転写因子を単離することを含む。現在、転写因子および転写因子遺伝子の特性を解明するための多数のプロトコルがあり、当業者に知られている。好ましい態様においては、電気的移動度シフトアッセイおよび/またはスーパーシフトアッセイを用いて、その発

10

20

30

40

50

現が最終分化に関連する遺伝子の調節領域に結合する転写因子の特性を解明する。実施例1に、腸特異的タンパク質グアニリルシクラーゼCをコードする遺伝子の調節領域への結合による転写因子Cd<sub>x</sub>2の特性解明を示す。

#### 【0305】

本発明方法においては、起源組織細胞集団における最終分化に関連する転写因子の活性を”ダウンレギュレートする”。”ダウンレギュレートする”とは、その細胞集団における転写因子の活性を”正常な”または対照細胞集団と比較して低下させることを意味する。本明細書中で用いる”細胞集団”は、細胞培養物、組織培養物、切除組織もしくは生検試料、または目的とする組織タイプに由来するいづれかの細胞群を表わす。正常または対照の起源細胞集団は、転写因子をダウンレギュレートするのに用いる起源組織の培養物に由来する起源細胞集団であり、ただし転写因子の活性が修飾されていないものである。10

#### 【0306】

細胞集団における転写因子の活性は、当業者に周知の幾つかの手段でダウンレギュレートできる。ある態様においては、遺伝子のコード領域または調節領域の部位特異的変異形成により、転写因子を、または転写因子遺伝子のコード配列にから構築されるアンチセンス遺伝子の転写を、ダウンレギュレートする。あるいは他の態様においては、特異的抗体、DNA結合分子、あるいは転写複合体のアセンブリーおよび/または開始の妨害により転写因子の活性を妨害する低分子によって、転写因子の活性をブロックまたは阻害する。重要なインヒビターポリヌクレオチド分子にはFP1、FP1BおよびSIF1が含まれるが、これらに限定されない(実施例1参照)。最後に他の態様においては、転写因子を不活性化するシグナリング事象の活性化により、たとえば転写因子をリン酸化および不活性化する細胞シグナリング事象を開始する細胞外リガンドの添加により、転写因子をダウンレギュレートできる。これらの方法は当業者に周知であり、そのプロトコルは多数の実験手引き、たとえばAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, ニューヨーク, John Wiley & Sons社, 2000中にみられる。これらの態様は、ダウンレギュレートされた起源細胞を形成する方法を説明するものである。他のダウンレギュレーション方法も当業者に周知であり、本発明の範囲に含まれる。20

#### 【0307】

好ましい態様において、ダウンレギュレートされる起源細胞はCd<sub>x</sub>2-nu11ポリープである。Cd<sub>x</sub>2-nu11ポリープは、腸上皮における分化を制御するホメオボックス遺伝子cd<sub>x</sub>2の不活性コピーについてヘテロ接合体であるマウスから切除できる(Chawengsaksophak et al., 1997, Nature, 386: 84-87; Tamai et al., 1999, Cancer Res., 59: 2965-2970; Beck et al., 1999, PNAS, 96: 7318-7323; 本明細書に援用する)。Cd<sub>x</sub>2はエンドサイト(endocyte)分化のマーカーを刺激する。これらのヘテロ接合マウスは、活性Cd<sub>x</sub>2およびCd<sub>x</sub>2関連マーカーを発現しない多数の腸ポリープ様病変を発症する。この態様においては、Cd<sub>x</sub>2-nu11ポリープと周囲の腸組織の発現プロフィールを比較して、Cd<sub>x</sub>2により刺激されたエンドサイト分化マーカーを同定する。30

#### 【0308】

本発明方法は、ダウンレギュレートされた起源細胞集団の発現プロフィールと対照の起源細胞集団の発現プロフィールを比較する工程を含む。”発現プロフィール”とは、その細胞集団において発現した核酸またはタンパク質のアレイを意味する。最も一般的には、発現プロフィールはプロファイリングされた細胞集団にみられる核酸分子、主にmRNA分子のアレイである。RNA発現プロフィールを比較する方法は当業者に周知である。重要な方法には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：ディファレンシャルデイスクレイン法(Welsh et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20: 4695-4970; Liang and Pardee, 1992, Science, 257: 967-970; Barnes, 1994, Proc. Natl40

10

20

30

40

50

. Acad. Sci. USA, 91: 2216 - 2220; Cheng et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5695 - 5699; およびそれらに引用される文献)、サブトラクティブハイブリダイゼーション (Subtraction; Diatchenko et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 6025 - 6030; Gurskaya et al., 1996, Anal. Biochem., 240: 90 - 97; Endege et al., 1999, Biotechniques, 26: 542 - 550; およびそれらに引用される文献)、発現アレイ (Schena et al., 1995, Science, 270: 467 - 470; Shalon et al., 1996, Genome Res., 6: 639 - 645; Cheung et al., 1999, Nature Genetics, 21 (Suppl.): 15 - 19; およびそれらに引用される文献)、遺伝子発現系列分析 (Serial Analysis of Gene Expression; SAGE) (Veculescu et al., 1995, Science, 270: 484 - 487; Zhang et al., 1997, Science, 276: 1268 - 1272; Adams et al., 1996, Bioessays, 18: 261 - 261; およびそれらに引用される文献)、遺伝子発現迅速分析 (Rapid Analysis of Gene Expression; RAGE) (Wang et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27: 4609 - 4618; およびそれらに引用される文献)、マッシブリパラレルシグナチュアシーケンシング (Massively Parallel Signature Sequencing; MPSS) (Brenner et al., Nature Biotech., 18: 630 - 634; およびそれらに引用される文献) および発現配列タグタンデムアレイライゲーション (Tandem Arrayed Ligation of Expressed Sequence Tags; TALEST) (Spinella et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27: e22 (I - VII I); およびそれらに引用される文献)。

#### 【0309】

上記方法の多くは市販のキット、試薬および装置を用いて実施できる。ディファレンシャルディスプレイ用の市販キットは特に Delta (登録商標) ディファレンシャルディスプレイキット (Clontech、カリフォルニア州パロアルト) などとして購入できる。サブトラクティブハイブリダイゼーション用の市販キットは特に Clontech PCR-Select (登録商標) Subtraction (Clontech、カリフォルニア州パロアルト) として購入できる。普通の cDNA 集団のマイクロアレイは購入でき (Incyte Genomics, ミズーリ州セントルイス)、または注文生産マイクロアレイは業者に注文できる (Radius Biosciences、マサチューセッツ州メドフィールド; ProtoGene Laboratories 社、カリフォルニア州メンローパーク)。好ましいメンプラン型マイクロアレイは LifeGrid (商標) Sequence-Verified Gene Expression Array Kits (Incyte Pharmaceuticals 社、ミズーリ州セントルイス) であり、好ましいスライド型マイクロアレイは GEM (登録商標) Gene Expression Microarray (Incyte Pharmaceuticals 社、ミズーリ州セントルイス) である。RAGE 用の市販キットは Kirkegaard & Perry Laboratories 社 (メリーランド州ガイザースバーグ) から入手できる。Celera Genomics (メリーランド州ロックビル) が開発した有標技術 Gene Tag (登録商標) も、RNA 転写体のプロフィールにおける遺伝子発現の定量に使用できる。

#### 【0310】

タンパク質発現プロフィールも当業者に周知の方法で比較することができる。特に重要な方法には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：二次元電気泳動・質量分析 (2DE-MS) (O'Farrell, 1975, J. Biol. Chem., 250: 50

4007-4021; Patterson and Aebersold, 1995, Electrophoresis, 16: 1791-1814; Gygi et al. (2000) Current Opinion in Biotech., 11: 396-401; およびそれらに引用される文献) および同位体コードアフィニティータグ (Isotope-Coded Affinity Tags; ICAT) (Gygi et al., 1999, Nature Biotech., 17: 994-999; Gygi et al., 2000, Current Opinion in Biotech., 11: 396-401; およびそれらに引用される文献)。

#### 【0311】

発現プロフィールの比較により同定された目的とする核酸分子またはタンパク質分子をさらに、当業者に周知の方法で単離できる。選択する単離方法は、多くの場合、発現プロフィールの比較に用いた方法に依存し、好ましい方法は比較方法を記載した文献に記載されていることが多い(前記の引用文献を参照)。たとえば核酸バンドをポリアクリルアミドゲル、アガロースゲルまたはニトロセルロースから取り出し、核酸を溶離し、当技術分野で周知の方法によりクローニングすることができる(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, ニューヨーク, John Wiley & Sons社, 2000)。

10

#### 【0312】

本発明方法は、候補マーカーの発現を数種類の細胞において比較する工程を含む。単一遺伝子の発現を比較する方法は多数あり、当業者に周知であろう(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, ニューヨーク, John Wiley & Sons社, 2000)。これにはノーザン分析、cDNAについてのサザン分析、RNase保護アッセイ、競合PCR、定量PCR、5'ヌクレアーゼアッセイ(Lie and Petropoulos, 1998, Curr. Opin. Biotech., 9: 43-48 およびそれに引用される文献)、ウェスタン分析、ドットプロットウェスタン、ELISAおよび他の免疫アッセイ、ならびに免疫組織化学的分析が含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0313】

本発明方法により同定された分子マーカーを用いて哺乳動物患者の癌を診断し、病期を判定することができる。これには、術後の癌再発の追跡および正常な患者の癌発症のスクリーニングも含まれる。癌患者の場合、用いる分子マーカーは理想的にはその患者の癌が発症したと同じ組織から同定されたものであろう。癌病歴のない患者の場合、種々の臓器組織から単離した分子マーカーを選択することが好ましい。転移は、核酸またはタンパク質分子マーカーを検出するいずれかの方法で診断できる。検出できる転移のサイズは、一部はその方法の感度により決まる。好ましい方法ではPCR、ELISAなどを利用する。実施例2に、本発明方法の分子マーカーを用いて転移性癌を診断するための特に好ましい方法を示す。

30

#### 【0314】

組織特異的分子マーカーを使用して、療法薬を特定の組織および臓器系へ局在化させることもできる。この使用は、組織細胞の表面に局在化する組織特異的分子マーカーに特に適する。これらの療法薬には化学療法薬、鎮痛薬、抗体、抗炎症薬、ホルモンおよび刺激薬が含まれるが、これらに限定されない。

40

#### 【0315】

タンパク質分子マーカーを用いて抗体を產生することもでき、これらを診断方法および療法薬の局在化に使用できる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびにそのフラグメント、ならびにそれらの種々のコンジュゲートを、当技術分野で周知の方法により調製できる。

#### 【0316】

実施例3 Cd x 2 はグアニリルシクラーゼC 腸特異的発現に関連する転写因子であるこれは、グアニリルシクラーゼC (G C - C ) の腸特異的発現に必要な転写活性化因子の

