

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-518048

(P2009-518048A)

(43) 公表日 平成21年5月7日(2009.5.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02 ZNA	4B024
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4B063
<b>GO1N 33/574 (2006.01)</b>	GO1N 33/574 A	4C084
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	4C085
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-544629 (P2008-544629)  
 (86) (22) 出願日 平成18年12月5日 (2006.12.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月11日 (2008.8.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/061629  
 (87) 国際公開番号 W02007/120315  
 (87) 国際公開日 平成19年10月25日 (2007.10.25)  
 (31) 優先権主張番号 60/748,063  
 (32) 優先日 平成17年12月7日 (2005.12.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596168317  
 ジェネンテック・インコーポレーテッド  
 GENENTECH, INC.  
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408  
 0-4990・サウス・サン・フランシス  
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 ホフリッヒ, クラウス ピー.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944  
 01, サン マテオ, 3番, ジェフ  
 アーソン コート 822

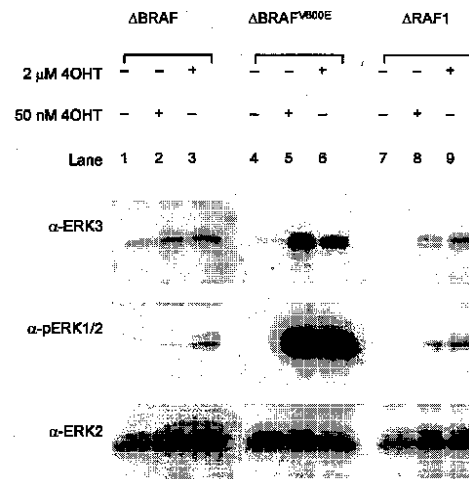
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の診断と軽減のための組成物と方法

(57) 【要約】

本発明は、生物学的試料中におけるある種の腫瘍関連キナーゼポリペプチドの存在を決定する方法と、哺乳動物の腫瘍の診断及び治療に有用な組成物に関する。

【選択図】 なし



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物学的試料中のポリペプチドであって、

(a) 図 2 (配列番号 2) に示すアミノ酸配列；又は

(b) 図 1 (配列番号 1) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドの有無を決定する方法であって、

上記ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は低分子に上記生物学的試料を暴露し、上記生物学的試料中の前記ポリペプチドに対する該抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は低分子の結合を決定することを含む方法。

10

## 【請求項 2】

生物学的試料が、増加したレベルの上記ポリペプチドの発現が疑われる細胞を含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

細胞が癌細胞である請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

上記抗体、s i R N A、オリゴペプチド又は低分子が検出可能に標識されている請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法において、上記哺乳動物から得られた組織細胞の試験生物学的試料中と同一組織由来の既知の正常細胞のコントロール生物学的試料中において、

(a) 図 2 (配列番号 2) に示すアミノ酸配列；又は

(b) 図 1 (配列番号 1) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、コントロール生物学的試料と比較したときの試験生物学的試料中における上記ポリペプチドのより高い発現レベルが、試験生物学的試料が得られた哺乳動物における腫瘍の存在を示している方法。

30

## 【請求項 6】

腫瘍がメラノーマである請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

癌が T A S K 1 2 1 (配列番号 3) 変異を含む請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

変異が T A S K 1 2 1<sup>V 6 0 0 E</sup> (配列番号 5) である請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

上記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出する工程が、免疫組織化学解析で抗体を用いることを含む請求項 5 に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

上記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出する工程が、インサイツハイブリダイゼーション又は R T - P C R 解析でオリゴヌクレオチドを用いることを含む請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 11】

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

(a) 図 2 (配列番号 2) に示すアミノ酸配列；又は

(b) 図 1 (配列番号 1) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

50

に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド又は低分子に接触させ、抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は低分子と試験生物学的試料中のポリペプチドの間の複合体の形成を検出し、該複合体の形成が哺乳動物における腫瘍の存在を示している方法。

【請求項12】

抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は低分子が検出可能に標識されている請求項11に記載の方法。

【請求項13】

組織細胞の試験生物学的試料が、メラノーマに罹っていることが疑われる個体から得られたものである請求項11に記載の方法。

10

【請求項14】

メラノーマがT A S K 1 2 1<sup>V 6 0 0 E</sup> (配列番号5)変異を含む請求項11に記載の方法。

【請求項15】

(a) 図2 (配列番号2) に示すアミノ酸配列; 又は

(b) 図1 (配列番号1) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドの、該ポリペプチドを含むことが疑われる生物学的試料中における有無を決定する方法であって、

核酸に結合するR N A i に上記生物学的試料を暴露し、上記生物学的試料中の前記ポリペプチドの有無を決定することを含む方法。

20

【請求項16】

前記生物学的試料が前記ポリペプチドを過剰発現することが疑われる細胞を含む請求項15に記載の方法。

【請求項17】

細胞が癌細胞である請求項16に記載の方法。

【請求項18】

抗T A S K抗体(A b)と薬剤部分(D)を含み、抗T A S K抗体がリンカー部分(L)によってDに結合する抗体薬剤コンジュゲート化合物であって、式I



30

(ここで、pは1から8である)を有し、抗T A S K抗体が、

(a) 図2 (配列番号2) に示すアミノ酸配列; 又は

(b) 図1 (配列番号1) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する抗体薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項19】

薬剤部分Dが、メイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、及びカリケアマイシンから選択される請求項18に記載の抗体薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項20】

請求項18に記載の抗体薬剤コンジュゲート化合物又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能な希釈剤、担体又は賦形剤を含有する薬学的組成物。

40

【請求項21】

腫瘍細胞又は癌細胞を死滅させ又はその増殖を阻害する方法において、腫瘍細胞又は癌細胞を死滅させ又はその増殖を阻害するのに有効な量の、請求項18に記載の抗体薬剤コンジュゲート化合物又はその薬学的に許容可能な塩又は溶媒和物で腫瘍細胞又は癌細胞を治療することを含む方法。

【請求項22】

請求項18に記載の抗体薬剤コンジュゲート化合物と、薬学的に許容可能な希釈剤、担体又は賦形剤の製剤を患者に投与することを含む癌の治療方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の開示】

## 【0001】

米国特許法施行規則第1.53条第b項に従って出願されたこの非仮出願は、出典明示により全内容を援用する2005年12月7日出願の米国仮出願第60/748063合に基づく米国特許法第119条第e項の優先権を主張する。

## 【0002】

## (発明の分野)

本発明は、哺乳動物における遺伝子発現を調節するのに有用な物質と、同目的に対してその物質を使用する方法に関する。

## 【0003】

## (発明の背景)

悪性腫瘍(癌)は、米国においては心臓疾患に続く第2の主要な死亡原因である(Boringerら, CA Cancer J. Clin., 43: 7(1993))。癌は、正常な組織に由来し、増殖し腫瘤を形成する異常な又は新生物細胞の数の増加、かかる新生物腫瘍細胞の隣接組織への浸潤、血液又はリンパ系を経て局所のリンパ節へ、また転移と呼ばれるプロセスを経て遠隔部位に最終的には拡散する悪性細胞の生成により特徴付けられる。癌の状態では、細胞は正常細胞が増殖しない条件下で増殖する。癌は、様々な程度の侵襲性及び攻撃性によって特徴付けられる広範な形態で現れる。

## 【0004】

癌の治療に効果的な細胞標的を発見すべく、研究者は、一又は複数の正常な非癌性細胞と比較し、特定のタイプの癌細胞で特に過剰発現するポリペプチドを同定しようとしてきた。このような腫瘍関連細胞ポリペプチドの同定は、抗体に基づく治療により癌細胞を特異的に標的として破壊する能力のもとになる。この点に関し、抗体に基づく治療が、ある種の癌の治療に非常に効果的であることが証明されていることが留意される。例えば、ハーセプチン(登録商標)とリツキサン(登録商標)(双方ともジェネンテック社, サウスサンフランシスコ, カリフォルニア)は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するのに成功裏に用いられてきた抗体である。より具体的には、ハーセプチン(登録商標)は、ヒト上皮増殖因子レセプター2(HER2)癌原遺伝子の細胞外ドメインに選択的に結合する組換えDNA誘導ヒト化モノクローナル抗体である。HER2タンパク質の過剰発現は原発性乳癌の25-30%で見られる。リツキサン(登録商標)は、正常及び悪性Bリンパ球の表面に見出されるCD20抗原に対する遺伝子操作キメラマウス/ヒトモノクローナル抗体である。

## 【0005】

シグナル伝達経路、細胞分裂周期及びプログラム細胞死を制御するキナーゼ類は細胞調節にとって重要である。これらの重要なキナーゼ類の過剰発現又は活性化変異は細胞調節を乱し腫瘍形成に至らしめうる。全ての既知癌遺伝子の20パーセントがプロテインキナーゼ類である。適切なシグナル伝達経路を同定し、これらの癌遺伝子キナーゼ類を特異的に阻害する薬剤を開発することが、しばらくの間、癌研究の主要な目標であった。ハイスルーブットスクリーニングにより、触媒性アデノシン三リン酸結合部位との競合、基質結合の阻害、又は基質自体の修飾のように異なった阻害形態の低分子が同定されている。ある種の化合物が単一のキナーゼに対して高度に特異的である一方、他のものは類似の結合構造を持つ幾つかのキナーゼ類を阻害しうる(Busseら, Semin. Oncol. 28:47-55 (2001))。例えば、チロシンキナーゼBcr-Ablは慢性骨髄性白血病(CML)の原因因子として同定されている。低分子のメシル酸イマチニブ(グリベック<sup>TM</sup>-Novartis Pharmaceuticals Corp, East Hanover, NJ)がCMLの治療に対して最近承認されており、シグナル伝達経路のキナーゼ成分の処置が癌の治療に効果的であることが実証されている(Griffin J. Semin. Oncol. 28:3-8 (2001))。

## 【0006】

Rafセリン/スレオニンキナーゼ類はRasの下流エフェクター分子である(Mercer

10

20

30

40

50

ら, *Biochem. Biophys. Acta* 1653:25-40 (2003)). R a fファミリーはA-R a f、B-R a f及びC-R a fからなり、三つの保存領域内に高度の相同性を有している。これらの領域の二つはR a s結合ドメインとG T P複合化R a sと相互作用するシステインリッチドメインである(Vojtekら, *Cell* 74:205-14 (1993)). R a fとR a sが結合すると、R a fは細胞膜に補充され、R a f触媒性ドメインの阻害が軽減され、B-R a fの活性化ドメイン内の特定部位のリン酸化に至り、よって分子の活性化に至る。これに対して、A-R a fとC-R a fは触媒ドメインの外側の更なるリン酸化を必要とする。B-R a fのこの別個の単純な活性化機構はそれをM E Kのような経路における下流標的の重要な調節因子にする。B-R a fノックアウトマウスでは、M E K活性化が乱されるが、この結果は、A-R a f又はC-R a fの何れかを欠く細胞では見られない。(Pritchardら, *Mol. Cell Bio.* 24:5937-5952 (2004); Mercerら, *Oncogene* 21:347-355 (2002); Wellbrockら, *Nature Rev.* 5 875-885 (2004))。

10

#### 【0007】

癌におけるB-R a fの発生率は、悪性メラノーマ(27% - 70%)、乳頭様甲状腺癌(36% - 53%)、結腸直腸癌(5% - 22%)及び漿液性卵巣癌(約30%)において最も高いことが報告されている(Garnettら, *Cancer Cell* 6:313-319 (2004))。メラノーマの発生率は最近の10年間に着実に増加している。合衆国では、およそ6000の新症例がメラノーマと毎年診断され、推定7700名の患者が2005年にメラノーマで死亡している(American Cancer Society, 2005)。疾患の早期発見の改善にもかかわらず、悪性メラノーマは伝統的な癌治療法に高度に耐性があり、その進行を安定化させ又は遅らせることができる効果的な治療法の開発に対して未だ達成されていない顕著な医療的必要性が存在している(Thompsonら, *Lancet* 365:687-701(2005))。例えば、メラノーマは免疫系による攻撃を受けやすい場合があるが、高用量のインターフェロン治療には大きな副作用があり、低用量のインターフェロンを用いるアジュバント療法は無再発性又は全生存の何れにも影響を有することは一貫しては示されていない(Hancockら, *J Clin Oncol* 22:53-61 (2004))。メラノーマの治療における希望の最近の指針は、体細胞B R A F変異が非定型色素性母斑及び初期段階メラノーマにおいて非常に高頻度で生じるという知見であった(Daviesら, *Nature* 417:949-54. (2002)) Mercerら, *Biochim Biophys Acta* 1653:25-40 (2003))。これらのB R A F変異のほぼ90%が、キナーゼの活性化セグメントにおいてV a l<sup>600</sup> G l u (V 6 0 0 E)アミノ酸置換を生じるエクソン15のT 1 7 9 9 Aトランスポージョンである(Wanら, *Cell* 116:855-67 (2004) Wellbrockら, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:875-85. (2004))。この変異は、正常なB R A F活性化の間に生じ、恒常的キナーゼ活性に至るT 5 9 9及びS 6 0 2リン酸化の必要性を不要にする。

20

30

#### 【0008】

B R A FはM E K 1 / 2及び細胞外シグナル制御キナーゼ1 / 2 ( E R K 1 / 2 )の活性化を誘発する(Mercerら, *Biochim Biophys Acta* 1653:25-40 (2003))。細胞増殖、浸潤、生存及び血管新生を含む腫瘍形成に関連した多数の細胞性応答を含む70を越えるE R K 1 / 2基質が記載されている(Lewisら, *Adv Cancer Res* 74:49-139 (1998))。E R K 1 / 2の機能及びシグナル伝達は広く研究されているが、E R K 3 / M A P K 6を含む他のE R Kファミリーメンバーについてはあまり知られていない(Bogoyevitchら, *Cell Signal* 16:1345-54 (2004))。E R K 3は、E R K 1とそのキナーゼドメインにおいて~50%の同一性を共有している97k D aのタンパク質である(Boultonら, *Cell* 65:663-75 (1991)) (Turgeonら, *Biochem J.* 346 Pt 1:169-75 2000)。E R K 3はキナーゼ活性と適合性があると考えられるが、推定のインビボ基質はなお議論の余地がある(Schumacherら, *Embo J* 23:4770-9 (2004))。

40

#### 【0009】

E R K 3は、それを他のE R Kファミリーメンバーから区別する二つの顕著な生化学的特徴をキナーゼドメイン内に有する。まず、E R K 3は、M A P K活性化及び基質結合に必須である他のE R Kファミリーメンバーに見出される基準のT h r - X a a - T y rリン

50

酸化モチーフの代わりに S e r - G l u - G l y 配列を含んでいる。更に、典型的なプロテインキナーゼの C 末端口を安定化させる A l a - P r o - G l u 活性化ループモチーフがまた E R K 3 で保存されていない (Hanksら, FASEB J 9:576-96 (1995))。E R K 3 のリン酸化媒介調節は現在よく理解されていないが、更なるレベルの E R K 3 調節への洞察が、プロテアソーム阻害剤での処置後に発現が増加した遺伝子のマイクロアレイスクリーニングでのこのキナーゼの同定から続いた (Zimmermannら, J Biol Chem 276:10759-66 (2001))。更なる研究は、E R K 3 タンパク質がユビキチン-プロテアソーム経路によって迅速に分解することを示しており、これは E R K 3 レベルのインピボでの調節のための重要な機序であると思われる (Coulombeら, Mol Cell Biol 24:6140-50 (2004))。E R K 3 結合対の M A P K 活性化プロテインキナーゼ-5 はまた E R K 3 の内因性レベルを安定化させることが示されている (Schumacherら, Embo J 23:4770-9 (2004))。併せて考えると、これは、E R K 3 の生物学的活性が、転写物 / タンパク質合成の制御及び安定性を通じてその細胞の存在量によって大きく調節されることを示している。

#### 【0010】

B R A F - V 6 0 0 E を発現する細胞における B R A F 特異的転写をマイクロアレイ遺伝子発現プロファイリングによって研究した (Hoeflichら (2006) Intl. Jour. of Oncology 29:839-849)。細胞外シグナル制御キナーゼ-3 及び M A P K ファミリーメンバー (E R K 3 / M A P K 6) は B R A F シグナル伝達に応答して高度に発現される。

生物学及び医学における B R A F シグナル伝達経路の重要性が分かると、癌遺伝子 B R A F によって誘発される下流シグナル伝達及び遺伝子発現の変化が特徴付けられる。網羅的マイクロアレイプロファイリング及び分子ネットワーク解析と結合させた誘導性 B R A F 細胞株を使用して、B R A F - M E K 1 / 2 - E R K 1 / 2 経路の新規標的を同定した。すなわち、E R K 3 は、活性化 B R A F ミスセンス変異を持つ腫瘍中において増加する B R A F の転写標的として示されている。哺乳動物の癌治療法の進歩にもかかわらず、腫瘍細胞増殖を診断可能な薬剤に対して大きな必要性がある。従って、診断用標的を同定することが本発明の目的である。

#### 【0011】

(発明の概要)

本発明の一側面は、生物学的試料中の腫瘍関連キナーゼ (TUMOR-ASSOCIATED KINASE) (T A S K) ポリペプチドであって、

(a) 図 2 (配列番号 2) に示すアミノ酸配列; 又は

(b) 図 1 (配列番号 1) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドの有無を決定する方法であって、

上記ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は低分子に上記生物学的試料を暴露し、上記生物学的試料中の前記ポリペプチドに対する該抗体、オリゴペプチド、s i R N A、オリゴヌクレオチド又は低分子の結合を決定することを含む方法である。

#### 【0012】

本発明の他の側面は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法において、上記哺乳動物から得られた組織細胞の試験生物学的試料中と同一組織由来の既知の正常細胞のコントロール生物学的試料中において、

(a) 図 2 (配列番号 2) に示すアミノ酸配列; 又は

(b) 図 1 (配列番号 1) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、コントロール生物学的試料と比較したときの試験生物学的試料中における上記ポリペプチドのより高い発現レベルが、試験生物学的試料が得られた哺乳動物における腫瘍の存在を示している方法である。

## 【0013】

本発明の他の側面は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法において、上記哺乳動物から得られた組織細胞の試験生物学的試料を、

(a) 図2(配列番号2)に示すアミノ酸配列；又は

(b) 図1(配列番号1)に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド又は低分子に接触させ、抗体、オリゴペプチド、siRNA、オリゴヌクレオチド又は低分子と試験生物学的試料中のポリペプチドの間の複合体形成を検出し、複合体の形成が哺乳動物における腫瘍の存在を示している方法である。

10

## 【0014】

本発明の他の側面は、

(a) 図2(配列番号2)に示すアミノ酸配列；又は

(b) 図1(配列番号1)に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドの、該ポリペプチドを含むことが疑われる生物学的試料中における有無を決定する方法であって、

核酸に結合するRNAiに上記生物学的試料を暴露し、上記生物学的試料中の前記ポリペプチドの有無を決定することを含む方法である。

20

## 【0015】

本発明の他の側面は、抗TASK抗体(Ab)と薬剤部分(D)を含み、抗TASK抗体がリンカー部分(L)によってDに結合する抗体薬剤コンジュゲート化合物であって、式I



(ここで、pは1から8である)を有し、抗TASK抗体が、

(a) 図2(配列番号2)に示すアミノ酸配列；又は

(b) 図1(配列番号1)に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列

に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する抗体薬剤コンジュゲート化合物である。

30

本発明の更なる実施態様は本明細書を読むと当業者には明らかであろう。

## 【0016】

(例示的实施態様の詳細な説明)

## I. 定義

ここで使用される「TASKポリペプチド」及び「TASK」という用語は、ここに記載する特定のポリペプチド配列である腫瘍関連キナーゼ(TUMOR-ASSOCIATED KINASE)を意味する。「数字」なる語が、ここで使用される実際の数字標記として提供される「TASK/数字ポリペプチド」及び「TASK/数字」には、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片(ここで更に定義される)が含まれる。ここで記載されるTASKポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え又は合成方法によって調製されてもよい。「TASKポリペプチド」という用語は、ここに開示される各個々のTASK/数字ポリペプチドを指す。「TASKポリペプチド」を指すこの明細書中の全ての開示は、各ポリペプチドを個々に指すのと同時にまとめて指す。例えば、調製、精製、誘導、抗体の形成、TASK RNAiの形成、TASK結合低分子の形成、投与、含有する組成物、疾患の治療等の記載は、本発明の各ポリペプチドのそれぞれに関する。「TASKポリペプチド」という用語はまたここに開示したTASK/数字ポリペプチドの変異体を含む。

40

## 【0017】

「天然配列TASKポリペプチド」には、天然由来の対応するTASKポリペプチドと

50

同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。このような天然配列 T A S K ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、あるいは組換え又は合成手段により産生することもできる。「天然配列 T A S K ポリペプチド」という用語には、特に、特定の T A S K ポリペプチドの自然に生じる切断型、ポリペプチドの自然に生じる変異型(例えば、選択的スプライシング型)及び自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、ここに開示される天然配列 T A S K ポリペプチドは、添付の図面に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドン(示される場合)は図中に太字及び下線で示す。添付図に「N」で示す核酸残基は、任意の核酸残基である。しかし、添付の図面に開示した T A S K ポリペプチドは、図中においてアミノ酸位置 1 としてここに標記されるメチオニン残基で始まるように示されるが、図中におけるアミノ酸位置 1 の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基を T A S K ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし、可能でもある。

10

## 【0018】

ここで同定した T A S K ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の T A S K ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、種々の方法、例えば BLAST、BLAST-2、ALIGN 又は Megalign(DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより、達成することができる。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含むアラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラム ALIGN-2 を使用することによって得られる。ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントン D.C., 20559 にユーザー用書類と共に提出され、米国著作権登録第 TXU510087 号として登録されている。ALIGN-2 プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能である。ALIGN-2 プログラムは、U N I X (登録商標) オペレーティングシステム、例えばデジタル U N I X (登録商標) V4.0D での使用のためにはコンパイルされなければならない。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2 プログラムによって設定され、変動しない。

20

30

## 【0019】

アミノ酸配列比較のために ALIGN-2 を用いる場合は、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する %アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の %アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる)は次のように計算される:

分率  $X / Y$  の 100 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム ALIGN-2 の A 及び B のプログラムのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する %アミノ酸配列同一性は、B の A に対する %アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた %アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 1 及び 2 が、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「T A S K」と称されるアミノ酸配列に対する %アミノ酸配列同一性の計算方法を実証するもので、「T A S K」が対象となる仮の T A S K (TUMOR-ASSOCIATED KINASE) ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」が対象となる T A S K ポリペプチドが比較されているアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」が各々異なった仮のアミノ酸残基を表す。特に断らない限りは、ここで使用する全ての %アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2 比較コンピュータプログラムを用いた直ぐ前の節に記載されたようにして得られる。

40

## 【0020】

50

「T A S K 変異体ポリヌクレオチド」又は「T A S K 変異体核酸配列」は、ここで定義される、T A S K ポリペプチド、例えば活性なT A S K ポリペプチドをコードし、ここに開示される完全長天然配列T A S K ポリペプチド配列、又は(完全長T A S K ポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを表す核酸によってコードされたもののような)ここに開示する完全長T A S K ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常は、T A S K 変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列T A S K ポリペプチド配列、又はここに開示する完全長T A S K ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有している。変異体は天然ヌクレオチド配列を包含しない。

10

#### 【0021】

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

20

#### 【0022】

ここで同定されるT A S K コード核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、T A S K 核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegaalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成することができる。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、そのソースコードは米国著作権庁、ワシントン D.C.、20559にユーザー用書類と共に提出され、米国著作権登録第TXU510087号として登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、例えばデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用にはコンパイルされなければならない。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

30

40

#### 【0023】

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

50

分率 W / Z の 1 0 0 倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチドである。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表3及び4は「比較DNA」と称される核酸配列の「TASK-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示し、ここで、「TASK-DNA」は対象となる仮のTASKコード化核酸配列を表し、「比較DNA」が対象となる「TASK-DNA」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮のヌクレオチドを表す。特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直ぐ前の節に示したようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

