

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5237638号
(P5237638)

(45) 発行日 平成25年7月17日(2013.7.17)

(24) 登録日 平成25年4月5日(2013.4.5)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/574 B
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P

請求項の数 14 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-524925 (P2007-524925)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成17年8月3日(2005.8.3)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2008-509394 (P2008-509394A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
(43) 公表日	平成20年3月27日(2008.3.27)		サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/027480		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02006/017531	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開日	平成18年2月16日(2006.2.16)		弁理士 園田 吉隆
審査請求日	平成20年8月4日(2008.8.4)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/599,425		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成16年8月6日(2004.8.6)	(72) 発明者	ワグナー, クラウス ダブリュ.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			10, バーリングゲーム, バーリングゲーム
			アベニュー 509
		審査官	赤坂 祐樹
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマーカーを用いたアッセイおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物の組織または細胞試料の A p o 2 L / T R A I L への感受性を予測するための方法であって、

哺乳動物組織または細胞試料を検査して、フコシルトランスフェラーゼ3、フコシルトランスフェラーゼ6、シアリルルイスA抗原および/またはシアリルルイスX抗原からなる群から選択される一又は複数のバイオマーカーの発現を検出する工程を含む方法。

【請求項2】

前記一又は複数のバイオマーカーの発現がフコシルトランスフェラーゼ3またはフコシルトランスフェラーゼ6の mRNA 発現を検出することによって検査されるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記一又は複数のバイオマーカーの発現がシアリルルイスA抗原および/またはシアリルルイスX抗原の発現を検出するための免疫組織化学的な方法によって検査されるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

さらに、前記組織または細胞試料中の D R 4、D R 5、D c R 1 または D c R 2 レセプターの発現を検査する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記組織または細胞試料に癌組織または癌細胞が含まれる、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

前記癌細胞が、大腸、結腸直腸、消化管または膵臓の癌細胞または組織である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記癌細胞が大腸または結腸直腸の癌細胞である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 A p o 2 L / T R A I L が、図 1 (配列番号：1) のアミノ酸 4 1 - 2 8 1 又はその生物学的に活性な断片を含有してなるポリペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 A p o 2 L / T R A I L が図 1 (配列番号：1) のアミノ酸 1 1 4 - 2 8 1 を含有してなるポリペプチドである、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

哺乳動物の大腸または結腸直腸の癌細胞の A p o 2 L / T R A I L への感受性を予測するための方法であって、

哺乳動物の大腸または結腸直腸の癌細胞を検査して、フコシルトランスフェラーゼ 3、フコシルトランスフェラーゼ 6、シアリルルイス A 抗原および/またはシアリルルイス X 抗原からなる群から選択される一又は複数のバイオマーカーの発現を検出する工程を含む方法。

【請求項 11】

哺乳動物の組織または細胞試験試料の A p o 2 L / T R A I L への感受性を予測するためのキットであって、

20

a. 容器と、

b. 該容器内に収容される組成物であって、フコシルトランスフェラーゼ 3 (F U T 3) および/またはフコシルトランスフェラーゼ 6 (F U T 6) のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブが含有されている組成物、

c. 少なくとも一種類の哺乳動物細胞中の F U T 3 および/または F U T 6 の存在を評価するための F U T 3 および/または F U T 6 ポリヌクレオチドプローブの使用についての指示書

を具備しており、

試験試料中の前記 F U T 3 および/または F U T 6 ポリヌクレオチドプローブにより形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在は、試験試料の A p o 2 L / T R A I L への感受性を予測するものである、キット。

30

【請求項 12】

さらに、組織試料の切片を調製して組織試料にポリヌクレオチドプローブを適用するための一組の指示書と材料を具備する、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

哺乳動物の組織または細胞試験試料の A p o 2 L / T R A I L への感受性を予測するためのキットであって、

a. 容器と、

b. 該容器内に収容される組成物であって、シアリルルイス A 抗原および/またはシアリルルイス X 抗原に結合する一次抗体が含有されている組成物、

40

c. 少なくとも一種類の哺乳動物細胞中のシアリルルイス A 抗原および/またはシアリルルイス X 抗原の存在を評価するための前記抗体の使用についての指示書

を具備しており、

試験試料中のシアリルルイス A 抗原および/またはシアリルルイス X 抗原の存在は試験試料の A p o 2 L / T R A I L への感受性を予測するものである、キット。

【請求項 14】

さらに、組織試料の切片を調製して組織試料の同一片に抗体およびプローブを適用するための一組の指示書と材料を具備する、請求項 13 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

50

【発明の開示】

【0001】

(出願について)

この出願は、米国特許法119条(e)に基づき、2004年8月6日提出の米国特許仮出願番号第60/599,425号の優先権を主張する出願であり、ここに出典明記により組み込まれるものである。

【0002】

(発明の分野)

本明細書中に記載の発明は、Apo2L/TRAILおよび/またはデスレセプターアゴニスト抗体に対する哺乳動物細胞の感受性を予測するバイオマーカーを検出するための方法およびアッセイに関する。

10

【0003】

(発明の背景)

腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリに属する様々なリガンドおよびレセプターが当分野で同定されている。そのようなリガンドの中には、腫瘍壊死因子- (「TNF-」)、腫瘍壊死因子- (「TNF-」又は「リンホトキシン-」)、リンホトキシン- (「LT-」)、CD30リガンド、CD27リガンド、CD40リガンド、OX-40リガンド、4-1BBリガンド、LIGHT、Apo-1リガンド(Fasリガンド又はCD95リガンドとも称される)、Apo-2リガンド(Apo2L又はTRAILとも称される)、Apo-3リガンド(TWEAKとも称される)、APRIL、OPGリガンド(RANKリガンド、ODF又はTRANCEとも称される)、及びTALL-1(BlyS、BAFF又はTHANKとも称される)が含まれる。[例えば、Ashkenazi, Nature Review, 2:420-430 (2002); AshkenaziおよびDixit, Science, 281:1305-1308 (1998); AshkenaziおよびDixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997) Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley 等, Cell, 104:487-501 (2001); GrussおよびDower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Schmid 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 83:1881 (1986); Dealtry 等, Eur. J. Immunol., 17:689 (1987); Pitti 等, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley 等, Immunity, 3:673-682 (1995); Browning 等, Cell, 72:847-856 (1993); Armitage 等 Nature, 357:80-82 (1992); 1997年1月16日公開のWO97/01633; 1997年7月17日公開のWO97/25428; Marstersら, Curr. Biol., 8:525-528(1998); Chicheporticheら, Biol. Chem., 272:32401-32410(1997); Hahneら, J. Exp. Med., 188:1185-1190(1998); 1998年7月2日公開のWO98/28426; 1998年10月22日公開のWO98/46751; 1998年5月7日公開のWO/98/18921; Mooreら, Science, 285:260-263(1999); Shuら, J. Leukocyte Biol., 65:680(1999); Schneiderら, J. Exp. Med., 189:1747-1756(1999); Mukhopadhyayら, J. Biol. Chem., 274:15978-15981(1999)参照]。

20

30

【0004】

このようなTNFファミリリガンドによって媒介される様々な細胞性応答の誘導は、一般的に特定の細胞レセプターへの結合によって開始される。すべてではなく、いくつかのTNFファミリリガンドは、細胞表面の「デスレセプター」に結合して、それを介して様々な生物学的活性を誘導し、細胞死やアポトーシス経路を行うカスパーゼまたは酵素を活性化する(Salvesen 等, Cell, 91:443-446 (1997)。今日までに同定されたTNFレセプタースーパーファミリのメンバーには、TNFR1、TNFR2、TAC1、GITR、CD27、OX-40、CD30、CD40、HVEM、Fas (Apo-1またはCD95とも称される)、DR4 (TRAIL-R1とも称される)、DR5 (Apo-2またはTRAIL-R2とも称される)、DcR1、DcR2、破骨細胞分化抑制因子(OPG)、RANKおよびApo-3 (DR3またはTRAMPとも称される)が含まれる。(例えば、Ashkenazi, Nature Reviews, 2:420-430 (2002); AshkenaziおよびDixit, Science, 281:1305-1308 (1998); AshkenaziおよびDixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997) Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, 377-411頁; Locksley 等., Cell, 104:487-501 (2001); Gruss and Dower, Blood, 85:3378-34

40

50

04 (1995); Hohman 等, *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990); 1991年3月20日出願の欧州特許第417,563; Loetscher 等, *Cell*, 61:351 (1990); Schall 等, *Cell*, 61:361 (1990); Smith 等, *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin 等, *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991); Stamenkovic 等, *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989); Mallett 等, *EMBO J.*, 9:1063-1068 (1990); Anderson 等, *Nature*, 390:175-179 (1997); Chicheportiche 等, *J. Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Pan 等, *Science*, 276:111-113 (1997); Pan 等, *Science*, 277:815-818 (1997); Sheridan 等, *Science*, 277:818-821 (1997); Degli-Esposti 等, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); Marsters 等, *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Tsuda 等, *BBRC*, 234:137-142 (1997); Nocentini 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:6216-6221 (1997); vonBulow 等, *Science*, 278:138-141 (1997)。

【 0 0 0 5 】

これら TNF レセプターファミリーメンバーの多くは、細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域を含む細胞表面レセプターの典型的な構造を共有しており、一方、他のメンバーは膜貫通領域と細胞内ドメインを欠いた可溶性タンパク質として天然にみられる。典型的な TNFR の細胞外部位には、NH₂-末端から始まる複数のシステインリッチドメイン(CRD)の反復性のアミノ酸配列パターンを含有する。

Apo-2L または TRAIL と称されるリガンドはサイトカインの TNF ファミリのメンバーとして数年前に同定された。[例えば Wiley ら, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti ら, *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996); 国際公開公報97/01633; 国際公開公報97/25428; 1998年6月9日発行の米国特許第5,763,223号; 2001年9月4日発行の米国特許第6284236を参照]。完全長天然配列ヒト Apo2L/TRAIL ポリペプチドは 281 アミノ酸長の I I 型膜貫通タンパク質である。ある細胞は、ポリペプチドの細胞外領域の酵素切断によって、そのポリペプチドの天然の可溶型を生じうる [Mariani ら, *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)]。Apo2L/TRAIL の可溶型の結晶学的研究は TNF 及び他の関連タンパク質の構造に類似したホモ三量体構造を明らかにする [Hymowitz ら, *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Cha 等, *Immunity*, 11:253-261 (1999); Mongkolsapaya 等, *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999); Hymowitz 等, *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)]。しかし、他の TNF ファミリーメンバーとは異なり、Apo2L/TRAIL は、(ホモ三量体の各サブユニットの位置 230 の) 3 つのシステイン残基が併せて亜鉛原子を配位しており、亜鉛の結合が三量体の安定性と生物学的活性のために重要であるという独特の構造的特徴を有していることが分かった。[上掲の Hymowitz ら; Bodmer ら, *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)]。

【 0 0 0 6 】

Apo2L/TRAIL は関節リウマチなどの自己免疫性疾患を含む、免疫系の調節において働きうるということが文献で報告されている [例として、Thomas 等, *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen 等, *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith 等, *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song 等, *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000) を参照]。

また、Apo2L/TRAIL の可溶型は大腸、肺、乳房、前立腺、膀胱、腎臓、卵巣及び脳腫瘍を含む様々な癌細胞並びに黒色腫、白血病、及び多発性骨髄腫においてアポトーシスを誘導することが報告されている [例えば、上掲の Wiley ら; 上掲の Pitti ら; 2000年2月29日発行の米国特許第6,030,945号; 2004年6月8日発行の米国特許第6,746,668号; Rieger 等, *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi 等, *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak 等, *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane 等, *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani 等, *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu 等, *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000) を参照のこと]。マウス腫瘍モデルでのインビボ研究は、Apo2L/TRAIL が、単独で又は化学療法や放射線療法と組み合わせて、実質的な抗腫瘍効果を生じうることを示唆している [例えば上掲の

10

20

30

40

50

Ashkenaziら；上掲のWalczakら；Gliniakら，*Cancer Res.*，59:6153-6158 (1999)；上掲のChinnaiyanら；Rothら，*Biochem. Biophys. Res. Comm.*，265:1999 (1999)；PCT出願 US/00/15512；PCT出願 US/01/23691を参照のこと]。多くのタイプの癌細胞とは対照的に、殆どの正常なヒト細胞タイプはApo2L/TRAILのある種の組換え形態によるアポトーシスの誘導に対して耐性があるように思われる[上掲のAshkenaziら；上掲のWalczakら]。Jo等はApo2L/TRAILのポリヒスチジンタグ可溶型が正常な単離された非ヒトではなくヒト肝細胞においてインビトロにてアポトーシスを誘導したことを報告している[Jo等，*Nature Med.*，6:564-567 (2000)；またNagata，*Nature Med.*，6:502-503 (2000)を参照のこと]。ある種の組換えApo2L/TRAIL調製物は、例えばタグ分子の有無、亜鉛含有量、及び三量体の含有%に応じて、罹患細胞対正常細胞に対する生化学的性質及び生物学的活性に関して変動しうると考えられている。[Lawrence等，*Nature Med.*，Letter to the Editor，7:383-385 (2001)；Qin等，*Nature Med.*，Letter to the Editor，7:385-386 (2001)]。

【0007】

Apo2L/TRAILは、少なくとも5つの異なるレセプターに結合することが明らかとなった。Apo2L/TRAILに結合するそのレセプターの少なくとも2つは、機能的な細胞質ドメインを含有している。そのあるレセプターは「DR4」(あるいはTR4またはTRAIL-R1)と称されている(Pan等，*Science*，276:111-113 (1997)；また、1998年7月30日公開の国際公開公報98/32856；1999年7月29日公開の国際公開公報99/37684；2000年12月7日公開の国際公開公報00/73349；2002年8月13日発行の米国特許第6,433,147号；2002年10月8日発行の米国特許第6,461,823号および2002年1月29日発行の米国特許第6,342,383号)。

Apo2L/TRAILの他のレセプターはDR5と称されている(あるいはApo-2；TRAIL-RまたはTRAIL-R2、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2またはKILLERとも称されている)(例として、Sheridan等，*Science*，277:818-821 (1997)、Pan等，*Science*，277:815-818 (1997)、1998年11月19日公開の国際公開公報98/51793；1998年9月24日公開の国際公開公報98/41629；Screaton等，*Curr. Biol.*，7:693-696 (1997)；Walczak等，*EMBO J.*，16:5386-5387 (1997)；Wu等，*Nature Genetics*，17:141-143 (1997)；1998年8月20日発行の国際公開公報98/35986；1998年10月14日発行の欧州特許第870,827号；1998年10月22日公開の国際公開公報98/46643；1999年1月21日公開の国際公開公報99/02653；1999年2月25日公開の国際公開公報99/09165；1999年3月11日公開の国際公開公報99/11791；2002年8月13日公開の米国特許公開2002/0072091；2001年12月7日公開の米国特許公開2002/0098550；2001年12月6日発行の米国特許第6,313,269号；2001年8月2日公開の米国特許公開2001/0010924；2003年7月3日公開の米国特許公開2003/01255540；2002年10月31日公開の米国特許公開2002/0160446、2002年4月25日公開の米国特許公開2002/0048785；2002年2月発行の米国特許第6,342,369号；2003年5月27日発行の米国特許第6,569,642号、2000年6月6日発行の米国特許第6,072,047号、2003年11月4日発行の米国特許第6,642,358号；2004年6月1日発行のIS 6,743,625を参照)。DR4と同様に、DR5は細胞質ドメインを含有し、リガンド結合時(またはリガンドの活性を擬態するアゴニスト抗体などの分子の結合時)にアポトーシスをシグナル伝達することができることが報告された。Apo-2L/TRAILとDR5とで形成される複合体の結晶構造はHymowitz等，*Molecular Cell*，4:563-571 (1999)に記載されている。