50

同定を示す。腸細胞における特異的発現に必要な近位 G C - C プロモーター領域は、C d × 2 に対するコンセンサス結合配列をもつ保護された領域 F P 1 を含む。F P 1 は腸細胞由来の核タンパク質のみと特異的に複合体を形成し、この複合体を抗 C d × 2 抗体が認識する。F P 1 内の C d × 2 コンセンサス結合配列を除去または変異させると、腸細胞のレポーター遺伝子活性は腸外細胞において得た活性にまで低下した。これらのデータは、C d × 2 が G C - C の組織特異的転写を活性化することを示唆する。

### 【0317】

#### 材料および方法

ゲノムライブラリースクリーニングおよび配列決定：G C - C 遺伝子 5' 調節領域を F I X I I ヒトゲノムライブラリー (Stratagene、カリフォルニア州ラ・ホヤ) からクローニングした。グアニリルシクラーゼ C (G C - C) cDNA のエキソン 1 に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより、ライブラリーをスクリーニングした。転写開始部位の 2 kb 上流にある 2.8 kb Xba I フラグメントを、Bluescript KS (Stratagene) にサブクローニングした。全構築体をこの Bluescript / G C - C 遺伝子構築体から形成した。各構築体の核酸配列を、Applied Biosystems Model 377 DNA 配列決定システムによる配列分析のための Big Dye terminator (登録商標) 反応化学により確認した (Perkin-Elmer、コネチカット州ノーウォーク；Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスター・シティー)。

### 【0318】

レポーター遺伝子構築体：転写開始部位に対し - 835 ~ + 117、- 257 ~ + 117、- 129 ~ + 117、および - 46 ~ + 117 のフラグメントを、選択した制限エンドヌクレアーゼ消化により Bluescript KS 構築体から単離した (Mann, et al., 1996, Biochem. Biophys. Acta, 1305: 7-10)。これらのフラグメントを平滑末端にし、Bluescript KS の EcoRV 部位にライゲートさせた。Sma I および Kpn I により挿入配列を Bluescript KS から切り取り、pGL-3-Basic ルシフェラーゼベクター (Promega、ワイオミング州マディソン) 中へライゲートさせた。エンハンサーをもつ SV40 プロモーターを含む pGL-3 対照ベクターを陽性対照として用いた。

### 【0319】

PCR ベース Ex-site Mutation Kit (Stratagene) を用いて、- 835 ~ + 117 pGL-3 - 構築体中に変異を形成した。目的部位をフランкиングするプライマーを用いて、欠失構築体を作製した。下記のリン酸化プライマーを用いて F P 1 " CCC " 変異体を作製した：

### 【0320】

#### 【化8】

5' GCCCATAGCTCTGACCTTCCTG 3' (SEQ ID NO:7) および

5' AGAGAGATTAGCTGGGCCTCACCC 3' (SEQ ID NO:8).

### 【0321】

細胞培養および形質転換：細胞系はすべて American Type Culture Collection (メリーランド州ロックビル) から入手された。T 84 細胞を DMEM / F 12 (Life Technologies、メリーランド州ロックビル) 中で、Caco 2 細胞を DMEM (Life Technologies) 中で、Hep G 2 および HS 766 T 細胞を DMEM 高グルコース (Cellgro (登録商標))、Mediatech 社、バージニア州ハーンドン) 中で、HeLa 細胞をグルタミン加 MEM (Life Technologies) 中で培養した。すべての細胞を 37 °C 、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気の雰囲気に維持し、4 日毎に継代した。レポーター遺伝子活性のアッセイは、6 ウェルプレートにウェル当たり 5.0 × 10<sup>10</sup> 細胞 (T 84、Caco 2 およ

10

20

30

40

50

びHeLa)または $1 \cdot 0 \times 10^{10}$ 細胞(HePG2およびHS766T)で接種した細胞について実施された。細胞を一夜インキュベートし、PBSで1回洗浄し、新鮮な培地を補充した後、形質転換した。

### 【0322】

Qualifier Kit(Quiaagen、バージニア州バレンシア)で精製したプラスミドを、非リポソーム脂質形質転換試薬Effectene(登録商標)(Quiaagen)により細胞中へ形質転換した。すべての細胞系をpGL-3-Basicから修飾した実験用ホタルルシフェラーゼレポーター構築体0.4mg、およびウイルスチミジンキナーゼプロモーターで誘導されるレニラ(Renilla)ルシフェラーゼ対照レポーターpRL-TK(Promega)0.1mgの両方で同時形質転換した。<sup>10</sup>細胞を形質転換用複合体と共に24時間インキュベートし、PBSで洗浄し、次いで適切な培地を補充してさらに24時間インキュベートした。合計48時間後、細胞を溶解し、二重ルシフェラーゼレポーター・アッセイ系(Promega)のプロトコルおよび材料を用いてアッセイした。ルミネセンスをBiolumbit 1251ルミノメーター(Pharmacia LKB、ウスエーデン、ウプサラ)により測定した。pGL3構築体からのルシフェラーゼ発現をpRL-TK発現に対して正規化した。

### 【0323】

核タンパク質抽出：本質的に前記に従って核抽出物を調製した(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, ニューヨーク, John Wiley & Sons社, 2000)。核タンパク質濃度をクーマシータンパク質アッセイ試薬(Pierce、イリノイ州ロックフォード)により測定した。<sup>20</sup>

### 【0324】

DNAse I フットプリントинг：GC-C遺伝子の転写開始部位に対し-46~-257の調節領域フラグメントをDraIIIおよびAluI消化により採取し、平滑末端にし、前記に従ってBluescript(登録商標)KSのEcoRV部位中へサブクローニングし、次いでEcoRIおよびHindIIIにより消化して、プローブのコード鎖が[ $-^{32}P$ ]dCTPで確実に单一末端標識されたようにした。フットプリントинг反応で得た生成物を変性性6%ポリアクリルアミドゲル上で分離し、Phosphor imager SI(Molecular Dynamics、カリフォルニア州サンベール)により視覚化した。<sup>30</sup>

### 【0325】

電気移動度シフトアッセイ(EMSA)：DNAse I保護アッセイと同じ緩衝液(4%グリセロール, 10mMトリス-HCl(pH7.5), 50mM NaCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>および5mM DTT)中で実施するタンパク質-DNA結合反応に、1mgのポリ(dI-dC)-ポリ(dI-dC)(Amersham Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカッタウェイ)および30kcpmのプローブを含有させた。核抽出物の添加により反応を開始し、室温で30分間インキュベートして、タンパク質複合体を形成させ、0.5×TBEランニング緩衝液中、6%非変性性ポリアクリルアミド(37.5:1)ゲル上で分離した。ゲルを乾燥させた後、放射性標識複合体をオートラジオグラフィーにより視覚化した。競合アッセイにおいては、非標識競合体を反応混合物に標識プローブの25~250倍モル過剰濃度で添加した後、核抽出物を添加した。30分の初期インキュベーション期間後、2mlのネズミCd<sub>x</sub>2抗体の添加によりスーパーシフトアッセイを実施した：次いでさらに30分間インキュベーションを続けた。インビトロで線状pRC/CMV-Cd<sub>x</sub>2発現ベクターをTNT-Quicckcoupled Kit(Promega)の鑄型として用いて、転写および翻訳されたネズミCd<sub>x</sub>2タンパク質を形成した。<sup>40</sup>

### 【0326】

EMSA用オリゴヌクレオチドプローブを合成した。相補的オリゴヌクレオチドを10mMトリス-HCl(pH7.5)、1mM EDTA中において、Hybaid The

10

20

30

40

50

r m a l C y c l e r 中で、温度 95 から 25 まで 1 時間にわたってプログラミングされた勾配によりアニールさせた。プローブの一本鎖配列は下記のとおりであった：

【 0 3 2 7 】

【 化 9 】

FP1: 5' CAGCTAATCTCTGTTTTAGCTCTGACCTTTC 3'(SEQ ID

NO:9)

FP1B: 5' ATCTCTCTGTTTTAGCTCTGACCTTCTGGGTGC 3'(SEQ ID

NO:10)

FP1-CCC: 5' CAGCTAATCTCTGCCCATAGCTCTGACCTTTC 3'(SEQ ID

10

NO:11)

SIF1: 5' GATCCGGCTGGTGAGGGTGCAATAAAACTTTATGAGTA 3'(SEQ

ID NO:12)

【 0 3 2 8 】

太字の配列は特異的 C d × 2 結合部位を示す。FP1 保護部位に形成された変異に下線を施してある。アニールしたオリゴヌクレオチドプローブ 5 p m o l を、1 単位の T 4 ポリヌクレオチドキナーゼおよび 2 m l の 7 , 0 0 0 Ci / mm o l [ - <sup>32</sup> P ] A T P により末端標識した (Ausubel et al. , Current Protocols in Molecular Biology , ニューヨーク , John Wiley & Sons 社 , 1999) 。標識プローブを Quiaquick ヌクレオチドカラム (Quiaagen) により精製した。

20

【 0 3 2 9 】

サウスウェスタンおよびウェスタンプロッティング：核抽出物を還元性 S D S 試料用緩衝液中で変性させ、8 % トリス - グリシン - S D S ポリアクリルアミドゲル上で分離し、ニトロセルロースにプロットした。サウスウェスタン分析のために、プロットしたタンパク質を 4 ° で 1 時間、3 % の脱脂粉乳を含有する Z ' 緩衝液 (2 5 m M ヘペス - K O H (pH 7 . 6 ) , 1 2 . 5 m M M g C l <sub>2</sub> , 2 0 % グリセロール , 0 . 1 % Nonidet P - 4 0 , 1 0 0 m M K C l , 1 0 m M Z n S O <sub>4</sub> , 1 m M D T T ) 中においてプロックした (Hames and Higgins , Gene Transcription: A Practical Approach , The Practical Approach Series , ニューヨーク , Oxford University Press , 1993) 。メンプランを E M S A 結合用緩衝液で 5 分間すすぎ、1 0 0 k c p m / m l の標識 FP1 プローブを含む E M S A 結合用緩衝液 2 0 m l と室温で 1 時間ハイブリダイズさせた。次いで E M S A 結合用緩衝液を 3 回交換してメンプランを 5 分間ずつ洗浄し、乾燥させ、オートラジオグラフィーにより視覚化した。

30

【 0 3 3 0 】

ウェスタンプロットを、5 % の脱脂粉乳を含む T B S / 0 . 1 % Tween - 2 0 中でプロックし、1 : 5 0 0 0 希釈した C d × 2 抗体で試験した。一次抗体の結合を、アルカリ性ホスファターゼ結合したヤギ - 抗ウサギ二次抗体 (1 : 1 0 , 0 0 0 希釈) (Sigma) により視覚化した。A P C o l o r K i t ( Bi o r a d ) 中のアルカリ性ホスファターゼ基質 B C I P および N B T を用いた。