10

20

30

40

50

【0024】

表1

T A S K                    X X X X X X X X X X X X X X X (長さ = 15 アミノ酸)  
 比較タンパク質        X X X X X Y Y Y Y Y Y Y (長さ = 12 アミノ酸)  
 %アミノ酸配列同一性 = (ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間の一致する同一アミノ酸残基の数)を(TASKポリペプチドのアミノ酸残基全数)で割る =  
 5割る 15 = 33.3%

【0025】

表2

T A S K                    X X X X X X X X X X (長さ = 10 アミノ酸)  
 比較タンパク質        X X X X X Y Y Y Y Y Y Z Z Y Z (長さ = 15 アミノ酸)  
 %アミノ酸配列同一性 = (ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間の一致する同一アミノ酸残基の数)を(TASKポリペプチドのアミノ酸残基全数)で割る =  
 5割る 10 = 50%

【0026】

表3

T A S K - D N A        N N N N N N N N N N N N N N (長さ = 14 ヌクレオチド)  
 比較DNA                N N N N N N L L L L L L L L L L (長さ = 16 ヌクレオチド)  
 %核酸配列同一性 = (ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間の一致する同一ヌクレオチドの数)を(TASK-DNA核酸配列のヌクレオチドの全数)で割る =  
 6割る 14 = 42.9%

【0027】

表4

T A S K - D N A        N N N N N N N N N N N N (長さ = 12 ヌクレオチド)  
 比較DNA                N N N N L L L V V (長さ = 9 ヌクレオチド)  
 %核酸配列同一性 = (ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間の一致する同一ヌクレオチドの数)を(TASK-DNA核酸配列のヌクレオチドの全数)で割る =  
 4割る 12 = 33.3%

【0028】

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

ここで開示する様々なTASKポリペプチドを記載するために使用される場合、「単離」は、その自然環境の成分から同定され、分離され、及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク

質様溶質が含まれる。ある種の実施態様では、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、TASKポリペプチドの自然環境の少なくとも一成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一の精製工程により調製される。

#### 【0029】

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

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

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合」している。

#### 【0030】

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

#### 【0031】

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高度にストリンジェントな条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50% (v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)42における50%ホルムアミド、5×SSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42における0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55での50%ホルムアミド、ついで55におけるEDTAを含む0.1×SSCからなる高ストリンジェントな洗浄を用いるものによって特定される。

#### 【0032】

10

20

30

40

50

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているようにして特定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び%SDS）の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、20%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37°Cでの終夜インキュベーション、ついで1×SSC中約37-50°Cでのフィルターの洗浄という条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかは分かるであろう。

10

## 【0033】

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

## 【0034】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治癒的処置及び予防的又は防護的療法の双方を意味し、その目的は、対象の病的症状又は疾患を防ぐか又は遅延（小さく）させることである。治療を必要とする者には、疾患に罹りやすい者並びに疾患に既に罹っている者、又は疾患が予防されるべき者を含む。本発明の方法に従ってRNAi又は低分子の治療量を投与された後に、患者が次の一又は複数について観察可能な及び/又は測定可能な減少又は消失を示したならば、患者又は哺乳動物は、TASKポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害（すなわち、ある程度の減速又は停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の減速及び停止）；腫瘍成長のある程度の阻害；及び/又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の緩和；罹患率及び死亡率の減少、及び生活の質問題の改善。RNAiが存在する癌細胞の成長を防ぎ及び/又は死滅させることができる程度では、それは細胞増殖抑制性及び/又は細胞毒性であり得る。これらの兆候又は症状の低減はまた患者が感じることができる。

20

30

## 【0035】

疾患における成功裏の治療及び改善を評価するための上記パラメーターは、医師にとってよく知られている常套的手順によって容易に測定可能である。癌治療では、有効性は、例えば、腫瘍増殖停止時間（TTP）の評価及び/又は奏効率（RR）の決定によって測定することができる。転移は、病期決定試験によって、及び骨への広がりを決定するための骨スキャン及びカルシウムレベル及び他の酵素の試験によって、決定することができる。CTスキャンはまた該領域の骨盤及びリンパ節への広がりを探索することで行うことができる。胸部X線と既知の方法による肝臓酵素レベルの測定を、それぞれ肺及び肝臓への転移を調べるために用いる。疾患をモニタリングする他の常套的方法には、経直腸的超音波断層法（TRUS）及び経直腸的針生検（TRNB）が含まれる。

40

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

## 【0036】

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするた

50

めに、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処置である。

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

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

#### 【0037】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、これらは、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体はpH緩衝水溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例には、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）が含まれる。

10

20

#### 【0038】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、siRNA、TASK結合オリゴペプチド又はTASK結合低分子が接着又は結合できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例には、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド類、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコン類で形成されたものが含まれる。ある実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィークラム）を含むことができる。また、この用語は別々の粒子の不連続な固相も含む（米国特許第4275149号）。

「リボソーム」は、哺乳動物へのRNAiの輸送に有用な種々のタイプの脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤からなる小胞体である。リボソームの成分は、通常は生体膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。

30

#### 【0039】

「低」分子又は「低」有機分子とは、約500ダルトン以下の分子量を持つとここで定義される。

ここに開示するRNAiの「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量である。「有効量」は、述べた目的に関連して、用量設定によって、経験的及び常套的な形で決定することができる。

「治療的有效量」という用語は、患者又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的な抗体、ポリペプチド、TASK結合オリゴペプチド、TASK siRNA、TASK結合低分子又は他の薬剤の量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬剤は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、又は停止）させ；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度まで減速、又は停止）させ；腫瘍成長をある程度まで阻害し；及び/又は癌に伴う一又は複数の症状をある程度まで緩和しうる。「治療する」のここでの定義を参照せよ。薬剤が存在する癌細胞の成長を妨げ及び/又は死滅させることができる程度において、それは、細胞増殖抑制性及び/又は細胞毒性でありうる。

40

#### 【0040】

抗TASK抗体、TASKポリペプチド、TASK結合オリゴペプチド、TASK siRNA又はTASK結合低分子の「増殖阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の

50

増殖をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗TAS K抗体、TAS Kポリペプチド、TAS K結合オリゴペプチド、TAS K s i R N A又はTAS K結合有機分子の「増殖阻害量」は、経験的かつ常套的な形で決定することができる。

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

10

#### 【0041】

「干渉RNA」又はRNA iは標的遺伝子の発現を減少させる10から50ヌクレオチド長のRNAであり、ストランド部分が十分に相補的である（例えば標的遺伝子に対して少なくとも80%の同一性を有している）。

「低分子干渉RNA」又はs i R N Aは標的遺伝子の発現を減少させる10から50ヌクレオチド長の二本鎖RNA二重鎖であり、第一のストランド部分が十分に相補的である（例えば標的遺伝子に対して少なくとも80%の同一性を有している）。

「ヘアピン」なる用語は7~20ヌクレオチドのループRNA構造を意味する。

「低分子ヘアピン型RNA」又はs h R N Aは標的遺伝子の発現を減少させる10から50ヌクレオチド長の一本鎖RNAであり、RNAストランド部分が十分に相補的である（例えば標的遺伝子に対して少なくとも80%の同一性を有している）。

20

#### 【0042】

「TAS K干渉RNA」又は「TAS K RNA i」はTAS K核酸に結合し又は特異的にハイブリダイズし、その発現を減少させる。これは、TAS K分子の発現が、RNA iが存在しないコントロールにおけるTAS K分子の発現と比較して、RNA iが存在していると低いことを意味している。TAS K RNA iは既知の方法を使用して同定し、合成しうる（Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003), 国際公開第2003056012号及び国際公開第2003064621号）。

例えばTAS Kポリペプチド標的のような対象核酸に「結合する」RNA iは、RNA iが該抗原を発現する細胞又は組織を標的とする場合に診断用及び/又は治療用薬剤として有用であるように十分な親和性をもって標的配列に結合し、他の標的配列と有意には交差反応しないものである。そのような実施態様では、「非標的」配列に対するRNA iの結合の度合いは、ハイブリダイゼーションにより決定して、その特定の標的タンパク質へのRNA iの結合の約10%未満である。RNA iの結合に関して、特定の核酸に「特異的に結合」又は「特異的に結合する」又は「特異的である」なる用語は、非特異的相互作用とは測定可能に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般には結合活性を有していない類似の構造の分子であるコントロール分子の結合と比較して分子の結合を決定することにより、測定することができる。例えば、特異的結合は、標的、例えば過剰の非標識標的と類似したコントロール分子との競合によって決定することができる。この場合、プローブへの標識標的の結合が過剰の未標識標的によって競合的に阻害される場合に、特異的結合が示される。

30

40

#### 【0043】

「TAS Kポリペプチドを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する」RNA i又は他の低分子又は「増殖阻害」オリゴペプチド、RNA i又は他の低分子は、適切なTAS Kポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な増殖阻害を生じるものである。例示的な増殖阻害性抗TAS K抗体、オリゴペプチド、RNA i又は低分子は、適切なコントロールと比較して20%以上、約20%から約50%以上（例えば約50%から約100%）TAS K発現腫瘍細胞の増殖を阻害し、ここで、コントロールは、典型的には試験されているオリゴペプチド、RNA i又は他の低分子で処置していない腫瘍細胞である。腫瘍細胞のインビボでの増殖阻害は、以下の実験実施例に記載したような様々な方法で決定す

50

ることができる。

【0044】

「アポトーシスを誘導する」オリゴペプチド、RNAi又は他の低分子は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞の縮み、小胞体の拡張、細胞断片化、及び/又は膜小胞(アポトーシス体)の形成によって決定されるプログラム細胞死を誘導するものである。細胞は通常はTASKポリペプチドを過剰発現するものである。細胞は腫瘍細胞、例えば前立腺、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、肺、腎臓、大腸、又は膀胱細胞でありうる。アポトーシスに伴う細胞性事象を評価するために様々な方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン(PS)転位置はアネキシン結合によって測定することができる; DNA断片化はDNAラダーを介して評価することができる; 及びDNA断片化を伴う核/クロマチン凝縮は低二倍体細胞中の増加によって評価することができる。アポトーシスを誘導するRNAi又は他の低分子は、アネキシン結合アッセイにおいて、未処理細胞に対して、約2から50倍、約5から50倍、約10から50倍のアネキシン結合の誘導を生じるものでありうる。

10

【0045】

「抗体」なる用語は最も広い意味で使用され、例えば、単一の抗TASKモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ特異性を持つ抗TASK抗体物質、ポリクローナル抗体、一本鎖抗TASK抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗TASK抗体の断片(下記を参照)を特に包含する。「免疫グロブリン」(Ig)なる用語は、ここでの抗体と相互に置換え可能に用いられる。

20

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。例示的な実施態様では、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって決定して、95重量%以上まで、また99重量%以上の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)例えばクーマシーブルーあるいは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで、精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツ抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

30

【0046】

基本4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本ヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5を含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。各L鎖は一つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により相互に結合する。各H及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。各H鎖は、及び鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン( $C_H$ )が、 $\mu$ 及びアイソタイプに対しては4つの $C_H$ ドメインが続く可変ドメイン( $V_H$ )をN末端に有する。各L鎖は、その他端に定常ドメイン( $C_L$ )が続く可変ドメイン( $V_L$ )をN末端に有する。 $V_L$ は $V_H$ と整列し、 $C_L$ は重鎖の第一定常ドメイン( $C_H1$ )と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。 $V_L$ と $V_H$ は共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr及びTristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

40

50

## 【 0 0 4 7 】

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C<sub>H</sub>)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ と呼ばれる重鎖を有する。更に $\kappa$ 及び $\lambda$ のクラスは、C<sub>H</sub>配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1及びI g A 2が発現する。

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

## 【 0 0 4 8 】

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

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

## 【 0 0 4 9 】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、

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

「無傷」の抗体は、抗原結合部位、並びに $C_L$ 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、 $C_H1$ 、 $C_H2$ 及び $C_H3$ を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

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

#### 【0050】

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Fc」断片を産生する。Fab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン( $V_H$ )、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン( $C_H1$ )からなる。各Fab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな $(Fab')_2$ 断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖 $C_H1$ ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。 $(Fab')_2$ 抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

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

#### 【0051】

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

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

#### 【0052】

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原結合部位を有する断片が得られるよう

10

20

30

40

50

に、 $V_H$ と $V_L$ ドメインとの間に、短いリンカー(約5 - 10残基)を持つsFv断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sFv断片のヘテロ二量体であり、そこでは2つの抗体の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開93/11161号；及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)においてより十分に記載されている。

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。更なる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986)；Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

#### 【0053】

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

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)；貪食作用；細胞表面レセプター(すなわち、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

#### 【0054】

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

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」なる用語は何らかの度合いの異常な細胞増殖を伴う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

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

## 【 0 0 5 5 】

「細胞死を誘導する」RNAi、オリゴペプチド又は他の低分子は、生存可能な細胞を生育不能にするものである。細胞は、TASKポリペプチドを発現するもの、あるいは、同じ組織型の正常細胞と比較してTASKポリペプチドを過剰発現するものである。細胞は癌細胞、例えば、メラノーマ、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害(ADCC)又は補体依存性障害(CDC)によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活化血清(すなわち、補体の不存在下)を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。オリゴペプチド、RNAi又は他の低分子が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンブルー(Mooreら Cytotechnology 17: 1-11(1995))又は7AADの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と相対して評価することができる。細胞死誘導RNAi、オリゴペプチド又は他の低分子は、BT474細胞でのPI取込みアッセイでPI取込みを誘導するものでありうる。

10

## 【 0 0 5 6 】

「TASK発現細胞」は、内因性又は形質移入されたTASKポリペプチドを発現する細胞である。「TASK発現癌」は、TASKポリペプチドを過剰発現する細胞を含む癌である。「TASK発現癌」は、場合によっては、RNAi、オリゴペプチド又は他の低分子がそれに結合することができ、癌に関して治療的効果を有するように、十分なレベルのTASKポリペプチドを生成する。他の実施態様では、「TASK発現癌」は、場合によっては、TASK RNAiがそれに結合することができ、癌に対して治療的効果を有するように十分なレベルのTASK遺伝子を発現する。TASKポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、顕著により高いレベルのそのTASKポリペプチドを有するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。TASKポリペプチド過剰発現は、診断又は予後アッセイにおいて、細胞中に存在するTASKタンパク質の増大したレベルを評価することによって決定されうる(例えば、TASKポリペプチドをコードする単離された核酸から、組換えDNA技術を用いて調製することができる単離TASKポリペプチドに対して調製した抗TASK抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して; FACS分析など)。あるいは、又は付加的に、例えば、TASKコード核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベスプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション; (FISH; 1998年10月に公開の国際公開98/45479を参照)、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術、例えばリアルタイム定量PCR(RT-PCR)を介して、細胞中のTASKポリペプチドコード核酸又はmRNAのレベルを測定することができる。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイが、熟練技術者に利用可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射性同位元素のような検出可能な標識で標識していてもよい抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合が、例えば、放射能の外部スキニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって、評価することができる。

20

30

40

## 【 0 0 5 7 】

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

ここで用いられる「細胞毒性薬」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 及びLuの放射性同位元素)、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカ

50

ロイド類（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び/変異体を含む低分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、及び下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むものである。他の細胞毒性薬を以下に記載する。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0058】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞、特にT A S K発現癌細胞の増殖をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期におけるT A S K発現細胞の割合を有意に減少させるものでありうる。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止及びM期停止を誘導する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーには、ピンカス（ピンクリスチン及びピンブラスチン）、タキソール、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakamiら, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特にp13に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、ローン-プーラン・ローラー）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、プリストル-マイヤー・スクウィブ）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

「ドキシサイクリン」はテトラサイクリンファミリーの抗生物質のメンバーである。ドキシサイクリンの完全な化学名は、1-ジメチルアミノ-2,4a,5,7,12-ペンタヒドロキシ-11-メチル-4,6-ジオキソ-1,4a,11,11a,12,12a-ヘキサヒドロテトラセン-3-カルボキサミドである。ドキシサイクリンはTetRに結合し、TetOのTetR阻害を軽減する。

【0059】

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

からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、用量、投与、配合禁忌及び/又はその治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的パッケージを慣習的に含めた指示書を指す。

【0060】

II. 本発明の組成物及び方法

ある実施態様では、本発明は腫瘍関連キナーゼ (TUMOR-ASSOCIATED KINASE) ポリペプチド (「TASK」ポリペプチド) をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。他の側面では、本発明は、キナーゼドメインが不活性化されたか、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的である TASK を提供する。従って、ここに記載した TASK ポリペプチドの触媒的に不活性な形態が考慮される。

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

【0061】

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

単離された核酸分子は、ここに開示されるヒトタンパク質 cDNA の何れかの完全長コード配列によってコードされるものと同じ成熟ポリペプチドをコードする DNA 分子に対して、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含みうる。この点において、「完全長コード配列」なる用語は、(添付図において開始コドンと停止コドンの間にしばしば示される) cDNA の TASK ポリペプチドコードヌクレオチド配列を意味する。

【0062】

本発明の他の実施態様は、(a) ここで開示される完全長アミノ酸配列を有する TASK ポリペプチド、又はここで開示される完全長 TASK ポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするヌクレオチド配列、又は (b) (a) のヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリダイズする単離された核酸分子に関する。この点に関して、本発明の実施態様は、例えば、診断用プローブ、アンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとして有用なハイブリダイゼーションプローブとして、あるいは完全長 TASK ポリペプチドの断片のコード化のための用途を見出し得る、ここに開示される完全長 TASK ポリペプチドコード配列の断片に関する。このような核酸断片は、通常は少なくとも約 5 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370

、 380、390、400、410、420、430、440、450、460、470  
 、 480、490、500、510、520、530、540、550、560、570  
 、 580、590、600、610、620、630、640、650、660、670  
 、 680、690、700、710、720、730、740、750、760、770  
 、 780、790、800、810、820、830、840、850、860、870  
 、 880、890、900、910、920、930、940、950、960、970  
 、 980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈において「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。TASKポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、よく知られた多くの配列アラインメントプログラムの任意のものを使用してTASKポリペプチドコードヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのTASKポリペプチドコードヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することによって、常套的に決定しうることに留意される。そのようなTASKポリペプチドコードヌクレオチド配列の新規な断片の全てがここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされるTASKポリペプチド断片で、TASK結合オリゴペプチド又はTASKポリペプチドに結合する他の低分子に対する結合部位を含んでなるTASKポリペプチド断片である。

10

#### 【0063】

本発明の他の実施態様は、上記において同定した単離された核酸配列の何れかによりコードされる単離されたTASKポリペプチドを提供する。

20

本発明の他の実施態様は、ここに開示される完全長アミノ酸配列を有するTASKポリペプチド、又はここに開示される完全長TASKポリペプチドアミノ酸配列のその他の具体的に定まった断片によってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたTATポリペプチドに関する。

本発明の他の実施態様は、ここに開示されているヒトタンパク質cDNAの何れかによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたTASKポリペプチドに関する。

30

#### 【0064】

本発明の他の実施態様は、単離されたTASKポリペプチドを提供する。これを製造する方法もまたここに記載され、該方法には、TASKポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からTASKポリペプチドを回収することを含む。

本発明の他の実施態様は、ここに記載されたポリペプチドの何れかをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞もまた提供される。例を挙げると、宿主細胞は哺乳動物細胞、大腸菌又は酵母でありうる。

40

本発明の他の実施態様は、ここに記載のTASK核酸、ここに記載のキメラTASK核酸、又はTASK阻害性RNA(RNAi)を含んでなる物質に関する。

本発明の他の実施態様は、容器及び容器内に収容された物質を含む製造品に関し、ここで、その物質には、(a)ここに記載のTASK核酸、(b)ここに記載のキメラTASK核酸、又は(c)TASK RNAiと、(a)、(b)又は(c)を送達させることができるベクターを含みうる。製造品は、更に場合によっては、腫瘍の治療的処置又は診断的検出のための該物質の使用に言及する、容器に添付したラベル、又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を含みうる。

#### 【0065】

50

本発明の他の実施態様は、(a)ここに記載のTASK核酸、(b)ここに記載のキメラTASK核酸、(c)TASK RNAiと、(a)、(b)又は(c)を送達させることができるベクターの、TASK核酸、キメラTASK核酸、TASK RNAiと、(a)、(b)又は(c)を送達させることができるベクターに応答性である症状の治療に有用な医薬の調製における使用に関する。

本発明の他の実施態様は、TASKポリペプチドを発現する癌細胞を死滅させる方法に関し、該方法は、TASK核酸に結合するRNAiに癌細胞を接触させ、癌細胞の死を生じさせることを含む。

本発明の他の実施態様は、癌細胞の増殖がTASKポリペプチドの増殖増強効果に少なくとも部分的に依存する癌細胞の増殖を阻害する方法に関し、該方法は、TASK核酸を、TASK核酸に結合するRNAiと接触させ、それによってTASKポリペプチドの増殖増強活性をアンタゴナイズし、順に癌細胞の増殖を阻害する。癌細胞の増殖は完全に阻害されうる。

#### 【0066】

本発明の他の実施態様は哺乳動物におけるTASKポリペプチド発現腫瘍を治療的に処置する方法に関し、該方法は、TASK核酸に結合するRNAiの治療的有効量を哺乳動物に投与し、それによって腫瘍の効果的な治療的処置を行うものである。

本発明の他の実施態様は哺乳動物における腫瘍であって、その増殖がTASKポリペプチドの増殖増強効果に少なくとも部分的に依存する腫瘍を治療的に処置する方法に関し、該方法は、TASK核酸に結合するRNAiの治療的有効量を哺乳動物に投与し、それによって上記TASKポリペプチドの増殖増強活性をアンタゴナイズし、腫瘍の効果的な治療的処置を行うものである。

本発明の他の実施態様は、TASKポリペプチドの変化した又は増加した発現あるいは活性を伴う細胞増殖性疾患を治療し又は予防する方法に関する。例示的な方法は、TASKポリペプチドのアンタゴニストの治療的有効量をそのような治療を必要とする患者に投与することを含む。細胞増殖性疾患は癌であり得、TASKポリペプチドのアンタゴニストはTASK RNAiであり得る。細胞増殖性疾患の効果的な治療又は予防は、TASK核酸ポリペプチドを発現する細胞を直接死滅させ又はその増殖を阻害し、又はTASKポリペプチドの細胞増殖活性をアンタゴナイズすることによる結果でありうる。

本発明の他の実施態様は、TASK核酸を含むことが疑われる生物学的試料中におけるTASK核酸の有無を決定する方法に関し、該方法は、TASK核酸に結合するRNAiに生物学的試料を暴露し、生物学的試料中のTASK核酸へのRNAiの結合性を決定し、かかる結合性の有無が生物学的試料中のTASKポリペプチドの有無を示すものである。場合によっては、生物学的試料はTASKポリペプチドを発現することが疑われる細胞(癌細胞であり得る)を含みうる。該方法で用いられるTASK結合RNAiは、場合によっては検出可能に標識され、固形担体に結合等されている。

#### 【0067】

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、(a)上記哺乳動物から得た組織細胞の試験生物学的試料中と、(b)同じ組織由来の既知の正常細胞のコントロール生物学的試料中の、TASKポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、コントロール試料と比較した、試験試料中のTASKポリペプチドのより高いレベルの発現が、試験試料が得られた哺乳動物における腫瘍の存在を示すものである。

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、(a)上記哺乳動物から得た組織細胞の試験生物学的試料中と、(b)同じ組織由来の既知の正常細胞のコントロール生物学的試料中において、抗体を用いて、TASKポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、コントロール試料と比較した、試験試料中のTASKポリペプチドのより高いレベルの発現が、試験試料が得られた哺乳動物における腫瘍の存在を示すものである。

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法

10

20

30

40

50

は、(a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料をT A S K核酸に結合するR N A iに接触させ、(b)試験試料中におけるR N A iとT A S Kポリペプチドの間の複合体形成を検出し、複合体の形成が哺乳動物における腫瘍の存在を示すものである。場合によっては、用いられるR N A iは検出可能に標識され、固形担体に結合等され、及び/又は組織細胞の試験試料は癌性腫瘍を持つことが疑われる個体から得られる。