【0008】

リガンドが結合すると、DR4とDR5はともに、FADD/Mort1と称されるドメイン含有アダプター分子を介してアポトーシスインヒビターであるカスパーゼ8を増加または活性化することによって独立してアポトーシスを引き起こしうる[Kischkel等，*Immunity*，12:611-620 (2000)；Sprick等，*Immunity*，12:599-609 (2000)；Bodmer等，*Nature Cell Biol.*，2:241-243 (2000)]。

また、Apo2L/TRAILはDcR1、DcR2およびOPGと称されるレセプターに結合することが報告されている。そのレセプター等はシグナル伝達のトランスデュ

10

20

30

40

50

サーというよりもインヒビターとして機能すると思われる。(例えば、DCR1 (TRID、LITまたはTRAIL-R3とも称される) [Pan 等, *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan 等, *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane 等, *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider 等, *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti 等, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); およびMongkolsapaya 等, *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998); DCR2 (TRUNDDまたはTRAIL-R4とも称される) [Marsters 等, *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan 等, *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti 等, *Immunity*, 7:813-820 (1997)], およびOPG [Simonet 等, *supra*]. DR4 および DR5 に反して、DCR1 および DCR2 レセプターはアポトーシスをシグナル伝達しない。

【0009】

DR4 および / または DR5 レセプターに結合する特定の抗体が文献で報告されている。例えば、DR4 レセプターに対するものであり、特定の哺乳動物細胞の拮抗的ないしはアポトーシス的な活性を有する抗DR4抗体は、例として、1999年7月29日公開の国際公開公報99/37684; 2000年7月12日公開の国際公開公報00/73349; 2003年8月14日公開の国際公開公報03/066661に記載されている。例として、Griffith 等, *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Chuntharapai 等, *J. Immunol.*, 166:4891-4898 (2001); 2002年12月2日公開の国際公開公報02/097033; 2003年5月22日公開の国際公開公報03/042367; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/038043; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/037913も参照のこと。特定の抗DR5抗体も同様に記載されている。例として、1998年11月8日公開の国際公開公報98/51793; Griffith 等, *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Ichikawa 等, *Nature Med.*, 7:954-960 (2001); Hylander 等, "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Abstract, 2d International Congress on Monoclonal Antibodies in Cancers, Aug. 29-Sept. 1, 2002, Banff, Alberta, Canada; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/038043; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/037913を参照のこと。さらに、DR4 と DR5 レセプターの両方と交差反応する特定の抗体が記載されている(例として、2001年6月26日発行の米国特許第6,252,050号を参照)。

【0010】

場合によっては、哺乳動物細胞の中には、腫瘍性形質転換がシアリルルイスA およびシアリルルイスX 抗原の発現の特徴的な変化と関連しているものもある。例えば、大腸、膵臓および胃のヒトの腺癌には相対的に高い量のシアリルルイスA / X が存在することがあり、抗原の糖鎖構造に対する抗体を用いたアッセイによって膵臓癌および消化器癌が検出されている(例として、Ugorski 等, *Acta Biochimica Polonica*, 49:2:303-311 (2002)を参照)。また、糖質腫瘍マーカーの発現レベルは、臨床症状、患者生存期間および転移性疾患の指標と相関がある。

シアリルルイスA およびシアリルルイスX はともに、セレクチンと称される、血流からの細胞の管外遊出に伴う炭水化物-結合タンパク質のファミリーと結合することが示されている。シアリルルイスA およびX がEセレクチンのリガンドであって、内皮へのヒト癌細胞の吸着の原因となりうるということがいくつかの報告に示唆されている。癌細胞の表面に存在するシアル酸付加ルイス構造は、糖タンパク質および糖脂質の糖鎖によって付加され、内皮細胞に存在するEセレクチンを結合する。したがって、セレクチンおよびそれらの糖質リガンドは、転移の間、腫瘍細胞の選択的なホーミングに重要な役割を果たしうる。

シアリルルイスA およびX の生合成は、 α -1,3/1,4-フコシルトランスフェラーゼ(α -1,3/1,4 Fuc-T, FUT)によって触媒される工程である、細胞の種類に特異的かつ発生時期に特異的な酵素によるシアル酸付加前駆物質に結合した(1,3)および(1,4)のグアノシンリン酸-フコース(GDP-Fuc)からのフコースの最終的な添加に依存していると考えられている。

【0011】

現在までに様々なヒトフコシルトランスフェラーゼ遺伝子がクローニングされ、特徴付けられている。これらの遺伝子(FUT 3-7)の発現とその酵素産生物(Fuc-TIII-VII)は組織

10

20

30

40

50

特異的にみられる。5つの遺伝子によってコードされる酵素は、FUTIII、FUTIV、FUTV、FUTVIおよびFUTVIIと称される。FUTIII、FUTVおよびFUTVIをコードする3つの遺伝子は第19染色体p13.3上の物理的に近接した位置に局在する。生化学および分子クローニング研究により、シアリルルイスA/X分子の系統特異的な発現は、-1,3-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の系統特異的な発現によって決定されることが示唆される。この-1,3-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の酵素産物は恒常的に発現されるオリゴ糖前駆物質に作用して、表面に局在するシアリルルイスA/X決定基をもたらす。上皮性組織での活性を担うヒトフコシルトランスフェラーゼはFUT3およびFUT6である。FUT3 [ルイス(1,3/1,4)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子とも称される]およびFUT6 [プラズマ(1,3)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子]転写産物は正常組織にも形質転換組織にも存在する。また、フコシルトランスフェラーゼ転写産物は、一般的には多くの腺癌細胞株、特に大腸癌ではFUT3およびFUT6が高く発現される。(例として、Ugorski等, *Acta Biochimica Polonica*, 49:303-311 (2002); Nakamori等, *Dis. Colon Rectum*, 40:420-431 (1997); Takada等, *Cancer Res.*, 53:354-361 (1993); Ichikawa等, *J. Surg. Oncol.*, 75:98-102 (2000)); Nakagoe等, *J Exp Clin Cancer Res.*, 2002 Mar;21(1):107-13; Matsumoto等, *Br J Cancer*, 2002 Jan 21;86(2):161-7; Ito等, *J Gastroenterol.* 2001 Dec;36(12):823-9; Nakagoe等, *Cancer Detect Prev.* 2001;25(3):299-308; Kumamoto等, *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4620-7; Murata等, *Dis Colon Rectum*, 2001 Apr;44(4):A2-A4; Nakagoe等, *J Exp Clin Cancer Res.* 2001 Mar;20(1):85-90; Nakagoe等, *J Gastroenterol.* 2001 Mar;36(3):166-72; Nakagoe等, *Tumour Biol.* 2001 Mar-Apr;22(2):115-22; Nakagoe等, *Can J Gastroenterol.* 2000 Oct;14(9):753-60; Izawa等, *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1410-6; Tanaka等, *Hepatogastroenterology.* 1999 Mar-Apr;46(26):875-82; Matsushita等, *Cancer Lett.* 1998 Nov 27;133(2):151-60; Sato等, *Anticancer Res.* 1997 Sep-Oct;17(5A):3505-11; Yamada等, *Br J Cancer.* 1997;76(5):582-7; Nakamori等, *Dis Colon Rectum.* 1997 Apr;40(4):420-31; Srinivas等, *Scand J Immunol.* 1996 Sep;44(3):197-203; Matsushita等, *Lab Invest.* 1990 Dec;63(6):780-91; Ashizawa等, *J Exp Clin Cancer Res.* 2003 Mar;22(1):91-8; Nakagoe等, *J Exp Clin Cancer Res.* 2002 Sep;21(3):363-9; Nakagoe等, *Anticancer Res.* 2002 Jan-Feb;22(1A):451-8; Nakagoe等, *J Clin Gastroenterol.* 2002 Apr;34(4):408-15; Nakagoe等, *Cancer Lett.* 2002 Jan 25;175(2):213-21; Tatsumi等, *Clin Exp Metastasis.* 1998 Nov;16(8):743-50; Ikeda等, *J Surg Oncol.* 1996 Jul;62(3):171-6; Ikeda等, *Eur J Surg Oncol.* 1995 Apr;21(2):168-75; Togayachi等, *Int J Cancer.* 1999 Sep 24;83(1):70-9; Satoh等, *Clin Cancer Res.* 1997 Apr;3(4):495-9; Satoh等, *Respiration.* 1998;65(4):295-8; Satoh等, *Anticancer Res.* 1998 Jul-Aug;18(4B):2865-8; Fukuoka等, *Lung Cancer.* 1998 May;20(2):109-16; Fujiwara等, *Anticancer Res.* 1998 Mar-Apr;18(2A):1043-6; Ogawa等, *Int J Cancer.* 1997 Apr 22;74(2):189-92; Ogawa等, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Aug;108(2):329-36; Asao等, *Cancer.* 1989 Dec 15;64(12):2541-5; Narita等, *Breast Cancer.* 1996 Mar 29;3(1):19-23; Yamaguchi等, *Oncology.* 1998 Jul-Aug;55(4):357-62; Sikut等, *Int J Cancer.* 1996 May 29;66(5):617-23; Saito等, *Anticancer Res.* 2003 Jul-Aug;23(4):3441-6; Fujii等, *Urol Int.* 2000;64(3):129-33; Idikio等, *Glycoconj J.* 1997 Nov;14(7):875-7; Inoue等, *Obstet Gynecol.* 1992 Mar;79(3):434-40; Yamashita等, *Eur J Cancer.* 2000 Jan;36(1):113-20; Hamanaka等, *Pancreas.* 1996 Aug;13(2):160-5; Ho等, *Cancer Res.* 1995 Aug 15;55(16):3659-63.を参照のこと)。

【 0 0 1 2 】

(発明の概要)

本明細書に開示される発明は、哺乳動物組織または細胞試料における一ないし複数のバイオマーカーの発現を検査する方法およびアッセイを提供するものであり、この一ないし複数のバイオマーカーの発現により該組織または細胞試料がApoptosis/TRAAILおよび抗DR5アゴニスト抗体などのアポトーシス誘導剤に対して感受性があるか否かを予測

10

20

30

40

50

するものである。本発明の様々な実施態様では、該方法およびアッセイは、特定のフコシルトランスフェラーゼ、特にフコシルトランスフェラーゼ3 (FUT3) および/またはフコシルトランスフェラーゼ6 (FUT6)、並びにシアリルルイスA および/またはX抗原などのバイオマーカーの発現を検査するものである。

上記のように、正常なヒト細胞種類の多くは、Apo2L/TRAILの特定の組み換え型によるアポトーシス誘導に抵抗性を示す(上掲のAshkenazi等; 上掲のWalczak等)。また、罹患したヒト細胞種類のあるもの(ある種の癌細胞)もApo2L/TRAILの特定の組み換え型によるアポトーシス誘導に抵抗性を示すことが明らかとされている(上掲のAshkenazi等, J. Clin. Invest., 1999; 上掲のWalczak等, Nature Med., 1999)。したがって、アッセイによって特定のバイオマーカーの発現について哺乳動物組織または細胞試料を検査することによって、治療する患者にとって適切ないしは効果的な治療法を判断する際の有効な情報を簡便にかつ効率よく得ることができる。例えば、哺乳動物組織または細胞試料におけるFUT3またはFUT6発現を検出するためのアッセイから得られた情報により、医師は、癌などの疾患を患っている患者にとって適切な治療計画を決定するために用いることができる有用なデータを得ることができる。

【0013】

本発明は、Apo2L/TRAILまたはデスレセプターアゴニスト抗体に対する哺乳動物組織または細胞試料(例えば癌細胞)の感受性を予測する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、哺乳動物組織または細胞試料を採取し、フコシルトランスフェラーゼ3またはフコシルトランスフェラーゼ6の発現について該組織または細胞を検査することを含む。また、前記方法は、シアリルルイスA および/またはX抗原などの他のバイオマーカーの発現について該組織または細胞を検査することを含んでもよい。前記方法は、mRNA発現を検出するアッセイ、酵素活性の存在を検出する酵素アッセイ、免疫組織化学的なアッセイおよび本明細書に記載の他のアッセイを含む、様々なアッセイ様式で行われうる。そのような組織または細胞がApo2L/TRAILおよび/またはデスレセプター抗体のアポトーシス誘導活性に対して感受性であることが、前記組織または細胞におけるそれらのバイオマーカーの発現の決定により予測されうる。任意の実施態様では、前記組織または細胞は、DR4、DR5、DcR1またはDcR2レセプターについても検査されうる。

【0014】

本発明の更なる方法には、哺乳動物組織または細胞試料を採取し、フコシルトランスフェラーゼ3、フコシルトランスフェラーゼ6、シアリルルイスA および/またはX抗原(一ないし複数)などの一ないし複数のバイオマーカーの発現について該組織または細胞を検査し、該組織または細胞試料が該一ないし複数のバイオマーカーを発現するかを決定し、有効量のApo2L/TRAILまたはデスレセプターアゴニスト抗体に該組織または細胞試料を曝す工程を含む、哺乳動物組織または細胞試料のアポトーシスを誘導する方法が含まれる。一ないし複数のバイオマーカーの発現を検査するための方法にある工程は、mRNA発現を検出するアッセイ、酵素活性の存在を検出する酵素アッセイおよび免疫組織化学的なアッセイを含む、様々なアッセイ様式で行われうる。任意の実施態様では、前記方法は、前記組織または細胞をDR4、DR5、DcR1またはDcR2レセプターの発現についても検査することを含む。場合によっては、前記組織または細胞試料には癌組織または癌細胞が含まれる。

本発明の更なる方法には、免疫関連疾患や癌などの哺乳動物から組織または細胞試料を採取し、フコシルトランスフェラーゼ3、フコシルトランスフェラーゼ6、シアリルルイスA および/またはX抗原(一ないし複数)などの一ないし複数のバイオマーカーの発現について該組織または細胞を検査し、該組織または細胞試料が該一ないし複数のバイオマーカーを発現するかを決定し、有効量のApo2L/TRAILまたはデスレセプターアゴニスト抗体を該哺乳動物に投与する工程を含む、免疫関連疾患や癌などの哺乳動物の疾患の治療方法が含まれる。一ないし複数のバイオマーカーの発現を検査するための方法にある工程は、mRNA発現を検出するアッセイ、酵素活性の存在を検出する酵素アッセイお