40

【 0 3 3 1 】

結果

G C - C 遺伝子の 5 ' 側調節領域にある腸特異的発現を制御するエレメントの決定：種々の細胞系を - 4 6 構築体で形質転換したときの最小ルシフェラーゼ活性を求めた (図 1) 。それぞれ他のレポーター遺伝子構築体で形質転換した腸細胞のルシフェラーゼ活性は増大した (図 1) 。腸外細胞をこれらの構築体で形質転換した場合、ルシフェラーゼ活性は

50

増大しなかった(図1)。これらの結果はこれまでのGC-C遺伝子調節研究と一致し、1又はそれより多くの組織特異的調節エレメントが+118~-257領域にあることを示唆する。-46~-129構築体による形質転換は腸細胞のみのレポーター遺伝子活性を有意に増大させた(図1)ので、またこの領域は進化的に高度に保存されているので、これを詳細な構造・機能分析のために選んだ。

#### 【0332】

GC-Cの5'側調節領域への腸特異的核タンパク質結合によるDNase I保護: DNase I保護アッセイにより、腸細胞からの核抽出物のみで保護される2領域(-75~-83, FP1; -164~-178, FP3)が明らかになった(T84; 図2)。領域-104~-137(FP2)および-180~-217(FP4)は腸細胞(T84)または腸外細胞(HepG2)からの核抽出物で保護されたが、FP2の近位末端と遠位末端は異なる保護パターンを示した。これらのデータは、保護されたFP1およびFP3と表示される領域は腸細胞からの核抽出物に特異的な結合部位であることを示唆する。さらに、GC-C遺伝子の近位5'側フランкиング領域にある開クロマチン構造の腸特異的部位を、塩基-163のDNase I過感受性部位により同定した(図2)。

#### 【0333】

FP1またはFP3欠失後の-857構築体の転写活性:T84細胞の転写から、FP3の欠失によりルシフェラーゼ活性が野生型構築体と対比して2.5倍増大することが明らかになった(図3)。これに対し、FP1の除去によりT84細胞のルシフェラーゼ活性はHepG2細胞にみられるレベルにまで低下した(図3)。これらのデータは、FP3が負の調節エレメントを含むこと、およびFP1が腸特異的な正の調節エレメントを含むことを示唆する。転写因子結合部位のデータベースであるTRANSFAC(Heine meyer et al., 1998, Nucleic Acids Res., 26: 364-370)による分析で、FP1はホメオドメインタンパク質Cd×2に対するコンセンサス結合部位を含むことが明らかになった(Quandt et al., Nucleic Acids Res., 1995, 23: 4878-84)。Cd×2は数種類の遺伝子の腸特異的発現を指令する転写因子であるので、FP1をより詳細に調べた(Traber and Silberg, 1996, Annu. Rev. Physiol., 58: 275-97)。

#### 【0334】

腸核抽出物とFP1プローブによって特異的複合体が形成される:オリゴヌクレオチドプローブをT84、Caco2、HepG2またはHeLa細胞から調製した核抽出物と共にインキュベートすることにより、保護された部位FP1が腸特異的複合体を形成する能力を測定した。実際に、FP1プローブをこれらの細胞からの核抽出物と共にインキュベートすると、EMSAにより数種類の複合体が得られた(図4)。しかし腸特異性に対する基準を満たしたのは1種類の複合体のみであり、これにはHepG2またはHeLa細胞からの抽出物ではなく、T84およびCaco2からの核抽出物による形成が含まれる。HepG2またはHeLa細胞からの抽出物ではなく、T84およびCaco2からの核抽出物は、そのプローブを用いて先に得られたものと同一のSIF1とも複合体を形成し、これらの抽出物の統合性が証明された(Suh et al., 1994, Mol Cell Biol., 14: 7340-51)。T84核抽出物と形成されたEMSA複合体はすべて、漸増量の非標識FP1と濃度依存性様式で競合した。これに対し、Cd×2結合部位を特異的に変異させた非標識競合体(FP1-CCCプローブ; 材料および方法を参照)は腸特異的複合体と競合しなかった。Cd×2に対する2つのコンセンサス結合部位を含むオリゴヌクレオチドであるFP1は、非標識FP1より強くFP1依存性腸特異的複合体形成を選択的に阻害したが、残りのT84-EMSA複合体の結合には影響を与えたなかった(Suh et al., 1994)。これらのデータは、FP1保護された部位に結合する腸特異的因子はCd×2である可能性が最も高いことを示唆する。

#### 【0335】

Cd×2はFP1プローブに特異的に結合する: FP1がCd×2に対する結合部位であ

10

20

30

40

50

るか判定するために、標識 F P 1 をインビトロ転写および翻訳されたネズミ C d x 2 と共にインキュベートした。その結果、T 8 4 核抽出物により形成された腸特異的複合体と移動度が同一である複合体が得られた。これに対し、標識 F P 1 - C C C は C d x 2 または T 8 4 核抽出物のいずれのとも腸特異的複合体を形成しなかった。C d x 2 に対する抗体は、標識 F P 1 と T 8 4 核抽出物またはインビトロ転写および翻訳 C d x 2 のいずれかとの間で形成された特異的複合体の移動度を低下させた。これに対し、関連のホメオドメイン転写因子 C d x 1 に対する抗体は、腸特異的複合体の移動度を変化させなかった。これらのデータから、F P 1 保護された部位が C d x 2 の結合部位であるという結論に達した。

## 【 0 3 3 6 】

サウスウェスタンおよびウェスタンプロット法による腸特異的核因子の同定：F P 1 プローブおよび抗 C d x 2 抗体が同一の腸特異的タンパク質に結合するか調べた。F P 1 プローブに対する相同性の高い標識 F P 1 B は T 8 4 および C a c o 2 核抽出物中にある約 40 kDa の腸特異的タンパク質に特異的に結合したが、H e p G 2 核抽出物には結合しなかった。さらに、F P 1 B プローブは試験したすべての細胞中に存在する約 131 kDa のタンパク質に結合した。同様に、抗 C d x 2 抗体は、T 8 4 細胞核抽出物において発現した約 40 kDa のタンパク質ダブレットを認識したが、H e p G 2 または H e L a 細胞核抽出物において発現したものは認識しなかった；これは C d x 2 に特徴的なパターンである (James et al., 1994, J Biol Chem, 269: 15229-37)。このように、F P 1 保護された領域は C d x 2 と同一の分子量および抗原認識をもつ腸特異的因素に結合する。さらにサウスウェスタンプロットにより、F P 1 プローブは C d x 2 に直接結合することが明らかになった。

## 【 0 3 3 7 】

G C - C プロモーターの腸特異的遺伝子発現における C d x 2 結合エレメント (F P 1) の役割：-835 ルシフェラーゼ遺伝子構築体の F P 1 エレメント中へ " C C C " 変異を導入した。この変異レポーター遺伝子構築体は T 8 4 細胞において活性低下を示した；これは全 F P 1 領域を欠失させた構築体に匹敵した (図 5)。F P 1 欠失体も F P 1 の " C C C " 変異体も、H e p G 2 細胞におけるルシフェラーゼ活性は変化させなかった (図 5)。これらのデータにより、G C - C プロモーターの活性には無傷の C d x 2 結合部位が必要であることが証明された。実際に、C d x 2 結合部位を攪乱すると最小活性になった。

## 【 0 3 3 8 】

実施例 4：グアニリルシクラーゼ C メッセンジャー R N A を再発性 I I 期結腸直腸癌の検出のための分子マーカーとして使用する

この例は、転移の診断における組織特異的分子マーカーの使用を示す。R T - P C R による G C C m R N A の検出により、結腸直腸癌の病期判定の精度が向上する。リンパ節において腸外組織中の結腸直腸癌細胞に対する分子マーカーである G C C m R N A が発現したことは、リンパ節が組織学的には陰性である患者における疾患再発に関連する (I I 期)。G C C m R N A の発現は、標準的組織病理学においては検出限界未満である結腸直腸癌ミクロ転移の存在を反映する。G C C 特異的 R T - P C R は、10<sup>7</sup> 個の有核血球中 1 個のヒト結腸直腸癌細胞 (T 8 4 細胞、A T C C C、メリーランド州ロックビル) を、信頼性および再現性をもって検出できる (Carrithers et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93: 14827-32)。

## 【 0 3 3 9 】

グアニリルシクラーゼファミリー受容体のメンバーである G C C は、腸粘膜細胞にのみ特異的に発現する。しかし G C C 発現は、結腸直腸癌細胞への腫瘍トランスフォーメーションを受けた腸細胞においても持続する。300 例以上の外科検体を検査して、G C C をすべての原発性および転移性結腸直腸癌細胞が特異的に発現するが、他のいずれの腸外組織または腫瘍も発現しないことを証明した。G C C は、診断後 3 年以下の再発を伴う I I 期患者からのリンパ節のみにおいて同定され、6 年で再発性疾患を伴わない患者からのリ

10

20

30

40

50

ンパ節には同定されなかった。

### 【0340】

#### 材料および方法

患者および組織：Thomas Jefferson University 病院腫瘍登録データベースを、1989～1995年に結腸直腸癌の治療を受けた患者について検索した。これはこの研究のために患者を適切に追跡できる期間である。この初期調査は、再発性ではなく継時性(metachronous)の癌を伴う患者を不注意に含めるのを避けるために、インデックス手術後3年未満で再発性疾患を伴うI期患者を除外する目的で企画された。この調査で、外科処置時に転移の徴候がない浸潤性の結腸癌または直腸癌(N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>)を伴う患者445人が得られた。これらのうち260人の患者はThomas Jefferson Universityで外科処置を受け、リンパ節を提供した。10  
。続いて167人の患者を、TNM I期以下の疾患(T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>またはT<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>)、局所的もしくは不特定部位の再発性疾患を伴うか、またはネオアジュvant化学療法もしくは放射線療法を受けたため、除外した。次いで、再発の徴候がない56人の患者を、追跡期間が6年未満であるため除外した。これらを除外した後、術後6年以上疾患の徴候がなく、臨床的に治癒していると考えられる合計18人の患者が残った。これらの患者が対照群となった。同様に、術後3年内に再発した19人の疾患全員を症例群に入れた。対照群の16人および症例群の12人からは以後の分析のための病理検体が得られた。対照群の2人(患者9と16；12.5%)および症例群の1人(患者24；8.3%)は、術後に5-フルオロウラシルをベースとするアジュvant化学療法を受けた。20