【0068】

本発明の他の実施態様は、上述し又は以下に記載するポリペプチドの任意のものに特異的に結合し、又はハイブリダイズする抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又は抗T A S Kポリペプチド抗体のその各抗原エピトープへの結合を競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、場合によっては、例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等を含む毒素のような増殖阻害剤又は細胞傷害性薬物にコンジュゲートされうる。本発明の抗体は場合によってはC H O細胞又は細菌細胞において産生され得、それらが結合する細胞の死を誘導しうる。診断目的では、本発明の抗体は検出可能に標識され、固形担体に結合等されうる。特定の態様では、抗体は組織試料中のT A S Kポリペプチドの発現レベルを決定するために使用することができる。

10

本発明の他の実施態様は、10から50ヌクレオチド長の単離された低分子干渉(s i R N A)二本鎖に関し、ここで、第一ストランドの部分は対象のT A S K核酸に十分に相補性(例えば少なくとも80%の同一性を有する)であり、T A S Kポリペプチドの発現を抑制又は「ノックダウン」する。

20

【0069】

本発明の他の実施態様は、低分子のスクリーニング方法に関し、該方法は、(a)標的遺伝子に対するR N A iに試験試料を接触させ、(b)R N A iサイレンス標的遺伝子の活性又は発現の減少を、低分子に接触させた場合の標的遺伝子の活性又は発現の減少と比較することを含む。

本発明の他の実施態様は、10から50ヌクレオチド長の単離された低分子ヘアピン(s h R N A)二本鎖に関し、ここで、第一ストランドの部分は対象のT A S K核酸に十分に相補性(例えば少なくとも80%の同一性を有する)であり、T A S Kポリペプチドの発現を抑制又は「ノックダウン」する。

本発明の他の実施態様は、R N Aループ構造又はR N Aヘアピンによって作用可能に結合されうるR N Aの第一及び第二ストランドに関する。このR N Aループ構造は5から50ヌクレオチド長でありうる。特定の態様では、複数のT A S K遺伝子のノックダウンに対して複数のヘアピンが考えられる。

30

本発明は、他のT A S K遺伝子に応答して癌においてアップレギュレーションされる新規に同定したT A S K遺伝子の同定を含み、該新規に同定したT A S K遺伝子は癌の診断に使用することができる。

【0070】

A. 抗T A S K抗体

一実施態様では、本発明は、ここで治療及び/又は診断薬としての用途が見出され得る抗T A S K抗体を提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。抗T A S K抗体には、完全長又はインタクトな抗体、抗体断片、天然配列抗体又はアミノ酸変異体、ヒト化、キメラ又は融合抗体、免疫複合体、及びその機能的断片が含まれる。融合抗体においては、抗体配列は異種ポリペプチド配列に融合している。抗T A S K抗体はF c領域を修飾して所望のエフェクター機能をもたらすようにすることができる。このセクションで更に詳細に検討するように、適切なF c領域があれば、細胞表面に結合した裸の抗体は、例えば抗体依存性細胞傷害(A D C C)を介するか又は補体依存性細胞傷害における補体の補充、あるいは何らかの他の機構によって、細胞傷害を誘導し得る。あるいは、エフェクター機能をなくしたり又は減少させ、副作用又は治療合併症を最小にすることが望まれる場合には、ある種の他のF c領域を使用することができる。

40

50

## 【 0 0 7 1 】

## 1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、関連抗原とアジュバントの複数回の皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射により、動物において産生されうる。免疫されるべき種において免疫原性であるタンパク質に関連抗原(特に合成ペプチドが用いられる場合)を結合させることは有用でありうる。例えば、該抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリブシンインヒビターへ、二官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl<sub>2</sub>、又はR<sup>1</sup>N=C=NR(ここで、R及びR<sup>1</sup>は異なるアルキル基である)を用いて結合させることができる。

10

## 【 0 0 7 2 】

## 2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohlerら, Nature, 256:495 (1975); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製することができ、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作製することができる。

ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株もまたヒトモノクローナル抗体の産生に対して開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。ハイブリドーマ細胞が生育している培地について、抗原に対するモノクローナル抗体の産生を検定する。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定しうる。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munsonら, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって測定することができる。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する概説論文には、Skerraら, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPlueckthun, Immunol. Revs., 130: 151-188(1992)が含まれる。

20

## 【 0 0 7 3 】

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

30

抗体をコードするDNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン(C<sub>H</sub>及びC<sub>L</sub>)配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第4816567号; Morrisonら, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列を非免疫グロブリンポリペプチド(異種ポリペプチド)のコード配列の全部又は一部と融合させることによって、修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを産生させることができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き換えることができるか、又は抗体の一つの抗原結合部位の変動ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する一つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作り出す。

40

## 【 0 0 7 4 】

## 3. ヒト及びヒト化抗体

50

本発明の抗 T A S K 抗体は、ヒト化抗体又はヒト抗体を更に含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化型とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えば F v、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub> あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(C D R)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の C D R の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入された C D R もしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全て又は実質的に全ての C D R 領域が非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又は実質的に全ての F R 領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(F c)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む [ Jones ら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann ら, Nature, 332:323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992) ]。

10

#### 【 0 0 7 5 】

ヒト化は本質的にウィンター(Winter)及び共同研究者 [ Jones ら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann ら, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen ら, Science, 239:1534-1536 (1988) ] の方法に従って、齧歯類 C D R 又は C D R 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施されうる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から一又は複数のアミノ酸残基がそこに導入されたものである。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば「移入」残基と呼ばれ、これは典型的には「移入」可変ドメインから取り出される。従って、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの C D R 残基と場合によっては幾つかの F R 残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

20

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

30

#### 【 0 0 7 6 】

抗体は、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化される。親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体は調製されうる。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能である。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは入手可能である。これらのディスプレイを見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性の増加といった所望の抗体特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

40

ヒト化抗 T A S K 抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を

50

産生するために、場合によっては一又は複数の細胞傷害剤と結合されていてもよい抗体断片、例えば Fab でありうる。あるいは、ヒト抗体はインタクトな抗体、例えばインタクト IgG1 抗体でありうる。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を産生することができる。例えば、現在では、免疫化されると、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物(例えばマウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域( $J_H$ )遺伝子のホモ接合体欠失によって内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが記載されている。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの、かかる生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、抗原投与時にヒト抗体の産生が起こる。Jakobovitsら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovitsら, Nature 362:255-258 (1993); Bruggemanら, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第 5 5 4 5 8 0 6 号、同第 5 5 6 9 8 2 5 号、同第 5 5 9 1 6 6 9 号; 同第 5 5 4 5 8 0 7 号; 及び国際公開第 9 7 / 1 7 8 5 2 号を参照のこと。

#### 【0077】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCaffertyら, Nature 348:552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産生させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレームを一致させて、繊維状バクテリオファージ、例えば M13 又は fd の大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子の何れかでクローン化し、ファージ粒子表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖 DNA コピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択によって、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択がなされる。よって、該ファージは B 細胞の特性の幾つかを模倣する。ファージディスプレイは、例えば Johnson, Kevin S. 及び Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)において概説されている多様な形式で行うことができる。V-遺伝子セグメントの幾つかの供給源を、ファージディスプレイに対して使用することができる。Clacksonら, Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来の V 遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。非免疫化ヒトドナーの V 遺伝子のレパートリーを構成することができ、抗原の多様なアレイ(自己抗原を含む)に対する抗体を、Marksら, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又は Griffithsら, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。米国特許第 5 5 6 5 3 3 2 号及び同第 5 5 7 3 9 0 5 号も参照のこと。

上で検討したように、ヒト抗体はインビトロで活性化された B 細胞により産生することもできる(米国特許第 5 5 6 7 6 1 0 号及び同第 5 2 2 9 2 7 5 号)。

#### 【0078】

#### 4. 抗体断片

ある状況下では、抗体全体よりも抗体断片を用いることに利点がある。より小さなサイズの断片は迅速なクリアランスを可能とし、固形腫瘍への接近の改良につながりうる。

抗体断片を産生するための様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導されていた(例えば、Morimotoら, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及び Brennanら, Science, 229:81(1985)を参照のこと)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。Fab、Fv 及び ScFv 抗体断片は、全て大腸菌で発現させ分泌させることができ、よって、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で検討した抗体ファージライブラリーから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させて  $F(ab')_2$  断片を形成することができる(Carterら, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、 $F(ab')_2$  断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むインビボ半減期が増した Fab 及び  $F(ab')_2$  断片が、米国特許第 5 8 6 9 0 4 6 号に記載されている。抗体断片の産生のため

他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖 Fv 断片 (s c F v) である。国際公開第 93 / 16185 号 ; 米国特許第 5571894 号 ; 及び米国特許第 5587458 号を参照のこと。Fv 及び s F v は、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である ; 従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。s F v 融合タンパク質は、s F v のアミノ又はカルボキシ末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されうる。上掲の Antibody Engineering, Borrebaeck 編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第 5641870 号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

【0079】

#### 5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、T A S K タンパク質の 2 つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位と T A S K 結合部位とが結合しうる。あるいは、抗 T A S K アームは、T A S K - 発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、F c R I (C D 6 4)、F c R I I (C D 3 2) 及び F c R I I I (C D 1 6) 等の I g G (F c R) に対する F c レセプター、又は T 細胞レセプター分子 (例えば C D 3) 等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は T A S K を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体は T A S K 結合アーム及び細胞障害剤 (例えば、サボリン、抗インターフェロン- $\gamma$ 、ピンカアルカロイド、リシン A 鎖、メトトレキサート又は放射性同位体ハプテン) と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片 (例えば F (a b')<sub>2</sub> 二重特異性抗体) として調製することができる (国際公開第 96 / 16673 号 ; 米国特許第 5837234 号 ; 国際公開第 98 / 02463 号 ; 米国特許第 5821337 号)。

【0080】

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

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン (抗体-抗原結合部位) を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は、少なくともヒンジの一部、C<sub>H</sub>2 及び C<sub>H</sub>3 領域を含む I g 重鎖定常ドメインとでありうる。第一の重鎖定常領域 (C<sub>H</sub>1) は、融合物の少なくとも一つに存在する、軽鎖の結合に必要な部位を含みうる。免疫グロブリン重鎖の融合物と、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしている DNA を別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、2 又は 3 個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0081】

この手法の例示的な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対 (第二の結合特異性を提供する) とからなる。二重特異性分子の半分にしか

10

20

30

40

50

免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は国際公開第 9 4 / 0 4 6 9 0 号に開示されている。

二重特異性抗体は、Sureshら, *Methods in Enzymology* 121:210(1986); 米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号; 米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号; 国際公開第 9 1 / 0 0 3 6 0 号; 国際公開第 9 2 / 2 0 0 3 7 3 号; 欧州特許第 0 3 0 8 9 号; 米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号; Brennanら, *Science* 229:81 (1985); Shalabyら, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992); Kostelnyら, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992); Hollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); Gruberら, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994); Tuttleら, *J. Immunol.* 147:60 (1991))。

#### 【 0 0 8 2 】

##### 6 . ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため(米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号)及び HIV 感染の治療のために(国際公開第 9 1 / 0 0 3 6 0 ; 国際公開第 9 2 / 2 0 0 3 7 3 ; 欧州特許第 0 3 0 8 9 号)提案されている。該抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号に開示されたものが含まれる。

#### 【 0 0 8 3 】

##### 7 . 多価抗体

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

#### 【 0 0 8 4 】

##### 8 . エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原依存細胞媒介細胞毒性(ADCC)及び/又は補体依存細胞毒性(CDC)を向上させることは望ましい。これは、抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸置換を誘導することにより達成されうる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖

間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。このようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体依存細胞性細胞毒性 (A D C C) を有する可能性がある。Caronら, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. *Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)を参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolffら, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びA D C C能力を向上させることもできる。Stevensonら, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989)を参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)中にサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合、「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>又はIgG<sub>4</sub>)のFc領域のエピトープを意味する。

10

【0085】

#### 9. イムノコンジュゲート(抗体薬コンジュゲート)

他の側面では、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞傷害性薬物(薬剤部分)にコンジュゲートした抗体を含むイムノコンジュゲート又は抗体薬コンジュゲートを提供する。

抗T A S K抗体-薬剤コンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイドの何れかの生物学的活性を有意に消失させることなく抗T A S K抗体を薬剤部分に化学的に結合させることによって調製することができる。

20

【0086】

癌の治療において細胞傷害性薬物又は細胞増殖阻害薬を局所送達するために抗体-薬剤コンジュゲートを使用すること(Syrgios及びEpenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz及びSpringer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; 米国特許第4975278号)により、腫瘍への薬剤部分の標的送達と、そこでの細胞内蓄積が可能になり、これら未コンジュゲート薬剤の全身投与が、正常細胞並びに排除することが求められている腫瘍細胞に対して許容できないレベルの毒性をもたらさうる(Baldwinら, (1986) *Lancet* pp.(Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pincheraら(編), pp. 475-506)。最小の毒性で最大の効果が求められる。ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の双方がこれらの方策において有用であると報告されている(Rowlandら, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。これらの方法に使用される薬剤には、Drugs used in these methods include ダウノマイシン、ドキシソルピシン、メトトレキセート、及びビンデシンが含まれる(上掲のRowlandら, (1986))。抗体-毒素コンジュゲートに使用される毒素には、細菌毒素、例えばジフテリア毒素、植物毒素、例えばリシン、低分子毒素、例えばゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandlerら(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandlerら(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド類(欧州特許出願公開第1391213号; Liuら, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lodeら(1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinmanら(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)が含まれる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合、又はトポイソメラーゼ阻害を含む機序によって細胞傷害性及び細胞増殖阻害性効果を奏さうる。ある種の細胞傷害性薬物は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に不活性か活性が少なくなる傾向にある。

30

40

【0087】

本発明の抗体は任意の治療薬剤、つまり薬剤部分とコンジュゲートさせることができ、その薬剤部分は抗体に共有結合させることができる。

50

抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)化合物の例示的实施態様は、抗TASK抗体(Ab)と薬剤部分(D)を含み、ここで、抗TASK抗体はDにリンカー部分(L)によって結合しており；該物質は式Iを有する：



ここで、pは1から約8である。

薬剤が抗体にコンジュゲートされていない場合、薬剤は細胞傷害又は細胞増殖阻害効果を有している。よって、薬剤部分の生物学的活性は抗TASK抗体へのコンジュゲーションによって調節される。本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は腫瘍組織に細胞傷害性薬剤の有効用量を選択的に送達し、より大きい選択性、つまりより低い有効用量が達成されうる。

10

「リンカー」(L)は、一又は複数の薬剤部分(D)と抗体ユニット(Ab)を結合させて式Iの抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を形成するために使用することができる二官能性又は多官能性部分である。抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は薬剤と抗体に結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して簡便に調製することができる。抗TASK抗体(Ab)のシステインチオール又はリジンアミノがリンカー試薬、薬剤部分又は薬剤-リンカー中間体の官能基と結合を形成し得る。

#### 【0088】

本発明のADC又はADCの細胞内代謝物のバイオアベイラビリティは、ADCの薬剤部分を含む薬剤化合物と比較すると、哺乳動物において改善されうる。またADC又はADCの細胞内代謝物のバイオアベイラビリティは、薬剤部分を有していないADCの類似体と比較すると、哺乳動物において改善される。

20

抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)の薬剤部分(D)には、細胞傷害又は細胞増殖阻害効果を有している任意の化合物、部分又は基が含まれる。薬剤部分には、(i)微小チューブリン阻害剤、有糸分裂阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、又はDNA介入物として機能しうる化学療法剤；(ii)酵素的に機能しうるタンパク質毒素；及び(iii)放射性同位元素が含まれる。

#### 【0089】

例示的な薬剤部分には、限定するものではないが、メイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、トリコテシン、CC1065、カリケアマイシン及び他のエンジイン抗生物質、タキサン、アントラサイクリン、及びその立体異性体、アイソスター、類似体又は誘導体が含まれる。

30

使用することができる酵素的に活性な毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)由来)、リシンA鎖(Vitettaら(1987)Science, 238:1098)、アプリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカナ(Phytolacca americana)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテシン類(tricothecenes)が含まれる(国際公開第93/21232号)。様々な放射性核種が放射性コンジュゲート抗体の産生のために利用できる。例には、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y、及び<sup>186</sup>Reが含まれる。

40

#### 【0090】

抗体と一又は複数の低分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド類、ドラスタチン類、オーリスタチン類、トリコテシン、及びCC1065、及び毒素活性を有するこれら毒素の誘導体のコンジュゲートがまたここで考えられる。

メイタンシノイド類は、チューブリン重合を阻害することによって作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、

50

例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同第4248870号；同第4256746号；同第4260608号；同第4265814号；同第4294757号；同第4307016号；同第4308268号；同第4308269号；同第4309428号；同第4313946号；同第4315929号；同第4317821号；同第4322348号；同第4331598号；同第4361650号；同第4364866号；同第4424219号；同第4450254号；同第4362663号；及び同第4371533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに援用される。ADCにおけるメイタンシノイド薬剤部分の例示的实施態様には、DM1、DM3、及びDM4(米国特許出願公開第2005/0169933号；国際公開第2005/037992号；米国特許第5208020号)が含まれる。その治療係数を改善する試みで、メイタンシン及びメイタンシノイド類は、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体にコンジュゲートさせられている(米国特許第5208020号；同第5416064号；欧州特許第0425235号；Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996))。

10

#### 【0091】

式Iの抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)の薬剤部分(D)にはまたドラスタチン類とそのペプチド性類似体及び誘導体、オーリスタチン類(米国特許第5635483号；同第5780588号)が含まれる。ドラスタチン類及びオーリスタチン類は微小管動態、GTP加水分解、及び核及び細胞分裂に干渉し(Woykeら(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、抗癌(米国特許第5663149号)及び抗真菌活性(Pettitら(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有していることが示されている。様々な形態のドラスタチン又はオーリスタチン薬剤部分は、ペプチド性薬剤部分のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端を通して抗体に共有結合されうる(国際公開第02/088172号；Doroninaら(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784；Franciscoら(2003) Blood 102(4):1458-1465)。

20

薬剤部分には、ドラスタチン類、オーリスタチン類(米国特許第5635483号；同第5780588号；同第5767237号；同第6124431号)、及びその類似体及び誘導体が含まれる。ドラスタチン類及びオーリスタチン類は微小管動態、GTP加水分解、及び核及び細胞分裂に干渉し(Woykeら(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、抗癌(米国特許第5663149号)及び抗真菌活性(Pettitら(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有していることが示されている。ドラスタチン又はオーリスタチン薬剤部分は、ペプチド性薬剤部分のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端を通して抗体に共有結合されうる(国際公開第02/088172号)。

30

#### 【0092】

例示的オーリスタチン実施態様には、国際公開第2005/081711号；2004年3月28日に提示されたSenterら, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示されたN末端結合モノメチルオーリスタチン薬剤部分DE及びDFが含まれ、その各開示は出典明示によりその全体が明示的に援用される。

40

薬剤部分にはカリケアマイシン及びその類似体及び誘導体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはピコモル以下の濃度で二本鎖DNAの切断を生じ得る。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号；同第5714586号；同第5739116号；同第5767285号；同第5770701号；同第5770710号；同第5773001号；同第5877296号を参照のこと。使用することができるカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 $1^I$ 、 $2^I$ 、 $3^I$ 、N-アセチル- $1^I$ 、PSAG及び $1^I$ が含まれる(Hinmanら Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lodeら Cancer Research 58:2925-2928 (1998))。

50

## 【0093】

本発明の抗TASK抗体にコンジュゲートさせることができる他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同第5770710号に記載され、集合的にLL-E33288複合体として知られている薬剤ファミリー、並びにエスペラミシン(米国特許第5877296号)が含まれる。

本発明は、抗体と核分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNエース)との間で形成されるイムノコンジュゲートを更に考察する。

腫瘍の選択的破壊のため、抗体は高い放射性の原子を含みうる。放射性コンジュゲート抗TASK抗体の産生のために様々な放射性同位体が利用可能である。例には、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$ 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが診断用に使用される場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば $tc^{99m}$ 又は $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)画像法(磁気共鳴画像法、MRIとしても知られている)のためのスピン標識、例えば再びヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含みうる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である(国際公開第94/11026号)。

## 【0094】

放射性又は他の標識は、既知の方法でコンジュゲート中に導入される。例えば、ペプチドは生合成されうるか、又は水素に代えて例えばフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学アミノ酸合成法により合成されうる。例えば $tc^{99m}$ 又は $I^{123}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 及び $In^{111}$ のような標識は、ペプチドのシステイン残基を介して結合され得る。イットリウム-90はリジン残基を介して結合され得る。IODOGEN法(Frakerら(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)はヨウ素-123の導入に使用することができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)は他の方法を詳細に記載している。

抗体と細胞傷害性薬物のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング「リンカー」試薬、例えばスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラートSMCC、BMPEO、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)(Carlssonら, Biochem. J. 173:723-737 [1978])、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、2,6-ジイソシアネートトルエン)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。

## 【0095】

一側面では、リンカーは、抗体上に存在している求核システイン又はリジンに反応性である求電子基を持つ反応性部位を有している。抗体のシステインチオールはリンカー上の求電子基と反応性であり、リンカーと共有結合を形成する。有用な求電子基には、限定されないが、スクシンイミド、マレイミド及びハロアセトアミド基が含まれる。抗体は、Klissmanら(2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773の766頁のコンジュゲーション法に従って、リンカー試薬又は薬剤-リンカー中間体、求電子官能基、例えばマレイミド又は -ハロカルボニルと反応する。

他の実施態様では、リンカーは、分岐した多官能性リンカー部分を介して抗体に一を越

10

20

30

40

50

える薬剤部分を共有結合させるための樹状タイプのリンカーでありうる (Sunら (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215 ; Sunら (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768 ; King (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990)。樹状リンカーは、抗体に対する薬剤のモル比、つまり負荷を増加させることができ、これはADCの効力に関連する。よって、システイン操作抗体が反応性システインチオール基を一つのみ担持している場合、複数の薬剤部分を樹状リンカーを介して結合させることができる。

#### 【0096】

リンカーは、例えばジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペントペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド又はドデカペプチドユニットのようなアミノ酸残基を含みうる。アミノ酸ユニットを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びに少数のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンが含まれる。リンカーのアミノ酸ユニットは、腫瘍関連プロテアーゼを含む一又は複数の酵素によって酵素的に切断されて、薬剤部分(D)を放出し得、該部分は一実施態様では放出時にインビボでプロトン化されて薬剤(D)をもたらす。有用な $-W_w$ -ユニットは、例えば腫瘍関連プロテアーゼのような特定の酵素による酵素的切断に対するその選択性について設計され最適化され得る。一実施態様では、 $-W_w$ -ユニットは、その切断がカテプシンB、C及びD、又はプラスミンプロテアーゼによって触媒されるものである。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(v c又はv a l - c i t)、アラニン-フェニルアラニン(a f又はa l a - p h e)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(g l y - v a l - c i t)及びグリシン-グリシン-グリシン(g l y - g l y - g l y)が含まれる。

10

20

リンカーはまたp-アミノベンジルカルバモイル(P A B)のような自壊的ユニットを含みうる。

#### 【0097】

他の実施態様では、リンカーは、抗体上に存在している求電子基に反応性である求核基を持つ反応性官能基を有している。抗体上の有用な求電子基には、限定されないが、アルデヒド及びケトンカルボニル基が含まれる。リンカーの求電子基のヘテロ原子は抗体上の求電子基と反応することができ、抗体ユニットと共有結合を形成する。リンカー上の有用な求核基には、限定しないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリアルヒドラジドが含まれる。抗体上の求電子基はリンカーへの結合のために簡便な部位を提供する。

30

他の実施態様では、リンカーは、溶解度又は反応性を調節する基で置換されてもよい。例えば、スルホネート( $-S O_3^-$ )又はアンモニウムのような荷電置換基は試薬の水溶解度を増大させ、ADCの調製に用いられる合成経路に応じて、抗体又は薬剤部分とのリンカー試薬のカップリング反応を容易にし、あるいはAb-L(抗体-リンカー中間体)とD、又はD-L(薬剤-リンカー中間体)とAbのカップリング反応を容易にする。