10

20

30

40

50

よび免疫組織化学的なアッセイを含む、様々なアッセイ様式で行われうる。任意の実施態様では、前記方法は、前記組織または細胞試料をDR4、DR5、DcR1またはDcR2レセプターの発現についても検査することを含む。場合によっては、前記方法は哺乳動物の癌を治療することを含む。場合によっては、前記方法は、有効量のAp o 2 L / T R A I Lおよび/またはデスレセプターアゴニスト抗体の投与に加えて、化学療法剤又は放射線療法が前記哺乳動物に投与されることを含む。

【0015】

更なる実施態様は、以下の特許請求の範囲により具体的に開示される：

1．哺乳動物の組織または細胞試料のAp o 2 L / T R A I Lへの感受性を予測する方法であって、

10

哺乳動物組織または細胞試料を採取し、

該組織または細胞試料を検査して、フコシルトランスフェラーゼ3、フコシルトランスフェラーゼ6、シアリルルイスAおよび/またはX抗原(一ないし複数)からなる群から選択される一ないし複数のバイオマーカーの発現を検出し、該組織または細胞試料がAp o 2 L / T R A I Lのアポトーシス誘導活性に感受性があることが該一ないし複数のバイオマーカーの発現により予測される工程を含む方法。

2．前記一ないし複数のバイオマーカーの発現がフコシルトランスフェラーゼ3またはフコシルトランスフェラーゼ6のmRNA発現を検出することによって検査されるものである、請求項1に記載の方法。

3．前記一ないし複数のバイオマーカーの発現がシアリルルイスAおよび/またはX抗原(一ないし複数)の発現を検出するための免疫組織化学的な方法によって検査されるものである、請求項1に記載の方法。

20

4．さらに、前記組織または細胞試料中のDR4、DR5、DcR1またはDcR2レセプターの発現を検査する工程を含む、請求項1に記載の方法。

5．前記組織または細胞試料が癌組織または癌細胞が含まれる、請求項1に記載の方法。

6．前記癌細胞が、大腸、結腸直腸、消化管または膵臓の癌細胞または組織である、請求項5に記載の方法。

7．哺乳動物組織または細胞試料のアポトーシスを誘導する方法であって、

哺乳動物組織または細胞試料を採取し、

フコシルトランスフェラーゼ3、フコシルトランスフェラーゼ6、シアリルルイスAおよび/またはX抗原(一ないし複数)からなる群から選択される一ないし複数のバイオマーカーの発現を検出するために、該組織または細胞試料を検査し、その後、該一ないし複数のバイオマーカーの発現を検出し、有効量のAp o 2 L / T R A I Lに該組織または細胞試料を曝す工程を含む方法。

30

8．前記一ないし複数のバイオマーカーの発現がフコシルトランスフェラーゼ3またはフコシルトランスフェラーゼ6のmRNA発現を検出することによって検査されるものである、請求項7に記載の方法。

9．前記一ないし複数のバイオマーカーの発現がシアリルルイスAおよび/またはX抗原(一ないし複数)の発現を検出するための免疫組織化学的な方法によって検査されるものである、請求項7に記載の方法。

40

10．さらに、前記組織または細胞試料中のDR4、DR5、DcR1またはDcR2レセプターの発現を検査する工程を含む、請求項7に記載の方法。

11．前記組織または細胞試料に癌組織または癌細胞が含まれる、請求項7に記載の方法。

12．前記癌細胞が、大腸、結腸直腸、消化管または膵臓の癌細胞または組織である、請求項11に記載の方法。

13．前記細胞が、図1のアミノ酸114-281を含有するAp o 2 L / T R A I Lポリペプチドの有効量に曝される、請求項7に記載の方法。

14．哺乳動物の免疫関連疾患または癌などの疾患の治療方法であって、

該哺乳動物から組織または細胞試料を採取し、

50

フコシルトランスフェラーゼ 3、フコシルトランスフェラーゼ 6、シアリルルイス A および / または X 抗原 (一ないし複数) からなる群から選択される一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現を検出するために、該組織または細胞試料を検査し、

その後、該一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現を検出し、有効量の A p o 2 L / T R A I L が該哺乳動物に投与される工程を含む方法。

15. 前記一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現がフコシルトランスフェラーゼ 3 またはフコシルトランスフェラーゼ 6 の m R N A 発現を検出することによって検査されるものである、請求項 14 に記載の方法。

16. 前記一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現がシアリルルイス A および / または X 抗原 (一ないし複数) の発現を検出するための免疫組織化学的な方法によって検査されるものである、請求項 14 に記載の方法。

17. さらに、前記組織または細胞試料中の D R 4、D R 5、D c R 1 または D c R 2 レセプターの発現を検査する工程を含む、請求項 14 に記載の方法。

18. 前記組織または細胞試料に癌組織または癌細胞が含まれる、請求項 14 に記載の方法。

19. 前記癌細胞または癌組織に、大腸、結腸直腸、消化管または膵臓の癌細胞または組織が含まれる、請求項 18 に記載の方法。

20. 図 1 のアミノ酸 114 - 281 を含有する A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドの有効量が前記哺乳動物に投与される、請求項 14 に記載の方法。

21. また、化学療法剤 (一ないし複数) または放射線療法が前記哺乳動物に投与される、請求項 14 に記載の方法。

22. また、サイトカイン、細胞障害性剤又は成長阻害剤が前記哺乳動物に投与される、請求項 14 に記載の方法。

23. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドがポリエチレングリコール分子に結合している、請求項 7 に記載の方法。

24. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドがポリエチレングリコール分子に結合している、請求項 14 に記載の方法。

25. 前記癌細胞が大腸または結腸直腸の癌細胞である、請求項 6 に記載の方法。

26. 前記 A p o 2 L / T R A I L が、図 1 (配列番号: 1) のアミノ酸 41 - 281 ないしはその生物学的に活性な断片を含有してなるポリペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

27. 前記 A p o 2 L / T R A I L が図 1 (配列番号: 1) のアミノ酸 114 - 281 を含有してなるポリペプチドである、請求項 26 に記載の方法。

28. 前記癌細胞が大腸または結腸直腸の癌細胞である、請求項 12 に記載の方法。

29. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドが図 1 (配列番号: 1) のアミノ酸 114 - 281 からなる、請求項 20 に記載の方法。

30. 哺乳動物の大腸または結腸直腸の癌細胞の A p o 2 L / T R A I L への感受性を予測する方法であって、

哺乳動物の大腸または結腸直腸の癌細胞を採取し、

該癌細胞を検査して、フコシルトランスフェラーゼ 3、フコシルトランスフェラーゼ 6、

シアリルルイス A および / または X 抗原 (一ないし複数) からなる群から選択される一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現を検出し、該癌細胞が A p o 2 L / T R A I L のアポトーシス誘導活性に感受性があることが該一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現により予測される工程を含む方法。

31. 哺乳動物の大腸または結腸直腸の癌細胞のアポトーシスを誘導する方法であって、

哺乳動物の大腸または結腸直腸の癌細胞を採取し、

フコシルトランスフェラーゼ 3、フコシルトランスフェラーゼ 6、シアリルルイス A およ

び / または X 抗原 (一ないし複数) からなる群から選択される一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現を検出するために、該癌細胞を検査し、

その後、該一ないし複数のバイオマーカ

ーの発現を検出し、

10

20

30

40

50

有効量の A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドに該癌細胞を曝す工程を含む方法。

32. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドが、図 1 (配列番号: 1) のアミノ酸 4 1 - 2 8 1 ないしはアポトーシス活性を有するその断片を含有してなる、請求項 3 1 に記載の方法。

33. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドがポリエチレングリコール分子に結合している、請求項 3 2 に記載の方法。

34. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドが図 1 (配列番号: 1) のアミノ酸 1 1 4 - 2 8 1 を含有してなるものである、請求項 3 2 に記載の方法。

35. 哺乳動物の大腸癌または結腸直腸癌の治療方法であって、
該哺乳動物から大腸または結腸直腸の癌細胞試料を採取し、
フコシルトランスフェラーゼ 3、フコシルトランスフェラーゼ 6、シアリルルイス A および / または X 抗原 (一ないし複数) からなる群から選択される一ないし複数のバイオマーカーの発現を検出するために、該癌細胞試料を検査し、
その後、該一ないし複数のバイオマーカーの発現を検出し、
有効量の A p o 2 L / T R A I L が該哺乳動物に投与される工程を含む方法。

10

36. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドが、図 1 (配列番号: 1) のアミノ酸 4 1 - 2 8 1 ないしはアポトーシス活性を有するその断片を含有してなる、請求項 3 5 に記載の方法。

37. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドがポリエチレングリコール分子に結合している、請求項 3 6 に記載の方法。

20

38. 前記 A p o 2 L / T R A I L ポリペプチドが図 1 (配列番号: 1) のアミノ酸 1 1 4 - 2 8 1 を含有してなるものである、請求項 3 6 に記載の方法。

【 0 0 1 6 】

(発明の詳細な記載)

本明細書中に記載または参照の技術および手順は一般的に十分理解されるものであり、例えば Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載の広く利用される分子クローニング方法論などの、当分野の技術者による従来の方法論を用いて通常行われるものである。好ましくは、市販のキットや試薬の使用を伴う手順は、特に明記しない限り、プロトコールおよび / またはパラメータを定義する製造者に従って一般的に行われる。

30

本方法やアッセを開示する前に、本発明は、ここに記載の特定の метод論、プロトコール、細胞株、動物種や属、コンストラクトおよび試薬に限定されるものではなく、変更されてもよいことを理解されたい。また、本明細書中で用いる用語は特定の実施態様のみを開示するためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の権利範囲を限定するものでないことを理解されたい。

【 0 0 1 7 】

本明細書で用いられるおよび添付の特許請求の範囲中の単数形「a」、「and」および「the」には、明らかな記載がない限り複数形も含まれる。ゆえに、例えば「一般的な変更」なる用語にはは複数の変更が含まれ、「プローブ」なる用語は一ないし複数のプローブおよび当分野の技術者に公知のその等価物および前述のものを言及する。

40

本明細書中で引用するすべての出版物は、該出版物が引用される方法および / または材料を開示および記載するために、出典明記によって本明細書中に組み込まれる。本明細書中で引用する出版物は、本出願の提出日前の開示について言及するものである。発明者等は、早い優先日またはより前の発明日のために先行する出版物に権利が与えられないことが認められると解釈されるものではない。さらに、実際の出版日は明記されているものと異なり、個々に検証が必要であろう。

【 0 0 1 8 】

I. 定義

【 0 0 1 9 】

50

「Apo2L/TRAIL」、「Apo-2L」、及び「TRAIL」という用語は、
 図1に示されたアミノ酸配列のアミノ酸残基114-281、95-281、残基92-2
 81、残基91-281、残基41-281、残基15-281、又は残基1-281、並び
 に上記配列の生物活性な断片、欠失、挿入又は置換変異体を含むポリペプチド配列を称す
 るために、ここでは使用される。一実施態様において、ポリペプチド配列は、図1の残基
 114-281を含み、場合によっては図1の残基114-281からなる。場合によっ
 ては、ポリペプチド配列は、図1の残基92-281又は残基91-281を有する。Apo
 -2Lポリペプチドは、図1に示す天然のヌクレオチド配列によりコードされ得る。場合
 によっては、残基Pro119(図1)をコードするコドン、「CCT」又は「CCG」
 であってよい。他の一実施態様では、断片又は変異体は生物学的に活性であり、列挙され
 たApo2L/TRAIL配列の何れかと、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、
 より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、そして更により好ましくは少なくとも
 95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する。場合によっては、A
 po2L/TRAILポリペプチドは、図1にて提供されるコード化ポリヌクレオチド配
 列と、ストリンジェントな条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列によりコード
 される。本定義は、少なくとも一の天然アミノ酸がアラニン残基によって置換された、A
 po2L/TRAILの置換変異体を包含する。Apo2L/TRAILの特定の置換変
 異体は、少なくとも一のアミノ酸がアラニン残基で置換されたものを包含する。これらの
 置換変異体には、例えば「D203A」；「D218A」及び「D269A」として同定
 されているものが含まれる。この命名は、(図1に示されるの番号を用いて)位置203、
 218及び/又は269で、アスパラギン酸残基がアラニン残基によって置換された、A
 po2L/TRAIL変異体を同定するのに使用される。場合によっては、Apo2L
 変異体はPCT出願国際公開第01/00832号に公開された表1に列挙されている、一
 又は複数のアラニン置換基を含有していてもよい。置換変異体には、2001年1月4日
 に公開されている国際公開第01/00832号の表1において同定されている、一又は
 複数の残基置換が含まれる。また本定義は、組換え又は合成法により調製されるか、又は
 Apo2L/TRAIL供給源から単離された、天然配列Apo2L/TRAILも包含
 する。本発明のApo2L/TRAILには、PCT出願国際公開第97/25428号
 及び国際公開第97/01633号に開示されたApo2L/TRAIL又はTRAIL
 と称されるポリペプチドも含まれる。「Apo2L/TRAIL」又は「Apo2L」な
 る用語は、一量体、二量体又は三量体形態のポリペプチドを含む、Apo2L/TRAIL
 形態のものを一般的に称するために使用される。特に記載しない限りは、Apo2Lに
 記載されているアミノ酸残基の全てのナンバリングが、図1のナンバリングに使用されて
 いる。例えば「D203」又は「Asp203」は、図1に付与された配列の位置203
 にあるアスパラギン酸残基を意味する。

【0020】

「Apo2L/TRAIL細胞外ドメイン」又は「Apo2L/TRAIL ECD」
 なる用語は、膜貫通及び細胞質ドメインが本質的にないApo2L/TRAILの形態を
 称する。通常、ECDはこのような膜貫通及び細胞質ドメインを1%未満、好ましくはこ
 のようなドメインを0.5%未満有している。本発明のポリペプチドとして同定される任
 意の膜貫通ドメイン(類)は、疎水性ドメインのタイプのもを同定するのに、当該分野で
 常套的に使用されている基準に従い同定されると理解されるであろう。膜貫通ドメインの
 正確な境界は多様であるが、多くの場合は、最初同定されたドメインのいずれかの末端に
 おいて、約5アミノ酸を超えないと思われる。好ましい実施態様において、ECDは、膜
 貫通及び細胞質又は細胞内ドメインのない(膜に結合していない)ポリペプチドの、可溶性
 の細胞外ドメイン配列からなる。Apo-2L/TRAILの特定の細胞外ドメインは、
 PCT出願国際公開第97/01633号及び国際公開第97/25428号に記載され
 ている。