### 【0341】

逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応：予備試験により、個々のリンパ節から得た10 μmの切片より単離したmRNAで得られたRNAはRT-PCR分析に不十分なことが証明された。したがって、各患者について代表的リンパ節から少なくとも5つの10 μm切片をプールし、脱パラフィンし、全RNAを単離した(Waldman et al., 1996, Dis Colon Rectum, 41:1-6)。RNA PCRキット2型を用いてRT-PCRを実施した(宝酒造、日本、京都; Carrithers et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14827-32; Waldman et al., 1996, Dis Colon Rectum, 41:1-6)。-アクチン特異的RT-PCR後にアンプリコンを生成した全RNAのみを、下記に概説する試験に用いた。GCC特異的な入れ子型癌胎児性抗原特異的RT-PCRを、先の記載に従って実施した(Carrithers et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14827-32; Waldman et al., 1996, Dis Colon Rectum, 41:1-6; Liefers et al., 1998, New Engl J Med, 339:223-8)。RT-PCR反応物を、4%NuSieve 3:1 agarose(登録商標)(FMC Bioproducts, メーン州ロックランド)上での電気泳動により分離し、增幅生成物を臭化工チジウムで視覚化した。GCCおよび癌胎児性抗原を発現しているヒト結腸直腸癌細胞(Caco2細胞; American Type Culture Collection、メリーランド州ロックビル)から単離したRNAからなる陽性対照、および鑄型を添加せず、結腸直腸癌を伴わないリンパ節からのRNAを添加したインキュベーション物からなる陰性対照を含めた。30

アンプリコンの同一性を配列決定により確認した。増幅に用いたプライマーに対して内側の配列に相補的な<sup>32</sup>P標識アンチセンスプローブを用いるサザン分析により、GCC特異的アンプリコンの生成を確認した(Kroczek, 1993, J Chromatog, 618:133-145)。40

### 【0342】

統計分析：結果を平均±SDとして表わす。ただし無疾患および全生存は平均±範囲として表わす。P値はFisher Exact試験により計算された。StatXact 4.0統計ソフトウェアパッケージ(CYTEL Software社、マサチューセッツ50

州ケンブリッジ)を用いて、正確に95%の信頼区間(CI)をもつ見込み率を計算した。

### 【0343】

#### 結果

RT-PCRにより評価した患者の特性：患者の年齢は37～85歳(68±9.5歳)であった。女性(52～85歳；64.5±10.5歳)と男性(37～82歳；70.9±7.8歳)の年齢は類似していた。男性：女性の比率は、対照群(8:9)と症例群(5:7)の間でバランスがとれていた。1人の女性患者はアフリカ系アメリカ人であり、他の患者はすべてコーカソイド(白色人種)であった。T<sub>3</sub>:T<sub>4</sub>疾患の比率は対照群では3:13、症例群では4:8であった。患者を9～105ヶ月間(67.4±30.7ヶ月間)追跡した。対照群の患者を73～105ヶ月間(89.9±7.8ヶ月間)追跡した、一方、症例群の患者を9～78ヶ月間(37.3±22.6ヶ月間)追跡した。対照群では、1人(6.3%)が初診後96ヶ月目に新たな原発性結腸病変を発症し、1人(6.3%)が結腸直腸癌と無関係な原因で死亡し、残りの14人(87.5%)が生存し、診断後88(範囲73～97)ヶ月間無疾患であった。症例群では、8人(66.6%)が、それぞれ13(範囲3～35)ヶ月間および19(範囲9～64)ヶ月間の無疾患および全生存期間後、再発性結腸直腸癌のため死亡した。4人(33%)は、それぞれ12(範囲2～36)ヶ月間および52(範囲17～78)ヶ月間の無疾患および全生存期間後、転移を伴う状態で生存した。

### 【0344】

リンパ節におけるRNA発現のRT-PCR分析：対照群および症例群の患者28人について、手術時に採取した合計524のリンパ節(リンパ節18.4±12.5個/患者)が組織学的観察では腫瘍を含まないと報告された。最初の手術による病期判定時に各患者から得たリンパ節の個数は、対照群(19.9±13.2)と症例群(17.2±12.7)の間で類似していた。21人(75%)から、RT-PCRによって適切に評価できるパラフィン包埋リンパ節159個(リンパ節7.6±5.2個/患者)を得た。RT-PCRからリンパ節を除外したのは、病理学的立場から利用できなかったもの(28人からのリンパ節326個；手術時に得られたリンパ節524個のうち62.6%)またはRNAが得られなかつたもの(7人からのリンパ節39個；手術時に得られたリンパ節524個のうち7.4%；RT-PCR分析に用いたリンパ節198個のうち19.7%)であった。RT-PCR分析に利用できたリンパ節の個数は、対照群(6.4±3.0)と症例群(8.1±6.3)の間でバランスがとれていた。

### 【0345】

症例群の5人(41.7%)および対照群の2人(16.7%)のプールしたリンパ節切片からの全RNA中に-アクチン特異的アンプリコン(無傷RNAの指標)が検出されず、これらの患者を以後の分析から除外した。残り21人からプールしたリンパ節切片より抽出した全RNAを、GCC特異的プライマーを用いるRT-PCRにより分析した。対照群患者のリンパ節からのRNAを用いた反応物のいずれにも、GCC特異的アンプリコンは検出されなかつた(p=0.004；表1)。これらの反応物中にGCC特異的アンプリコンが存在しないことはサザン分析により確認され、無疾患患者のリンパ節には結腸直腸癌のミクロ転移がないことを示唆する。これに対し、症例群患者のリンパ節からのRNAを用いたすべての反応物中にGCC特異的アンプリコンが検出された(表1)。これらの反応物中にGCC特異的アンプリコンが存在することは配列決定および/またはサザン分析により確認され、再発性疾患を伴う患者のリンパ節に結腸直腸癌のミクロ転移があることを示唆する。それまでにRT-PCRで分析された結腸直腸癌を伴わない他の21人(陰性対照)からのリンパ節39個のいずれにもGCC mRNAが発現していなかつたことは注目される。

### 【0346】

#### 【表1】

10

20

30

40

表1. リンパ節におけるGCC mRNA発現と患者の結果

患者 対照	GCC mRNA*	DFT†	OS‡	生存状態
6	(-)	97	97	生存, NED¶
7	(-)	96	105	生存, 新1° 結腸癌(T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub> )
8	(-)	96	96	生存
9	(-)	82	82	生存
10	(-)	86	86	脱水症のため死亡
11	(-)	89	89	生存
12	(-)	94	94	生存
13	(-)	87	87	生存
14	(-)	86	86	生存
15	(-)	87	87	生存
16	(-)	73	73	生存
症例				
17	(+)	13	15	死亡 肝臓転移2°
18	(+)	15	52	死亡 肝臓転移2°
19	(+)	3	9	死亡 肝臓転移2°
20	(+)	14	20	死亡 肝臓転移2°
21	(+)	2	78	生存 肝臓転移
22	(+)	12	25	生存 肝臓転移
23	(+)	9	55	死亡 肺と中枢神経転移2°
24	(+)	29	64	生存 肺および骨転移2°
25	(+)	17	19	死亡 肝臓、肺および骨転移2°
26	(+)	11	17	生存 肺転移

## 【0347】

\* リンパ節中にGCC mRNAが検出された(+)または存在しない(-);

† 無疾患期間(診断後の月数);

§ 全生存期間(診断後の月数);

¶ N E D: 疾患の徴候がない。

癌胎児性抗原は60%未満の結腸直腸癌および他の腫瘍、正常細胞、ならびにある非悪性病理学的状態に発現する糖タンパク質である。癌胎児性抗原発現のRT-PCR分析から、これはリンパ節における結腸直腸癌ミクロ転移のマーカーであることが示唆された。この試験では、プールしたリンパ節切片から抽出した全RNAを、癌胎児性抗原特異的プライマーを用いるRT-PCRにより分析した(Lieffers et al., 1998, New Engl J Med, 339:223-8)。入れ子型RT-PCRにより、対照群の患者からの全RNAを用いた反応では癌胎児性抗原(CEA)特異的アンプリコンは生成しなかったが、症例群の患者1人において癌胎児性抗原特異的アンプリコンが検出された。癌胎児性抗原特異的アンプリコンの存在は、配列分析により確認された。

## 【0348】

リンパ節におけるGCC mRNA発現と臨床病理学的予後指標: 症例群と対照群(28人)を、疾患再発に関連する腫瘍および疾患特性について比較した。各群は下記に関してバランスがとれていると思われた: 腫瘍等級(十分に分化: 対照2(12.5%) ; 症例1(8.3%) ; 中等度に分化: 対照13(81.3%) ; 症例9(75%) ; 分化不十分: 対照1(8.3%) ; 症例2(12.5%) ) ; 腫瘍サイズ(対照, 5.7 ± 2.3 cm ; 症例, 4.8 ± 1.7 cm) ; 腫瘍位置(右結腸; 対照7(43.8%) ; 症例4(33.3%) ; 横行結腸; 対照3(18.8%) ; 症例0 ; S状結腸; 対照5(31.3%) ; 症例8(66.6%) ; 直腸: 対照1(6.3%) ; 症例0) : ならびに結腸周

10

20

30

40

50

囲への腫瘍の侵入の深さおよび拡大。血管リンパ浸潤が症例群の患者3人にみられたが、対照群の患者にはみられず、これは前者における転移の基礎になると思われる機序を反映している。リンパ節におけるGCC mRNA発現は、すべての症例で疾患再発と関連があった( $p = 0.004$ )。局所リンパ節におけるGCC mRNA発現に関連する死亡の見込み率は16.5(1.1~756.7, 95%CI)であった。感受性分析により、“偽陰性”(対照群における死亡)または“偽陽性”(症例群における生存患者)増加結果は、1(過剰リスクなし)を含む95%CIをもつ見込み率を与えることが証明された。これは、この分析で用いた小規模の試料集団がもつ限界を反映する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトGC-C遺伝子プロモーターの欠失変異体の機能特性解明を示す。GC-C遺伝子5'側フランкиング領域の欠失変異体をルシフェラーゼに結合させ、レニラルシフェラーゼ対照プラスミドpRL-TKと一緒に腸細胞系(T84, Caco2)および腸外細胞系(HepG2, HeLa, HS766T)内へ同時形質転換した。データを、pGL3 Basic無プロモーター構築体に対するルシフェラーゼ活性(相対活性)として表示する。各棒は、二重に実施した少なくとも3回の独立した形質転換の平均±標準誤差を表わす。

【図2】近位ヒトGC-CプロモーターのDNAse I保護を示す。フットプリントイング反応には、指示したmg量(NE)のHepG2またはT84核抽出物、およびコード鎖の5'末端を標識した-46~-257プロモーターフラグメントを含有させた。対照消化は60mgのウシ血清アルブミン(BSA)を含有していた。保護された塩基を標識フラグメントのMaxam-Gilbertシーケンシング反応(G+A)により同定した。FP1の配列を示す。矢頭は塩基-163におけるDNAse I過感受性部位を示す。