#### 【0098】

本発明の化合物は、限定するものではないが、リンカー試薬: B M P E O、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ-E M C S、スルホ-G M B S、スルホ-K M U S、スルホ-M B S、スルホ-S I A B、スルホ-S M C C、及びスルホ-S M P B、及びS V S B(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾアート)を用い、ビス-マレイミド試薬: D T M E、B M B、B M D B、B M H、B M O E、B M(P E O)<sub>3</sub>、及びB M(P E O)<sub>4</sub>を含んで調製されるADCを明示的に考慮し、これらは、Pierce Biotechnology社, Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, International +815-968-0747から商業的に入手できる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照のこと。ビス-マレイミド試薬により、連続的な又は同時の形で、チオール含有薬剤部分、標識、又はリンカー中間体へのシステイン操作抗体のチオール基の結合が可能になる。システ

40

50

イン操作抗体、薬剤部分、標識又はリンカー中間体のチオール基と反応性であるマレイミド以外の他の官能基には、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート、及びイソチオシアネートが含まれる。

【0099】

有用なリンカー試薬は、また、他の商業的供給源、例えばMolecular Biosciences社(Boulder, CO)を経由して得ることができ、あるいはTokiら(2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frischら(1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; 米国特許第6214345号; 国際公開第02/088172号; 米国特許出願公開第2003130189号; 同第2003096743号; 国際公開第03/026577号; 国際公開第03/043583号; 及び国際公開第04/032828号に記載された手順に従って合成できる。

式IのADCは、(1)リンカー試薬と抗TASK抗体のシステイン基を反応させて、共有結合を介して抗体-リンカー中間体Ab-Lを形成し、ついで活性化された薬剤部分Dと反応させる; 及び(2)リンカー試薬と薬剤部分の求核基を反応させて、共有結合を介して薬剤-リンカー中間体D-Lを形成し、ついでシステイン操作抗体のシステイン基と反応させることを含む、有機化学反応、条件及び試薬を用いて、幾つかの経路によって調製されうる。コンジュゲーション法(1)及び(2)を、様々なシステイン操作抗体、薬剤部分、及びリンカーと共に用いて、式Iの抗体-薬剤コンジュゲートを調製することができる。

【0100】

抗体システインチオール基は、求核性で、反応して、(i)活性エステル類、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸エステル(ハロホルメート)、及び酸ハロゲン化物; (ii)アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばアロアセトアミド; (iii)アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基; 及び(iv)スルフィド交換を介するピリジルジスルフィドを含むジスルフィドを含むリンカー試薬及び薬剤-リンカー中間体上の求電子基と共有結合を形成することができる。薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、反応してリンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成可能なアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリアルヒドラジド基が含まれる。

あるいは、抗TASK抗体及び細胞傷害性薬物を含む融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成法によって作製することができる。DNAの長さは、互いに隣接するか、又はコンジュゲートの所望の性質を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されたコンジュゲートの二つの部分をコードするそれぞれの領域を含みうるものである。

また他の実施態様では、抗体は、抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与する腫瘍プレタargeティングに使用するために「レセプター」(例えばストレプトアビジン)にコンジュゲートさせることができ、投与後、循環系から除去剤を使用して未結合コンジュゲートを除去し、ついで、細胞傷害性薬物(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートさせられる「リガンド」(例えばアビジン)が投与される。

【0101】

本発明の抗体は、反応性官能基を通して抗体に共有結合され得る任意の標識部分とコンジュゲートされうる(Singhら(2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. 及び Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2版 CRC Press, Boca Raton, FL)。結合された標識は、(i)検出可能なシグナルを提供し; (ii)第二の標識と相互作用して第一又は第二の標識によってもたらされる検出可能なシグナルを改変し、例えばFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)を付与し; (iii)抗原又はリガンドとの相互作用を安定化させ又は結合親和性を増加

させ；(i v) 電荷、疎水性、形状、又は他の物理的パラメータによって、移動度、例えば電気泳動移動度又は細胞透過性に影響を及ぼし、又は(v) 捕獲部分を提供して、リガンド親和性、抗体/抗原結合性、又はイオン性錯体形成するように機能しうる。

#### 【0102】

標識抗体は診断アッセイにおいて、例えば特定の細胞、組織、又は血清中の対象抗原の発現を検出するために有用でありうる。診断用途では、抗体は典型的には検出可能な部分で標識される。一般に次の範疇にグループ分けすることができる数多くの標識を利用できる：

(a) 放射性同位元素(放射性核種)、例えば<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>64</sup>Cu、<sup>68</sup>Ga、<sup>86</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>133</sup>Xe、<sup>177</sup>Lu、<sup>211</sup>At、又は<sup>213</sup>Bi。放射性同位元素標識抗体はレセプターを標的とした画像処理実験において有用である。抗体は、Current Protocols in Immunology, 1及び2巻, Coligenら編 Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs.(1991)に記載された技術を使用して、放射性同位元素金属に結合し、キレートし又は錯体化等する配位子試薬で標識することができ、該試薬はシステインチオール、リジンアミン、又はセリン、スレオニン又はチロシンヒドロキシルのような抗体の反応性求核体と反応性である。金属イオンを錯体化しうるキレート配位子には、DOTA、DTP、DOTMA、DTPA及びTETA(Macrocyclics, Dallas, TX)が含まれる。放射性核種は本発明の抗体-薬剤コンジュゲートとの錯体化を介して標的とされ得る(Wuら(2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146)。

10

20

#### 【0103】

画像処理実験のための抗体標識として適切な金属-キレート錯体は次のものに開示されている：米国特許第5342606号；同第5428155号；同第5316757号；同第5480990号；同第5462725号；同第5428139号；同第5385893号；同第5739294号；同第5750660号；同第5834456号；Hnatowichら(1983) J. Immunol. Methods 65:147-157；Mearesら(1984) Anal. Biochem. 142:68-78；Mirzadehら(1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65；Mearesら(1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26；Izardら(1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350；Nikulaら(1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90；Cameraら(1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62；Kukisら(1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110；Verelら(2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670；Cameraら(1994) J. Nucl. Med. 21:640-646；Rueggら(1990) Cancer Res. 50:4221-4226；Verelら(2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670；Leeら(2001) Cancer Res. 61:4474-4482；Mitchellら(2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112；Kobayashiら(1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111；Miedererら(2004) J. Nucl. Med. 45:129-137；DeNardoら(1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90；Blendら(2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363；Nikulaら(1999) J. Nucl. Med. 40:166-76；Kobayashiら(1998) J. Nucl. Med. 39:829-36；Mardirossianら(1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74；Roselliら(1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

30

#### 【0104】

(b) 蛍光標識、例えば希土類キレート剤(ユーロピウムキレート剤)、FITC、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセインを含むフルオレセインタイプ；TAMRAを含むローダミンタイプ；ダンシル；リサミン；シアニン；フィコエリトリン；テキサスレッド；及びそれらの類似体。蛍光標識は上掲のCurrent Protocols in Immunologyに開示された技術を使用して抗体にコンジュゲートできる。蛍光染料及び蛍光標識試薬には、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR)及びPierce Biotechnology社(Rockford, IL)から市販されているものが含まれる。

40

#### 【0105】

(c) 様々な酵素-基質標識が利用でき又は開示されている(米国特許第4275149号)。酵素は、様々な技術を使用して測定することができる発色基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は基質における色変化を触媒し得、その変化は分光学的に測定可能で

50

ある。あるいは、酵素は基質の蛍光又は化学発光を変化させることもある。蛍光変化を定量する技術は上述した。化学発光基質は化学反応によって電子的に励起され、ついで（例えば化学発光計を用いて）測定可能な光を放出し、又は蛍光受容体にエネルギーを供与する。酵素標識の例は、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4737456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸塩デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ（AP）、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソザイム、糖類オキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、ヘテロ環オキシダーゼ（ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等を含む。酵素を抗体にコンジュゲートさせる技術は、O'Sullivan等(1981), "Methods for Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", Methods in Enzym. (J. Langone及びH. Van Vunakis編) Academic press, New York, 73: 147-166に記載されている。

10

#### 【0106】

酵素-基質の組み合わせの例は、例えば以下を含む：

- (i) 基質として過酸化水素を用いるセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ここで、過酸化水素が染料前駆物質（例えば、オルトフェニレンジアミン（OPD）又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩（TMB））を酸化する；
- (ii) 発色基質としてパラ-ニトロフェニルホスフェートを用いるアルカリホスファターゼ（AP）；
- (iii) 発色基質（例えば、p-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ）又は蛍光発生基質4-メチルウンベリフェリル- $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼを用いる $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ（ $\alpha$ -D-Gal）。

20

数多くの他の酵素-基質の組み合わせが利用可能である。一般的な概説は、米国特許第4275149号及び同第4318980号を参照。

標識は抗体に間接的にコンジュゲートされうる。例えば、抗体にビオチンをコンジュゲートし、上記3つの範疇の標識の任意のものにアビジン又はストレプトアビジンをコンジュゲートし、又はその逆が可能である。ビオチンはストレプトアビジンに選択的に結合し、よってこの間接的な方式で抗体に標識をコンジュゲートさせることができる。あるいは、ポリペプチド変異体との標識の間接的コンジュゲーションを達成するために、ポリペプチド変異体に小さなハプテン（例えばジゴキシン）をコンジュゲートさせ、上記した異なる型の標識を抗ハプテンポリペプチド変異体（例えば抗ジゴキシン抗体）にコンジュゲートさせる。よってポリペプチド変異体との標識の間接的コンジュゲーションが達成できる(Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego)。

30

#### 【0107】

本発明のポリペプチド変異体は任意の既知のアッセイ法、例えばELISA、競合結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイで用いられうる(Zola,(1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc.))。

40

検出標識は、結合又は認識事象を局在化し、可視化し、定量するのに有用でありうる。本発明の標識抗体は細胞表面レセプターを検出することができる。検出可能に標識された抗体の他の用途は、ビーズを蛍光標識抗体とコンジュゲートさせ、リガンドの結合の際の蛍光シグナルを検出することを含むビーズベースの免疫捕捉法である。同様の結合検出法は表面プラズモン共鳴（SPR）効果を利用して抗体-抗原相互作用を測定し検出する。

蛍光染料及び化学発光染料のような検出標識（Briggsら(1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058）は検出可能なシグナルをもたらす、抗体の標識に一般に適用可能であり、次の性質を有している：(i) 標識抗体は、少量の抗体が無細胞及び細胞ベースアッセイの双方において高感度に検出できるように低いバックグラウンド

50

の非常に高いシグナルを作り出すべきであり；( i i ) 標識抗体は、有意な光退色なしに、蛍光シグナルを観察でき、モニターでき、記録できるように光安定であるべきである。膜又は細胞表面、特に生細胞への標識抗体の細胞表面結合を含む用途に対しては、( i i i ) 標識は、有効なコンジュゲート濃度と検出感度を達成すべく良好な水溶解性を有しており、( i v ) 細胞の正常な代謝過程を乱したり早期の細胞死を引き起こしたりしないように生細胞に非毒性である。

#### 【 0 1 0 8 】

本発明の標識抗体は、生物医学及び分子イメージングの様々な方法及び技術、例えば、( i ) M R I ( 磁気共鳴画像法 ) ； ( i i ) M i c r o C T ( コンピューター断層撮影法 ) ； ( i i i ) S P E C T ( 単一光子放射型コンピュータ断層撮影法 ) ； ( i v ) P E T ( ポジトロン放出断層撮影法 ) Chenら(2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49；( v ) バイオルミネセンス；( v i ) 蛍光；及び( v i i ) 超音波による、イメージングバイオマーカー及びプローブとして有用である。免疫シンチグラフィは、放射性物質で標識された抗体が動物又はヒト患者に投与され、抗体が局在化する体の中の部位の写真が撮られる画像処理法である(米国特許第6528624号)。イメージングバイオマーカーは、正常な生物学的過程、病原性過程、又は治療介入に対する薬理的反応の指標として客観的に測定され評価されうる。バイオマーカーには幾つかのタイプがありうる。タイプ0は疾患の自然経過マーカーであり、既知の臨床インデックス、例えば関節リウマチにおける滑膜炎のMRI評価と長期的に相関する；タイプIマーカーは、たとえ機序に臨床的結果が伴わなくとも、作用機序に従って介入の効果を捕捉する；タイプIIマーカーは、サロゲートエンドポイントとして機能し、バイオマーカーの変化又はバイオマーカーからのシグナルが臨床的有用性を予測し、例えばCTによる関節リウマチの測定した骨びらんのような標的の応答を「検証」する。よって、イメージングバイオマーカーは、( i ) 標的タンパク質の発現、( i i ) 標的タンパク質への治療剤の結合、つまり選択性、及び( i i i ) クリアランス及び半減期薬物動態データについて薬力学的(PD)治療上方を提供することができる。研究室ベースのバイオマーカーに対するインビボイメージングバイオマーカーの利点は、非侵襲性の処置、数量化可能、全身評価、反復投薬及び評価、つまり複数時点、及び前臨床(小動物)から臨床(ヒト)結果への潜在的に伝達性の効果を含む。幾つかの応用では、バイオイメージングは前臨床治験における動物実験に取って代わり又はその数を最小にする。

#### 【 0 1 0 9 】

放射性核種イメージング標識には、放射性核種、例えば $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、又は $^{213}\text{Bi}$ が含まれる。放射性核種金属イオンはDOTAのようなキレートリンカーで錯体化され得る。DOTA-マレイミド(4-マレイミドブチラミドベンジル-DOTA)のようなリンカー試薬は、Axworthyら(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807)の手順に従って、イソプロピルクロロホルメート(Aldrich)で活性化された4-マレイミド酪酸(Fluka)とのアミノベンジル-DOTAの反応によって調製することができる。DOTA-マレイミド試薬は抗体の遊離のシステインアミノ酸と反応し、抗体上に金属錯体化配位子をもたらす(Lewisら(1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。DOTA-NHS(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸モノ(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)のようなキレートリンカー標識試薬は市販されている(Macrocylics, Dallas, TX)。放射性核種標識抗体でのレセプター標的の画像化は、腫瘍組織中の抗体の進行性蓄積を検出し定量することにより経路活性化のマーカーを提供しうる(Albertら(1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210)。コンジュゲートした放射-金属はリソソーム分解後に細胞内に残りうる。

ペプチド標識法はよく知られている。Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practica

10

20

30

40

50

I Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer & (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work及びE. Work編) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L.及びNoyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, I及びII巻, CRC Press, New York; Pflleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche編, Walter DeGryter, Berlin and New York; 及びWong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez & (2004) Chem.Eur. J. 10:1149-1155; Lewis & (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li & (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier & (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237を参照のこと。

10

## 【0110】

十分に近接した蛍光レポーターとクエンチャーの二つの部分で標識されたペプチド及びタンパク質は蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を受ける。レポーター基は典型的には、ある波長の光によって励起され、アクセプター又はクエンチャー基にエネルギーを移送する蛍光染料であり、最大明度での発光のために適切なストークスシフトが伴う。蛍光染料には、広がった芳香性を持つ分子、例えばフルオレセイン及びローダミン、及びその誘導体が含まれる。蛍光レポーターはインタクトなペプチド中のクエンチャー部分によって部分的に又は有意にクエンチされうる。ペプチダーゼ又はプロテアーゼによるペプチドの切断の際に、検出可能な蛍光の増加が測定されうる(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

20

本発明の標識抗体は、アフィニティー精製剤として使用することができる。このプロセスでは、標識抗体は、セファデックス樹脂又は濾紙のような固相に固定される。固定化抗体は、精製される抗原を含む生物学的試料に接触させられ、その後、固定化されたポリペプチド変異体に結合した精製される抗原を除いて生物学的試料中の実質的に全ての材料を取り除く適切な溶媒で担体を洗浄する。最後に、担体を、pH 5.0のグリシンバッファーのような別の適切な溶媒で洗浄し、これがポリペプチド変異体から抗原を放出させる。

## 【0111】

標識試薬は、典型的には、(i)標識抗体を形成するために抗体の反応性求核基と直接的に、(ii)リンカー-標識中間体を形成するためにリンカー試薬と、あるいは(iii)標識抗体を形成するためにリンカー抗体と、反応しうる反応性官能基を担持している。標識試薬の反応性官能基には、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル(例えば、NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド)、イソチオシアネート、塩化スルホニル、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、及びホスホラミダイトが含まれるが、他の官能基もまた使用することができる。

30

例示的な反応性官能基は、検出可能な標識、例えばビオチン又は蛍光染料のカルボキシル末端置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)である。標識のNHSESTERは予め形成、単離、精製、及び/又は特徴付けでき、あるいはインサイトで形成され、抗体の求核基と反応させられうる。典型的には、標識のカルボキシル型は、カルボジイミド試薬、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、又はウロニウム試薬、例えばTSTU(O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート)、HBTU(O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、又はHATU(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、アクチベーター、例えば1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、及びN-ヒドロキシスクシンイミドの所定の組合せと反応させて標識のNHSESTERを生じさせて、活性化される。ある場合には、標識と抗体は、標識のインサイト活性化と、抗体との反応で一工程で標識-抗体コンジュゲートを形成することによりカップリングされうる。他の活性化及びカップリング試薬には、TBTU(2

40

50

-(1H-ベンゾトリアゾ-1-イル)-1-1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、TFFH(N,N',N'',N'''-テトラメチルウロニウム2-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート)、PyBOP(ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリシ-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、EEDQ(2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン)、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド); DIPCDI(ジイソプロピルカルボジイミド)、MSNT(1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール、及びアリアルスルホニルハロゲン化合物、例えば塩化トリイソプロピルベンゼンスルホニルが含まれる。

#### 【0112】

##### 11. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗TASK抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含むリポソームは、Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 米国特許第4485045号及び同第4544545号; 及び国際公開第97/38731号に記載された方法により調製することができる。循環時間が増したりリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に含まれる。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照のこと。

#### 【0113】

##### B. TASK結合オリゴペプチド

本発明のTASK結合オリゴペプチドはここで記載されるTASKポリペプチドに特異的に結合するか又はハイブリダイズするオリゴペプチドである。TASK結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製し精製することができる。TASK結合オリゴペプチドは、通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載されるTASKポリペプチドに対して特異的に結合し、又はハイブリダイズし得る。TASK結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなく同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合可能なオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は知られていることを注記する(例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号; PCT公開第84/03506号及び国際公開第84/03564号; Geysenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002(1984); Geysenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182(1985); Geysenら, Synthetic Peptides as Antigens, 130-149(1986); Geysenら, J. I

10

20

30

40

50

mmunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofsら, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwiria, S.E.ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.ら (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.ら (1991) J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。

#### 【0114】

この点において、バクテリオファージ（ファージ）ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラリーを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合することができるライブラリーのメンバーを同定することを可能にする一つによく知られた技術である。ファージディスプレイは、変異体ポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として表示される技術である（Scott, J.K.及びSmith G. P. (1990) Science 249:386）。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体（又はランダムにクローニングされたcDNA）の大きなライブラリーを、標的分子に高い親和性で結合する配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド（Cwiria, S.E.ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378）又はタンパク質（Lowman, H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.ら (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.ら (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363）ライブラリーのディスプレイは、特異的に結合する特性を有するものについて何百万ものポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている（Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668）。ランダム突然変異体のファージライブラリーの分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、及び同第5663143号。

#### 【0115】

殆どのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、ファージディスプレイシステム（国際公開第95/34683号；米国特許第5627024号）、T4ファージディスプレイシステム（Ren, Z.-J.ら (1998) Gene 215:439; Zhu, Z. (1997) CAN 33:534; Jiang, J.ら (1997) can 128:44380; Ren, Z.-J.ら (1997) CAN 127:215644; Ren, Z.-J. (1996) Protein Sci. 5:1833; Efimov, V.P.ら (1995) Virus Genes 10:173）及びT7ファージディスプレイシステム（Smith, G.P.及びScott, J.K. (1993) Methods in Enzymology, 217, 228-257；米国特許第5766905号）も知られている。

現在、基礎的なファージディスプレイ構想の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラリーをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のためのコンビナトリアル反応装置が開発されており（国際公開第98/14277号）、ファージディスプレイライブラリーは二分子相互作用（国際公開第98/20169号；国際公開第98/20159号）及び拘束性ヘリックスペプチドの特性（国際公開第98/20036号）を分析し制御するために使用されている。国際公開第97/35196号は、リガンドが標的分子に結合しうる一の溶液と、親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液にファージディスプレイライブラリーを接触させて、結合リガンドを選択的に単離する親和性リガンドの単離方法を記載している。国際公開第97/46251号は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、ついで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載している。黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）タンパク質Aの親和性タグとしての使用もまた報告されている（Liら, (1998) Mol Biotech., 9:187）。国際公開第97/47314号は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。

ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法は国際公開第97/09446号に記載されている。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第5498538号、同第5432018号、及び国際公開第98/15833号に記載されている。

#### 【0116】

ペプチドライブラリーの作製及びこれらのライブラリーのスクリーニング方法は、米国特許第5723286号、同第5432018号、同第5580717号、同第5427908号、同第5498530号、同第5770434号、同第5734018号、同第5698426号、同第5763192号、及び同第5723323号に記載されている。

TASKペプチドはまた誘導系を通して発現されうる。本発明は誘導性選択可能ベクター系のpHUSH-ProExを提供する。pHUSH-ProExはまた活性なウイルス粒子に収容することができる。pHUSH-ProExの有用性は、それを本発明のTASKオリゴペプチド又はTASKポリペプチドの有用な断片と組合せ、TASKポリペプチド又はその断片が細胞増殖に対して奏する効果を阻害するような形でTASK断片又はTASKオリゴペプチドを発現させることによって、見出すことができる。

#### 【0117】

##### C. TASK結合低分子

TASK結合低分子は、ここに記載されるTASKポリペプチドに特異的に結合し又はハイブリダイズするここに定義されるオリゴペプチド又は抗体以外である。TASK結合低分子は既知の方法（例えばPCT公開第00/00823号及び国際公開第00/39585号を参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。TASK結合低分子は通常は約500ダルトンの大きさであり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトン未満の大きさであり、ここに記載されるTASKポリペプチドに特異的に結合し又はハイブリダイズ可能なこのような低分子は、ポリペプチド標的に結合可能な分子について低分子ライブラリーを検索することにより（国際公開第00/00823号及び国際公開第00/39585号）、過度の実験をすることなく同定されうる。TASK結合低分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバメート、カーボネート、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホネート、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホネート、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアネート、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

#### 【0118】

##### D. 所望の性質を有するTASK結合オリゴペプチド、TASK結合低分子及びTASK RNAiのスクリーニング

TASKポリペプチドに結合する抗体、RNAi及び低分子を作製する技術を、上に記載した。所望される所定の生物学的特性を有する抗体、RNAi又は他の低分子を更に選択しうる。

本発明のRNAi又は他の低分子の増殖阻害効果は、例えば、内因的又はTASK遺伝子によるトランスフェクション後の何れかでTASKポリペプチドを発現する細胞を用いる方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びTASK形質移入細胞は、数日間（例えば、2-7）、種々の濃度の本発明のTASK RNAi又は他の低分子で処理し、クリスタルバイオレット又はMTTで染色し、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方法は、本発明のTASK RNAi又はTASK結合低分子の存在又は非存在下で処理した細胞の<sup>3</sup>H-チミジン取込みを比較することによる。処理後、細胞を収集し、DNAへ取り込まれた放射エネルギーをシンチレ

10

20

30

40

50

ーションカウンターで定量する。適切なポジティブコントロールには、細胞株の増殖を阻害することが知られている増殖阻害抗体で選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの腫瘍細胞の増殖阻害は、様々な方法で決定することができ、例えば腫瘍細胞は、TASKポリペプチドを過剰発現しうる。TASK RNA i又はTASK結合低分子は、未処理腫瘍細胞と比べて約25 - 100%、約30 - 100%、及び約50 - 100%又は70 - 100%のTASK発現腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害しうる。

#### 【0119】

細胞死を誘導するTASK RNA i又はTASK結合低分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム (PI)、トリパンブルー又は7AADの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いをコントロールと比較して評価することができる。PI取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で実施され得る。TASKポリペプチド発現腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切なTASK RNA i又はTASK結合低分子を含む培地でインキュベートする。細胞をおよそ3日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために35mmのストレーナキャップ付き12×75チューブ(チューブ当たり1ml、処理グループ当り3チューブ)に等分する。ついで、チューブへPI(10µg/ml)を入れる。サンプルをFACSCAN(登録商標)フローサイトメータとFACSCONVERT(登録商標)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析することができる。PI取込みによって測定して統計的に有意なレベルの細胞死を誘導するTASK RNA i又はTASK結合低分子は、細胞死誘導TASK RNA i又はTASK結合低分子として選択することができる。