「Apo2L/TRAIL単量体」又は「Apo2L単量体」なる用語は、Apo2L
 の細胞外ドメイン配列の共有鎖を称する。

10

20

30

40

50

「Apo2L/TRAIL二量体」又は「Apo2L二量体」なる用語は、ジスルフィド結合を介して共有結合に連結した2つのApo-2Lモノマーを称する。ここで使用される場合の用語には、独立したApo2L二量体、及び三量体形態のApo2L内にある二量体(すなわち、互いに結合した、第2のApo2L単量体)が含まれる。

「Apo2L/TRAIL三量体」又は「Apo2L三量体」なる用語は、非共有結合している3つのApo2L単量体を称する。

「Apo2L/TRAIL凝集体」なる用語は、自己結合した高級オリゴマー性形態のApo2L/TRAIL、例えばApo2L/TRAIL三量体、さらには六量体及びナノ量体(nanomeric)の形態のApo2L/TRAILを形成するものを称するために使用する。Apo2L/TRAIL単量体、二量体又は三量体(又は他の凝集体)の存在性及び量の決定は、当該分野で公知の方法及びアッセイ(市販されている物質を使用)、例えば天然サイズ排除HPLC(「SEC」)、ドデシル硫酸ナトリウムを使用する変性サイズ排除(「SDS-SEC」)、逆相HPLC、キャピラリー電気泳動によりなされ得る。

【0021】

「Apo-2リガンドレセプター」は、当分野では、図2及び3それぞれに示すポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を有する「DR4」及び「DR5」として称されるレセプターを含む。Panらにより、「DR4」と呼ばれるTNFレセプターファミリーのメンバーが開示されている(Pan等, Science, 276:111-113, 1997年; また、1998年7月30日公開のWO98/32856; 1999年7月29日公開の国際公報99/37684; 2000年12月7日公開の国際公報00/73349; 2002年8月13日発行の米国特許第6,433,147号; 2002年10月8日発行の米国特許第6,461,823号及び、2002年1月29日発行の米国特許第6,342,383号を参照)。Sheridan等によるScience, 277:818-821(1997年)およびPan等によるScience, 277:815-818(1997年)には、Apo2L/TRAILの他のレセプターが開示されている(1998年1月19日公開の国際公報98/51793; 1998年9月24日公開の国際公報98/41629も参照)。このレセプターはDR5と称される(あるいは、該レセプターはApo-2; TRAIL-R、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2またはKILLERとも称される; Sreaton等, Curr. Biol., 7:693-696, 1997年; Walczak等, EMBO J., 16:5386-5387, 1997年; Wu等, Nature Genetics, 17:141-143, 1997年; 1998年8月20日公開の国際公報98/35986; 1998年10月14日公開の欧州特許第870,827号; 1998年10月22日公開の国際公報98/46643; 1999年1月21日公開の国際公報99/02653; 1999年2月25日公開の国際公報99/09165; 1999年3月11日公開の国際公報99/11791; 2002年8月13日公開の米国公開特許2002/0072091; 2001年12月7日公開の米国公開特許2002/0098550; 2001年12月6日発行の米国特許第6,313,269号; 2001年8月2日公開の米国公開特許2001/0010924; 2003年7月3日公開の米国公開特許2003/01255540; 2002年10月31日公開の米国公開特許2002/0160446、2002年4月25日公開の米国公開特許2002/0048785; 2003年5月27日発行の米国特許第6,569,642号; 2000年6月6日発行の米国特許第6,072,047号; 2003年11月4日発行の米国特許第6,642,358号参照)。上記のように、Apo-2Lの他のレセプターはDcR1、DcR2及びOPGを含む(Sheridan等., 上掲; Marsters等., 上掲; 及びSimonet等., 上掲)。ここで用いられるところの「Apo-2Lレセプター」という用語は、天然配列レセプターとレセプター変異体を包含する。これらの用語はヒトを含む様々な哺乳動物で発現されるApo-2Lレセプターを包含する。Apo-2Lレセプターは、多くのヒト組織株で自然に起こるように内在的に発現されてもよいし、あるいは組換え又は合成方法によって発現されてもよい。「天然配列Apo-2Lレセプター」には、天然由来のApo-2Lレセプターと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。ゆえに、天然配列Apo-2Lレセプターは、任意の動物由来の天然に生じるApo-2Lレセプターのアミノ酸配列を持ちうる。そのような天然配列Apo

10

20

30

40

50

- 2 Lレセプターは、天然から単離してもよいし、組み換え又は合成手法により生成することもできる。特に、「天然配列 Apo-2 Lレセプター」なる用語は、天然に生じる切断型又は分泌型のレセプター(例えば、可溶型を含む、さらには細胞外ドメイン配列)、天然に生じる変異型(例えば、選択的スプライシング型)、及び天然に生じる対立変異型を包含する。レセプター変異型は天然配列 Apo-2 Lレセプターの断片又は欠損変異型を含みうる。図3Aは1998年11月19日公開の国際公報98/51793に公開されたヒトDR5の411アミノ酸配列を示す。ヒトDR5の転写スプライシング変異体は当分野で公知である。このDR5スプライシング変異体は、1998年8月20日に公開の国際公報98/35986に公開された図3B及び図3Cに示すヒトDR5の440アミノ酸配列をコードする。

10

【0022】

「デスレセプター抗体」は、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーであり、アポトーシスをシグナル伝達することができるデスドメインを含有するレセプターに対する抗体(一ないし複数)を一般的に意味するものであり、このような抗体にはDR5抗体およびDR4抗体が含まれる。

「DR5レセプター抗体」、「DR5抗体」又は「抗DR5抗体」とは、広義で、DR5レセプターまたはその細胞外ドメインの少なくとも一形態に結合する抗体を意味する。場合によっては、DR5抗体は異種性配列又は分子に融合又は結合する。好ましくは、異種性配列は抗体がより高次の複合体又はオリゴマー複合体を形成させる又は形成を補助する。場合によっては、DR5抗体はDR5レセプターに結合するが、任意の付加的な Apo-2 Lレセプター(例えばDR4、DcR1又はDcR2)と結合又は交差反応をしない。場合によっては、抗体はDR5シグナル伝達活性のアゴニストである。

20

場合によっては、本発明のDR5抗体は、BIACore結合アッセイの測定による約0.1 nMから約20 mMの範囲の濃度でDR5レセプターに結合する。場合によっては、本発明のDR5抗体は、BIACore結合アッセイの測定による約0.6 nMから約18 mMのIC50値を示す。

【0023】

「DR4レセプター抗体」、「DR4抗体」又は「抗DR4抗体」とは、広義で、DR4レセプターまたはその細胞外ドメインの少なくとも一形態に結合する抗体を意味する。場合によっては、DR4抗体は異種性配列又は分子に融合又は結合する。好ましくは、異種性配列は抗体がより高次の複合体又はオリゴマー複合体を形成させる又は形成を補助する。場合によっては、DR4抗体はDR4レセプターに結合するが、任意の付加的な Apo-2 Lレセプター(例えばDR5、DcR1又はDcR2)と結合又は交差反応をしない。場合によっては、抗体はDR4シグナル伝達活性のアゴニストである。

30

場合によっては、本発明のDR4抗体は、BIACore結合アッセイの測定による約0.1 nMから約20 mMの範囲の濃度でDR4レセプターに結合する。場合によっては、本発明のDR4抗体は、BIACore結合アッセイの測定による約0.6 nMから約18 mMのIC50値を示す。

「アゴニスト」なる用語は広義で用いられ、Apo2L/TRAIL、DR4ないしDR5のインビトロ、インサイツないしインビボでの一以上の生物学的活性を部分的又は完全に亢進、刺激又は活性化する任意の分子を含む。Apo2L/TRAIL、DR4ないしDR5の生物学的活性の例には、DR4又はDR5へのApo2L/TRAILの結合、アポトーシス並びに更に文献に報告されているものが含まれる。アゴニストは直接的ないし間接的形式で機能しうる。例えば、アゴニストは、レセプター活性化又はシグナル伝達を起こすDR4ないしDR5への直接的結合の結果としてのインビトロ、インサイツないしインビボでのDR4ないしDR5の一以上の生物学的活性を部分的又は完全に亢進、刺激又は活性化するために機能するかもしれない。また、アゴニストは、例えば、DR4又はDR5の活性化ないしシグナル伝達を引き起こす他のエフェクター分子を刺激する結果としてのDR4ないしDR5のインビトロ、インサイツないしインビボでの一以上の生物学的活性を部分的又は完全に亢進、刺激又は活性化するために間接的に機能するかもし

40

50

れない。アゴニストは、DR4ないしDR5の活性化ないし活性を亢進又は増強するように間接的に機能するエンハンサー分子として働きうることが考えられる。例えば、アゴニストは哺乳動物の内因性のApo-2Lの活性を亢進しうる。例えば、これはDR4ないしDR5をプレ複合体化することによって、ないし、DR4ないしDR5レセプターとのそれぞれのリガンドの複合体を安定化することによって達成することができる(Apo-2LとDR4ないしDR5との天然複合体型を安定化するなど)。

【0024】

本出願中で用いられる「バイオマーカー」なる用語は一般的に、遺伝子、タンパク質、糖質構造または糖脂質を含む分子を指し、哺乳動物組織または細胞中ないしは組織または細胞上での該分子の発現は標準的な方法(または本明細書中で開示される方法)によって検出されうるものであり、哺乳動物細胞又は組織のApo2L/TRAILないしはデスレセプター抗体への感受性を予測するものである。本発明の包含されるこのようなバイオマーカーには、限定するものではないが、「(1,3/1,4)フコシルトランスフェラーゼ」又は「FUT3」、「(1,3)フコシルトランスフェラーゼ」又は「FUT6」、「シアリルルイスA」、および「シアリルルイスX」が含まれる。場合によっては、このようなバイオマーカーの発現は、コントロール組織または細胞試料に観察されるものよりも高く測定される。場合によっては、例えば、このようなバイオマーカーの発現は、PCRまたはFACSアッセイにて、コントロール組織または細胞試料に観察されるものの少なくとも50倍、好ましくは少なくとも100倍高く測定されるであろう。場合によっては、このようなバイオマーカーの発現は、IHCアッセイにて、少なくとも2倍より高い染色強度のスコアとなることが測定されるであろう。

【0025】

「(1,3/1,4)フコシルトランスフェラーゼ」又は「FUT3」は、本明細書中に記載の構造的特徴を有する分子であり、場合によっては、ドナー基質であるGDP-フコースからGlcNAcへの3-および4-結合(FUT III-VIIおよびIX)中のアクセプター基質へのフコース残基の転移を触媒する分子を指すために本明細書中で使用する。ヒトFUT3のDNA配列およびアミノ酸配列を図4に示す。これらの配列はGenBank受託番号HSU27328と一致し、Kukowska-Latallo等, Genes Dev. 1990 Aug;4(8):1288-303の実施例に記載されている。一般的に、FUTはゴルジ体中に存在するII型膜貫通糖タンパク質であり、典型的には、N末端細胞質テイル、膜架橋領域、およびゴルジ体中に管腔内に位置する触媒ドメインからなる。膜架橋領域と触媒ドメインの間の領域は基部(stem、ステム)と称する(PaulsonおよびColley, J. Biol. Chem., 264:17615-17618 (1989))。

「(1,3)フコシルトランスフェラーゼ」又は「FUT6」は、例えば、図5に示すヒトFUT6のDNA配列およびアミノ酸配列に構造的に関連する分子を指すために本明細書中で使用する。これらの配列はGenBank受託番号HSU27333と一致し、KoszdinおよびBowen, Biochem Biophys Res Commun. 1992 Aug 31;187(1):152-7の実施例に記載されている。FUT6は典型的には上皮細胞および肝臓、腎臓および消化器系、特に胃、空腸および大腸(および典型的には脾臓、肺および頸部)で発現する。FUT6は典型的には、脳、副腎または末梢血中白血球では発現されない。

【0026】

「シアリルルイスA」は、四糖糖鎖または以下の配列または構造を有する抗原を意味するために本明細書中で使用され、例えば血清中では可溶型、環状であるか膜結合型でありうる：

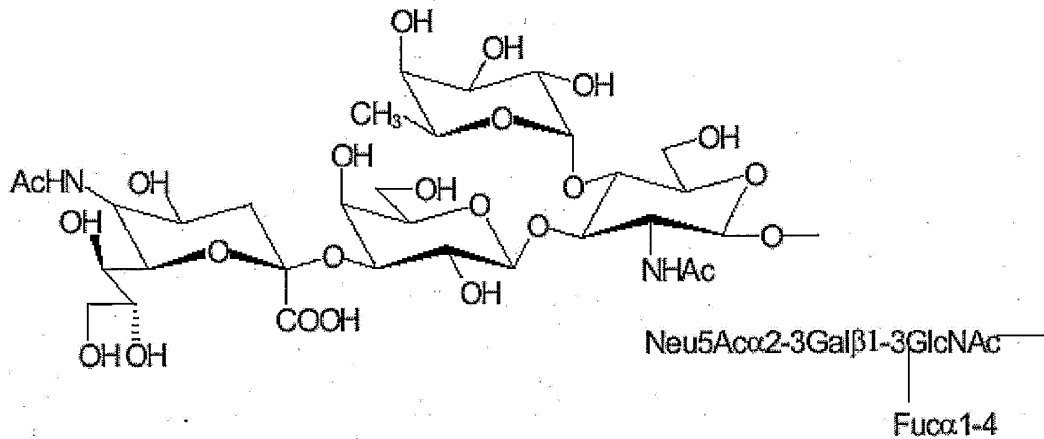
NeuAc 2-->3Gal 1-->3[Fuc 1-->4]GlcNAc 1-->R
(NeuAc 2-->3Gal 1-->3(Fuc 1-->4)GlcNAc 1-->R)

10

20

30

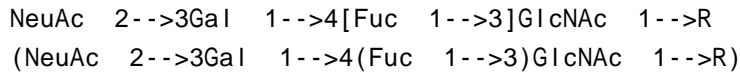
40



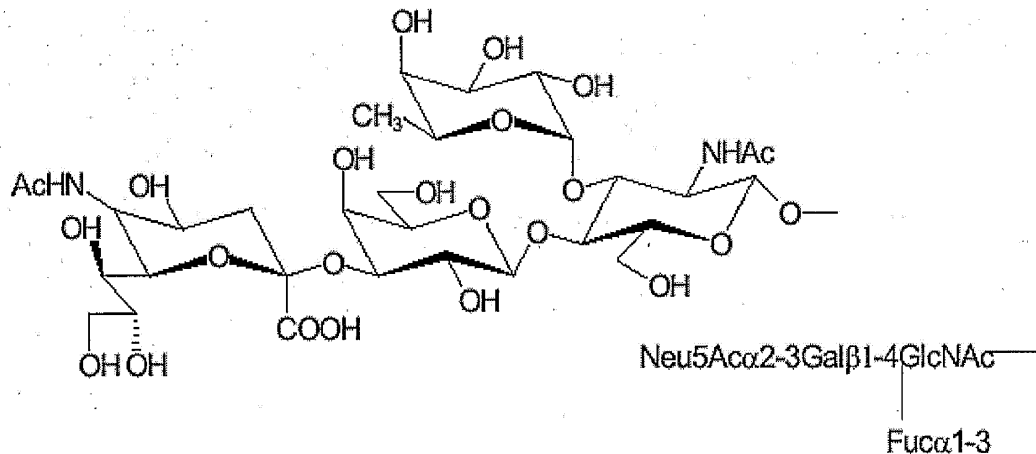
10

【 0 0 2 7 】

「シアリルルイスX」は、四糖糖鎖または以下の配列または構造を有する抗原を意味するために本明細書中で使用され、例えば血清中では可溶性、環状であるか膜結合型でありうる：