【図3】腸特異的保護エレメントによるレポーター遺伝子発現調節を示す。-835ルシフェラーゼ構築体からインビトロ変異形成によりFP1およびFP3を欠失させ、野生型および欠失型構築体をHepG2およびT84細胞において発現させた。結果は無プロモーター構築体に対比したルシフェラーゼ活性として表示され、二重に実施した3回の独立した形質転換の平均±標準誤差である。

【図4】FP1プローブEMSAの腸特異性を示す。腸細胞または腸外細胞からの核抽出物またはBSA(10mg)を、標識FP1と共に室温で30分間インキュベートした後、非変性性6%ポリアクリルアミドゲル上で分離した。

【図5】GC-Cレポーター遺伝子活性化にはCd×2結合エレメントFP1が必要である。Cd×2およびHNF-4aに対する推定結合部位を-835構築体上に示す。T84およびHepG2細胞を、FP1を欠失した-835レポーター構築体または“GCC”変異体を含むこの構築体で形質転換した。結果は(変異構築体のルシフェラーゼ活性、野生型構築体のルシフェラーゼ活性)×100として表示され、二重に実施した3回の独立した形質転換の平均±標準誤差である。相対ルシフェラーゼ活性として表示した数値は、それぞれ(野生型; FP1欠失; “CCC”変異体): T84(16.2±2.7; 1.9±0.3; 2.3±0.1)およびHepG2(2.1±0.1; 2.9±0.3; 2.2±0.1)である。

#### 【配列表】

10

20

30

40



agaaaatatgt catcatcttg gaccctgcaa tttccatagg tcgacgtgcc aatggAACAA	1380
catatgcAAC ctatgAGAGGG ggAAACACAC aACATGTG TG GATAAATGAG TCAAGATGGAA	1440
gtacaccaat tattggagAG gtatggccAG gattaacAGt ataccctgat ttcaCTAATC	1500
caaactgcat tgattggTGG gcaaATGAAT gcAGTATTtT ccatcaAGAA gtGCAATATG	1560
atggactTTG gattgACATG aatGAAGTtt ccAGCtttAt tcaAGGtTC ACAAAGGAT	1620
gtaatgtAAA caaATTGAAT tatCCACCGT ttACTCTGTA tattCTTGAC aaACTCATGT	1680
attccAAAAC aATTGcATG gATGCTGTc agaACTGGGG taaACAGTAT gATGTTcATA	1740
gcCTCTATGG atACAGCAtG gCTATAGCCA cAGAGCAAGC tGtACAAAAA gTTTTTcTA	1800
ataAGAGAAG cttcATTtTTT accCGCTCAA cATTtGCTGG AtCTGGAAGA catGCTGCTC	1860
atTGGTTAGG AGACAATACT gCTTCAtGGG aACAAATGGA atGGTCTATA ACTGGAAATGC	1920
tggAGTTcAG tttGTTTGGA atACCTTTGGG ttGGAGCAGA catCTGTGGA tttGTGGCTG	1980
aaACCACAGA agaACTTTGC agaAGATGGA tGCAACTTGG gGCATTTtTt ccATTTCCA	2040
gaaACCATAA ttCTGACGGA tatGAACATC aggATCTGC AtTTTTGGG cagaATTcAC	2100
tTTTGGTTAA atCATCAAGG cAGTATTtAA ctATTcGtA cacTTtATA ccCTTCCtCT	2160
acACTCTGTt ttATAAAGCC catGTGTTG gagAAACAGT agCAAGACCA gTTTtTCATG	2220
agTTTTATGA ggATACGAAc agCTGGATG aggACACTGA gTTTTTGTGG gGCCTGcat	2280
tacttattAC ttCTGTtCTA aaACAGGGAG cAGATACTGT gAGTGCCTAC AtCCCTGATG	2340
ctATTtGGTA tgATTATGAA tCTGGTGCAA AAAGGCCATG gAGGAAACAA CGGGTTGATA	2400
tGTATCTTCC acGAGACAAA atAGGATTAC AtCTTAGAGG AgGTtATAtC AtCCCCATTc	2460
aAGAACCGAGA tgTAACAACA ACAGCAAGCC gTAAGAAtCC tCTAGGACTT AtAGTcGAT	2520
tagGTGAAAa CAACACAGCC AAAGGAGACT ttttCTGGGA tGATGGAGAA ACTAAAGATA	2580
caatacAAA tGGCAACTAC AtATTATAcAt cATTtCAGT ttCTAATAAC ACATTAGATA	2640
ttGTGTGcAC acATTcATCA tATCAGGAAG gAACTACCTT AGCATTcAG ACTGTAAA	2700
tCCTTGGTT gACAGACAGT gTTACAGAAg tTAGAGTGGC gGAAAATAAt CAACCAATGA	2760
AcGCTCATTc CAATTtCAct tATGATGCTT CTAACCCAGGT tCTCCTAAtt GCAGATCTCA	2820
AACtTAATCT tGGAAGAAAAC ttTAGtGTc AATGGAAATCA AATTtCTCA gAAAATGAAA	2880
GATTTAATTG ttATCCAGAT gCAGATTGG CAACTGAACA AAAGTGCACA CAACGTGGCT	2940
gtGTATGGAG AACGGGTTCT tCTCTATCCA AAGCACCTGA gTGTtACTTT CCCAGACAAg	3000
AtAAACTCTTA ttCAgTCAAC tCAGCTCGt ATTCACTCCAT GGtATAACa GCTGACCTCC	3060
AACtAAATAc tGCAAATGcC AGAATAAAgT tacCTTCTGA cCCCATCTCA ACTCTCGTG	3120
tGGAGGTGAA AtATCACAaA AATGATATGT tGCAgTTAA GATTtATGAT cCCCAAAAGA	3180
AGAGATATGA AGTACCAgTA CGGTAAACA ttCCAAcCcAC cCCAAATAAGT ACTTATGAAG	3240
AcAGACTTTA tGATGTGGAA AtCAAGGAAA AtCCCTTTGG CATCCAGATT CGACGGAGAA	3300

gcagtggaaag agtcatttgg gattcttggc tgcctggatt tgcttttaat gaccaggcca	3360
tccaaatatac gactcgctg ccatcagaat atatatatgg ttttggggaa gtggaaacata	3420
cagcatttaa gcgagatctg aactggaaata cttggggaaat gttcacacaaga gaccaacccc	3480
ctggttacaa acttaattcc tatggatttc atccctatta catggctctg gaagaggagg	3540
gcaatgctca tgggttttc ttactcaaca gcaatgcaat ggatgttaca ttccagccaa	3600
ctcctgctct aacttaccgt acagttggag ggatcttggaa ttttatatg tttttggcc	3660
caactccaca agttgcaaca aagcaatacc atgaagtaat tggccatcca gtcatgccag	3720
cttattgggc tttgggattc caattatgtc gttatggata tgcaaatact tcagaggttc	3780
ggaaattata tgacgctatg gtggctgcta acatccccta tggatgttac tacacagaca	3840
ttgactacat ggaaaggcag cttagactta caatttggta agcattccag gaccttcctc	3900
agtttggta caaaaataaga ggagaaggaa tgagatacat tattatcctg gatccagcaa	3960
tttcaggaaa tgaaacaaag acttaccctg catttggaaag aggacagcag aatgatgtct	4020
ttgtcaaatg gccaaacacc aatgacattt gttggccaa gggttggcca gatttggccaa	4080
acataacaat agataaaaact ctaacggaaag atgaagctgt taatgttcc agagctcatg	4140
tagtttcccc agatttcttc aggacttcca cagcagagtg gtggggccaga gaaattgtgg	4200
acttttacaa tgaaaagatg aagtttgatg gtttggat tgatataat gagccatcaa	4260
gttttggtaaa tggaaacaact actaatcaat gcagaaatga cgaactaaat tatccacatt	4320
atttccaga actcacaaaa agaactgtatg gattacattt cagaacaatt tgcatggaaag	4380
ctgagcagat tcttagtcat ggaacatcag ttttgcatta cgtatgttcc aatctctatg	4440
gatggtcaca gatgaaacct actcatgtatg catttggaaaa gacaactggaa aaaagaggga	4500
ttgttaatttc tcgttccacg tatcctacta gtggacatg gggaggacac tggcttggag	4560
acaactatgc acgatggac aacatggaca aatcaatcat tggatgtatg gaatttagtc	4620
tgtttggaaat atcatataact ggagcagacaa tctgtggttt ttcaacaac tcagaatatac	4680
atctctgtac ccgctggatg caacttggag cattttatcc atactcaagg aatcacaaaa	4740
ttgcaaaatac tagaagacaa gatcccgtt cctggaaatga aacttttgct gaaatgtcaa	4800
ggaatattct aaatatttaga tacacattat tgcctatatt ttacacacaa atgcataaaa	4860
ttcatgtcaa tggtggcaact gttatccgac cccttttgc tggatgtttt gatggaaaac	4920
caacctggaa tatattcaag cagtttattt ggggtccagc atttatggtt accccagtac	4980
tggAACCTTA tggtcaact gtaaatgcct acgtccccaa tgctcggtgg tttgactacc	5040
atacaggcaa agatattggc gtcagaggac aatttcaaaac atttaatgtc tcttatgaca	5100
caataaacct acatgtccgtt ggtggtcaca tcctaccatg tcaagagcca gctcaaaaaca	5160
cattttacag tcgacaaaaaa cacatgaagc tcattttgc tgcagatgtatg aatcagatgg	5220