関心のある抗体が結合したTASKポリペプチド上のエピトープに結合するオリゴペプチド又は他の低分子をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane(1988)に記載されているもののような常套的な交差ブロッキングアッセイを実施することができる。試験オリゴペプチド又は他の低分子が既知の抗TASK抗体と同じ部位又はエピトープに結合するかどうかを決定するためにこのアッセイを用いることができる。

#### 【0120】

##### E. 完全長TASKポリペプチド

本発明は、また、本出願でTASKポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に下記の実施例で更に詳細に開示するように、様々なTASKポリペプチドをコードするcDNA(部分及び完全長)が同定され単離された。

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

#### 【0121】

##### F. TASKポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列TASKポリペプチドに加えて、TASKポリペプチド変異体を調製することができると考えられる。TASKポリペプチド変異体は、コード化DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び/又は所望のポリペプチドを合成することによって調製することができる。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのTASKポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうる。

ここに記載したTASKポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第5364934号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針の何れかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列ポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる

10

20

30

40

50

、ポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入でありうる。場合によっては、変異は、T A S Kポリペプチドのドメインの一又は複数における、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、T A S Kポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出されうる。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、つまり保存的アミノ酸置換の結果であるとして行うことができる。挿入又は欠失は、場合によっては約1から5のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に行い、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

10

## 【0122】

T A S Kポリペプチド断片がここで提供される。かかる断片は、例えば完全長天然タンパク質と比較した場合に、N末端又はC末端で切断しているか、又は内部残基を欠いている可能性がある。ある断片は、T A S Kポリペプチドの所望の生物学的活性にとって必修ではないアミノ酸残基を欠く。

T A S Kポリペプチド断片は、多くの一般的技術の任意のものによって調製することができる。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替アプローチ法には、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基で確定した部位でタンパク質を切断することが知られた酵素によってタンパク質を処理することで、又は適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによって、ポリペプチド断片を作製することが含まれる。更に他の適切な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することが含まれる。DNA断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。T A S Kポリペプチド断片は、ここに開示した天然T A S Kポリペプチドと少なくとも一つのアミノ酸残基及び/又は免疫学的活性を共有する。

20

## 【0123】

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の表題で表5に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表5に例示的置換と名前を付け、又は以下にアミノ酸分類を参照して更に記載される、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

30

## 【0124】

表5

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala(A)	val; Leu; ile	val
Arg(R)	lys; gln; asn	lys
Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu(L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu

40

50

Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

## 【 0 1 2 5 】

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

10

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

20

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのような置換残基は、保存的置換部位、又は残りの(非保存)部位に導入されうる。

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

30

## 【 0 1 2 6 】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するためにスキャニングアミノ酸分析を用いることができる。例示的なスキャニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸には、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインが含まれる。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の例示的なスキャニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であり、それは埋もれた位置及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

40

T A S K ポリペプチドの適切なコンフォメーションを維持することに関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐために、一般にセリンと置換されうる。逆に、T A S K ポリペプチドに、その安定性を向上させるためにシステイン結合を加えうる。

## 【 0 1 2 7 】

## G . 抗T A S K 抗体及びT A S K ポリペプチドの修飾

T A S K ポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一つのタイプには、T A S K ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、T A S K ポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応さ

50

せることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えばT A S Kポリペプチドを、T A S K低分子の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用である。通常用いられる架橋剤には、例えば、1, 1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

他の修飾には、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

#### 【0128】

本発明の範囲内に含まれるT A S Kポリペプチドの共有結合的修飾の他のタイプは、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更、つまり、天然配列T A S Kポリペプチドに見出される一又は複数の炭水化物部分を欠失させること(内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、又は化学及び/又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることの何れか)、及び/又は天然配列T A S Kポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を含む。また、修飾には、存在する様々な炭水化物部分の性質及び割合の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化が含まれる。

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。Xがプロリンを除く任意のアミノ酸であるアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンのトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチドにおけるこれらトリペプチド配列の何れかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位を作り出される。O結合グリコシル化とは、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシルリジンも用いるが、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの糖のうちの一つをヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに結合させることを指す。

#### 【0129】

T A S Kポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記のトリペプチド配列(N-結合グリコシル化部位について)の一又は複数を含むようにすることによって簡便に達成される。この改変は、また、元々のT A S Kポリペプチドの配列へ一又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される(O-結合グリコシル化部位について)。T A S Kポリペプチドアミノ酸配列は、DNAレベルでの変化を通して、特に、コドンが所望のアミノ酸へ翻訳されるあらかじめ選択した塩基でのT A S KポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって、随意的に改変されうる。

T A S Kポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。そのような方法は国際公開第87/05330号; 及びAplin及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

T A S Kポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的脱グリコシル化技術(Hakimuddinら, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)及びEdgeら, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981))を含む、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)に記載されているように、様々なエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることによ

10

20

30

40

50

り達成することができる。

【0130】

T A S Kポリペプチドの共有結合的修飾の他のタイプは、ポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール(P E G)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。またポリペプチドは、例えばコアセルベーション法によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル(例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)に、コロイド状薬物送達系(例えば、リボソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンに捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16版, Oslo A. 編(1980)に開示されている。

また、本発明のT A S Kポリペプチドは、その他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合したT A S Kポリペプチドを含むキメラ分子が形成されるように修飾されうる。

【0131】

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

他の実施態様では、キメラ分子はT A S Kポリペプチドと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はI g G分子のF c領域であり得る。例示的な実施態様では、免疫グロブリン融合体は、I g G分子のヒンジ、C H<sub>2</sub>及びC H<sub>3</sub>、又はヒンジ、C H<sub>1</sub>、C H<sub>2</sub>及びC H<sub>3</sub>領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5428130号を参照のこと。

【0132】

H . T A S Kポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、T A S Kポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりT A S Kポリペプチドを生成する方法に関する。他の方法を用いてT A S Kポリペプチドを調製してもよい。例えば、適切なアミノ酸配列、又はその一部分を、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって様々な商業的供給源から生成してもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(フォスター市, カリフォルニア)を用いて、製造者の指示に従って実施してもよい。T A S Kポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的な方法を用いて結合させて所望するT A S Kポリペプチドを生成させてもよい。

## 【 0 1 3 3 】

## 1 . T A S K ポリペプチドをコードする D N A の単離

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

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

10

## 【 0 1 3 4 】

c D N A ライブラリーをスクリーニングするための技術は、疑陽性が最小化されるよう十分な長さであり、十分に明瞭なプローブとしてオリゴヌクレオチド配列を使用することを含む。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内の D N A とのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていてもよい。標識化の方法は、<sup>3 2</sup>P 標識 A T P のような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲の Sambrook らに与えられている。

20

このようなライブラリースクリーニング法において同定される配列は、GenBank のような公共データベース又は他の個人の配列データベースに寄託され利用可能となっている他の周知の配列と比較されアラインメントされ得る。分子の決まった領域内の又は完全長配列にわたっての（アミノ酸又はヌクレオチドレベルの何れかでの）配列同一性は、ここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、c D N A に逆転写されていない m R N A の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrook らに記述されているような一般的なプライマー伸展法を使用して、選択された c D N A 又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られうる。

30

## 【 0 1 3 5 】

## 2 . 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した T A S K ポリペプチド生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、p H 等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler 編 (IRL Press, 1991) 及び 上掲の Sambrook らに見出すことができる。

40

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、C a C l <sub>2</sub>、C a P O <sub>4</sub>、リボソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲の Sambrook らに記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw ら、Gene, 23:315(1983) 及び 1 9 8 9 年 6 月 2 9 日公開の国際公開第 8 9 / 0 5 8 5 9 号に記載されているように、ある種の植物細胞の形質転換に用

50

いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4399216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, *J. Bact.*, 130:946 (1977)及びHsiaoら, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990)及びMansourら, *Nature*, 336:348-352 (1988)を参照。

10

## 【0136】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31446); 大腸菌X1776 (ATCC31537); 大腸菌株W3110 (ATCC27325)及びK5772 (ATCC53635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌 (*E. coli*)、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチリス (*B. subtilis*)及びバチルス・リチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュドモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しうる。例えば、株W3110を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌W3110株1A2; 完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株9E4; 完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'* を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC55244); 完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan'* を有する大腸菌W3110株37D6; 非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4; 及び1990年8月7日発行の米国特許第4946783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が適切である。

20

30

## 【0137】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、TASKポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレビシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行の欧州特許第139383号); クリュイベロミセス宿主 (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4943529号; Fleerら, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイベロミセスラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourtら, *J. Bacteriol.* 154(2): 737-742 [1983])、クリュイベロミセス・フラギリリス (*K. fragilis*) (ATCC12424)、クリュイベロミセス・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC16045)、クリュイベロミセス・ウイケラミイ (*K. wickeramii*) (ATCC24178)、クリュイベロミセス・ワルチイ (*K. waltii*) (ATCC565

40

50

00)、クリユイベロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*) (ATCC 36906; Van den Bergら, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、クリユイベロミセス・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びクリユイベロミセス・マルキシアナス(*K. marxianus*) ; ヤロウイア(*yarrowia*) (欧州特許第402226号); ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第183070号; Sreekrishnaら, *J. Basic Microbiol*, 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマ・レーシア(*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244234号); アカパンカビ (Caseら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日発行の欧州特許第394538号); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリボクラジウム(*Tolyocladium*) (1991年1月10日発行の国際公開第91/00357号); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Ballanceら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburnら, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yeltonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]) が含まれる。メチロトロピック (*Methylotropic*) 酵母はここでは適切であり、これらに限られないが、ハンセヌラ (*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ (*Kloeckera*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス (*Torulopsis*)、及びロドトルラ (*Rhodotorula*) からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982) に記載されている。

10

20

#### 【0138】

グリコシル化TASKポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。非脊椎動物細胞の例には、植物細胞、例えば綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの細胞培養と同様に、ショウジョウバエS2及びヨトウ (*spodoptera*) Sf9等の昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルス株及び変異体、及びヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) (幼虫 (*caterpillar*))、ネッタシマカ (蚊)、ヒトスジシマカ (蚊)、キロショウジョウバエ (ショウジョウバエ)、及びカイコ等の宿主に対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。種々のトランスフェクション用のウイルス株、例えばオートグラフィア・カルフォルニカ (*Autographa californica*) NPVのL-1変異株、カイコNPVのBm-5株が公に入手でき、このようなウイルスは、本発明に係るウイルスとして、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。

30

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

40

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

#### 【0139】

50

### 3. 複製可能なベクターの選択及び使用

T A S K ポリペプチドをコードする核酸(例えば、c D N A 又はゲノム D N A)は、クローニング(D N A の増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、D N A はこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

10

#### 【0140】

T A S K は直接的に組換え手法によって生成されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ポリペプチドの一部でありうる。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p p あるいは熱安定性エンテロトキシン I E リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第 5 0 1 0 1 8 2 号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の欧州特許第 3 6 2 1 7 9 号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開第 9 0 / 1 3 6 4 6 に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

20

#### 【0141】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターを複製可能にする核酸配列を含む。かかる配列は様々な細菌、酵母、及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 からの複製起点は殆どのグラム陰性細菌に適しており、2 μ プラスミド起点は酵母に対して適しており、様々なウイルス起点(S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又は B P V)は哺乳動物細胞にベクターをクローニングするのに有用である。

30

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

#### 【0142】

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

40

発現及びクローニングベクターは、通常、T A S K ポリペプチド-コード化核酸配列に

50

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

#### 【0143】

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

他の酵母プロモーターとしては、増殖条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘導性プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第73657号に更に記載されている。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのTASKポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開の英国特許第2211504号)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

#### 【0144】

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

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

組換え脊椎動物細胞培養でのTASKポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の

10

20

30

40

50

方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, Nature, 293:620-625 (1981); Manteiraら, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第 1 1 7 0 6 0 号 ; 及び欧州特許第 1 1 7 0 5 8 号に記載されている。

#### 【 0 1 4 5 】

##### 4 . 宿主細胞の培養

本発明の T A S K ポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)の F 1 0 (シグマ)、最小必須培地((MEM),シグマ)、R P M I - 1 6 4 0 (シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Hamら, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnesら, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第 4 7 6 7 7 0 4 号 ; 同第 4 6 5 7 8 6 6 号 ; 同第 4 9 2 7 7 6 2 号 ; 同第 4 5 6 0 6 5 5 号 ; 又は同第 5 1 2 2 4 6 9 号 ; 国際公開第 9 0 / 0 3 4 3 0 号 ; 国際公開第 8 7 / 0 0 1 9 5 号 ; 又は米国特許再発行第 3 0 9 8 5 号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び / 又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えば H E P E S )、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン<sup>T M</sup>薬)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものでありうる。

#### 【 0 1 4 6 】

##### 5 . 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び / 又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、一般的なサザンプロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンプロット法 [ Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980) ]、ドットプロット法(DNA分析)、又はインサイトハイブリダイゼーションによって、直接的に試料中で測定することができる。

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

#### 【 0 1 4 7 】

##### 6 . T A S K ポリペプチドの精製

T A S K ポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

T A S K ポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される : すなわち、イオン交換カラムでの分画 ; エタノール沈殿 ; 逆相 H P L C ; シリカ又はカチオン交換樹脂、例えば D E A E によるクロマトグラフィー ; クロマトフォーカシング ; S D S - P A G E ; 硫酸アンモニウム沈殿 ; 例えばセファデックス G - 7 5 を用いるゲル濾過 ; I g G のような汚染物を除くプロテイン A セファロースカラム ; 及び T A S K ポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990) ; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982) に記載された様々なタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製工程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定の T A S K

ポリペプチドの性質に依存する。

【0148】

I. 薬学的製剤

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

10

20

【0149】

ここでの製剤は、また、治療される特定の徴候に対して必要な一つ以上の活性化化合物を含んでいてもよい。例えば、TASK結合オリゴペプチド、TASK RNAi、又はTASK結合低分子に加えて、一つの製剤中に、更なるRNAi、例えばTASK核酸上の異なる領域に結合する第二のTASK RNAi、又は特定の癌の増殖に影響を与える成長因子のような何らかの他の標的に対するものを含めることが望ましい。あるいは、又は更に、該組成物は、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤、及び/又は心臓保護剤を更に含んでもよい。このような分子は、意図する目的にとって有効な量で組み合わせることで適切に存在する。

30

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に捕捉されていてもよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. 編(1980)に開示されている。

40

【0150】

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

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

50

## 【0151】

J . T A S K の診断及び治療、抗 T A S K 抗体、T A S K 結合オリゴペプチド、T A S K s i R N A 及び T A S K 結合低分子での診断及び治療

癌における T A S K 発現を確かめるために、様々な診断アッセイが利用可能である。一実施態様では、T A S K ポリペプチド過剰発現は、免疫組織化学 ( I H C ) によって分析される。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片を I H C アッセイへ供してよく、次の T A S K タンパク質染色強度基準に合致させてもよい：

スコア 0 - 染色が観察されないか、又は膜染色が腫瘍細胞の 1 0 % 未満で観察される

スコア 1 + - わずかに / 弱く認知できる程度の膜染色が腫瘍細胞の 1 0 % を越えて検出される。細胞はそれらの膜の一部のみが染色される。

スコア 2 + - 弱いなしは中程度の完全な膜染色が腫瘍細胞の 1 0 % を越えて観察される。

スコア 3 + - 中程度から強い完全な膜染色が腫瘍細胞の 1 0 % を越えて観察される。

T A S K ポリペプチド発現に関して 0 又は 1 + スコアの腫瘍は、T A S K が過剰発現していないことで特徴付けられうるものであるのに対し、2 + 又は 3 + スコアの腫瘍は T A S K が過剰発現していることで特徴付けられうる。

## 【0152】

あるいは又は付加的に、F I S H アッセイ、例えば I N F O R M (登録商標) (Ventana, Arizona から販売) 又は P A T H V I S I O N (登録商標) (Vysis, Illinois) を、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織で実施して、腫瘍における T A S K 過剰発現の程度 (生じているならば) を測定してもよい。

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

上述のように、本発明の抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド及び低分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド及び低分子は、T A S K ポリペプチドを発現している癌の診断及び病期判定に有用である (例えば、放射性画像法で)。他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団から T A S K 発現細胞を死滅させて除去するために、抗体、オリゴペプチド及び低分子はまた例えば E L I S A 又はウェスタンブロットにおいて、インビトロで T A S K ポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞から T A S K ポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

## 【0153】

現在、癌の病期に応じて、癌の治療は、次の治療法の一又は組合せを含む：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療。抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド、s i R N A 又は低分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望される。本発明の腫瘍を標的とする抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド、s i R N A 及び低分子は、疾患の初期診断時及び再発中において T A S K 発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド、s i R N A 又は低分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成剤、又は放射標識化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び / 又は放射線治療と組み合わせて使用してもよい。抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド又は低分子による治療は、一般的治療の前又は後の何れかに連続させて、他の形態の一般的治療法と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ (登録商標) (ドセタキセル)、タキソール (登録商標) (パクリタキセル)、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した化学療法剤の一又は複数による治療と組合せて、癌患者に抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド又は低分子を投与することができる。特に、パリクタキセルと修飾された誘導体との併用療法が考えられる (例えば、欧州特許第 0 6 0 0

10

20

30

40

50

517号を参照)。抗TASK抗体、オリゴペプチド又は低分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施態様では、抗TASK抗体、オリゴペプチド、siRNA又は低分子は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(PDR)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

【0154】

特定の一実施態様では、細胞傷害性薬物にコンジュゲートさせた抗TASK抗体、オリゴペプチド又は低分子を含有するコンジュゲートを患者に投与する。特定の作用機序によって限定されるものではないが、TASKタンパク質に結合したイムノコンジュゲートは細胞により内部移行し、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性におけるイムノコンジュゲートの治療的効果が向上する。細胞傷害性薬物は、癌細胞内の核酸を標的とするか、又はこれに干渉する。このような細胞傷害性薬物の例は、上述されており、メイトンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼ及びDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

抗TASK抗体、オリゴペプチド、低分子又はその毒素コンジュゲートは、既知の方法、例えばボラス、もしくは所定時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、くも膜下腔内、経口、局所的、又は吸入経路により、ヒトの患者に投与される。抗体、オリゴペプチド又は低分子の静脈内又は皮下投与が例示的な投与経路である。

他の治療計画を抗TASK抗体、オリゴペプチド又は低分子の投与と組合せてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の医薬製剤を使用する同時投与、及び両方(又は全ての)活性剤が同時にその生物学的活性を働かせる時間がある何れかの順での連続投与が含まれる。このような組合せ治療により、結果として相乗的治療効果が生じうる。

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

【0155】

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤のカクテル剤の同時投与を含む、抗TASK抗体(又は抗体群)、オリゴペプチド又は低分子と一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、ブレドニムスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素及びヒドロキシ尿素タキサン(hydroxyureataxanes)(例えばパクリタキセル及びドキシタキセル)及び/又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)にも記載されている。

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

しばしば、心臓保護剤(治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益でありうる。上述した治療方法に加えて、抗体、オリゴペプチド又は低分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び/又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗TASK抗体、オリゴペプチド又は

低分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

【0156】

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、既知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は低分子の適切な用量は、上記のような治療される疾患のタイプ、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は低分子を予防目的で投与するのが治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は低分子に対する応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は低分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。抗体、オリゴペプチド又は低分子は静脈注入又は皮下注射により投与されうる。疾患のタイプ及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入の何れであれ、体重 1 kg 当たり約 1  $\mu$ g から 50 mg (例えば 0.1 - 1.5 mg / kg / 用量)の抗体を患者への最初の候補投与量とすることができる。投薬計画は、約 4 mg / kg の初期負荷量、続いて1週間に約 2 mg / kg の維持用量の抗 T A S K 抗体を投与することを含むことができる。しかしながら、他の投薬計画も有用であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約 1  $\mu$ g / kg から 100 mg / kg あるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで治療を維持する。この治療の進行状態は、一般的な方法及びアッセイ及び医療ベースの基準によって容易にモニターできる。

10

抗体タンパク質の患者への投与の他に、本出願は遺伝子治療による抗体の投与を考察する。抗体をコードする核酸の投与は「治療的有効量の抗体を投与する」という表現に包含される。例えば、細胞内抗体の生成のための遺伝子療法の使用に関する 1996年3月14日に公開された国際公開第 96 / 07321号を参照のこと。

20

【0157】

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

30

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

40

【0158】

本抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド及び低分子は、哺乳動物における T A S K 発現癌の治療又は一又は複数の癌の徴候の緩和に有用である。このような癌には、前立腺癌、尿道癌、肺癌、乳癌、大腸癌及び卵巣癌、特に前立腺癌腫(prostate adenocarcinoma)、腎細胞癌腫、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺細胞の扁平癌腫、及び胸膜中皮腫が含まれる。癌には、上述したものの何れかの転移性癌が含まれる。抗体、オリゴペプチド又は低分子は、哺乳動物において T A S K ポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。例示的な実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は低分子は、インビボ又はインピトロで細胞の T A S K ポリペプチドに結合して、T A S K 発現腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の増殖を阻害するのに効果的である。このような抗体

50

には、裸の抗 T A S K 抗体(いかなる薬剤にもコンジュゲートしていない)が含まれる。細胞傷害性又は細胞増殖阻害性を有する裸の抗体は、細胞傷害性薬物と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞傷害性薬物と抗体をコンジュゲートさせ、以下に記載するようなイムノコンジュゲートを形成させることによって、細胞傷害性を抗 T A S K 抗体に付与することができる。この細胞傷害性薬物又は増殖阻害剤は、低分子、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、又はそれらの類似体又は誘導體でありうる。

#### 【 0 1 5 9 】

本発明は、本発明の抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド、s i R N A 又は低分子と担体を含有する組成物を含む。癌の治療の目的のために、組成物はそのような治療を必要とする患者に投与することができ、ここで組成物はイムノコンジュゲート又は裸の抗体として存在する一又は複数の抗 T A S K 抗体を含有し得る。更なる実施態様では、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含む細胞傷害性薬物又は増殖阻害剤とこれらの抗体、オリゴペプチド又は低分子を組合せて含有することもできる。また本発明は、本発明の抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド又は低分子と担体を含有する製剤も提供する。一実施態様では、製剤は製薬的に許容可能な担体を含有する治療用製剤である。

本発明の他の側面は、抗 T A S K 抗体をコードする単離された核酸分子である。H鎖及びL鎖の双方、特に高頻度可変領域残基をコードする核酸、天然配列抗体をコードする鎖、並びに該抗体の変異体、修飾体及びヒト化形態が包含される。

本発明はまた抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド又は低分子の治療的有効量を哺乳動物に投与することを含む哺乳動物における T A S K ポリペプチド発現癌の治療又は癌の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は低分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(急性)又は慢性的に、又は間欠的に投与することができる。また、T A S K ポリペプチド発現細胞の増殖を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

#### 【 0 1 6 0 】

##### L. 製造品及びキット

本発明は少なくとも一の抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド、s i R N A 又は低分子を含むキット及び製造品も提供する。抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド、s i R N A 又は低分子を含むキットは、例えば T A S K 細胞殺傷アッセイ、細胞からの T A S K ポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、T A S K の単離及び精製のためには、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗 T A S K 抗体、オリゴペプチド又は低分子を含むことができる。例えば E L I S A 又はウエスタンブロットにおけるインビトロでの T A S K の検出及び定量化のために、抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は低分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されうる。

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

#### 【 0 1 6 1 】

様々な目的、例えばT A S K発現細胞殺傷アッセイ、細胞からのT A S Kポリペプチドの精製又は免疫沈降に有用なキットも提供される。T A S Kポリペプチドの単離及び精製において、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗T A S K抗体、オリゴペプチド、s i R N A又は低分子を含むことが可能である。例えばE L I S A又はウエスタンブロットにおけるインビトロでのT A S Kポリペプチドの検出及び定量化のために抗体、オリゴペプチド又は低分子を含むキットを提供することもできる。製造品と同様、キットも容器と容器上に付与又は付随されるラベル又はパッケージ挿入物を含んでなる。容器には少なくとも一つの本発明の抗T A S K抗体、オリゴペプチド又は低分子を含有する組成物が収容されている。希釈液及びバッファー、コントロール抗体等を収容する付加的な容器を含めてもよい。ラベル又パッケージ挿入物は、組成物についての記載、並びに意図するインビトロ又は診断での使用に関する指示書を提供しうる。