20



30

【 0 0 2 8 】

「被検体」または「患者」は、治療が望まれる任意の単一の被検体、例えばヒト、ウシ、イヌ、モルモット、ウサギ、ニワトリ、昆虫などを意味する。また、臨床試験に用いられる疾患の臨床的な特徴を全く示さない任意の被検体、または疫学的な研究に用いられる被検体、またはコントロールとして用いられる被検体も被検体に含まれる。

本明細書中で用いられる「哺乳動物」なる用語は、哺乳動物と分類される任意の哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ウマ、イヌおよびネコを意味する。本発明の好適な実施態様では、哺乳動物がヒトである。

40

「組織または細胞試料」は、被検体または患者の組織から採取された同種の細胞の集まりを意味する。組織または細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結されたおよび/または保存されていた臓器や組織試料または生検または吸引による固形組織；血液または血液成分；大脳脊髄液、羊水、腹膜の体液又は間質液などの体液；被検体の妊娠期または発生期の任意の時期の細胞であってもよい。また、組織試料は原発性または培養した細胞または細胞株であってもよい。場合によっては、組織または細胞試料は原発性腫瘍または転移性腫瘍から得られる。組織試料は、防腐剤、抗凝血物質、バッファ、固定液、栄養分、抗生物質など天然の組織にはもともと混在していない化合物を含んでもよい。

【 0 0 2 9 】

本明細書中の組織試料の「切断部分」とは、組織試料の一部または一片、例えば組織試

50

料から切り出した組織または細胞の一薄片を意味する。組織試料の複数の切断部分は採取され、本発明の分析に供されることが理解される。これにより、本発明は、組織試料の同じ切断部分は形態学および分子的レベルで分析されるか、タンパク質および核酸の両方に関して分析される方法を含む。

「**相関**」または「**相関する**」は、任意の方法で、第一の分析またはプロトコールの成績および/または結果を、第二の分析またはプロトコールの成績および/または結果と比較することを意味する。例えば、第二のプロトコールを行う際に第一の分析またはプロトコールの結果を用いてもよいし、第一の分析またはプロトコールの結果を用いて、第二の分析またはプロトコールを行うかどうかを決定してもよい。免疫組織化学的分析またはプロトコールの実施態様では、IHCの結果を用いて、特定の治療計画を実行するかどうかを決定してもよい。

10

「**核酸**」は、任意のDNAまたはRNAを含むことを意味する。例えば、染色体性核酸、ミトコンドリア核酸、ウイルス核酸および/または細菌性核酸が組織試料中に存在する。「**核酸**」なる用語は、二本鎖の核酸分子の何れかまたは両鎖を包含し、原型の核酸分子の任意の断片または部分を包含する。

【0030】

「**遺伝子**」は、タンパク質をコードする又は転写する、あるいは他の遺伝子発現を調節する際に機能的に働く任意の核酸配列またはその一部を意味する。遺伝子は、機能的なタンパク質のコードを担うすべての核酸またはタンパク質のコードあるいは発現を担う核酸の一部のみを構成してもよい。核酸配列は、エクソン、イントロン、開始領域または終末領域、プロモータ配列、他の調節配列または遺伝子に近接する特定の領域内に遺伝的な異常を含有してもよい。

20

本明細書中で用いられる「**標識**」なる用語は、核酸プローブや抗体などの試薬に直接的または間接的にコンジュゲートないしは融合され、コンジュゲートないしは融合した試薬の検出を容易にする化合物または組成物を指す。標識自体が検出可能なもの(例えば放射性標識または蛍光性標識)であってもよく、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物ないしは組成物の化学的变化を触媒するものであってもよい。

【0031】

ここで「**抗体**」なる用語は、広い意味で用いられ、特に無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成した多特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び所望の生物学的活性を有する限りにおける抗体断片の範囲にわたる。

30

「**抗体断片**」は、無傷の抗体の一部、好ましくはその抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、(Fab')₂及びFv断片；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多特異性抗体が含まれる。

「**天然抗体**」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。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。

40

【0032】

「**可変**」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフ

50

レームワーク領域(F R)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのF Rをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、F Rによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞媒介性障害活性(ADCC)への抗体の関与を示す。

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を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0033】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域は相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも一つの遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0034】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」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が割り当てられる。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体は異なるクラスが割り当てられる。無傷の抗体には5つの主なクラスがある: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、更にそれらは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2等のサブクラス(イソ型)に分かれる。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ 、及び μ と呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られている。

「一本鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Fv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scFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。scFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【0035】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号; 国際公報93/11161; 及びHollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448

10

20

30

40

50

(1993)に更に詳細に記載されている。

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能性が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、単一の抗原部位に対するものである。更に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原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ハイブリドーマ培養により合成され、他のイムノグロブリンの混入がないという利点がある。「モノクローナル」との修飾語句は、実質的に均一な抗体の集団から得たものとしての抗体の性質を表すものであり、抗体が何か特定の方法による生成を必要として構築したものであることを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler等, *Nature*, 256:495 (1975)に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法によって作ることができる(例えば米国特許第4816567号を参照のこと)。また「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991)およびMarks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから作成することもできる。

【0036】

ここで言うモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含み、それは特定の種由来または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体が持つ配列に一致するまたは類似する重鎖および/または軽鎖の一部を含むものであり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来または他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体が持つ配列に一致するまたは類似するものである(米国特許第4,816,567号; およびMorrisonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。ここで対象とするキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば、ヒヒ、アカゲザル又はカニクイザルなどの旧世界サル)由来の可変ドメイン抗原結合配列とヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む(米国特許第5,693,780号)。

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒトイムノグロブリン(免疫グロブリン)に由来する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、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)から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。例として、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、もしくは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。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に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対応し、ヒト免疫グロブリン配列の高頻度可変ループがFRのすべて又は実質的にすべてである少なくとも一又は一般的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部、一般的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含む。更なる詳細については、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。

【0037】

ここで使用されるところの「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合に寄与する抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は一般には「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)、及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び/又は「高頻度可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基26-

10

20

30

40

50

32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))を含む。「フレームワーク」又は「FR」残基はここで定義するように高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

目的の抗原に「結合する」抗体とは、抗体が抗原発現細胞を標的とした治療薬又は診断剤として有用となるように十分な親和性及び/又は結合活性を有して抗原に結合することができるものである。

ここでの目的のための「免疫治療」とは、抗体を用いた哺乳動物(好ましくはヒト患者)の治療方法を意味し、この抗体はコンジュゲートされたもの又は「ありのままの」抗体でもよいし、又は一又は複数の細胞障害性剤などの薬剤やヘテロ分子とコンジュゲート又は融合して、それによって「免疫コンジュゲートを生成してもよい。

10

【0038】

「単離された」抗体は、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は、アンタゴニスト又は抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様においては、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法により定量して、抗体が95重量%より多くなるほど、最も好ましくは99重量%より多くなるまで、(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、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分な程度まで精製される。抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。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。

20

「有効量」という用語は、疑われる疾患又は症状を予防、寛解又は治療するのに効果的な薬剤(例えば、Apo2L/TRAIL、抗DR4抗体または抗DR5抗体など)の量を意味する。

ここで使用される「処置する」又は「処置」又は「治療」とは、治癒的治療、予防的治療又は防止的治療を称する。連続的治療又は投与とは、一又は複数の日数、治療を中断することなく、少なくとも毎日であることを基本とし治療を行うことを称する。断続的治療又は投与、もしくは断続的な方法での治療又は投与とは、連続させることなく、むしろ事実的には周期的に治療することを称する。

30

【0039】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、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; リラクシン; プロリラクシン; 卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)のような糖タンパク質ホルモン; 肝臓成長因子; 繊維芽細胞成長因子; プロラクチン; 胎盤ラクトゲン; 腫瘍壊死因子-及び-; ミューラー阻害物質; マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド; インヒピン; アクチピン; 血管内皮成長因子; インテグリン; トロンボポエチン(TPO); 神経成長因子; 血小板成長因子; TGF-及びTGF-のようなトランスフォーミング成長因子(TGF); インスリン様成長因子I及びII; エリスロポイエチン(EPO); オステオインダクティブ因子; インターフェロン、例えばインターフェロン、-ガンマ; コロニー刺激因子(CSF)、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); IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17等のインターロイキン(IL); 及びLIF及びキットリガンド(KL)を含

40

50

む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合は、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

ここで用いられる「細胞障害剤」という用語は、細胞の機能を阻害し又は妨害し、及び/又は細胞の破壊を引き起こす物質を称する。この用語は放射性アイソトープ(例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及び Re^{186})、化学療法剤、及び細菌性、真菌性、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素等の毒素又はその断片を含むことが意図されている。

【 0 0 4 0 】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN™)のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピオスルファンのようなスルホン酸アルキル類、；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins)(特にプラタシン(bullatacin)及びプラタシノン(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュカロマイシン(duocarmycin)(合成類似体、KW-2189及びCBI-TMIを含む)；エレクトロピン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediynes) 抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシンガンマ1I及びカリケアマイシンフィーI1、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照のこと)；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；ビスホスホナート類、例えばクロドロナート；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediynes) 抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(acclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラピシン(carabicin)、カリミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトロピシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(アドリアマイシン^{T M})(モルフォリノ-ドキシソルピシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン(esorubicin)、イダルピシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシン(mitomycins)、例えばマイトマイシンC、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(

10

20

30

40

50

fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラピン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルラシル(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ロソキサントロン(losoxantrone)；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K (登録商標)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニユアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziqone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトプロニトール；ミトラクトール(mitrolactol)；ピボプロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばパクリタキセル(タキソール(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、及びドキセタキセル(タキソテア(登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲンシタピン(gemcitabine)(Gemzar™)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ピンブラスチン；プラチナ；エトポシド(V P - 1 6)；イフォスファミド；ミトキサントン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン(navelbine)(Navelbine™)；ノバントロン(novantron)；テニボシド；エダトレキセート(edatrexate)；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；C T P - 1 1；トポイソメラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸等のレチノイド類；カペシタピン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩、酸又は誘導体が含まれる。また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホルモン剤、例えばタモキシフェン(Nolvadex™を含む)、ラロキシフェン(raloxifene)、ドロロキシフェン(droloxifene)、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(Fareston™)を含む抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERMs)；副腎におけるエストロゲン生成を調節する、アロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼインヒビター、例えば4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、酢酸メゲステロール(Megace™)、エグゼメスタン(exemestane)、ホルメスタン(formestane)、ファドロゾール、ボロゾール(vorozole)(Rivisor™)、レトロゾール(letrozole)(Femara™)、及びアナストロゾール(anastrozole)(Arimidex™)；及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；並びに上記のもの製薬的に許容可能な塩、酸又は誘導体が含まれる。

【 0 0 4 1 】

ここで使用される場合の「成長阻害剤」なる用語は、インビトロ又はインビボのいずれ

10

20

30

40

50

かにおいて、ここで同定された任意の遺伝子が発現する細胞、特に癌細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を称する。よって、成長阻害剤とは、S相において、このような細胞が発現する細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。成長阻害剤の例には、細胞分裂周期の進行をブロックする薬剤(S相以外の場所において)、例えばG1停止及びM相停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM相ブロッカーには、ビンカ(ピンクリスチン及びビンブラスチン)、TAXOL、及びトポI Eインヒビター、例えばドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。G1を停止させるこれらの薬剤、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-CがS相停止に溢流する。更なる情報は、Murakamiらにより「細胞分裂周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬」と題された、癌の分子的基础、Mendelsohn及びIsrael編、第1章(WB Saunders; Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

10

「アポトーシス」及び「アポトーシス活性」という用語は広義に使用され、典型的には、細胞質の凝集、原形質膜の微絨毛の喪失、核の分節化、染色体DNAの分解又はミトコンドリア機能の喪失を含む一又は複数の特徴的な細胞変化を伴う、哺乳動物における細胞死の規則的又はコントロールされた形態を称する。この活性は、当該分野で公知の、例えば細胞生死判別アッセイ(例えばアラマーブルーアッセイ又はMTTアッセイ)、FACS分析、カスパーゼ活性化、DNA断片化(例えば、Nicolettiら、J. Immunol. Methods, 139: 271-279(1991)を参照)、ポリ-ADPリボースポリメラーゼ、「PARP」、切断アッセイにより、決定し測定することができる。

20

【0042】

ここで使用される場合、「疾患」なる用語は、本明細書に記載の組成物による治療により利益を得る任意の症状を指し、有効量のApoptin/TRAIL、抗DR4抗体、および/または抗DR5抗体により治療される任意の疾患または疾病を含む。これには、慢性及び急性の疾患、並びに問題の疾患に哺乳動物を罹患させやすくする病理状態が含まれる。ここで治療される疾患の非限定的例には、良性及び悪性の腫瘍；炎症、血管由来及び免疫学的疾患、自己免疫疾患、関節炎(関節リウマチを含む)、多発性硬化症、及びHIV/AIDSが含まれる。

「癌」、「癌性」又は「悪性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を称するか記述する。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、白血病、芽細胞腫、及び肉腫が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、骨髄腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、消化器系(管)癌、腎臓癌、卵巣癌、肝臓癌、リンパ芽球性白血病、リンパ性白血病、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、多形成膠芽腫、子宮頸癌、脳癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞腫(hepatoma)、乳癌、結腸癌、及び頭部及び頸部の癌が含まれる。

30

【0043】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の成分が、哺乳動物の病理学的状態の原因であるか、媒介又は寄与するものである疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は介在により疾患の進行に改善された効果が付与される疾患も含まれる。この用語には、自己免疫疾患、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染症、及び免疫欠損症が含まれる。そのうちの一部が免疫又はT細胞媒介であり、本発明によって治療することが可能な免疫関連及び炎症性疾患の例には、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、若年型慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症性筋疾患(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間ヘモグロビン尿症)、自己免疫性血小板減少症(溶血性血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症)、甲状腺炎(バセドウ病、橋本甲状腺炎、若年型リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、糖尿病、免疫媒介腎疾患(糸球体腎炎、尿管間質性腎炎)、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患例えば多発性硬化症、特発性脱髄多

40

50

発神経障害又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症性脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患例えば感染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎、及び他の非肝親和性ウイルス)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患等の炎症性及び線維性肺疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚病を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、多形滲出性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患例えば好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主病を含む移植関連疾患が含まれる。感染症疾患には、AIDS(HIV感染)、A、B、C、D及びE型肝炎、細菌感染症、真菌感染症、原虫感染症及び寄生虫症が含まれる。