10

20

30

cacagggttc tctgtttgg gatgatggag agagtataga cacctatgaa agagacctat	5280
atttatctgt acaatttaat ttaaacccaga ccaccttaac aagcactata ttgaagagag	5340
gttacataaa taaaagtcaa acgaggcttg gatccctca tgtatgggg aaaggaacta	5400
ctcctgtcaa tgcagttact ctaacgtata acggaaataa aaatcgctt ccttttaatg	5460
aagacactac caacatgata ttacgtatgt atctgaccac acacaatgtt actctagaag	5520
aaccaataga aatcaactgg tcatgaagat caccatcaat ttttagttgc aatggaaaaa	5580
aacaccagga ttttaagtttc acagcactta caatttccc tcttcacttg gtttttgtac	5640
tctacaaaat atagcttca taacatgaa aagttatttt gtagcgtaca tcaatgataa	5700
tgctaattttt attatagtaa tgtgacttgg attcaattttt aaggcatatt taacaaaatt	5760
tgaatagccc tatttattcct tgtaaagtat cagctacaat tgtaaacttag ttactaaaca	5820
tgtatgtaaa tagctaagat ataatttaaa cgtgatTTT aaattaaata aaatttttat	5880
gtaattatat atactatatt tttctcaatg ttttagcagat ttaagatatg taacaacaat	5940
tatttgaaga ttttaattact tcttagatg tgcatataat tagaaaaaga gaataaaaaaa	6000
tgtaagtgt aaaaaaaaaa a	6021
<210> 2	
<211> 1827	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	20
Met Ala Arg Lys Lys Phe Ser Gly Leu Glu Ile Ser Leu Ile Val Leu	
1 5 10 15	
Phe Val Ile Val Thr Ile Ile Ala Ile Ala Leu Ile Val Val Leu Ala	
20 25 30	
Thr Lys Thr Pro Ala Val Asp Glu Ile Ser Asp Ser Thr Ser Thr Pro	
35 40 45	
Ala Thr Thr Arg Val Thr Thr Asn Pro Ser Asp Ser Gly Lys Cys Pro	
50 55 60	
Asn Val Leu Asn Asp Pro Val Asn Val Arg Ile Asn Cys Ile Pro Glu	
65 70 75 80	
Gln Phe Pro Thr Glu Gly Ile Cys Ala Gln Arg Gly Cys Cys Trp Arg	
85 90 95	
Pro Trp Asn Asp Ser Leu Ile Pro Trp Cys Phe Phe Val Asp Asn His	
100 105 110	30
Gly Tyr Asn Val Gln Asp Met Thr Thr Ser Ile Gly Val Glu Ala	
115 120 125	
Lys Leu Asn Arg Ile Pro Ser Pro Thr Leu Phe Gly Asn Asp Ile Asn	
130 135 140	
Ser Val Leu Phe Thr Thr Gln Asn Gln Thr Pro Asn Arg Phe Arg Phe	
145 150 155 160	

Lys Ile Thr Asp Pro Asn Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro His Gln Tyr  
 165 170 175  
 Val Lys Glu Phe Thr Gly Pro Thr Val Ser Asp Thr Leu Tyr Asp Val  
 180 185 190  
 Lys Val Ala Gln Asn Pro Phe Ser Ile Gln Val Ile Arg Lys Ser Asn  
 195 200 205  
 Gly Lys Thr Leu Phe Asp Thr Ser Ile Gly Pro Leu Val Tyr Ser Asp  
 210 215 220  
 Gln Tyr Leu Gln Ile Ser Ala Arg Leu Pro Ser Asp Tyr Ile Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Gly Glu Gln Val His Lys Arg Phe Arg His Asp Leu Ser Trp Lys  
 245 250 255  
 Thr Trp Pro Ile Phe Thr Arg Asp Gln Leu Pro Gly Asp Asn Asn Asn  
 260 265 270  
 Asn Leu Tyr Gly His Gln Thr Phe Phe Met Cys Ile Glu Asp Thr Ser  
 275 280 285  
 Gly Lys Ser Phe Gly Val Phe Leu Met Asn Ser Asn Ala Met Glu Ile  
 290 295 300  
 Phe Ile Gln Pro Thr Pro Ile Val Thr Tyr Arg Val Thr Gly Gly Ile  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Phe Tyr Ile Leu Leu Gly Asp Thr Pro Glu Gln Val Val Gln  
 325 330 335  
 Gln Tyr Gln Gln Leu Val Gly Leu Pro Ala Met Pro Ala Tyr Trp Asn  
 340 345 350  
 Leu Gly Phe Gln Leu Ser Arg Trp Asn Tyr Lys Ser Leu Asp Val Val  
 355 360 365  
 Lys Glu Val Val Arg Arg Asn Arg Glu Ala Gly Ile Pro Phe Asp Thr  
 370 375 380  
 Gln Val Thr Asp Ile Asp Tyr Met Glu Asp Lys Lys Asp Phe Thr Tyr  
 385 390 395 400  
 Asp Gln Val Ala Phe Asn Gly Leu Pro Gln Phe Val Gln Asp Leu His  
 405 410 415  
 Asp His Gly Gln Lys Tyr Val Ile Ile Leu Asp Pro Ala Ile Ser Ile  
 420 425 430  
 Gly Arg Arg Ala Asn Gly Thr Thr Tyr Ala Thr Tyr Glu Arg Gly Asn  
 435 440 445  
 Thr Gln His Val Trp Ile Asn Glu Ser Asp Gly Ser Thr Pro Ile Ile  
 450 455 460  
 Gly Glu Val Trp Pro Gly Leu Thr Val Tyr Pro Asp Phe Thr Asn Pro  
 465 470 475 480  
 Asn Cys Ile Asp Trp Trp Ala Asn Glu Cys Ser Ile Phe His Gln Glu  
 485 490 495  
 Val Gln Tyr Asp Gly Leu Trp Ile Asp Met Asn Glu Val Ser Ser Phe

10

20

30

500	505	510	
Ile Gln Gly Ser Thr Lys Gly Cys Asn Val Asn Lys Leu Asn Tyr Pro 515	520	525	
Pro Phe Thr Pro Asp Ile Leu Asp Lys Leu Met Tyr Ser Lys Thr Ile 530	535	540	
Cys Met Asp Ala Val Gln Asn Trp Gly Lys Gln Tyr Asp Val His Ser 545	550	555	560
Leu Tyr Gly Tyr Ser Met Ala Ile Ala Thr Glu Gln Ala Val Gln Lys 565	570	575	
Val Phe Pro Asn Lys Arg Ser Phe Ile Leu Thr Arg Ser Thr Phe Ala 580	585	590	
Gly Ser Gly Arg His Ala Ala His Trp Leu Gly Asp Asn Thr Ala Ser 595	600	605	10
Trp Glu Gln Met Glu Trp Ser Ile Thr Gly Met Leu Glu Phe Ser Leu 610	615	620	
Phe Gly Ile Pro Leu Val Gly Ala Asp Ile Cys Gly Phe Val Ala Glu 625	630	635	640
Thr Thr Glu Glu Leu Cys Arg Arg Trp Met Gln Leu Gly Ala Phe Tyr 645	650	655	
Pro Phe Ser Arg Asn His Asn Ser Asp Gly Tyr Glu His Gln Asp Pro 660	665	670	
Ala Phe Phe Gly Gln Asn Ser Leu Leu Val Lys Ser Ser Arg Gln Tyr 675	680	685	
Leu Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Leu Pro Phe Leu Tyr Thr Leu Phe Tyr 690	695	700	20
Lys Ala His Val Phe Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Val Leu His Glu 705	710	715	720
Phe Tyr Glu Asp Thr Asn Ser Trp Ile Glu Asp Thr Glu Phe Leu Trp 725	730	735	
Gly Pro Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Lys Gln Gly Ala Asp Thr 740	745	750	
Val Ser Ala Tyr Ile Pro Asp Ala Ile Trp Tyr Asp Tyr Glu Ser Gly 755	760	765	
Ala Lys Arg Pro Trp Arg Lys Gln Arg Val Asp Met Tyr Leu Pro Ala 770	775	780	
Asp Lys Ile Gly Leu His Leu Arg Gly Tyr Ile Ile Pro Ile Gln 785	790	795	800
Glu Pro Asp Val Thr Thr Ala Ser Arg Lys Asn Pro Leu Gly Leu 805	810	815	
Ile Val Ala Leu Gly Glu Asn Asn Thr Ala Lys Gly Asp Phe Phe Trp 820	825	830	
Asp Asp Gly Glu Thr Lys Asp Thr Ile Gln Asn Gly Asn Tyr Ile Leu 835	840	845	

Tyr Thr Phe Ser Val Ser Asn Asn Thr Leu Asp Ile Val Cys Thr His  
 850 855 860  
 Ser Ser Tyr Gln Glu Gly Thr Thr Leu Ala Phe Gln Thr Val Lys Ile  
 865 870 875 880  
 Leu Gly Leu Thr Asp Ser Val Thr Glu Val Arg Val Ala Glu Asn Asn  
 885 890 895  
 Gln Pro Met Asn Ala His Ser Asn Phe Thr Tyr Asp Ala Ser Asn Gln  
 900 905 910  
 Val Leu Leu Ile Ala Asp Leu Lys Leu Asn Leu Gly Arg Asn Phe Ser  
 915 920 925  
 Val Gln Trp Asn Gln Ile Phe Ser Glu Asn Glu Arg Phe Asn Cys Tyr  
 930 935 940  
 Pro Asp Ala Asp Leu Ala Thr Glu Gln Lys Cys Thr Gln Arg Gly Cys  
 945 950 955 960  
 Val Trp Arg Thr Gly Ser Ser Leu Ser Lys Ala Pro Glu Cys Tyr Phe  
 965 970 975  
 Pro Arg Gln Asp Asn Ser Tyr Ser Val Asn Ser Ala Arg Tyr Ser Ser  
 980 985 990  
 Met Gly Ile Thr Ala Asp Leu Gln Leu Asn Thr Ala Asn Ala Arg Ile  
 995 1000 1005  
 Lys Leu Pro Ser Asp Pro Ile Ser Thr Leu Arg Val Glu Val Lys  
 1010 1015 1020  
 Tyr His Lys Asn Asp Met Leu Gln Phe Lys Ile Tyr Asp Pro Gln  
 1025 1030 1035  
 Lys Lys Arg Tyr Glu Val Pro Val Pro Leu Asn Ile Pro Thr Thr  
 1040 1045 1050  
 Pro Ile Ser Thr Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Asp Val Glu Ile Lys  
 1055 1060 1065  
 Glu Asn Pro Phe Gly Ile Gln Ile Arg Arg Arg Ser Ser Gly Arg  
 1070 1075 1080  
 Val Ile Trp Asp Ser Trp Leu Pro Gly Phe Ala Phe Asn Asp Gln  
 1085 1090 1095  
 Phe Ile Gln Ile Ser Thr Arg Leu Pro Ser Glu Tyr Ile Tyr Gly  
 1100 1105 1110  
 Phe Gly Glu Val Glu His Thr Ala Phe Lys Arg Asp Leu Asn Trp  
 1115 1120 1125  
 Asn Thr Trp Gly Met Phe Thr Arg Asp Gln Pro Pro Gly Tyr Lys  
 1130 1135 1140  
 Leu Asn Ser Tyr Gly Phe His Pro Tyr Tyr Met Ala Leu Glu Glu  
 1145 1150 1155  
 Glu Gly Asn Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met  
 1160 1165 1170  
 Asp Val Thr Phe Gln Pro Thr Pro Ala Leu Thr Tyr Arg Thr Val  
 1175 1180 1185