10

## 【0162】

M. T A S Kポリペプチド及びT A S K-ポリペプチドコード核酸の用途

T A S Kポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(又はそれらの相補鎖)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスR N A、s i R N A及びD N Aプローブの生成において、様々な用途を有している。またT A S Kコード核酸は、ここに記載される組換え技術によるT A S Kポリペプチドの調製に有用であり、そのT A S Kポリペプチドは、例えばここで記載の抗T A S K抗体の調製における用途を見出しうる。

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

20

30

## 【0163】

T A S Kコード化核酸の他の有用な断片には、標的T A S K m R N A(センス)又はT A S K D N A(アンチセンス)配列に結合可能な一本鎖核酸配列(R N A又はD N Aの何れか)を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明に係るアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、T A S K D N Aのコード領域の断片を含む。そのような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、又は約14から30のヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするc D N A配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen(Cancer Res. 48:2659, 1988)及びvan der Krolら(BioTechniques 6:958, 1988)に記載されている。

40

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらし、それが、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本

50

発明に包含される。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T A S Kタンパク質の発現を阻止するのに用いられ得、そのT A S Kタンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖 - ホスホジエステル骨格（又は他の糖結合、例えば国際公開第 9 1 / 0 6 6 2 9 に記載のもの）を有するオリゴヌクレオチドを更に含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インピボで安定であるが（つまり、酵素分解に耐えうるが）、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【 0 1 6 4 】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開第 9 0 / 1 0 0 4 8 に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。更にまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO<sub>4</sub> 媒介DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子導入法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子導入ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入されうる。一手順では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インピボ又はエキソピボの何れかで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。適切なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2 (M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター（国際公開第 9 0 / 1 3 6 4 1 号参照）を含む。

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開第 9 1 / 0 4 7 5 3 号に記載されているように、リガンド結合分子とのコンジュゲートの形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子には、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドが含まれる。リガンド結合分子のコンジュゲーションは、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合するか、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲート体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

【 0 1 6 5 】

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開第 9 0 / 1 0 4 4 8 号に記載されたように、オリゴヌクレオチド - 脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、内因性リパーゼにより細胞内で分解されうる。

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は、一般には少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、8

10

20

30

40

50

90、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

#### 【0166】

あるいは、二本鎖RNAを作製することができる。30ヌクレオチド長以下の二本鎖RNAは細胞に導入したときに特定の遺伝子の発現を阻害する。この機序はRNA媒介干渉(RNAi)として知られ、試薬として使用される低分子(30ヌクレオチド以下)RNAはsiRNAとして知られている。TASK干渉RNAは既知の方法(Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12(2003)、国際公開第2003056012号及び国際公開第2003064621号)を使用して同定することができ、合成されうる。siRNAは、

10

標的遺伝子の発現の減少が症状又は疾患を軽減する症状において遺伝子発現量を減少させるのに有用である。

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

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

20

#### 【0167】

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

30

#### 【0168】

また、TASK又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物の何れかを産生することに使用でき、これらについて治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施態様では、TASKをコードするcDNAは、TASKをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、TASKをコードするゲノムDNAをクローニングするために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を産生する方法は、例えば米国特許第4736866号や第4870009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのTASK導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたTASKをコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はTASKをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物

40

50

として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療介入の可能性が示される。

【0169】

あるいは、T A S Kの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたT A S Kをコードする変更ゲノムDNAと、T A S Kをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、T A S Kをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するT A S K「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、T A S KをコードするcDNAは、確立された技術に従い、T A S KをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。T A S KをコードするゲノムDNAの一部を欠失させたり、組み込みをモニターするために使用する選べるマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターには無変更のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)の数キロベースが含まれる[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照]。ベクターを胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Liら, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152を参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間において「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、例えばT A S Kポリペプチドの欠乏によるある種の病理学的状態及びその病理学的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられうる。

10

20

30

40

50

【0170】

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

【0171】

生存可能な細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。該技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技術は、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。例示的なインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リボソーム媒介トランスフェクションである(Dzauら, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤と共に提供するのが望ましい。リボソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及びノ

又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wuら, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414(1990)によって記述されている。遺伝子マーキング及び遺伝子治療のプロトコルの概説については、Andersonら, Science 256, 808-813 (1992)を参照。

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

#### 【0172】

また、本発明のT A S Kポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングの診断に使用でき、本発明のT A S Kポリペプチドは、他の組織と比較して一つの組織で差次的に発現し、例えば同じ型の正常組織と比較して疾患組織において発現する。T A S K核酸分子には、P C R、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のためのプローブ作製のための用途が見出されるであろう。

この発明は、T A S Kポリペプチド(アゴニスト)を模倣し、又はT A S Kポリペプチド(アンタゴニスト)の効果を防ぐものを同定するための化合物をスクリーニングする方法を含む。アンタゴニスト薬候補に関するスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされたT A S Kポリペプチドと結合又は複合化し、さもなければコードされているポリペプチドと他の細胞タンパク質の相互作用を妨害する化合物、例えば、細胞からのT A S Kポリペプチドの発現を阻害するものを含む化合物を同定するように設計される。そのようなスクリーニングアッセイには、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイが含まれ、それらアッセイを特に低分子薬剤候補の同定に適したものにす。

該アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、及び細胞ベースアッセイを含む様々な形式で行うことができる。

アンタゴニストのための全てのアッセイは、薬候補をここで同定された核酸によってコードされているT A S Kポリペプチドと、これら二成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間にわたって接触させることを必要とする点で共通である。

#### 【0173】

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

#### 【0174】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子によってコードされる特定のT A S Kポリペプチドと結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。更に、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)に開示されているよ

10

20

30

40

50

うにして、Fields及び共同研究者等(Fiels及びSong, Nature(London), 340, :245-246(1989); Chienら, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991))に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。前記文献に記載された酵母菌発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-1lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

10

## 【0175】

ここで同定されたTASKポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞内又は細胞外成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で調製される。候補化合物の結合阻害能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。更に、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールとしてもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合(複合体形成)は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなくコントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

20

アンタゴニストを検定するために、TASKポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物と共に細胞に添加してもよく、TASKポリペプチドの存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がTASKポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、TASKポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合TASKポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。TASKポリペプチドは、放射性等で標識でき、レセプターに結合したTASKポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。発現クロニングが用いられ、そこではポリアデニル化RNAがTASKポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリーがプールに分配され、COS細胞又は他のTASKポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラス上で増殖させた形質移入細胞を、標識したTASKポリペプチドへ曝露する。TASKポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ解析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

30

40

## 【0176】

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

50

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

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

10

#### 【 0 1 7 7 】

他の潜在的な T A S K ポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンス R N A 又は D N A 作成物であり、例えば、アンチセンス R N A 又は D N A 分子は、標的 m R N A にハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することにより m R N A の翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンス D N A 又は R N A を通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法は共に、ポリヌクレオチドの D N A 又は R N A への結合に基づく。例えば、ここでの成熟 T A S K ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の 5'コード化部分は、約 10 から 40 塩基対長のアンチセンス R N A オリゴヌクレオチドの設計に使用される。D N A オリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(三重螺旋 - Leeら, Nucl, Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooneyら, Science, 241: 456 (1988); Dervanら, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それにより T A S K ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンス R N A オリゴヌクレオチドはインピボで m R N A にハイブリッド形成して m R N A 分子の T A S K ポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。また上述のオリゴヌクレオチドは、細胞に送達され、アンチセンス R N A 又は D N A をインピボで発現させて、T A S K ポリペプチドの産生を阻害することもできる。アンチセンス D N A が用いられる場合、オリゴデオキシリボヌクレオチドは、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の - 10 から + 10 位置の間の翻訳開始部位から誘導されうる。

20

30

#### 【 0 1 7 8 】

潜在的アンタゴニストは、T A S K ポリペプチドの活性部位、又は他の関連結合部位に結合し、それにより T A S K ポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する低分子を含む。低分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

T A S K 過剰発現又は増幅は、インピボ診断アッセイを使用し、例えば検出される分子に結合し検出可能な標識(例えば放射性同位体又は蛍光標識)でタグが付けられている分子(例えば R N A i、オリゴペプチド又は低分子)を投与し、標識の局在化について患者を外部からスキャンングすることによって、評価することができる。

上述のように、本発明の R N A i 及び低分子は様々な治療的用途を有している。本発明の R N A i 及び低分子は T A S K ポリペプチド発現癌の診断及び病期判定(例えば放射性画像法)に対して有用でありうる。オリゴペプチド及び低分子は、他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団から T A S K 発現細胞を死滅させて除去するために、例えば E L I S A 又はウェスタンブロットにおいて、インピボで T A S K ポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞から T A S K ポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

40

#### 【 0 1 7 9 】

現在、癌の病期に応じて、癌の治療は、次の治療法の一又は組合せを含む：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療。R N A i 又は低分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用

50

性に限界がある転移性疾患において所望される。本発明の腫瘍を標的とするRNAi及び低分子は、疾患の初期診断時及び再発中においてTASK発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、RNAi又は低分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成剤、又は放射標識化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び/又は放射線治療と組み合わせて使用してもよい。RNAi又は低分子による治療は、一般的治療の前又は後の何れかに連続させて、他の形態の一般的治療法と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パクリタキセル)、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した化学療法剤の一又は複数による治療と組合せて、癌患者にRNAi又は低分子を投与することができる。特に、パクリタキセルと修飾された誘導体との併用療法が考えられる(例えば、欧州特許第0600517号を参照)。RNAi又は低分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施態様では、RNAi又は低分子は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(PDR)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

10

単離されたTASKポリペプチドコード核酸は、ここに記載されているものを含む様々な技術を用いて、組換え的にTASKポリペプチドを生成するために、ここで用いることが可能である。次に、生成されたTASKポリペプチドは、そのような技術を用いて、抗TASK抗体を生成するために用いることができる。

20

#### 【0180】

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

TASKポリペプチドは内部移行細胞内抗体でありうる。しかしながら、リポフェクション又はリポソームはまた抗体、又は抗体断片を細胞に送達するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が使用されうる。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子を設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び/又は組換えDNA技術によって産生できる。例えば、Marascoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)を参照。

30

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に一つの活性化化合物、例えば互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞傷害性薬物、サイトカイン、化学療法剤、又は増殖阻害剤のようなその機能を高める薬剤を含んでもよい。このような分子は、適切には、意図する目的に有効な量で組合わせて存在する。

#### 【0181】

以下の実施例は例示目的のためのみに提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

40

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

#### 【0182】

(実施例)

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

#### 【0183】

50

### 実施例 1 : T A S K 1 2 1 活性化

T A S K 1 2 1 活性化にตอบสนองして特異的に調節され、完全な分裂促進刺激の結果としてではない遺伝子を同定するために、T A S K 1 2 1 を、過去に記載されたエストロゲンレセプター ( E R ) 融合タンパク質系 ( Samuelsら, Mol Cell Biol 13:6241-52 (1993)) を使用して条件的に活性化した。野生型及び発癌性ヒト T A S K 1 2 1 (それぞれ D T A S K 1 2 1 及び D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> と命名) の触媒ドメインを、G 5 2 5 R 変異が内因性エストロゲンから合成アンタゴニスト 4 - ヒドロキシタモキシフェン ( 4 O H T ) ( Danielianら, Mol Endocrinol 7:232-40 (1993)) へ応答性を切り替えるマウス E R ホルモン結合ドメインの変異体に融合させた。T A S K 1 2 1 融合タンパク質は構成的に発現されるが、4 O H の不在下で不活性なコンフォメーションで維持される。D T A S K 1 2 1 - E R、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 又は空ベクターを発現する N I H 3 T 3 細胞をレトロウイルス感染によって誘導し、幾つかの独立したクローンを、クローン選択バイアスに対して確実にするために特徴付けた。T A S K 1 2 1 キナーゼ活性を誘導するための有効用量を決定するために、D T A S K 1 2 1 - E R 及び D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> E R 細胞を最少培地中で培養し、0 - 2 0 0 0 n M の 4 O H T で 2 4 時間、刺激した。図 7 は、4 O H T を用いた処理による D T A S K 1 2 1 - E R 及び D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R の活性化を示す。図 7 A は、4 O H T 刺激に対する D T A S K 1 2 1 - E R 及び D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 細胞の用量応答性を示す。N I H 3 T 3 D T A S K 1 2 1 - E R 及び D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 細胞は 8 0 % の集密度になるまで増殖させ、0 . 5 % の F B S、0 . 5 m g / m l のウシ血清アルブミン及びインスリン-トランスフェリン-セレニウム ( I T S - X ) 補填を含む最少培地で一晚培養した後、示した 4 - ヒドロキシタモキシフェン ( 4 O H T ) 濃度で 2 4 時間処理した。D T A S K 1 2 1 - E R 及び D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R キメラタンパク質の蓄積と対応する E R K 1 / 2 リン酸化を免疫プロットによって検出した。T A S K 1 2 1 媒介シグナル伝達は、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 及び D T A S K 1 2 1 - E R それぞれに対して 1 0 及び 1 0 0 n M の 4 O H T で最大であった。これは、下流シグナル制御にตอบสนองした D T A S K 1 2 1 - E R タンパク質の選択的安定化と高まった D T A S K 1 2 1 - E R m R N A の発現の双方の結果であると思われる ( Samuelsら, Mol Cell Biol 13:6241-52 (1993))。E R K 1 / 2 リン酸化の比較から、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R タンパク質は、該細胞系における E R K 経路の活性化について、野生型 D T A S K 1 2 1 - E R タンパク質よりもおよそ 1 0 倍強力であることが明らかになった。

#### 【 0 1 8 4 】

図 7 B は T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> の誘導の際の 3 T 3 細胞の形態変換を示している。4 O H T が無い場合は、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 細胞は親細胞のものと同様の平坦な非転換形態を示した。4 O H T で D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 細胞を処理すると、細胞性形質転換を示す紡錘状の表現型が生じた。D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 細胞はまた D T A S K 1 2 1 - E R 細胞に対して増加した形態変化及び発癌能を示し、2 0 0 n M の 4 O H T の添加は D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 細胞に対して 2 4 時間以内に屈折性及び紡錘状の表現型を生じた ( 図 7 B )。

T A S K 1 2 1 は多くの成長因子及びインテグリンからのシグナルを核に伝達して遺伝子転写を調節すると考えられる。従って、最少培地で培養され、未処理又は 5 0 n M の 4 O H T で 2 4 時間処理されて T A S K 1 2 1 キメラタンパク質を活性化させた無活動の D T A S K 1 2 1 - E R、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 及びコントロール細胞からの遺伝子発現プロファイルを、全ゲノムオリゴヌクレオチドマイクロアレイ (例えば Affymetrix 社製) を使用して調べた。分散分析 ( A N O V A ) を実施して、処理にわたってプロブセットの各々に対する発現と付随する可変性を推定した。タモキシフェンの効果を除外するために、5 0 n M の 4 O H T で処理したベクター感染 3 T 3 細胞の R N A をコントロール実験として比較した。全部で 4 5 1 0 1 のプロブセットのうち、3 1 7 6 プロブが、D T A S K 1 2 1 - E R 及び D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R 細胞株の双方で 4 O H T 処理時に差次的発現を示したが、コントロール感染細胞では示さなかった。スクリーニン

10

20

30

40

50

グで同定される無数の遺伝子が、R A F - M E K - R K 1 / 2 シグナル伝達の最初期転写標的として確立されている (Schulze, Genes Dev 15:981-94 (2001)), (Schulzeら, Mol Biol Cell 15:3450-63 (2004))。まとめると、これらの実験は、T A S K 1 2 1 が発癌の潜在性を有しており、他の遺伝子の転写に影響を及ぼし得ることを示している。

#### 【 0 1 8 5 】

実施例 2 : 発癌性 T A S K による遺伝子のディファレンシャル発現

T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> に応答して差次的に発現した遺伝子の優先順位を付けるために、ジーンオントロジーコンソーシアム(Harrisら, Nucleic Acids Res 32:D258-61 (2004))によって提供された情報を使用してオントロジーを割り当てた。T A S K 1 2 1 シグナル伝達に関連する細胞活性の成分であるか、細胞形質転換及び腫瘍形成に寄与することが知られている遺伝子に焦点を当てた。例えば、R A F - M E K - E R K 1 / 2 経路に対するポジティブフィードバックシグナル伝達は、上皮増殖因子(E G F)ファミリーリガンドの転写におけるT A S K 1 2 1 依存的増加によって強調された。発現変化は、リアルタイム定量P C R (q P C R) によって確認したところ、 $\alpha$ -セルリン(B T C)、エピレグジュリン(E R G)及びヘパリン結合E G F(H B - E G F)に対しておよそ30 - 200倍であった。E G Fファミリーリガンドとは異なり、脳由来神経栄養因子(B D N F)の転写において、T A S K 1 2 1 活性に応答して、10倍の増加が観察された。感覚及び運動ニューロンがB D N F 誘導生存シグナルに応答するのに機能的T A S K 1 2 1 が必要とされるT A S K 1 2 1 欠損マウス胎仔のニューロン表現型が与えられると、この転写フィードバック機構はT A S K 1 2 1 媒介ニューロン生存ために重要である(Wieseら, Nat Neurosci 4:137-42 (2001))。セマフォリン7 a 及びスリット2の発現が初めて実証された。これらの遺伝子は、体細胞遊走の案内と、腫瘍誘導血管形成の促進の双方において機能する細胞外タンパク質ファミリーのメンバーであり、T A S K 1 2 1 活性の増加に応答して高まる(Klagsbrunら, Cytokine Growth Factor Rev 16:535-48 (2005))。更に、インターロイキン(I L)ファミリーに属する遺伝子は、多面発現性サイトカインI L - 1 1 及びI L - 1 8 それぞれに対するT A S K 1 2 1 シグナル伝達によってポジティブ及びネガティブの双方に調節され、T A S K 1 2 1 に対する免疫調節性機能を実証している。活性化されたマクロファージ、クッパー細胞、樹状細胞、ランゲルハンス細胞及びB細胞によるその分泌に加えて、I L - 1 8 はまた皮膚の上皮細胞、胃腸管、及び気道によっても産生される(Lebel-Binayら, Eur Cytokine Netw 11:15-26 (2000))。従って、I L - 1 8 は腫瘍発達に対する宿主の免疫防御に関連している。よって、I L - 1 8 の生産を制限することによって、発癌性T A S K 1 2 1 が宿主免疫系の回避を介して腫瘍増殖の開始と維持を促進しうる。

#### 【 0 1 8 6 】

免疫、炎症及びアポトーシスを含む多くのプロセスを制御する転写因子である核因子-k B (NF-kB)の活性化を調節するシグナル伝達カスケードの成分をコードする遺伝子の発現に変化があった。この裏付けとして、TASK121<sup>V600E</sup>変異体は、N I H 3 T 3 細胞においてI K K 依存的形式でN F -  $\kappa$  B を活性化することが過去に示されている(Ikenoueら, Cancer Res 63:8132-7 (2003))。発現解析は、T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> の誘導がC A R D 1 0 (カスパーゼ動員ドメイン-10) / C A R M A 3 の15倍の増加を生じたことを実証している。CARD10は、I $\kappa$ Bキナーゼ- (IKK )の上流で機能するNF-kBカスケードの成分であるB C L 1 0 を通してNF-kBを活性化することが知られている(Wangら, J Biol Chem 276:21405-9 (2001), Zhouら, Nature 427:167-71 (2004))。BCL10発現自体は、またこの系において TASK121<sup>V600E</sup> シグナル伝達によって2.1倍上方制御された。これらの結果は、T A S K 1 2 1 によるNF-kB活性化の機序を更に定める。

Apo2L/TRAIL (Apo2リガンド/腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド)に結合し、アポトーシスの誘導を防止するD c R 1 及びD c R 2 「デコイ」レセプターの発現は、T A S K 1 2 1 誘導の際にまた高まった。比較すると、構造的に関連する遺伝子のオステオプロテジェリン(O P G)の転写はB R A F 活性によっては影響を受けないことが示された。正常な細胞はデコイレセプターを発現するが、癌細胞は通常は発現せず、大きなパネ

ルの培養メラノーマ細胞では、デコイレセプターの mRNA 及びタンパク質がしばしば検出された(Herseyら, Nat Rev Cancer 1:142-50 (2001))。従って、デコイレセプター発現の刺激において、T A S K 1 2 1 は A p o 2 L 媒介アポトーシスに対するメラノーマのよく記載された耐性に寄与しうる(Herseyら, Nat Rev Cancer 1:142-50 (2001))。

#### 【 0 1 8 7 】

標準的なマイクロアレイ解析法から明らかではない T A S K 1 2 1 生物学の重要な面を明らかにするために、T A S K 1 2 1 シグナル伝達のゲノムワイド転写プロファイルを、タンパク質-タンパク質相互作用を含む他のタイプのゲノムデータについて調べた(Rhodesら, Nat Genet 37 Suppl:S31-7 (2005), (Calvanoら, Nature 437:1032-7 (2005))。D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup>: E R 活性化の際に2倍以上のディファレンシャル発現を示すアフメトリックスプローブ(0.01 - 713.66倍変化範囲を表す)を、Ingenuity Pathway Analysis ツールを使用して解析した。343の遺伝子は分子ネットワークを作るのに適格であり、13のモジュールにマッピングした。T A S K 1 2 1 応答モジュールの例には、J U N 及び F B J マウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子相同性(F O S) 転写因子ファミリーを含むアクチベータープロテイン-1(A P - 1) シグナル伝達ネットワーク、筋細胞分化を阻害し筋形成を拘束する筋原性因子3(M Y O D) の阻害、骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ(M Y C) 調節及びエフェクタータンパク質の協調したアップレギュレーション、及びタンパク質異化反応を増強するプロテアソーム(P S M) 複合体成分の発現の増加が含まれる。これらのT A S K 1 2 1 関連機能モジュールはまた癌(76遺伝子)及び生殖系(34遺伝子)、結合組織(29遺伝子)、神経系(26遺伝子)及び血液系(20)の疾患を含むヒトの疾患に伴う数多くの遺伝子産物を含む。従って、T A S K 1 2 1 シグナル伝達は、疾患表現型に至るネットワーク機能不全の特定の側面に対して重要である。まとめると、これらのネットワーク解析はT A S K 1 2 1 とその標的の我々の理解を更に深め、様々な生物学的過程においてT A S K 1 2 1 の役割をもたらす。

#### 【 0 1 8 8 】

実施例3: T A S K 1 2 2 は T A S K 1 2 1 シグナル伝達のための標的である。

マイクロアレイ遺伝子発現データセットは、非定型 M A P K、細胞外シグナル調節キナーゼ-3 T A S K 1 2 2 (配列番号3及び4)のアップレギュレーションを示している。正規化したマイクロアレイシグナル強度で定量した場合、T A S K 1 2 2 mRNA レベルは、未処理又はコントロール細胞と比較し発癌 T A S K 1 2 1 活性にตอบสนองして大幅に上昇した(~10倍)(図10)。全体が援用される Hoeflichら(2006) Intl. Jour. of Oncology 29:839-849を参照のこと。これらの結果を更に定量するために、mRNA の発現の T A S K 1 2 2 誘導を、定量的 P C R を使用し、コントロール R P L 1 9 転写物に対して T A S K 1 2 2 の比を比較することによって調べた(図8A)。T A S K 1 2 2 mRNA の誘導は、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup>-E R による活性化にตอบสนองして最も強かったが、野生型 D T A S K 1 2 1-E R もまた96時間で T A S K 1 2 2 の転写を有意に増加させた。T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup>と野生型 T A S K 1 2 1 による T A S K 1 2 2 の誘導の動態の差は、T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup>に伴うキナーゼ活性の上昇に反映されている。T A S K 1 2 2 mRNA の発現の上昇もまたタンパク質レベルで明らかであった(図8B)。集密的以下の D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup>-E R 及びコントロール細胞を、エタノール又はエタノール中の50nMの4OHTに2-5日間さらし、可溶化液を免疫プロット法で分析した。細胞を、50mMのT R I S、pH7.4、150mMのNaCl、1mMのE D T A、1%のB r i j - 3 5、0.1%のデオキシコール酸塩、プロテアーゼ阻害薬(Roche Molecular Biochemicals)及びホスファターゼ阻害薬カクテル(Sigma)を含む改変 R I P A バッファーに溶解させた。S D S - P A G E (4-12%ゲル)を使用して可溶化液中のタンパク質を分離した。電気泳動後、タンパク質をフッ化ポリビニリデン微孔性メンブレンに電氣的に転写し、標準的な手順を使用して免疫検出した。