10

【0044】

本明細書の「自己免疫疾患」という語は広義で使用され、一般的な意味で、自己の組織成分に対する個体の体液又は細胞の免疫反応から正常又は健康な組織の破壊が生じる、哺乳動物の障害、又は状態を指す。例として、これらに限定するものではないが、エリテマトーデス、甲状腺炎、リウマチ様関節炎、乾癬、多発性硬化症、自己免疫糖尿病、及び炎症性腸疾患(IBD)が挙げられる。

ここで使用される場合の「タグ化」なる用語は、「タグポリペプチド」に融合した、抗体、又はポリペプチドを含有するキメラ分子を称す。タグポリペプチドは、その抗体が産生するエピトープを提供するか、又はオリゴマー化(例えば、ロイシンジッパードメインを有するペプチドと生じるような)等の他のいくつかの機能を提供するのに十分な残基を有しているが、その長さは、一般的に抗体又はポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、タグ特異性抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～約50のアミノ酸残基(好ましくは約10～約20のアミノ酸残基)を有する。

20

【0045】

「二価の金属イオン」なる用語は、2つの正電荷を有する金属イオンを称する。限定するものでないが、二価の金属イオンの例には、亜鉛、コバルト、ニッケル、カドミウム、マグネシウム及びマンガンが含まれる。使用され得るこのような金属の特定の形態には塩の形態(例えば、製薬的に許容可能な塩の形態)、上述した二価の金属イオンの塩化物、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩及び硫酸塩の形態のものが含まれる。場合によっては、本発明で使用される二価の金属イオンは亜鉛、好ましくは硫酸亜鉛又は塩化亜鉛等の塩の形態をしている。

30

「単離された」とは、ここで開示された種々のペプチド又はタンパク質を記述するために使用するときには、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたペプチド又はタンパク質を意味する。その自然環境の汚染成分とは、タンパク質の診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ペプチド又はタンパク質は、(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、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブル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による均一性が得られるように十分なほど、又は(3)質量分光分析又はペプチドマッピング技術による均一性が得られるように十分なほど精製される。その自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された材料には、組換え細胞内のインサイツのペプチド又はタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたペプチド又はタンパク質は少なくとも一の精製工程により調製される。

40

【0046】

ここで同定されている配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」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、参照配列のアミノ酸残基と同一である

50

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。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法により達成可能であり、比較される配列の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。ここでの目的のために、パーセントアミノ酸配列同一性値は、ジェネンテク社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁, Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている配列比較コンピュータプログラムALINE-2を用いて得ることができる。ALIGN-2プログラムはジェネンテク社、South San Francisco, CAを通して公的に入手可能である。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

10

ハイブリッド形成反応の「ストリンジェント」は、通常、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなればなる程、適切なアニーリングのために温度を高くする必要があり、プローブが短くなればなる程、温度を低くする必要が生じる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点より低い環境に存在する場合、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ッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用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が、低い温度はストリンジェントを低下させる。ハイブリッド形成反応のストリンジェントの更なる詳細及び説明は、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

20

【0047】

ここで定義される「高度のストリンジェント条件」は、(1)洗浄に低イオン強度及び高温を用いる；50 で、0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリッド形成中に変性剤を用いる；42 で、50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50 mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMのクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)42 で、50%ホルムアミド、5×SSC(0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理サケ精子DNA(50 µg/ml)、0.1% SDS、及び10%のデキストラン硫酸を用いて、42 で0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)及び55 の50%ホルムアミド中にて洗浄、次いでEDTAを含む0.1×SSCにて55 で高ストリンジェントな洗浄を行うことによって同定され得る。

30

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように同定され、20%ホルムアミド、5×SSC(150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンハート液、10%デキストラン硫酸、及び20 mg/mlの変性切断サケ精子DNAを含む溶液中にて37 で終夜インキュベーション、次いで1×SSC中にておよそ37 - 50 でフィルターを洗浄を含む。当業者であれば、プローブ長等の因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

40

【0048】

「プライマー」または「複数のプライマー」なる用語は、相補的なRNAまたはDNA標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズして、例えばポリメラーゼ連鎖反応で起こるような、ヌクレオチジルトランスフェラーゼの働きによってモノヌクレオチドからポリヌクレオチドの段階的な合成の開始点となるオリゴヌクレオチド配列を指す。

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を称す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む

50

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

10

【0049】

「抗体依存性細胞障害活性」または「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)を発現する非特異的細胞障害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞を溶解する細胞媒介性反応を指す。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現する一方、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血性細胞でのFcRの発現は、Ravetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92(1991)の464頁の表3に要約されている。対象分子のADCC活性を評価するためには、米国特許第5500362号又は第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象分子のADCC活性は、例えばClynes等 *.PNAS(USA)*, 95:652-656(1998)に開示されたような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。

20

「ヒトエフェクター細胞」とは、1つ又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。好ましくは、その細胞が少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が好適である。

30

【0050】

「Fcレセプター」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを表す。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(レセプター)に結合し、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRIIレセプターは、FcRIIA(「活性化レセプター」)及びFcRIIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース阻害モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234(1997)参照)。FcRはRavetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991); Capelら, *Immunomethods* 4:25-34(1994); 及びde Hasら, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRが、ここにおける「FcR」なる用語によって包含される。この用語は胎児への母性IgGの移動の原因である新生児レセプター、FcRnもまた含む(Guyerら, *J. Immunol.* 117:587(1976)及びKimら, *J. Immunol.* 24:249(1994))。本明細書中のFcRはFcRIIIaをコードする遺伝子内に遺伝的二形性などの多型を含有し、それによってIgG1に結合するレセプターの領域内に位置するアミノ酸位置158がフェニルアラニン(F)又はバリン(V)となる。ホモ接合体バリンFc

40

50

R III a (F c R III a - 1 5 8 V) は、ホモ接合体フェニルアラニン F c R III a (F c R III a - 1 5 8 F) 又はヘテロ (F c R III a - 1 5 8 F / V) レセプターと比較してインビトロでの A D C C 媒介を増加し、ヒト I g G 1 に対する親和性も高いことが示された。

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

【 0 0 5 1 】

I I . 本発明の例示的材料及び方法

本明細書に開示される発明は、哺乳動物組織または細胞試料における一ないし複数のバイオマーカーの発現の測定に関する方法およびアッセイに関するものであり、この一ないし複数のバイオマーカーの発現の測定により該組織または細胞試料が A p o 2 L / T R A I L および抗 D R 5 アゴニスト抗体などのアポトーシス誘導剤に対して感受性があるか否かを予測するものである。該方法およびアッセイには、特定のフコシルトランスフェラーゼ、特にフコシルトランスフェラーゼ 3 (F U T 3) および / またはフコシルトランスフェラーゼ 6 (F U T 6)、並びにシアリルルイス A および / または X 抗原などのバイオマーカーの発現を検査するものが含まれる。

上記のように、アポトーシス誘導に抵抗性がある罹患したヒト細胞種類の集団がある (癌細胞の特定の集団など)。したがって、開示した方法およびアッセイは、治療中の患者にとって好ましいあるいは効果的な治療を評価する際に有用なデータおよび情報を得るために、便利で、効率的で、費用効率のよい可能性がある方法を提供すると思われる。例えば、癌または免疫関連症状であると診断されている患者は組織または細胞試料を得るために行われる生検を有し、該試料は様々なインビトロのアッセイによって検査され、患者の細胞が A p o 2 L / T R A I L やデスレセプター抗体などの治療的試薬に感受性があるかどうかを決定することができる。

【 0 0 5 2 】

本発明は、哺乳動物組織または細胞試料 (癌細胞など) の A p o 2 L / T R A I L やデスレセプターアゴニスト抗体に対する感受性を予測するための方法を提供する。この方法では、哺乳動物組織または細胞試料は採取され、一ないし複数のバイオマーカーの発現について試験される。前記方法は、m R N A 発現を検出するアッセイ、酵素活性の存在を検出する酵素アッセイ、免疫組織化学的なアッセイを含む、様々なアッセイ様式で行われうる。そのような組織または細胞が A p o 2 L / T R A I L および / またはデスレセプター抗体のアポトーシス誘導活性に対して感受性であることが、前記組織または細胞におけるこれらのバイオマーカーの発現の決定により予測されうる。驚くべきことに、出願人は、このような特定のバイオマーカーの発現が、A p o 2 L / T R A I L および / またはデスレセプター抗体などのアポトーシス誘導性剤に対する感受性と相関することを発見した。

【 0 0 5 3 】

後述するように、試料中の様々なバイオマーカーの発現は、当分野で公知であり当業者に理解される多くの方法によって分析することができ、その方法には、免疫組織化学および / またはウェスタンブロットティング、定量的血液ベースのアッセイ (例えば、血清 E L I S A) (例えば、タンパク質発現のレベルを調べるためのもの)、生化学酵素活性アッセイ、インサイツハイブリッド形成、m R N A のノーザン分析および / または P C R 分析、およびゲノムのサザン分析 (例えば、遺伝子欠損又は遺伝子増幅を調べるためのもの)、並びに遺伝子および / または組織アレイ分析によって行われうる多種多様なアッセイの何かが含まれるが、これらに限定するものではない。遺伝子の状態および遺伝子産物を評価するための典型的なプロトコールは、例えば Ausubel 等 編集, 1995, Current Protocols In Molecular Biology 中のユニット 2 (ノーザンブロットティング)、4 (サザンブロットティング)、15 (イムノブロットティング) および 18 (P C R 分析) にみられる。

10

20

30

40

50

試料中のフコシルトランスフェラーゼ3(FUT3)、フコシルトランスフェラーゼ6(FUT6)、シアリルルイスA、およびシアリルルイスXなどの特定のバイオマーカーの検出に関するプロトコールを、例示として以下に挙げる。

【0054】

本発明の好適な方法には、哺乳動物組織または細胞試料中のシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスXタンパク質の存在について試験するあるいは検査するプロトコールが含まれる。シアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスX関連タンパク質を検出するために様々な方法を用いることができ、その中には例えば免疫組織化学的分析方法、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA、蛍光活性化細胞分類法(FACS)などがある。例えば、組織または試料中のシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスX関連タンパク質の発現を検出する好適な方法は、該試料をシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスX抗体、そのシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスX反応断片、ないしはシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスX抗体の抗原結合領域を含有する組み換えタンパク質と接触させ、次いで、該試料中のシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスX関連タンパク質の結合を検出することを含む。

10

本発明の特定の実施態様では、試料中のシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスXタンパク質の発現を免疫組織化学法および染色プロトコールを用いて検査する。組織切片の免疫組織化学的染色は、試料中のタンパク質の存在を評価ないしは検出するための確実な方法であることが示されている。免疫組織学法(「IHC」)技術は、抗体を用いて、一般的には色素生産性方法または蛍光性方法によって、インサイトで細胞性抗原を探索して視覚化する。

20

【0055】

試料の調整では、哺乳動物(典型的にはヒト患者)の組織または細胞試料を用いてもよい。試料の例として、大腸、乳房、前立腺、卵巣、肺、胃、膵臓、リンパ系および白血球などの癌細胞が含まれるが、これらに限定するものではない。前記試料は、当分野で公知の様々な手順、限定するものではないが、外科的切除、吸引または生検などによって採取することができる。組織は新鮮なものでも凍結したものでもよい。一実施態様では、前記試料は固定し、パラフィンなどに包埋する。

前記組織試料は従来の方法によって固定(すなわち保存)されてもよい(例として、“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.を参照)。当分野の技術者は、組織学的染色ないしは他の分析に供する試料の目的に応じて固定液を選択することは理解するところであろう。また、当分野の技術者は、組織試料の大きさおよび用いる固定液に応じて固定の長さを決定することも理解するであろう。実施例では、中性緩衝ホルマリン、ブアン固定液またはパラホルムアルデヒドを用いて試料を固定してもよい。

30

40

【0056】

通常、まず試料を固定し、次いで段階的に増加させたアルコールによって、脱水し、パラフィンまたは他の切片溶液に浸透させて包埋し、組織試料を切断できるようにする。別法として、組織を切断して、得られた切片を固定してもよい。例として、従来の方法によって、組織試料を包埋して、パラフィンで処理してもよい(例として、上掲の“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”を参照)。使用されるパラフィンの例として、Paraplast、BroloidおよびTissuemayがあるが、これらに限定するものではない。組織試料を包埋すると、試料をマイクロトーム等によって、切断してもよい(例として、上掲の“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”を参照)。この手順の例として、切片はおよそ3

50

ミクロンからおよそ5ミクロンの範囲の厚さでよい。切断すると、いくつかの標準的な方法によって、切片をスライドに付着させてもよい。スライド接着剤の例として、シラン、ゼラチン、ポリ L リジンなどがあるが、これに限定されるものではない。例として、パラフィン包埋切片は、正に荷電したスライドおよび/またはポリ L リジンでコートしたスライドに付着させてもよい。

包埋材料としてパラフィンを用いた場合、組織切片は通常、脱パラフィン化して、水に再水和させる。組織切片は、いくつかの従来の標準的な方法によって、脱パラフィン化してもよい。例えば、キシレンおよび段階的に減少するアルコールを用いてもよい(例として、上掲の"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"を参照)。別法として、Hemo-De 7 (CMS, Houston, Texas)などの市販の脱パラフィン化非有機薬剤が用いられてもよい。

10

【0057】

場合によって、試料の調整の後に、組織切片をIHCを用いて分析してもよい。IHCは、形態学的染色および/または蛍光発光インサイツハイブリダイゼーションなどの付加的な技術と組み合わせて行ってもよい。IHCの直接アッセイおよび間接アッセイの2つの一般的な方法が有用である。第一のアッセイでは、標的抗原(例えばシアリルルイスAおよび/またはシアリルルイスX)に対する抗体の結合は、直接的に測定される。この直接アッセイは、更なる抗体相互作用を必要とせず可視化されうる酵素標識一次抗体または蛍光タグ付加一次抗体などの標識された試薬を用いる。代表的な間接アッセイでは、コンジュゲートしていない一次抗体が抗原と結合し、次いで標識された二次抗体が一次抗体と結合する。二次抗体が酵素標識にコンジュゲートする場合、抗原を視覚化させるために色素生産性基質ないしは蛍光発生基質が加えられる。二次抗体の中には一次抗体上の異なるエピトープと反応するものもあるので、シグナルの増幅が起こる。

20

一般的に、免疫組織化学に使用する一次および/または二次抗体は、検出可能な成分にて標識されるであろう。通常、以下の種類に分類できる多くの標識が利用可能である：

【0058】

(a)ラジオアイソトープ、例えば³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³Hおよび¹³¹I。抗体は例えばImmunology, Volumes 1 and 2, Coligen 等, 編集 Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)のCurrent Protocolsに記載される技術を用いて放射性同位体にて標識することができ、放射能はシンチレーション計測器を用いて測定することができる。