10

20

30

Gly Gly Ile Leu Asp Phe Tyr Met Phe Leu Gly Pro Thr Pro Gln  
 1190 1195 1200  
 Val Ala Thr Lys Gln Tyr His Glu Val Ile Gly His Pro Val Met  
 1205 1210 1215  
 Pro Ala Tyr Trp Ala Leu Gly Phe Gln Leu Cys Arg Tyr Gly Tyr  
 1220 1225 1230  
 Ala Asn Thr Ser Glu Val Arg Glu Leu Tyr Asp Ala Met Val Ala  
 1235 1240 1245  
 Ala Asn Ile Pro Tyr Asp Val Gln Tyr Thr Asp Ile Asp Tyr Met  
 1250 1255 1260  
 Glu Arg Gln Leu Asp Phe Thr Ile Gly Glu Ala Phe Gln Asp Leu  
 1265 1270 1275  
 Pro Gln Phe Val Asp Lys Ile Arg Gly Glu Gly Met Arg Tyr Ile  
 1280 1285 1290  
 Ile Ile Leu Asp Pro Ala Ile Ser Gly Asn Glu Thr Lys Thr Tyr  
 1295 1300 1305  
 Pro Ala Phe Glu Arg Gly Gln Gln Asn Asp Val Phe Val Lys Trp  
 1310 1315 1320  
 Pro Asn Thr Asn Asp Ile Cys Trp Ala Lys Val Trp Pro Asp Leu  
 1325 1330 1335  
 Pro Asn Ile Thr Ile Asp Lys Thr Leu Thr Glu Asp Glu Ala Val  
 1340 1345 1350  
 Asn Ala Ser Arg Ala His Val Ala Phe Pro Asp Phe Phe Arg Thr  
 1355 1360 1365  
 Ser Thr Ala Glu Trp Trp Ala Arg Glu Ile Val Asp Phe Tyr Asn  
 1370 1375 1380  
 Glu Lys Met Lys Phe Asp Gly Leu Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro  
 1385 1390 1395  
 Ser Ser Phe Val Asn Gly Thr Thr Thr Asn Gln Cys Arg Asn Asp  
 1400 1405 1410  
 Glu Leu Asn Tyr Pro Pro Tyr Phe Pro Glu Leu Thr Lys Arg Thr  
 1415 1420 1425  
 Asp Gly Leu His Phe Arg Thr Ile Cys Met Glu Ala Glu Gln Ile  
 1430 1435 1440  
 Leu Ser Asp Gly Thr Ser Val Leu His Tyr Asp Val His Asn Leu  
 1445 1450 1455  
 Tyr Gly Trp Ser Gln Met Lys Pro Thr His Asp Ala Leu Gln Lys  
 1460 1465 1470  
 Thr Thr Gly Lys Arg Gly Ile Val Ile Ser Arg Ser Thr Tyr Pro  
 1475 1480 1485  
 Thr Ser Gly Arg Trp Gly Gly His Trp Leu Gly Asp Asn Tyr Ala  
 1490 1495 1500  
 Arg Trp Asp Asn Met Asp Lys Ser Ile Ile Gly Met Met Glu Phe

10

20

30

1505	1510	1515	
Ser Leu Phe Gly Ile Ser Tyr	Thr Gly Ala Asp Ile	Cys Gly Phe	
1520	1525	1530	
Phe Asn Asn Ser Glu Tyr His	Leu Cys Thr Arg Trp	Met Gln Leu	
1535	1540	1545	
Gly Ala Phe Tyr Pro Tyr Ser	Arg Asn His Asn Ile	Ala Asn Thr	
1550	1555	1560	
Arg Arg Gln Asp Pro Ala Ser	Trp Asn Glu Thr Phe	Ala Glu Met	
1565	1570	1575	
Ser Arg Asn Ile Leu Asn Ile	Arg Tyr Thr Leu Leu	Pro Tyr Phe	
1580	1585	1590	
Tyr Thr Gln Met His Glu Ile	His Ala Asn Gly Gly	Thr Val Ile	10
1595	1600	1605	
Arg Pro Leu Leu His Glu Phe	Phe Asp Glu Lys Pro	Thr Trp Asp	
1610	1615	1620	
Ile Phe Lys Gln Phe Leu Trp	Gly Pro Ala Phe Met	Val Thr Pro	
1625	1630	1635	
Val Leu Glu Pro Tyr Val Gln	Thr Val Asn Ala Tyr	Val Pro Asn	
1640	1645	1650	
Ala Arg Trp Phe Asp Tyr His	Thr Gly Lys Asp Ile	Gly Val Arg	
1655	1660	1665	
Gly Gln Phe Gln Thr Phe Asn	Ala Ser Tyr Asp Thr	Ile Asn Leu	
1670	1675	1680	
His Val Arg Gly Gly His Ile	Leu Pro Cys Gln Glu	Pro Ala Gln	20
1685	1690	1695	
Asn Thr Phe Tyr Ser Arg Gln	Lys His Met Lys Leu	Ile Val Ala	
1700	1705	1710	
Ala Asp Asp Asn Gln Met Ala	Gln Gly Ser Leu Phe	Trp Asp Asp	
1715	1720	1725	
Gly Glu Ser Ile Asp Thr Tyr	Glu Arg Asp Leu Tyr	Leu Ser Val	
1730	1735	1740	
Gln Phe Asn Leu Asn Gln Thr	Thr Leu Thr Ser Thr	Ile Leu Lys	
1745	1750	1755	
Arg Gly Tyr Ile Asn Lys Ser	Glu Thr Arg Leu Gly	Ser Leu His	
1760	1765	1770	
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr	Pro Val Asn Ala Val	Thr Leu Thr	30
1775	1780	1785	
Tyr Asn Gly Asn Lys Asn Ser	Leu Pro Phe Asn Glu	Asp Thr Thr	
1790	1795	1800	
Asn Met Ile Leu Arg Ile Asp	Leu Thr Thr His Asn	Val Thr Leu	
1805	1810	1815	
Glu Glu Pro Ile Glu Ile Asn	Trp Ser		
1820	1825		

<210> 3  
 <211> 1745  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400>	3
gcgcacctgg cagcccaa cgtcggtccc caggcagcat ggtgaggctt gctccggac	60
cctcgccacc atgtacgtga gtcactctt ggacaaggac gtgagcatgt accctagctc	120
cgtgcgcac tctggcgccc tcaacctggc gcccagaac ttctcgccccc ccccgacta	180
cccgactac ggccgttacc acgtggcgcc cgccatgtca gcccagaact tggacagcgc	240
gcagttccccggggccatctt ggccggcgcgtc gtatggcgcc ccactccggg aggactggaa	300
tggctacgcg cccggaggcc cgccggccgc caacgcgttg gtcacgcgc tcaacggtg	360
ctccccggcc gcacccatgg gtcacgcgc cccgcagac taccatccgc accaccaccc	420
gcatcaccc cccgcaccc cggccggccgc gcctcttgc gttctggc tgctgcaaac	480
gctcaacccc ggccctctgt ggccggccgc cacccgtgcc gcccggcgc tgcgtccgg	540
cgcccgccgg cggaaacctgt gtcgtggat gcccggccgc gcccggcgt ccctccgg	600
ccaagtggaaa accaggacga aagacaaata tcggatggtg tacacggacc accageggct	660
ggagctggag aaggagttt actacagtgc ctacatcacc atccggagga aagccggagct	720
agccgcaccc ctggggctct ctgagaggca ggttaaaatc tggtttcaga accgcagac	780
aaaggagagg aaaatcaaca agaagaagtt gcacgcacca cagcagcgc agccaccaca	840
gcccgcctccg cccgcaccc accctccca gcctcggcc ggtctctgt gaaatgtccc	900
agagcccttg agtccggtgt ctccctgca gcctcgttg tctggctctg tccctgggt	960
tctggggcca actggggggg tgcttaaaccc cacgtccacc cagtggccca cgggggtctg	1020
cagcggaga gcaattccag gtcgtggccat gaggagcgtg gactctgtca gactccctcg	1080
gagagacccc tccccccca cccacagcca tagacctaca gacccggctc tcagagggaa	1140
aatgggggccc aggagtaaga caagttggat ttggggccctc aagaaatata ctctccaga	1200
tttttactttt ttcctatctgg cttttctgc cactgaggag acagaaagcc tccgctggc	1260
ttcattccgg actggcagaa gcattgcctg gactgaccac accaaccagc ttcatctatc	1320
cgactcttctt ctcccttagat ctgcaggctg cacctctggc tagagccgag gggagagagg	1380
gactcaaggaa aaaggcaagc ttgaggccaa gatggctgt gtcgttcat gcccctcgga	1440
ggtcctcgact ggcctctgc ctccggccag caaggtttac actgcggAAC gcaaggcag	1500
ctaagataga aagctggact gaccaagac tgcagaaccc ccagggtggcc ctgcgtcttt	1560
tttctttccc ctcccccaga ccaggaaagg ctggctgtt gtatgcacag ggtgtggat	1620
gagggggtgg ttattggact ccaggcctga ccagggggcc cgaacaggac ttgttagaga	1680
gcctgtcacc agagcttctc tgggtgaat gtatgtcgt gctataaatg ccagagccaa	1740
cctgg	1745

<210> 4  
<211> 311  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Tyr Val Ser Tyr Leu Leu Asp Lys Asp Val Ser Met Tyr Pro Ser  
1 5 10 15

Ser Val Arg His Ser Gly Gly Leu Asn Leu Ala Pro Gln Asn Phe Val  
20 25 30

Ser Pro Pro Gln Tyr Pro Asp Tyr Gly Gly Tyr His Val Ala Ala Ala  
35 40 45

Ala Ala Ala Gln Asn Leu Asp Ser Ala Gln Ser Pro Gly Pro Ser Trp  
50 55 60

10

Pro Ala Ala .Tyr Gly Ala Pro Leu Arg Glu Asp Trp Asn Gly Tyr Ala  
65 70 75 80

Pro Gly Gly Ala Ala Ala Ala Asn Ala Val Ala His Ala Leu Asn Gly  
85 90 95

Gly Ser Pro Ala Ala Ala Met Gly Tyr Ser Ser Pro Ala Asp Tyr His  
100 105 110

Pro His His His Pro His His Pro His His Pro Ala Ala Ala Pro  
115 120 125

Ser Cys Ala Ser Gly Leu Leu Gln Thr Leu Asn Pro Gly Pro Pro Gly  
130 135 140

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Ala Glu Gln Leu Ser Pro Gly Gly Gln Arg  
145 150 155 160

20

Arg Asn Leu Cys Glu Trp Met Arg Lys Pro Ala Gln Gln Ser Leu Gly  
165 170 175

Ser Gln Val Lys Thr Arg Thr Lys Asp Lys Tyr Arg Val Val Tyr Thr  
180 185 190

Asp His Gln Arg Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Ser Arg Tyr  
195 200 205