免疫プロットは、内因性 T A S K 1 2 2 の基底の発現が3T3細胞では検出できず、T A S K 1 2 2 タンパク質レベルの増加が、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup>-E R 誘導後に観察され、4日で最大に達したことを示している(図8B)。T A S K 1 2 2 の存在量は、

下流の E R K 1 / 2 キナーゼのリン酸化と相関していた。R A F アイソフォーム間の生物学的かつ生化学的差異がこのタモキシフェン誘導系を使用して同定されたので、野生型 T A S K 1 2 1、T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> 及び R A F 1 を、T A S K 1 2 2 の発現を増加させるその能力について評価した (図 8 C) (Pritchardら, Mol Cell Biol 15:6430-42 (1995))。

#### 【 0 1 8 9 】

D T A S K 1 2 1 - E R (図 8 C、レーン 2 及び 3)、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R (図 8 C、レーン 5 及び 6) 及び D R A F 1 - E R (図 8 C、レーン 8 及び 9) の活性化は、T A S K 1 2 2 の蓄積を促進し、E R K 1 / 2 のリン酸化を高めた。触媒活性及び E R K 1 / 2 への下流シグナル伝達の差異は、T A S K 1 2 2 を誘導するこれらのキナーゼの相対能力に反映されていた。まとめると、これらの結果は、構成的 T A S K 1 2 1 シグナル伝達及び E R K 1 / 2 の活性化は、コントロール細胞と比較した場合、T A S K 1 2 2 の転写とタンパク質レベルの劇的な上昇を生じていることを示している。

T A S K 1 2 2 は迅速にユビキチン依存性分解 (Coulombeら, Mol Cell Biol 23:4542-58 (2003)) の標的にされるので、細胞株における T A S K 1 2 2 の T A S K 1 2 1 媒介蓄積へのこの機構の寄与の解析を実施した。内因性 T A S K 1 2 2 の半減期を、B A Y 4 3 - 9 0 0 6 での D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> - E R の薬理的な阻害後に測定した (Wilhelmら, Cancer Res 64:7099-109 (2004))。10 μM の B A Y 4 3 - 9 0 0 6 での処理は E R K 1 / 2 のリン酸化を迅速かつ強力に消失させることが分かった (図 8 D、上パネル)。これらの条件下では全 E R K 1 / 2 の存在量の変化は観察されなかった。これに対して、T A S K 1 2 2 タンパク質は、D T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> : E R 阻害後は高度に不安定で、およそ 15 分の半減期であった。シクロヘキシミド処理によりタンパク質合成を阻害しながら T A S K 1 2 1 シグナル伝達を維持した場合、T A S K 1 2 2 分解の同様の動態がまた観察された (図 8、下パネル)。これらの結果は、T A S K 1 2 1 活性が、T A S K 1 2 2 タンパク質のプロテアソーム媒介回転に影響を及ぼすことなく T A S K 1 2 2 の転写を専ら調節することを示している。

#### 【 0 1 9 0 】

実施例 4 : メラノーマにおける T A S K 1 2 2 の発現

癌における T A S K 1 2 2 の関連性を確立し、T A S K 1 2 1 誘導 T A S K 1 2 2 転写が T A S K 1 2 1 - E R 発現系に単に特異的ではないことを確実にするために、T A S K 1 2 1 の活性化された対立遺伝子を担持する腫瘍細胞株における T A S K 1 2 2 の発現を調べた。TASK122は、LOX-IMVI (TASK121<sup>V600E</sup>)、A375 (TASK121<sup>V600E</sup>)、624-MEL (TASK121<sup>V600E</sup>)、888-MEL (TASK121<sup>V600E</sup>) 及び 928-MEL (TASK121<sup>V600E</sup>) メラノーマ中において、また HC T116 (KRAS<sup>G13D</sup>)、及び LS180 (KRAS<sup>G12D</sup>) 大腸癌細胞中において高度に発現していた (図 9 A)。TASK121<sup>V600E</sup> 変異を有する全ての細胞株は TASK122 の増加レベルに対してポジティブであった。全体が援用される Hoeflichら (2006) Intl. Jour. of Oncology 29:839-849 を参照のこと。

TASK121<sup>V600E</sup> 変異を含む 3 種の原発性メラノーマについて T A S K 1 2 2 の存在量についてまたアッセイした。正常な皮膚組織と一致したメラノーマを直ぐに凍結させ、切片を病理学者が組織学的に検証した。免疫プロットによって調べた 3 種の T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> メラノーマの全てにおいて高まったタンパク質レベルが検出された (図 9 B)。

T A S K 1 2 1 による T A S K 1 2 2 の調節は R N A i ノックダウン実験において直接に対象とした。内因性 T A S K 1 2 1<sup>V600E</sup> 対立遺伝子を含んでいる A 3 7 5 メラノーマ細胞を、T A S K 1 2 1 特異的 s h R N A 又はコントロールホタルルシフェラーゼ s h R N A の何れかを発現するレトロウイルスで感染させた。

この研究で使用されるヘアピンオリゴヌクレオチドは次の通りである :

TASK121 shRNA (センス) 5' -GAT CCC CAG AAT TGG ATC TGG ATC ATT TCA AGA GAA TGA TCC AGA TCC AAT TCT TTT TTT GGA AA-3' (配列番号 7)

TASK121 shRNA-1 (アンチセンス) 5' -AGC TTT TCC AAA AAA AGA ATT GGA TCT GGA TCA T TC TCT TGA AAT GAT CCA GAT CCA ATT CTG GG-3' (配列番号 8)

10

20

30

40

50

ルシフェラーゼshRNA (センス) 5' -GAT CCC CCT TAC GCT GAG TAC TTC GAT TCA AGA GAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT TTT GGA AA-3' (配列番号 9)

ルシフェラーゼshRNA (アンチセンス) 5' -AGC TTT TCC AAA AAA CTT ACG CTG AGT ACT T CG ATC TCT TGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGG GG-3' (配列番号 10)。

#### 【0191】

この系において、Tetリプレッサータンパク質は改変されたp01IIIプロモーターに結合して、shRNAの発現を防止する。しかしながら、テトラサイクリン類似体ドキシサイクリン(Dox)が存在すると、Tetリプレッサータンパク質はプロモーターから放出され、shRNAの転写と内因性TASK121又はルシフェラーゼの発現のノックダウンが生じる。TASK121<sup>V600E</sup>:ER細胞から得られた結論と一致して、Dox誘導のshRNA媒介TASK121ノックダウンはTASK122レベル及びリン酸化ERK1/2の有意な減少を生じる一方、全ERK2レベルは変わらないままであった(図9C)。この結果の特異性は第二のTASK121特異的shRNAを用いて確認されており、これらのデータが、TASK121標的遺伝子の遺伝子サイレンシングから生じるもので、意図されないオフターゲットの転写物から生じるものではないことを裏付けている(図9C、レーン4)。ルシフェラーゼに対するコントロールshRNAを発現するA375細胞では、Doxの添加はTASK122の存在量を変えなかった(図9C、レーン6)。併せて考えると、これは、TASK122の発現が、内因性の発癌性TASK121の抑制によってメラノーマ細胞において停止され得ることを示している。

TASK122発現に重要なTASK121下流シグナルを同定するために実験を実施した。A375、928-MEL、COLO205及びSK23-MEL細胞株をTASK121及びRAS活性化変異について特徴づけ、TASK122発現を、MEK1/2阻害剤U0126(Favataら, J Biol Chem 273:18623-32 (1998))の存在又は不在で培養した場合のこれらの腫瘍細胞の免疫プロットによって測定した。10µMのU0126で細胞を処理することによって、ERK1/2のリン酸化が減少し、全ERK2レベルは影響を受けなかった(図9D)。ERK1/2のリン酸化の阻害はTASK122の発現を消滅させた。これに対して、TASK122は、TASK122特異的siRNAの一過性形質移入を使用して発現停止させ、ERK1/2の存在量又は活性化の無変化が検出された(図9E)。

この実験において使用したTASK122特異的siRNAは次の通りであった：

TASK122 (センス) 5' GUACAGAUCCACGUCUUUU 3' (配列番号 11)

TASK122 (アンチセンス) 5' AAGACGUGGAGAUUGUACUU 3' (配列番号 12)

TASK122 (センス) 5' CUACUGAUGUUGUUGAUAAUU 3' (配列番号 13)

TASK122 (アンチセンス) 5' UUAUCAACAACAUCAGUAGUU 3' (配列番号 14)

#### 【0192】

このサイレンシング効果はまたMEK1/2及びERK1/2発現をノックダウンしたshRNA実験によっても確立された。

よって、メラノーマ細胞におけるTASK122の誘導には、MAPK経路成分のMEK1/2及びERK1/2に対してTASK121の下流シグナル伝達の活性化が必要となる。細胞性TASK122の蓄積はp38MAPK機能に依存することが報告されている(Zimmermannら, J Biol Chem 276:10759-66 (2001))。TASK122発現がTASK121に依存性でp38にはそうではないことを示すために、TASK122レベルを、選択的p38MAPK阻害剤(SB203580)の存在又は不在でA375細胞において分析した(Cuendaら, FEBS Lett 364:229-33 (1995))。SB203580での細胞の処理はこれらの細胞においてTASK122を不安定化できなかった(図9F)。コントロールとして、細胞可溶化物中でのp38MAPK下流シグナル伝達の活性化を、p38活性の強力なアゴニストであるアニソマイシンを使用して、p38MAPKの直接のキナーゼ基質のリン酸化MAPKAPK2(MK2)の電気泳動移動度シフトによって評価した。これらの結果は、p38MAPKシグナル伝達がTASK122局在化に影響を及ぼさないことを示す細菌の研究(Seternesら, Embo J 23:4780-91 (2004))と一致した。まとめると、これらの結果はTASK122がTASK121によっ

て、特にTASK121<sup>V600E</sup>変異体によって調製され、TASK122に対する抗体又はプローブが、TASK121が役割を果たす任意の腫瘍の診断で有用であることを示す。

【0193】

実施例5：RNAiによるTASK発現の調節

RNAiは、伝統的なアンタゴニスト、例えば低分子又は抗体が機能していない遺伝子発現を調節する実験におけるツールとして有用であることが証明されている(Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003)及びFire A., Trends in Genetics 391; 806-810 (1999))。RNAiはその標的RNAの分解を媒介することによって作用する。しかしながら、それらは通常は30ヌクレオチド長以下であるため、インターフェロン産生及び宿主細胞タンパク質合成の一般的活動停止を含む細胞の抗ウイルス防御機構を惹起しない。実際には、RNAiは合成され、ついでDNAベクター中にクローニングされ得る。そのようなベクターを形質移入し、高レベルでRNAiを発現させることができる。高レベルのRNAiの発現は、細胞内に生成されるタンパク質の量を有意に低減させるか、又は「ノックダウン」するのに使用され、よって、タンパク質の発現が、過剰発現か変異体型の発現かの何れかによって、癌のような疾患に関連していると考えられる実験において有用である。TASKは細胞内キナーゼであり、TASKの過剰発現又は変異は癌の発症及び進行に役割を果たしている。従って、RNAiは、癌の軽減と、癌におけるTASKに対する低分子の効能の測定の双方において、TASK発現に対する有用なアンタゴニストである。

10

相補的二本鎖RNAiオリゴをBglII及びHindIII制限酵素部位を使用してpHUSHベクター中に挿入する。この実施例で使用するpHUSH系はカナマイシン耐性のH1プロモーター駆動shRNA発現シャトルプラスミドと、Tet調節shRNA発現を可能にするコドン最適化TetR-IRE5-ピューロマイシンカセットを含むアンピシリン耐性レトロウイルスベクターからなる。ノックダウンベクターは、shRNAオリゴをシャトルベクター中にクローニングした後、Gateway組換え反応(Invitrogen, Carlsbad CA)によってレトロウイルスベクターにshRNAカセットを移すことによって作製される。

20

【0194】

実施例6：腫瘍スクリーニング

TASKポリペプチドに対するアンタゴニストはヌードマウスモデルによってインビボにて決定することができる。細胞株中に高レベルのTASKポリペプチドを生じさせるために十分量のTASKポリペプチド発現プラスミドを哺乳動物細胞に形質移入することができる。既知数の過剰発現細胞をヌードマウスの脇腹に皮下注射することができる。十分な時間をかけて腫瘍が増殖し、可視でき、測定できる(典型的には2-3mm直径)ようになったところで、そのマウスを潜在的なTASKアンタゴニストで処理することができる。有益な効果が生じたかどうかを決定すべく、腫瘍をバーニアノギスでミリメートル単位で測定し、腫瘍負荷を計算する；腫瘍重量 = (長さ × 幅<sup>2</sup>) / 2 (Geranら, (1972) Cancer Chemotherapy Rep., 3 1-104)。ヌードマウス腫瘍モデルは、腫瘍増殖速度及び用量依存的な形での可能な抗腫瘍剤による腫瘍増殖速度の減少を評価するための再現性のあるアッセイである。例として、候補プロテインキナーゼC阻害剤である化合物317615-HCLはこのモデルを使用して抗腫瘍効果を有していることが見出された(Teicherら, (2002) Can Chemo Pharm 49: 69-77)。

30

40

【0195】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発

50

明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【0196】

【図1A】TASK122 cDNAのヌクレオチド配列（配列番号1）を示し、ここで、配列番号：1は「DNA327674」と命名されたクローンである。

【図1B】TASK122 cDNAのヌクレオチド配列（配列番号1）を示し、ここで、配列番号：1は「DNA327674」と命名されたクローンである。

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

【図3】TASK121 cDNAのヌクレオチド配列（配列番号3）を示し、ここで、配列番号3は「DNA335802」と命名されたクローンである。

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

【図5】TASK121<sup>V600E</sup> cDNAのヌクレオチド配列（配列番号5）を示し、ここで、配列番号5は「TASK121<sup>V600E</sup>」と命名されたクローンである。

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

【図7】40HTでの処置によるTASK121-ERの活性化を示す。

【図8A】TASK121によるTASK122の発現の誘導を示す。

【図8B】TASK121によるTASK122の発現の誘導を示す。

【図9A】TASK122の発現の変化がTASK121に特異的であることを示す。

【図9B】TASK122の発現の変化がTASK121に特異的であることを示す。

【図10】発癌性TASK121に応答するマイクロアレイシグナル強度の統計を示す。

【図1A】

AATTTGAAAGGAAAGCAATAGTAAGGGTTTCAAAATGGCAGAGAAATTTGAAAGTCTC
ATGAAACATTCATGGTTTTGATCTGGGTTCTAGGTATATGAACTTAAACCATTTGGTGTG
GGAGGCAATGGCTTGGTTTTTCTGCTGTAGCAATGACTGTGACAAAAGAGTAGCCATC
AAGAAAATTTGCTTACTGATCCCCAGAGTGTCAAACATGCTCTACGTGAAATCAAAAT
ATTAGAAAGCTTGACCATGATAACATTTGGAAGATGTTGAGATTTCTGGTCCCAGTGG
AGCCATTTACAGAGAGATGTTGGCTCTTTACGGAACTGAACAGTGTTCAGATTTGTCAG
GACTACATGGAGCACTTGGCTAATGGTGGCAGCAGGCGCTTCTACTGAGAGGAT
GCCAGGCTTTTCATGTATCAGCTCTACGGGGCTCAGATATATTTACTCTGCAAAATGTA
CTCCACAGAGATCTCAACCCAGCTAACTTTTCATTAACGGGAAGACTTGGTGTGAG
ATAGTGTACTTTGGCTTTCAGCGGATCATGGATCTCATTATTCCCATAGGGTCACTTT
TCTGAAGGATTTGTTACTAATAGGTACAGATCTCCAGCTTTTACTTTCTCTAATAAT
TATACTAAAGCCATTGACATGTGGGCTGCGGGTGCATCTTGGTGAATGCTGACTGGT
AAAACCCCTTTTGCAGGTGCACATGAACCTGAACAGATGCAGCTGATTTAGAATCTATT
CCTGTGTACATGAGGAAGATGCTCAGGAGCTTCTCAGCTAATTCAGTTTACATGATA
AATGACATGACTGAGCCACACAAACCTTAACTCAGCTGCTCCAGGAATTTAGTGGAGAA
GCCTGATTTCTGGAAACAAATTTGACATTTAGCCCATGGATGGTTAGAGGACGAA
GAGCACTTCCCACTTCACTAGAGCAATATCTTTCCAAAGGATGAGCCATTTCA
AGCCATCTTTTCAATATTAGAGATGAGATTTGATGATATTTTGGCTATCGATCAAACTCAC
ACTCACATTTATACTGGGAAGGATCAATGCTCAGTTTTCAGAGCATGATTTGGCCCT
GTACATAACAACTTTGATATTGATGAAATGAGCTTGAATCCCAAGAGCTCTGCCGATGC
ACTGATGAGGAAGATGACAACTTGAATCCCAAGAAATTTGGATGGAGATCGGGAAGG
TATCTGGAGGATCTGCTTTTATACCAATTTACTCTACTGAGCTTGTGGCAATACTCA
GATCATGATAAAACAAATTTGATCTGGAATGAGCCTACTGTAACATAAAAGC
AGGTCATCATATTTAGATAACTTTAGTTTGGAGAGAGGATGAAATTAACCATTAAT
GATCCCAAGCTTATATAGATCTTTCCAATTTGGAAGARCAAAAGCAAGAAAAAATCTGAT
AAGAAGGCAATCAAAATGTAAGGAATGATTTGTTTAAAGCCAGATAGCCCTGAGG
GAGCATCACCAACTGCTGGAAGAAAGGAAAGAAATCAGGATTTGATTTTCAAT
TCCCTTTATGCAAGACTTATCAGCTTACTTCCAGCATGAGCTACTGATCTGTTGAT
AAATTAATGACTTGAATGCTCACTGTCCCACTAGAATGAAAGTTGATATCAAAG
TCAGTAAGCCAAAGAAACAGSAAAGGAATGGCAATCTGGCTCAATTAGAAGCCTTG
TACCAGTCTCTTGGGAGCAGGATTTGAGATGCTGGGAGGACTGTTTTTTCATAAAT
CAGTTTTCTGAGTAAAGGAGGATGAACAGTTGAAAGGAAACACTTACACTAGTTAC
TTGGCAAGTCTTTTACGAGGAAGAGATCTGAAATCTGAAACTGAGCAACTGAGCCAGTAG
GATGGGAAGCTTGGGAGGAGGACATGAGGAGGATTTCTGAAACAACAGTGGGAGTTC
CTCTTAAACAGCAGCTCGAGTCCATAGGCATCCCAGTTTCCAGTCCAGTGGGTC
CCCTTTAAGTCAATACAGCCACATTAACACCTTCTGCTATGAAATCTTCCCTCAAAAT
CTCTGTCAACATACAGCAGCTTGTGAACATCTGAACTAAAGCACTGAGCAGCAAT
ATCTTTGATTTCTCATGAATGTTTTGCTTTTTTATTTACTAGTGTGTTAAGTCAAT
TTTTACTGAAATCAGATGTTGATTTAGTAAAGATTTTATGAGTCTTGTTTTTTAAAA
TCCAGACTTCTTTTCTCAGATGAGATAGTTTTCAATTTAACTGGCATGCTATTGCA
CACAAAATAAAGACTAGAGCAAAATGATGCAAGCAGGAGGAGAAAGAAATGCACTTA
GCAAGAACATCTCTCATAGAAATGATCTGTTTACAGGAACAAACCTTGCCTTGA
AAATACACAGTGAAGCTTACATTAATGCAATGAAATAGCTATTTTTTCCCTAAGACAT
TTTTCAATCATGAATATTTCAAGTTTTTCAATCTGACACATTTCTTAAACACATGAT
ACCAGCAGCACTGAAATGAAATGCGGAATTTGGTACACATGTTTATCTACCTCAAGGT
AACAGGATATGTCGCAAAATATACACCCATAGTCTTCAACAAATGCACTTCTATT
TAGCCAGCTTTTCTGATAACATTTCTTAATAAAGCTCACTCACTTTTAAAGT
TCTGTAAGCATTCTTATAGTGAAGTTTAAATACATCAGATCTATTTATTTAGCAAA
TCATATATTTCTGATTTAATTAATAAAATTAAGTATGTTTTTAAAAATTTATTTGCA
AATATACTTTTCCATTTGGCAGTATGTTTGTGCTACCTAGCTGATCTATATATGTC
AGCTTATCTTAAAGCTTGCAGTACTTAAATTAATTAAGTGTCTATTAAAGTAAAGTG
CTCACTGTATAGCAATTTGATTTTGGAGGTCTGATCTATCAAAAAGAAATTA

【図1B】

ATTAGGAATTTACTTTATTATAAAATGCTCCTAGAAGTCTTAAATGTTTATTTTTTAAA
AAAACAAATGTTAGACTTGTGTGCATGGAAATTAAGGTACATCATTATTGATGTTTG
AAAGTTGTACATGATAAGACATTTTGTTTTTACTGTATGTTTTTACTGAATGATCTATTC
CCCATCCCAAGGCAAGCATGAATAAAATTAGTTAAACAGTACATGTTGGCATCCGAGTCT
CTTGAATAATTTTTCATCTATTTTTATTTATGAAATGCTGCTGTATCTTTGGTATCTCT
GTTTGAAGAAAAGGACAAATAAAACATGGCCAGCAATACAAAATAAAAAA

【図2】

MAEFESLMIHGFGLSRYMDLPLGCGGNLVSFVAVDNDCKRVAIKKIVLTPQSVKHALRE
IKIRLRLDHNIIVKVFELGSPSGSLTDDVGLTELSVYLVQYMETDLANVLEQPLLEEHAR
LFMYQLRLGLKYIHSANVLRDLKPNLFINTEDLVKIGDFGLARIMDFHYSHKGLHSEGLV7K
WYRSPRLLSFPNNYTKAIDMWAAGCTFAEMLTGKTLFAGARELEQMLLLESIPVHVEDRQELL
SVIPIVIRNOMTEPHKPLTQLLPGTSRALDFLQILFESFMDRITAEALSHPIHMSIYFPMDE
PIGSHFHEDEVDLDDIMDETFRSHYWEKRYHQQSEHWHVNNFIDIEVQLDHALSOVD
EEVQVDPKYLDCDREKYLEDBAFDNYSTPCWQYSDHHEKNYCDECSHTCNKTRASSYLD
NLVWRESEVNHYYEPLIIDLSENKQSKELKDKKYSKSCERKSLVKAQIALEEAQQLAGKERE
KNQGFDFDFFIAGIQLSSQHEPTVDVLDKNDLNSVSLKSLKLSKVSQKQKGMANLAQL
EALYQSSWDSQFVSGGDCFFINQFCEVRKDEQVEKENTYTSYLDKFFSRKDETEMLETEPVEDG
KIGERHEEGEFLNNSGELEFNKQLESIGIPQFHSVGSPLKSLQATLTPSAMKSSPOIPIHOTYS
ILKHLN