30

(b)コロイド金粒子

(c)希有土類キレート(ユウロピウムキレート)、テキサスレッド、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコクリセリン(phycocrytherin)、フィコシアニン又はSPECTRUM ORANGE7およびSPECTRUM GREEN7などの市販の蛍光体および/または上記の何れか一ないしは複数の誘導体を含むが、これらに限定されるものではない蛍光標識。蛍光標識は、例えば、上記のImmunologyのCurrent Protocolsに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光は、蛍光計を用いて定量化することができる。

40

(d)様々な酵素基質標識が利用可能であり、米国特許第4,275,149号にはこの概説がある。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定することができる色素生産性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定することができる基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変えうる。蛍光の変化を定量化する技術は上記の通りである。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、測定することができる(例えば化学発光計測器を用いて)か、またはエネルギーを蛍光アクセプターに与える光を発しうる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、リング酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチ

50

ーム、サッカライドオキシダーゼ(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およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環のオキシダーゼ(例えばウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivanら., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

【0059】

酵素基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる：

(i)基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP O)、ここで水素ペルオキシダーゼが染料前駆体(例えば、オルソフェニレン(orthophenylene)ジアミン(OPD)又は3,3',5,5'テトラメチルのベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する；

(ii)色素生産性基質としてリン酸パラグラフ-ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ(AP)；及び

(iii)色素生産性基質(例えばp-ニトロフェニル-D-ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質(例えば、4-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)-D-ガラクトシダーゼ)を有する-D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)。

多数の他の酵素基質の組合せは当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第4,275,149号および4,318,980を参照。標識は、抗体と間接的にコンジュゲートされることがある。これを行うための様々な技術は当分野の技術者に公知である。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した大きな4つの分類のうちの何れかはアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、抗体と標識を間接的にコンジュゲートさせるために、抗体は小ハプテンとコンジュゲートさせ、前述した標識の異なるタイプのうちの1つは抗ハプテン抗体とコンジュゲートさせる。したがって、抗体と標識は間接的にコンジュゲートすることができる。

【0060】

上記の試料調整手順以外に、IHC前、IHCの間又はIHC後に組織切片の更なる処置が所望されてもよい。例えば、クエン酸塩バッファ中で組織サンプルを加熱するなどのエピトープ検索方法が実施されてもよい(例として、Leong等 Appl. Immunohistochem. 4(3): 201 (1996)を参照)。

場合によって行うブロック処置の後に、一次抗体が組織試料中の標的タンパク質抗原と結合するような好適な条件下と十分な時間、組織切片を一次抗体に曝露させる。これを達成するための好適な条件は慣例的な実験によって決定できる。試料に対する抗体の結合の範囲は、上記の検出可能な標識の何れか一つを用いて決定される。標識は、3,3'-ジアミノベンジジクロモゲンなどの色素生産性基質の化学変化を触媒する酵素標識(例えばHRPO)であることが望ましい。好ましくは、酵素標識は、一次抗体(例えば、一次抗体はウサギポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である)に特異的に結合する抗体にコンジュゲートさせる。

場合によって、シアリルルイスA又は抗シアリルルイスXの発現を検出するためのIHC分析法で使用される抗体は、抗シアリルルイスAおよび抗シアリルルイスX抗体である。場合によって、抗シアリルルイスA抗体および抗シアリルルイスX抗体はモノクローナル抗体である。抗シアリルルイスA抗体および抗シアリルルイスX抗体は、当分野において、容易に利用できるものであり、様々な市販の供給源のものが含まれる。

【0061】

したがって、調製される検査材料はマウントしてカバーガラスをかけてもよい。その後、例えば顕微鏡を使用してスライドの評価を行い、当分野で通常用いられる染色強度判定基準を用いてもよい。抗原がシアリルルイスAタンパク質および/またはシアリルルイス

10

20

30

40

50

Xタンパク質である場合、染色強度判定基準は以下の通りに評価してもよい：

表 1

染色パターン	スコア
細胞内で染色は観察されない	0
10%以上の細胞内でかすかに／わずかに認識できる染色が検出される	1+
10%以上の細胞内で弱い～中程度の染色が観察される	2+
10%以上の細胞内で中程度～強い染色が観察される	3+

10

【 0 0 6 2 】

一般的に、IHCアッセイの2+又はそれ以上の染色パターンスコアは、Apo2L/TRAIL又はデスレセプターアゴニスト抗体に対する哺乳動物細胞(例えば哺乳動物癌細胞)の感受性を予測するに示していると考えられる。

20

別法では、試料を、抗体-バイオマーカー複合体が形成するために十分な条件下で該バイオマーカーに特異的な抗体と接触させ、次いで該複合体を検出してもよい。バイオマーカーの存在は、多くの方法、血漿又は血清を含む多種多様な組織および試料を検定するためのウェスタンブロットングおよびELISA手順によって、検定してもよい。このようなアッセイ様式を用いた広範囲にわたるイムノアッセイ技術は利用可能である。米国特許第4,016,043号、同第4,424,279号および同第4,018,653号参照。これらには、単一の部位および2-部位の両方、あるいは非競合型の「サンドイッチ」アッセイ、並びに従来の競合的結合アッセイが含まれる。また、これらのアッセイには、標的バイオマーカーに対する標識抗体の直接結合が含まれる。

サンドイッチアッセイは最も有用なものの一つで、一般的に用いられるアッセイである。サンドイッチアッセイ技術には多くのバリエーションあり、そのすべては本発明により包含されることを目的とする。簡潔には、代表的な最近のアッセイでは、非標識抗体を固体基板上に固定して、試験する試料を結合した分子に接触させる。抗体-抗原複合体が形成されるくらいの適当な期間インキュベートした後、検出可能なシグナルを産生できるレポーター分子で標識した、抗原特異的な第二抗体を添加して、更なる抗体-抗原-標識抗体の複合体が形成されるために十分な時間インキュベートする。反応しなかった材料を洗い流し、レポーター分子により産生されるシグナルを観察することによって抗原の存在を決定する。結果は、可視的なシグナルを単純に観察したものであれば質的なものであり、バイオマーカーを既知量含有するコントロール試料と比較したものであれば量的なものである。

30

40

【 0 0 6 3 】

前記のアッセイへのバリエーションには、試料および標識抗体の両方を結合した抗体に同時に添加する同時アッセイなどがある。これらの技術は当分野の技術者には公知であり、多少のバリエーションが加えられることは容易に明らかであろう。代表的な近年のサンドイッチアッセイでは、バイオマーカーに対して特異性を有する第一抗体は固形表面に共有結合するか受動的に結合する。固形表面は一般的にガラス又はポリマーであり、最も一般的に用いられるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリプロピレンである。固形支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートの皿、又はイムノアッセイを行うために適切な他の任意の表面の形態でもあってもよい。結合方法は従来技術において周知であり、一般に、架橋性共有結合又は物理的

50

な吸着から成り、ポリマー-抗体複合体は試験試料の調整において洗浄される。次いで、試験される試料の分割量を固相複合体に添加し、抗体中に存在する任意のサブユニットが結合するために十分な時間(例えば、より便利であるならば2~40分又は前夜)と適切な条件(例えば室温から40℃、例えば25℃から32℃の間)下でインキュベートする。インキュベーションの後、抗体サブユニット固相を洗浄して、乾燥させ、一部のバイオマーカーに特異的な二次抗体とともにインキュベートする。二次抗体は、分子マーカーへの二次抗体の結合を表すために用いられるレポーター分子に結合させる。

別法では、試料中の標的バイオマーカーを固定して、その後レポーター分子にて標識しているかまたは標識していない特異的抗体に固定された標的を曝すことを伴う。標的の量およびレポーター分子シグナルの強度に応じて、結合した標的は、抗体で直接標識することによって、検出可能でありうる。あるいは、一次抗体に特異的な二次標識抗体を標的-一次抗体複合体に曝して、標的-一次抗体-二次抗体の三位複合体を形成させる。複合体は、レポーター分子により発されるシグナルにより検出される。本明細書中で用いられる「レポーター分子」は、その化学的性質によって、抗原と結合した抗体を検出するための分析して同定可能となるシグナルを提供する分子を意味する。この種のアッセイにおいて、最も一般的に用いられるレポーター分子は、酵素、蛍光体または分子を含有する放射性核種(すなわち放射性同位体)および化学発光分子である。

【0064】

酵素イムノアッセイの場合、一般にグルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸塩によって、酵素を二次抗体にコンジュゲートさせる。しかしながら、容易に認識されるように、技術者に容易に利用可能である多種多様な異なるコンジュゲート技術が存在する。一般的に用いられる酵素には、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ-中でもガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼなどがある。特定の酵素と共に用いられる基質は、一般的に、対応する酵素による加水分解の際に生じる検出可能な色の变化で選択する。適切な酵素の例として、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼなどがある。また、上記の色素生産性基質よりも蛍光性産物を産生する蛍光性基質を用いることができる。すべての例において、酵素標識抗体を一次抗体-分子マーカー複合体に加えて、結合させ、次いで過剰な試薬を洗い流す。次いで、適当な基質を含有する溶液を抗体-抗原-抗体の複合体に加える。基質は二次抗体と結合した酵素と反応して、通常は分光測定法による量的なものでもある定性的な可視化シグナルを生じ、試料中に存在するバイオマーカーの量を表す。あるいは、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光性化合物を、抗体の結合能を変化させることなく抗体に化学的に結合させてもよい。特定の波長の光を照射することにより活性化されると、蛍光色素標識抗体はその光エネルギーを吸収し、それによりその分子において励起状態が誘発され、続いて光学顕微鏡を用いて目視で検出可能な特徴的な色で光が放射される。EIAでは、蛍光標識抗体は、一次抗体-分子マーカー複合体に結合できる。結合していない試薬を洗い落としした後に、残りの三位複合体を適当な波長の光に曝すと、対象の分子マーカーの存在を示す蛍光発光が観察される。免疫蛍光法およびEIA技術は何れも、当分野で非常に確立されたものである。しかしながら、放射性同位体、化学発光性分子または生物発光性分子などの他のレポーター分子も用いられてもよい。

【0065】

また、上記の技術が、FUT3又はFUT6のポリペプチドの発現を検出するために用いられうることも包含される。

本発明の方法は、組織又は細胞試料中のmRNA、例えばFUT3 mRNAおよび/またはFUT6 mRNAの存在および/または発現を調べる手順を更に含む。細胞中のmRNAの評価方法は公知であり、例えば、相補的DNAプローブを用いたハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、標識したFUT3および/またはFUT6のリボプローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション、ノーザンブロットおよび関連した技術)および様々な核酸増幅アッセイ(例えば、FUT3および/またはFUT6に特異的な相補的プライマーを用いたRT-PCRおよび、他の増幅型の検査法、例えば枝分れDNA、SI

10

20

30

40

50

SBA、TMAなど)が含まれる。

哺乳動物の組織又は細胞試料は、例えばノーザン、ドットプロットまたはPCR分析を用いて、FUT3および/またはFUT6のmRNAについて都合よくアッセイすることができる。例えば、定量的PCRアッセイなどのRT-PCRアッセイは公知技術である。本発明の例示的实施態様では、生体試料中のFUT3および/またはFUT6のmRNAの検出方法は、少なくとも一のプライマーを用いて逆転写によって、試料からcDNAを生成し、該FUT3および/またはFUT6のcDNAを増幅するために、FUT3および/またはFUT6のポリヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いて産生された該cDNAを増幅し、そして、増幅されたFUT3および/またはFUT6のcDNAの存在を検出することを含む。加えて、このような方法は、生体試料中のFUT3および/またはFUT6のmRNAのレベルを決定し得る一ないし複数の工程(例えば、アクチンファミリーメンバーなどの「ハウスキーピング」遺伝子のコントロールmRNA配列と該レベルを同時に検討すること)を含んでもよい。場合によって、増幅されたFUT3および/またはFUT6のcDNAの配列を決定してもよい。

10

【0066】

本発明の態様の材料の実施態様では、本発明のポリヌクレオチドまたはその任意の特定部分の特異的に増幅させるFUT3および/またはFUT6のプライマーおよびプライマー対と、本発明の核酸分子またはその任意の一部に選択的又は特異的にハイブリダイズするプローブが含まれる。プローブは、検出可能なマーカー、例えば放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤又は酵素にて標識されてもよい。このようなプローブおよびプライマーを、試料中のFUT3および/またはFUT6のポリヌクレオチドの存在を検出するため、および、FUT3および/またはFUT6のタンパク質を発現する細胞を検出するための手段として用いることができる。技術者に理解されるように、多数の異なるプライマーおよびプローブは、本願明細書中で示される配列に基づいて調製されてもよく、FUT3および/またはFUT6のmRNAの存在および/またはレベルを増幅、クローン化および/または決定するために効率的に用いてもよい。

20

【0067】

本発明の任意の方法には、マイクロアレイ技術によって、組織又は細胞試料中のmRNA、例えばFUT3およびFUT6又は他のフコシルトランスフェラーゼのmRNAを調べるかまたは検出する手順が含まれる。核酸マイクロアレイを用いて、試験およびコントロールの組織試料から得た試験およびコントロールのmRNA試料を逆転写させて、cDNAプローブを生成するために標識する。次いで、プローブを、固形支持体に固定した核酸のアレイにハイブリダイズさせる。アレイの配列および各々のメンバーの位置がわかるように、アレイを設定する。例えば、特定の疾患状態において、発現されうる遺伝子の選別を、固形支持体上に配列してもよい。特定のアレイメンバーと標識プローブとのハイブリダイゼーションは、プローブが由来する試料がその遺伝子を発現することを示す。疾患組織の差次的遺伝子発現分析は、貴重な情報を提供する。マイクロアレイ技術は、単一の実験で何千もの遺伝子のmRNA発現性質を評価するために、核酸ハイブリダイゼーション技術および演算技術を利用する。(2001年10月11日公開の国際公開公報01/75166を参照、(例えば米国特許第5,700,637号、同第5,445,934号および同第5,807,522号、Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996))、アレイ製作の考察のためにはCheung, V.G.等, Nature Genetics 21(Suppl): 15-19 (1999)を参照)。DNAマイクロアレイは、ガラスまたは他の基質上で染色されるか直接合成される遺伝子断片を含有する微小なアレイである。何千もの遺伝子は、通常単一のアレイ上に現れる。代表的なマイクロアレイ実験は以下の工程を伴う：1. 試料から単離したRNAからの蛍光性標識標的の調製、2. マイクロアレイへの標識した標的のハイブリダイゼーション、3. 洗浄、染色およびアレイのスキャニング、4. 走査画像の分析、そして5. 遺伝子発現性質の生成。一般に、DNAマイクロアレイには2つの主要な種類、cDNAから調製されたPCR産物を含有する遺伝子発現アレイおよびオリゴヌクレオ

30

40

50

チドアレイ(通常25~70マー)が用いられる。アレイを形成する際に、オリゴヌクレオチドは、事前に作製して表面にスポットしても、(インサイトで)表面上で直接合成してもよい。