Ile Thr Ile Arg Arg Lys Ala Glu Leu Ala Ala Thr Leu Gly Leu Ser  
210 215 220

Glu Arg Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Lys Glu Arg  
225 230 235 240

Lys Ile Asn Lys Lys Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro  
245 250 255

30

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gly Pro  
260 265 270

Leu Arg Ser Val Pro Glu Pro Leu Ser Pro Val Ser Ser Leu Gln Ala  
275 280 285

Ser Val Ser Gly Ser Val Pro Gly Val Leu Gly Pro Thr Gly Gly Val  
290 295 300

Leu Asn Pro Thr Val Thr Gln  
305 310

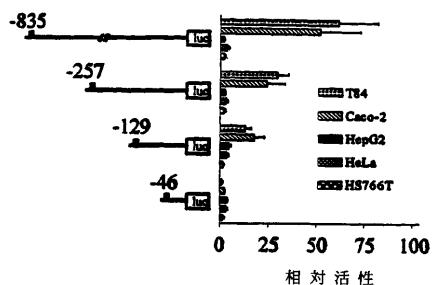
<210> 5  
<211> 1699  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5		
aggtagcgcc ttgctcgtcg tcggggcggc cggcagcggc ggctccaggc cccagcatgc	60	
gcgggggacc cccggccac catgtatgtg ggctatgtgc tggacaagga ttcccccgtg	120	
taccccccggcc cagccaggcc agccagccctc ggcctggcc cgcaagccta cggcccccccg	180	
gccccggccc cggcgccccc gcagtacccc gacttctcca gctactctca cgtggagccg	240	10
gcccccgccc ccccgacgcc ctqggggcgc cccttccctg cgcccaagga cgcactggcc	300	
gcgcctacg gccccggccc cgccggccct gccgcacgcc cagcttcgct ggcatctggg	360	
ccccctccag acttttagccc ggtgcggcgc cccccctggc cggggccggg cctccctggcg	420	
cagccccctcg ggggccccggg cacacgtcc tcgcggcgcg cgcagaggcc gacgcctac	480	
gagtggatgc ggccgcagcgt ggccggccgga ggccggccgt gcagcggtaa gactcggacc	540	
aaggacaagt accgcgttgt ctacaccgcac caccacgc tggagctgga gaaggagttt	600	
cattacagcc gttacatcac aatccggccg aaatcagacg tggctccaa tctggggctc	660	
actgaacggc aggtgaagat ctgggtccaa aaccggccgg caaaggagcg caaagtgaac	720	
aagaagaaaac agcagcagca acagccccca cagccggcga tggcccacga catcacggcc	780	20
accccagccg gccccatccct gggggccctg tgtcccaagca acaccagcct cctggccacc	840	
tccctccaa tgcctgtgaa agaggagttt ctgcctatgc cccatgccc gcctgtgcgc	900	
cgggggaccc ggggactcgg gtgcgtggag tgtggctct gtggccctag gaggtctgg	960	
cgcgcgtctca gcccgtaccc tctgggacat ggtggacagt cacctatcca ccctctgc	1020	
ccccctggcc catctgtgca gtaagcctgt tggataaaaga ccttcagct cctgtgttct	1080	
agaccccttgg gggataaagg agtccagggt ggatgatctc aatctccgt gggcatctca	1140	
agccccaaat gttttgggggaa gggccctaga caaggctcca gggccctact cccctccat	1200	
acgttcagag gtgcagctgg aggctgtgt ggggaccaca ctgatctgg agaaaaggga	1260	
tggagctgaa aaagatggaa tgcttgacaa gcatgacactg aggaggggagg aacgtggtca	1320	
actcacacccct gccttctct gcagcctcac ttctacactc cccatcata agggcactga	1380	30
gccttcctca ggctggatac taagcacaaa gcccatacga ctgggtctcg atggctgtc	1440	
cactgggtta cagaatcaca gcccatacga tcattctcg tgagggtct ggattgagag	1500	
ggaggccctg ggaggagaga agggggcaga gtcttcctca ccagggttctt acaccccccgc	1560	
caggctgccc atcaggggccc agggagcccc cagaggactt tattcggacc aagcagagct	1620	
cacagctgga cagggttgtt atatacgtg gaatctttt gatgcagctt caagaataaa	1680	

tttttcttct cttttcaaa	1699
<210> 6	
<211> 265	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
Met Tyr Val Gly Tyr Val Leu Asp Lys Asp Ser Pro Val Tyr Pro Gly	
1 5 10 15	
Pro Ala Arg Pro Ala Ser Leu Gly Leu Gly Pro Gln Ala Tyr Gly Pro	
20 25 30	
Pro Ala Pro Pro Ala Pro Pro Gln Tyr Pro Asp Phe Ser Ser Tyr	
35 40 45	10
Ser His Val Glu Pro Ala Pro Ala Pro Pro Thr Ala Trp Gly Ala Pro	
50 55 60	
Phe Pro Ala Pro Lys Asp Asp Trp Ala Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Pro	
65 70 75 80	
Ala Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ser Leu Ala Phe Gly Pro Pro Pro	
85 90 95	
Asp Phe Ser Pro Val Pro Ala Pro Pro Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu	
100 105 110	
Ala Gln Pro Leu Gly Gly Pro Gly Thr Pro Ser Ser Pro Gly Ala Gln	
115 120 125	
Arg Pro Thr Pro Tyr Glu Trp Met Arg Arg Ser Val Ala Ala Gly Gly	
130 135 140	20
Gly Gly Gly Ser Gly Lys Thr Arg Thr Lys Asp Lys Tyr Arg Val Val	
145 150 155 160	
Tyr Thr Asp His Gln Arg Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Ser	
165 170 175	
Arg Tyr Ile Thr Ile Arg Arg Lys Ser Glu Leu Ala Ala Asn Leu Gly	
180 185 190	
Leu Thr Glu Arg Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Lys	
195 200 205	
Glu Arg Lys Val Asn Lys Lys Gln Gln Gln Gln Pro Pro Gln	
210 215 220	
Pro Pro Met Ala His Asp Ile Thr Ala Thr Pro Ala Gly Pro Ser Leu	
225 230 235 240	
Gly Gly Leu Cys Pro Ser Asn Thr Ser Leu Leu Ala Thr Ser Ser Pro	
245 250 255	30
Met Pro Val Lys Glu Glu Phe Leu Pro	
260 265	
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	

<213> Homo sapiens		
<400> 7 gccccatagct ctgacccccc tg	22	
<210> 8 <211> 24 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 8 agagagatta gctgggcctc accc	24	
<210> 9 <211> 34 <212> DNA <213> Homo sapiens		10
<400> 9 cagctaatact ctctgtttat agctctgacc ttcc	34	
<210> 10 <211> 35 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 10 atctctctgt ttatagctct gacccccc tg ggtgc	35	
<210> 11 <211> 34 <212> DNA <213> Homo sapiens		20
<400> 11 cagctaatact ctctgccccat agctctgacc ttcc	34	
<210> 12 <211> 38 <212> DNA <213> Homo sapiens		
<400> 12 gatccggctg gtgagggtgc aataaaactt tatgagta	38	

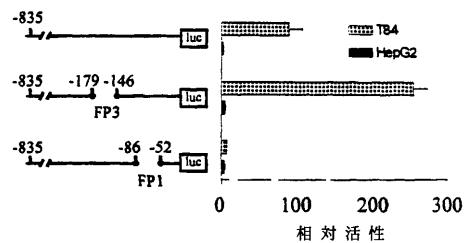
【図1】



【図2】

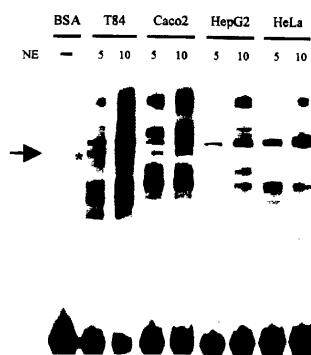
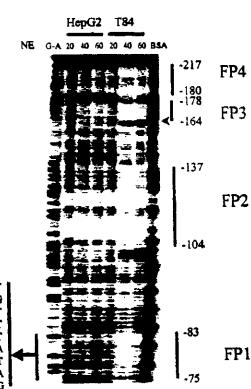
FIG. 2

【図3】

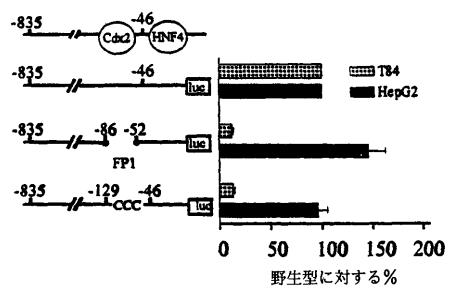


【図4】

FIG. 4



【図5】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 ワルドマン , スコット・エイ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 19003 , アードモア , ブレッディン・ロード 119

(72)発明者 パーク , ジェイソン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 19107 , フィラデルフィア , ラティマー・ストリート 92

5

(72)発明者 シュルツ , ステファニー

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 19380 , ウエスト・チェスター , ハワード・ロード 117

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第 98 / 009510 (WO , A1 )

Int. J. Cancer , (1997) , 74 , [1] , p.35-44

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	用于鉴定和靶向癌细胞的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5122713B2</a>	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	JP2001570846	申请日	2001-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	托马斯杰弗逊大学		
申请(专利权)人(译)	托马斯杰弗逊大学		
当前申请(专利权)人(译)	托马斯杰弗逊大学		
[标]发明人	ワルドマンスコットエイ パークジエイソン シュルツステファニー		
发明人	ワルドマン,スコット·エイ パーク,ジェイソン シュルツ,ステファニー		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/53 A61K31/196 A61K31/407 A61K31/4164 A61K31/475 A61K31/513 A61K31/519 A61K31/7034 A61K31/704 A61K31/7048 A61K31/7068 A61K31/711 A61K33 /24 A61K38/00 A61K38/43 A61K38/46 A61K39/00 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K51/00 A61P1/00 A61P35/00 A61P35/04 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/6886 G01N33/566		
CPC分类号	A61K31/7034 A61K31/7048 A61P1/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/04 A61K47/6871 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57407 G01N33/57419 G01N33/57446 A61K9/127 A61K39/0011 A61K39 /001102 A61K51/1075 C07K16/3046 C07K16/40 C12N15/113 G01N2333/988		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/574.A		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/192229 2000-03-27 US		
其他公开文献	JP2003532389A JP2003532389A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**

公开了用于原发性和/或转移性胃或食道癌的筛选和诊断试剂，试剂盒和方法。公开了用于成像和治疗原发性和/或转移性胃癌或食道癌的组合物和方法。公开了用于治疗和预防原发性和/或转移性胃癌或食道癌的疫苗组合物和方法。