10

20

【 図 3 】

TAAGATGGGGGGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGGGCGGGAGCGGGCCAGGCTCTGTT  
 CAACGGGACATGGAGCCGAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCTCTGGGCTGC  
 GGACCTGCATTCGGGAGGAGGTGGGAATATCAAAACAAATGATTAGTTGACACAGGA  
 ACATATAGAGGCCCTATGGACAATTTGGTGGGAGCATAATCCACCATCAATATATCT  
 GGAGGCCATGAAGAATACACCAAGCAAGCTAGTGCACTCCAAAGAGAGAACACAGTT  
 ATTGGAACTCTGGGGACGGGAATGATTTTTCTGTTTCTAGCTCTGCATCAATGGATAC  
 CGTTACATCTTCTCTCTAGGCTTTCCAGTGCACCTTCATCTCTTCCAGTTTTTCA  
 AAATCCCAACAGATTGGGACAGGAGCCCAAGTCCACCAAAACCTATCTGTAGACT  
 CTTCTCCCAACCAACAGAGCACTGGTACTTCCAGCTCTGGAGTTACAGTCCGAGGA  
 CAGTCTAAGAAGACACTGATGAGAGCTTAATCCAGAGTCTGTCTGTTACAG  
 AATTCCAGGATGGAGAGAAACCAATTTGGTGGGACACTGATATTTCTGGCTTACTGG  
 AGAAGAATTGCAATGGAAGTGTGGAGAATTTCCACTTACACACACACAACTTGTACG  
 AAAAACGTTTTCCACTTACGATTTGGTACTTTGGTGGAAAGTCTGTTTTCCAGGTTTT  
 CCCTCTCAAAACATGTGTTATTAATTTCCACAGCTGTAGTACAGAGTCCACTGAT  
 GTGTGTTAATATGACCAACTGATTTGCTGTTGTTCTCCAACTCTTTGAACACACCC  
 AATACACAGGAAGAGGCGCTTACGAGAGACTGCCCTAACTCTGGATCTCCCTCTC  
 CGCACCGGCTCGGACTCTATTTGGGCCCCAATTTCCACAGTCCGCTCTCTTCAAATC  
 CATTTCCAAATCCACAGCCCTTCCGACAGCAGATGAAGTCAATCGAAATCAATTTGGGCA  
 ACGAGCCGATCTCTACAGCTCCAAATTTGGTACTTAAGCAATAGAACCTTCAATAT  
 TGAATGCTTGAATAGAGCCAGGATTTCTGGTGGTGGAGACTTCCAGTGGGAGATTA  
 TGCTACCCCGCTGCTCACTTACTGGCTCACTTACTTACAGTGAAGGCTTACAGAAATC  
 TCCAGGACTCCAGGAGAAAGAGTCACTTCTACTTCCAGAGACAGGAAATCGAATGAA  
 AACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGAATTTGGGAGATTTCCACTTACACACACAACTT  
 GGGACAAGAAATTTGATCTGGATCATTTGGAACAGTCTACAGGGAAGGTTGGCATGTGA  
 TGGGCACTGAAATTTGAAATGGACAGCCTACACCTCAGCAGTTTCAAAAGCTTCAA  
 AAATGAAGTAGGACTCAGAAACACCACTGTAATTCCTACTCTTCAATGGGCTA  
 TTCCAAAGCCACAACCTGGCTATTTGACCACTGGTGTGAGGCTCCAGCTTGTATCA  
 CCATCCATATCATTTAGAGCAAAATTTAGATGATCAAACTTAATAGATATGACAGACA  
 GACTGCACAGGCGATGATTTACTTACGCCAAGTCAATCTCCAGACAGACCTCAGAG  
 TAATAATATTTCTCTCATAGACCTCACTCAAAATAGGATTTGGTCTAGCTC  
 AGTGAATCTCGATGGAGTGGTCCCACTGTTTGAACAGTGTCTGGATCTATTTGG  
 GATGGCACAGAAGTCACTCAGATGCAAGTAAATAATCCATACAGCTTCACTGATGAT  
 ATATGCAATTTGGGATTTCTCTGATGAATGATGACTGGACAGTACCTTATTCACACAT  
 CAACAACAGGACAGATATTTTTTATTTGGTGGGACAGGATACCTGCTCCAGATCTCAG  
 TAAGGTACGGAGTAACTTCCAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTCAAAA  
 GAAAAGAGATGAGAGCCACTCTTTCCCAAAATTTCCGCTCTATTGAGCTGTGGCCCG  
 CTATTGCCAAAAATCCAGCCAGTGCATCAGAACCTCTGAAATCGGGCTGGTTTCCA  
 ABCAGAGGATTTAGCTATATGTGTGCTTCCAAAACACCCATCCAGGAGGGGG  
 ATATGGTGGGTTTTCTGTCCACTAA

【 図 5 】

TAAGATGGGGGGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGGGCGGGAGCGGGCCAGGCTCTGTT  
 CAACGGGACATGGAGCCGAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCTCTGGGCTGC  
 GGACCTGCATTCGGGAGGAGGTGGGAATATCAAAACAAATGATTAGTTGACACAGGA  
 ACATATAGAGGCCCTATGGACAATTTGGTGGGAGCATAATCCACCATCAATATATCT  
 GGAGGCCATGAAGAATACACCAAGCAAGCTAGTGCACTCCAAAGAGAGAACACAGTT  
 ATTGGAACTCTGGGGACGGGAATGATTTTTCTGTTTCTAGCTCTGCATCAATGGATAC  
 CGTTACATCTTCTCTCTAGGCTTTCCAGTGCACCTTCATCTCTTCCAGTTTTTCA  
 AAATCCCAACAGATTGGGACAGGAGCCCAAGTCCACCAAAACCTATCTGTAGACT  
 CTTCTCCCAACCAACAGAGCACTGGTACTTCCAGCTCTGGAGTTACAGTCCGAGGA  
 CAGTCTAAGAAGACACTGATGAGAGCTTAATCCAGAGTCTGTCTGTTACAG  
 AATTCCAGGATGGAGAGAAACCAATTTGGTGGGACACTGATATTTCTGGCTTACTGG  
 AGAAGAATTGCAATGGAAGTGTGGAGAATTTCCACTTACACACACAACTTGTACG  
 AAAAACGTTTTTCCACTTACGATTTGGTACTTTGGTGGAAAGTCTGTTTTCCAGGTTTT  
 CCCTCTCAAAACATGTGTTATTAATTTCCACAGCTGTAGTACAGAGTCCACTGAT  
 GTGTGTTAATATGACCAACTGATTTGCTGTTGTTCTCCAACTCTTTGAACACACCC  
 AATACACAGGAAGAGGCGCTTACGAGAGACTGCCCTAACTCTGGATCTCCCTCTC  
 CGCACCGGCTCGGACTCTATTTGGGCCCCAATTTCCACAGTCCGCTCTCTTCAAATC  
 CATTTCCAAATCCACAGCCCTTCCGACAGCAGATGAAGTCAATCGAAATCAATTTGGGCA  
 ACGAGCCGATCTCTACAGCTCCAAATTTGGTACTTAAGCAATAGAACCTTCAATAT  
 TGAATGCTTGAATAGAGCCAGGATTTCTGGTGGTGGAGACTTCCAGTGGGAGATTA  
 TGCTACCCCGCTGCTCACTTACTGGCTCACTTACTTACAGTGAAGGCTTACAGAAATC  
 TCCAGGACTCCAGGAGAAAGAGTCACTTCTACTTCCAGAGACAGGAAATCGAATGAA  
 AACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGAATTTGGGAGATTTCCACTTACACACACAACTT  
 GGGACAAGAAATTTGATCTGGATCATTTGGAACAGTCTACAGGGAAGGTTGGCATGTGA  
 TGGGCACTGAAATTTGAAATGGACAGCCTACACCTCAGCAGTTTCAAAAGCTTCAA  
 AAATGAAGTAGGACTCAGAAACACCACTGTAATTCCTACTCTTCAATGGGCTA  
 TTCCAAAGCCACAACCTGGCTATTTGACCACTGGTGTGAGGCTCCAGCTTGTATCA  
 CCATCCATATCATTTAGAGCAAAATTTAGATGATCAAACTTAATAGATATGACAGACA  
 GACTGCACAGGCGATGATTTACTTACGCCAAGTCAATCTCCAGACAGACCTCAGAG  
 TAATAATATTTCTCTCATAGACCTCACTCAAAATAGGATTTGGTCTAGCTC  
 AGTGAATCTCGATGGAGTGGTCCCACTGTTTGAACAGTGTCTGGATCTATTTGG  
 GATGGCACAGAAGTCACTCAGATGCAAGTAAATAATCCATACAGCTTCACTGATGAT  
 ATATGCAATTTGGGATTTCTCTGATGAATGATGACTGGACAGTACCTTATTCACACAT  
 CAACAACAGGACAGATATTTTTTATTTGGTGGGACAGGATACCTGCTCCAGATCTCAG  
 TAAGGTACGGAGTAACTTCCAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTCAAAA  
 GAAAAGAGATGAGAGCCACTCTTTCCCAAAATTTCCGCTCTATTGAGCTGTGGCCCG  
 CTATTGCCAAAAATCCAGCCAGTGCATCAGAACCTCTGAAATCGGGCTGGTTTCCA  
 ABCAGAGGATTTAGCTATATGTGTGCTTCCAAAACACCCATCCAGGAGGGGG  
 ATATGGTGGGTTTTCTGTCCACTAA

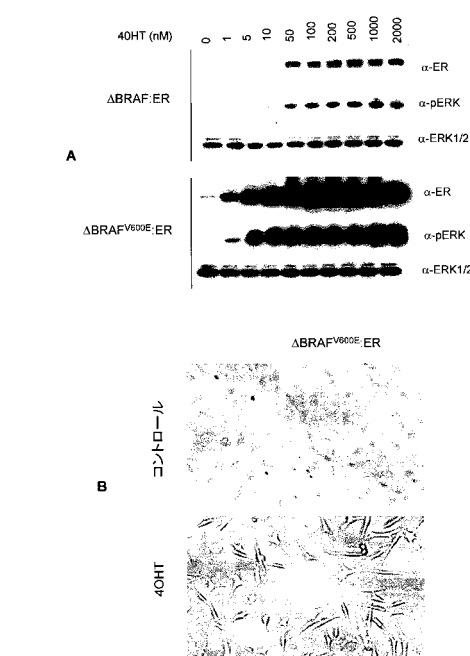
【 図 4 】

MAALSGGGGGAEFGQALFNGDMEPEAGAGGAAASAAADPAIPEEVNHIKQMIKLTQEH  
 IEALLDFGGEHNPFSYLEAYEYYSKLDALQREQLLESIGNTDFSVSSASMDTV  
 TSSSSSLSVLPSLSVFNQPDVARSNPKSPKPIVRYVFLPNKQRTVVPARGVTVRDS  
 LKKALMNRGLIPECCAVYRIQDGEKPIGWDTISWLTGEELHEVLENDPLTHNLFVVK  
 TFFTLAFCDPFRKLLFQGFRCQTCGYFHQRCSVEPLMVCVNYDQLDLFVSKFPEHPI  
 PQEASLAETALTSGSSSAPASDSIGPQILTSFSPKSIPIPPFRPADEDRHNFQGR  
 DRSSAPNVHINTIEPVNIDLLRDQFRDGGSTGLSATPPASLPGSLTNVKALQKSP  
 GPQREKSSSSSEDRNRKMLGRDSSDWEI PDQITVGRIGSGSFGTVYKRWGHDV  
 AVKMLNVTAFTPQQLQAFKNEVGLRKRHWVLLFMGYSTKPLAIVTQWCGSSLYHH  
 LHIETKFMILKLDIARQTAGMDYLHAKSIHRLKSNIFLHEDLTVKIGDFLATV  
 KSRWSGSHQFEQLSGSILMMAFEVIRMDRNFYSQSDVAFGIVLYELWGLPYSNIN  
 NRQIIFMVGRGLSPDLKVRSNCFKMKRMLMAECLKKRDERLFPQILASIELLARS  
 LPKIHRSAEPLNRAGFTQEDFSLYACASPKPTIQAGGYGAFVH

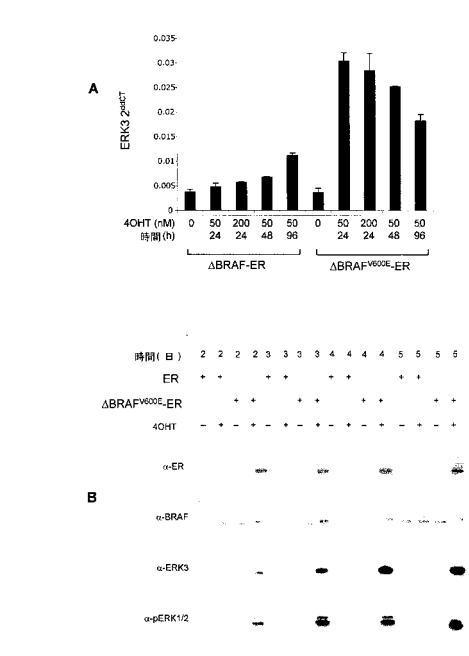
【 図 6 】

MAALSGGGGGAEFGQALFNGDMEPEAGAGGAAASAAADPAIPEEVNHIKQMIKLTQEH  
 IEALLDFGGEHNPFSYLEAYEYYSKLDALQREQLLESIGNTDFSVSSASMDTV  
 TSSSSSLSVLPSLSVFNQPDVARSNPKSPKPIVRYVFLPNKQRTVVPARGVTVRDS  
 LKKALMNRGLIPECCAVYRIQDGEKPIGWDTISWLTGEELHEVLENDPLTHNLFVVK  
 TFFTLAFCDPFRKLLFQGFRCQTCGYFHQRCSVEPLMVCVNYDQLDLFVSKFPEHPI  
 PQEASLAETALTSGSSSAPASDSIGPQILTSFSPKSIPIPPFRPADEDRHNFQGR  
 DRSSAPNVHINTIEPVNIDLLRDQFRDGGSTGLSATPPASLPGSLTNVKALQKSP  
 GPQREKSSSSSEDRNRKMLGRDSSDWEI PDQITVGRIGSGSFGTVYKRWGHDV  
 AVKMLNVTAFTPQQLQAFKNEVGLRKRHWVLLFMGYSTKPLAIVTQWCGSSLYHH  
 LHIETKFMILKLDIARQTAGMDYLHAKSIHRLKSNIFLHEDLTVKIGDFLATV  
 KSRWSGSHQFEQLSGSILMMAFEVIRMDRNFYSQSDVAFGIVLYELWGLPYSNIN  
 NRQIIFMVGRGLSPDLKVRSNCFKMKRMLMAECLKKRDERLFPQILASIELLARS  
 LPKIHRSAEPLNRAGFTQEDFSLYACASPKPTIQAGGYGAFVH

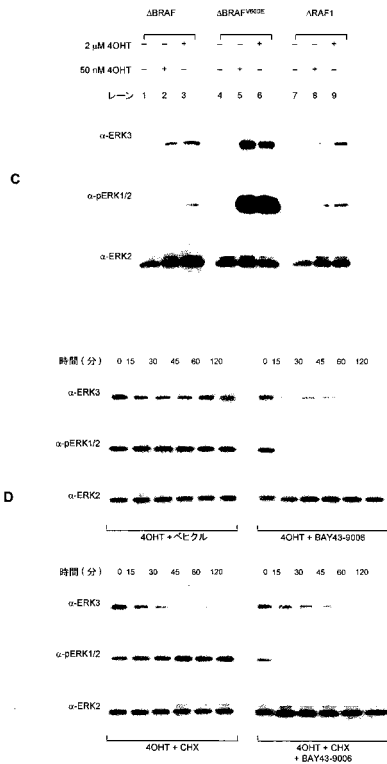
【 図 7 】



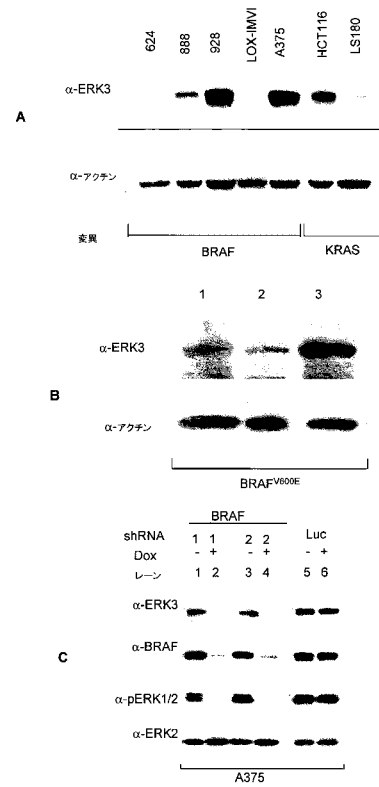
【 図 8 A 】



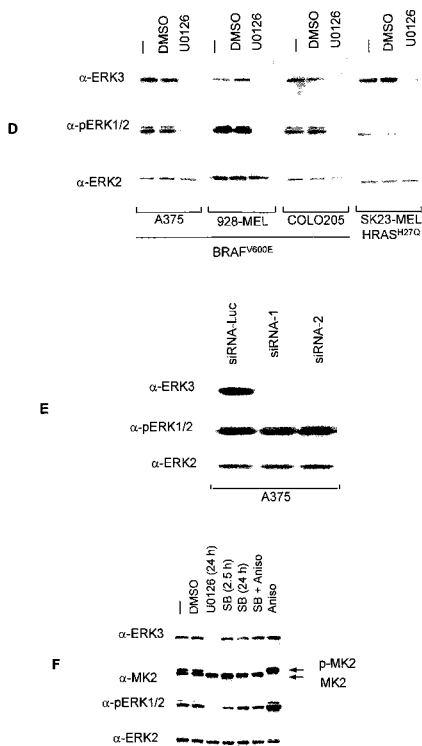
【 図 8 B 】



【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



【 図 10 】

遺伝子	GenBank 受託番号	機能	TASK K121	TASK 121 下限 CI	TASK 121 上限	TASK 121 V600E 下限 CI	TASK 121 V600E 上限 CI	TASK 121 V600E
Ereg	NM_007950	リガンド	9.18	5.84	14.43	76.52	48.66	120.31
BTC	NM_007568	リガンド	2.31	1.35	3.95	39.4	23	67.49
HB-EGF	NM_010415	リガンド	2.49	1.47	4.2	29.47	17.46	49.74
EGFR	NM_007912	レセプター	0.53	0.23	1.21	0.54	0.24	1.24
PDGFRL	NM_026840	レセプター	0.69	0.49	0.99	0.13	0.09	0.19
PDGFRB	NM_008809	レセプター	0.7	1.01	0.23	0.19	0.28	0.27
N-Ras	NM_010937	GTPアーゼ	0.86	0.76	0.98	0.66	0.58	0.75
R-Ras	NM_009101	GTPアーゼ	0.87	0.79	0.96	0.4	0.36	0.44
TASK121	NM_004333	キナーゼ	0.84	0.65	1.08	0.58	0.45	0.75
Mekk1	NM_011945	キナーゼ	0.73	0.46	1.16	0.7	0.44	1.11
Task122	NM_015806	キナーゼ	1.57	1.13	2.18	7.28	5.25	10.1
Mkp-2	NM_176933	ホスファターゼ	6.82	0.96	48.71	49.59	6.95	354.14
Mkp-3	NM_026268	ホスファターゼ	2.85	2.14	3.8	19.88	14.91	26.5
Mkp 6	NM_019819	ホスファターゼ	1.39	1.06	1.81	5.09	3.89	6.67
PTP1B	NM_011201	ホスファターゼ	1.47	1.27	1.7	1.96	1.7	2.27
Spred1	NM_033524	スキヤホールド	1.39	1.04	1.86	4.64	3.48	6.18
Spred2	NM_033523	スキヤホールド	1.24	1.02	1.51	3.83	3.14	4.66
Sprouty2	NM_011897	スキヤホールド	2.54	0.79	8.19	10.4	3.23	33.5
Sprouty4	NM_011898	スキヤホールド	1.17	1	1.38	1.53	1.3	1.79
14-3-3z	NM_011740	スキヤホールド	1.2	0.94	1.52	2.35	1.85	3
Erbin	NM_018695	スキヤホールド	0.83	0.68	1.03	0.5	0.41	0.62

EGFシグナル伝達成分として報告されているATASK121-ER及びATASK121<sup>V600E</sup>-ERにより転写制御される遺伝子をANOVA解析により決定、関連GenBank受託番号、発現の変化倍数及び99%信頼区間(CI)を列挙する。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/061629

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/037990 A (EXELIXIS INC [US]; PLOWMAN GREGORY D [US]; KARIM FELIX D [US]; SWIMMER) 6 May 2004 (2004-05-06) the whole document	1-6, 9-13, 15-17
X	WO 2004/043361 A (GENENTECH INC [US]; FONG SHERMAN [US]; DENNIS KATHRYN [US]; CLARK HILA) 27 May 2004 (2004-05-27) the whole document	1-6, 9-13, 15-17
X	US 2005/095657 A1 (ARBISER JACK L [US] ET AL) 5 May 2005 (2005-05-05) pages 1,2,4-8	1-6, 9-13, 15-17
A	US 2005/048533 A1 (SIDRANSKY DAVID [US] ET AL) 3 March 2005 (2005-03-03) the whole document	7,8,14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>21 November 2007</b>		Date of mailing of the international search report <b>15/02/2008</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>PINHEIRO VIEIRA, E</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2006/061629**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-17

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /061629

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. claims: 1-17

Method for determining the presence of a polypeptide in a biological sample where the polypeptide has at least 80% identity to Seq ID No 1 or an amino acid encoded by SEQ ID No 2; method for diagnosing the presence of a tumor (melanoma or comprises a TASK121 mutation) in a mammal comprising detecting the level of expression of a gene encoding a polypeptide having at least 80% identity to Seq ID No 1 or 2; method of diagnosis the presence of a tumor in a mammal by contacting a sample with an antibody, oligopeptide or small molecule that binds to a polypeptide having at least 80% identity to Seq ID No 1 or 2;

## 2. claims: 18-22

Antibody drug conjugate compound comprising an anti-TASK antibody (Ab) and a drug moiety (D) bound via a linker (L), where the anti-TASK antibody has at least 80% identity with SEQ ID No 1 or an amino acid encoded by SEQ ID No 2.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/061629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004037990 A	06-05-2004	AU 2003301619 A1	13-05-2004
		CA 2502681 A1	06-05-2004
		EP 1664337 A2	07-06-2006
		JP 2006515985 T	15-06-2006
WO 2004043361 A	27-05-2004	AU 2003295401 A1	03-06-2004
		CA 2503748 A1	27-05-2004
		EP 1581169 A2	05-10-2005
		JP 2006516094 T	22-06-2006
US 2005095657 A1	05-05-2005	NONE	
US 2005048533 A1	03-03-2005	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	1 0 1
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/429 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
	A 6 1 K 31/704	
	A 6 1 K 31/429	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 セシャギリ, ソマセカー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, ポルト マリーノ ドライ  
ブ 1 0 1 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 CA01 CA09 CA11 HA08 HA12  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ27 QQ42 QQ52 QQ79 QR08 QR42  
QR48 QR55 QR66 QS25 QS34 QS36 QX02  
4C084 AA02 AA03 AA17 BA01 BA08 BA14 BA22 BA32 DA29 DA39  
MA66 NA05 NA06 NA13 NA14 ZB211 ZB261  
4C085 AA13 AA14 AA16 AA19 AA22 AA26 BB31 BB41 BB42 BB43  
BB44 CC02 CC22 CC23 DD51 EE01 GG01  
4C086 AA01 AA02 AA03 CB22 CB27 EA08 GA16 GA17 MA01 MA02  
MA04 MA65 NA05 NA06 NA13 NA14 ZB21 ZB26

专利名称(译)	用于诊断和减轻肿瘤的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009518048A</a>	公开(公告)日	2009-05-07
申请号	JP2008544629	申请日	2006-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ホフリッヒクラウスピー セシャギリソマセカー		
发明人	ホフリッヒ, クラウス ピー. セシャギリ, ソマセカー		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/68 C12N15/09 A61P35/00 A61P43/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K38/00 A61K31/537 A61K31/704 A61K31/429		
CPC分类号	A61K47/6871 A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/485 G01N33/57484		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA G01N33/53.D G01N33/574.A C12Q1/68.A C12N15/00.A A61P35/00 A61P43/00.105 A61K39/395.Y A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00.101 A61K37/02 A61K31/537 A61K31/704 A61K31/429		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ27 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA14 4C084/BA22 4C084/BA32 4C084/DA29 4C084/DA39 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA06 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/AA22 4C085/AA26 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD51 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/CB22 4C086/CB27 4C086/EA08 4C086/GA16 4C086/GA17 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA65 4C086/NA05 4C086/NA06 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26		
优先权	60/748063 2005-12-07 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及确定生物样品中某些肿瘤相关激酶多肽存在的方法，以及用于诊断和治疗哺乳动物肿瘤的组合物。