【0068】

Affymetrix GeneChip(登録商標)システムは、ガラス表面上でオリゴヌクレオチドを直接合成することにより製造されるアレイを含んでなる市販のマイクロアレイシステムである。プローブ/遺伝子アレイ:オリゴヌクレオチド(通常25マー)は、半導体ベースのフォトリソグラフィと固相化学合成技術との組合せによって、ガラスウェーハ上へ直接合成される。各々のアレイは最高400,000の異なるオリゴを含み、各々のオリゴは何百万ものコピーで存在する。オリゴヌクレオチドプローブがアレイ上の既知の位置で合成されるので、ハイブリダイゼーションのパターンおよびシグナル強度は、Affymetrix Microarray Suiteソフトウェアによる遺伝子同一性と相対的な発現レベルに置き換えて解釈できる。各々の遺伝子は、一連の異なるオリゴヌクレオチドプローブによって、アレイ上に表される。各々のプローブ対は、完全一致のオリゴヌクレオチドと、不一致のオリゴヌクレオチドからなる。完全一致プローブは、特定の遺伝子に対して完全に相補的な配列を有するため、遺伝子の発現を測定する。不一致プローブは、中心塩基位置での単一塩基置換によって、完全一致プローブとは異なり、標的遺伝子転写物の結合を妨げる。これによって、完全一致オリゴを決定するシグナルの一因となるバックグラウンドおよび非特異的ハイブリダイゼーションを決定できる。Microarray Suiteソフトウェアは、完全一致プローブのハイブリダイゼーション強度から不完全一致プローブのハイブリダイゼーション強度を減算して、それぞれのプローブセットの絶対値または特異的強度の値を決定する。プローブは、Genbankおよび他のヌクレオチド貯蔵所の当時の情報に基づいて選択される。この配列は遺伝子の3'末端の特定の領域を認識すると思われる。GeneChipハイブリダイゼーションオープン(「回転式(rotisserie)」オープン)を用いて、一度に最高64アレイのハイブリダイゼーションを行う。fluidics stationでは、プローブアレイの洗浄と染色が行われる。これは完全に自動化しており、4つのモジュールを含有しており、その各々のモジュールが一つのプローブアレイを保持している。各々のモジュールは、事前にプログラム化されたfluidicsプロトコルを用いたMicroarray Suiteソフトウェアにより個々に制御される。スキャナは、プローブアレイ結合した標識cRNAにより発される蛍光強度を測定する共焦点レーザー蛍光発光スキャナである。Microarray Suiteソフトウェアを有するコンピュータワークステーションがfluidics stationとスキャナを制御する。Microarray Suiteソフトウェアは、プローブアレイについて事前にプログラム化したハイブリダイゼーション、洗浄および染色プロトコルを用いてfluidics stationを8つまで制御できる。また、ソフトウェアは、ハイブリダイゼーション強度データを得て、適切なアルゴリズムを使用して各々の遺伝子の存在/非存在情報に変換する。最後に、ソフトウェアは、比較分析によって、遺伝子発現における実験間の変化を検出して、テキストファイルに出力する。このファイルは更なるデータ分析のために他のソフトウェアプログラムに用いることができる。

【0069】

また、選択されたバイオマーカーの発現は、遺伝子欠損又は遺伝子増幅を調べることでより評価されてもよい。遺伝子欠損又は遺伝子増幅は、当分野で公知の様々なプロトコルの何れか一つ、例えば、慣例的なサザンプロット、mRNAの転写を定量化するノーザンプロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、ドットプロット(DNA分析)、又は適切に標識したプローブを用いたインサイトハイブリダイゼーション(例えばFISH)、適切に標識したプローブを用いた細胞遺伝学的方法又は比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)によって、測定できる。例として、これらの方法は、FUT3および/またはFUT6の遺伝子の増幅の欠失を検出するために用いてもよい。

加えて、組織又は細胞試料中のバイオマーカー、例えばFUT3および/またはFUT

10

20

30

40

50

6の遺伝子のメチル化状態を調べてもよい。遺伝子5'調節領域内のCpG島の異常な脱メチル化および/または過剰メチル化は、不死化細胞および形質転換細胞内でしばしば起こり、様々な遺伝子の発現が変化する。遺伝子のメチル化状態を調べるための様々なアッセイは、公知技術である。例えば、サザンハイブリダイゼーション方法では、CpG島のメチル化状態を評価するために、メチル化されたCpG部位を含有する配列を切断することができないメチル化感受性制限酵素を利用できる。加えて、MSP(メチル化特異的PCR)は、与えられる遺伝子のCpG島に存在するすべてのCpG部位のメチル化状態の分布を迅速に測定できる。この手順は、亜硫酸水素ナトリウムによるDNAの初期修飾(すべてのメチル化されていないシトシンをウラシルに変換する)の後に、メチル化されたDNA対非メチル化DNAに特異的なプライマーを用いた増幅を伴う。また、メチル化干渉を伴うプロトコールは、例えばCurrent Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995、De Marzo 等, Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)、Brooks 等, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536)、および、Lethe 等, Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998)にみられる。

【0070】

また、組織又は細胞試料中の選択されたバイオマーカーの発現は、機能的なアッセイまたは活性に基づくアッセイにより検査されてもよい。例えば、バイオマーカーが酵素である場合、組織又は細胞試料中の得られる酵素活性の存在を決定するかまたは検出するために公知技術のアッセイを行ってもよい。

本発明の方法において、組織又は細胞試料も、Apo2L/TRAILの発現又はApo2L/TRAIL又はデスレセプター抗体を結合する試料中のレセプターについて検査されることが考慮される。上記および当分野で記載されるように、現在、Apo2L/TRAILが少なくとも5つの異なるレセプター、DR4、DR5、DcR1、DcR2およびOPGと結合すると思われる。本明細書中で記載のものを含め、当分野で公知の方法を用いて、Apo2L/TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2および/またはOPGの発現を、mRNAレベルで、そして、タンパク質レベルで検出してもよい。図10および図11に示すように、データにより、DcR1および/またはDcR2のレセプターの発現について組織又は細胞試料を調べると、組織又は細胞試料がApo2L/TRAIL又はデスレセプター抗体に感受性があるかどうかについての情報がさらに得られることが示唆される。例として、上記のIHC技術を用いて、試料中の一ないし複数の上記分子の存在を検出してもよい。組織又は試料をFUT又はルイス抗原マーカーの存在についてだけでなく、例えばDR4、DR5又はDcR1の存在についても検査する方法では、同じ組織又は試料から異なるスライドを調製して、各々のスライドをそれぞれ特異的なバイオマーカーまたはレセプターに特異的な試薬で試験してもよいことが考えられる。あるいは、組織又は細胞試料から単一のスライドを調製してもよく、各々のバイオマーカー又はレセプターに対する抗体を多色染色プロトコールとともに用いて、それぞれのバイオマーカーまたはレセプターの可視化と検出を行ってもよい。

【0071】

組織又は細胞試料がApo2L/TRAIL又はデスレセプター抗体の活性に感受性があることを示す一ないし複数のバイオマーカーを組織又は細胞試料が発現すると決定すると、有効量のApo2L/TRAIL又はデスレセプター抗体を哺乳動物に投与して、哺乳動物を苦しめている癌又は免疫系関連疾患などの疾患を治療することが考慮される。本明細書中に記載の様々な病的状態の哺乳動物の診断は、熟練した実務者によって、することができる。診断用技術は、例えば、哺乳動物の癌又は免疫系関連疾患の診断又は検出が許可される当分野で有用である。例えば、癌は、限定するものではないが、触診、血液分析、X線、NMRなどの技術によって、同定してもよい。また、免疫系関連疾患は容易に同定できる。

Apo2L/TRAILまたはデスレセプター抗体は、周知の方法に従い、ボラスとしての静脈内投与、又は一定期間にわたる連続的な注入、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、骨膜内、くも膜腔内、経口、局所的又は吸入の経路により投与することがで

10

20

30

40

50

きる。場合によっては、投与は、様々な市販の装置を使用するミニポンプ注入によって実施することができる。

A p o 2 L / T R A I L または デスレセプター抗体の投与にとって有効な用量とスケジュールは、経験的に決定することができ、そのような決定を行うことは当業者の技量の範囲にある。一回又は複数回服用を用いることができる。単独で使用される A p o 2 L / T R A I L の効果的な用量又は量は、1日当たり体重の約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ から約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 又はそれより多い範囲であると現在考えられている。用量の種間スケールリングは、例えば、Mordentiら, Pharmaceut. Res., 8:1351(1991)に開示されているような、当該分野において既知の方法を用いて実施することができる。

【0072】

A p o 2 L / T R A I L のインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約 $10 \text{ng} / \text{kg}$ から $100 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲または1日当たりより多く、好ましくは約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ から $10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ とすることができる。特定の用量及び送達方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、又は第5,225,212号を参照のこと。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又は組織を標的とする投与には、他の器官又は組織とは異なる方式で送達することが必要であることが予想される。

さらに付加的な治療が本方法において使用され得ることを考慮する。一又は複数の他の治療には、限定されるものではないが、放射線治療、サイトカイン(一ないし複数)、成長阻害剤(一ないし複数)、化学治療剤(一ないし複数)、細胞障害剤(一ないし複数)、チロシンキナーゼインヒビター、r a s ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、血管形成インヒビター、及びサイクリン依存性キナーゼインヒビターなど、当該分野で公知であり、更に上記に定義されるものの投与が含まれる。このような他の治療法を、A p o 2 L / T R A I L または デスレセプター抗体とは異なる試薬として用いられうるということが考えられる。さらに、治療は、Rituxan^{T M} 又は Herceptin^{T M} 等の腫瘍抗原を標的にする治療用抗体、並びに抗 V E G F 等の抗-血管形成抗体をベースにしている。

【0073】

化学治療剤の調製と用量スケジュールは、製造者の指示書に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定されて使用される。また、このような化学治療の調製と用量スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学療法剤は、A p o 2 L / T R A I L または デスレセプター抗体の投与の前でも後でもよく、同時であってもよい。

また、他の抗原に対する抗体、例えば C D 2 0、C D 1 1 a、C D 1 8、C D 4 0、E r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、血管内皮因子(V E G F)、又は他の T N F R ファミリーのメンバー(例えば、O P G、T N F R 1、T N F R 2、G I T R、A p o - 3、T A C I、B C M A、B R 3)に結合する抗体を投与することも好ましい。別法として、あるいは付加的に、ここに開示した同一の又は二又はそれ以上の異なる抗原に結合する二又はそれ以上の抗体を患者に同時投与してもよい。しばしば、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有利である。投与後、インビトロで処理した細胞を分析することができる。インビボ処理の場合、熟練した実務者に公知の様々な方法により処理された哺乳動物をモニタリングすることができる。例えば、腫瘍細胞を病理学的に検査してネクローシスについてアッセイしてもよいし、血清を免疫系応答について分析してもよい。

【0074】

上記に記載または提案した用途への使用のために、本発明ではキットまたは製造品も提供される。このようなキットは、ガラス瓶、チューブなどの一ないし複数の密閉した容器内に収容するために区分けされている運搬容器を具備しており、それぞれの容器には本方法に使用する別個の成分の何れか一つを含んでいる。例えば、容器の一つには検出可能なように標識してあるないしは標識することができるプローブを含む。このプローブは、F

10

20

30

40

50

U T 3 および / または F U T 6 のタンパク質または F U T 3 および / または F U T 6 の遺伝子ないしは信号のそれぞれに特異的な抗体ないしはポリヌクレオチドであってもよい。標的核酸を検出するためにキットに核酸ハイブリダイゼーションが必要な場合には、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチドを収容する容器、および / または、酵素標識、蛍光標識または放射性標識などのレポーター分子に結合した、ビオチン結合タンパク質(例えばアビジンまたはストレプトアビジン)などのレポーターの働きをするものを収容する容器も具備する。

典型的に、本発明のキットは、上記の容器と、商業的および使用者の観点からみて望ましい物質、例えばバッファ、希釈液、フィルター、針、注射器および使用のための指示書を有するパッケージ挿入物を収容する一ないし複数のその他の容器とを具備する。特定の治療または非治療の用途に該組成物が使用されることを示すために容器上にラベルがあってもよく、またそのラベルは上記のようなインビボの使用またはインビトロの使用の何れかについての指導を示すものであってもよい。

【 0 0 7 5 】

本発明のキットは多くの実施態様を有する。典型的な実施態様は、容器と、該容器上のラベルと、該容器内に収容される組成物を具備するキットであり、この場合の組成物は F U T 3 および / または F U T 6 のポリペプチド配列に結合する一次抗体を含有するものであり、該容器上のラベルは、該組成物を用いて少なくとも一種類の哺乳動物細胞中の F U T 3 および / または F U T 6 のタンパク質の存在を評価することができることと、少なくとも一種類の哺乳動物細胞中の F U T 3 および / または F U T 6 のタンパク質の存在を評価するための F U T 3 および / または F U T 6 の抗体の使用についての指示書を示すものである。さらに、キットは、組織試料を調整して組織試料の同一片に抗体およびプローブを適用するための一組の指示書と材料を具備しうる。キットは、一次抗体と、酵素標識などの標識にコンジュゲートしている二次抗体の両方を具備してもよい。

他の実施態様は、容器と、該容器上のラベルと、該容器内に収容される組成物を具備するキットであり、この場合の組成物はストリンジェントな条件下で F U T 3 および / または F U T 6 のポリヌクレオチドの相補鎖とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含有するものであり、該容器上のラベルは、該組成物を用いて少なくとも一種類の哺乳動物細胞中の F U T 3 および / または F U T 6 の存在を評価することができることと、少なくとも一種類の哺乳動物細胞中の F U T 3 および / または F U T 6 の RNA または DNA の存在を評価するための F U T 3 および / または F U T 6 のポリヌクレオチドの使用についての指示書を示すものである。

キットの他の任意の成分には、一ないし複数のバッファ(例えばブロックバッファ、洗浄バッファ、基質バッファなど)、酵素標識によって化学的に変化する基質などの他の試薬(例えば色素原)、エピトープ探索溶液、コントロール試料(ポジティブコントロールおよび / またはネガティブコントロール)、コントロールスライド(一ないし複数)などがある。

【 0 0 7 6 】

(実施例)

さらに、本発明の様々な態様を以下の実施例によって記載し、例示する。これらは本発明の権利範囲を減縮するためのものではない。

方法および材料

細胞培養物および細胞株

以下のヒト結腸直腸腺癌細胞株 : H C T - 8、C O L O 2 0 5、H C T 1 1 6、S W 4 0 3、L o V o、S W 9 4 8、C a c o - 2、C O L O 2 0 1、S W 1 4 1 7、D L D - 1、C X - 1、H C T - 1 5、L S 1 8 0、R K O、R K O - A S 4 5 - 1、S K - C O - 1、S W 4 8 0、S W 6 2 0、S W 8 3 7、C L - 4 0、C O L O - 2 0 6 F、C O L O 3 2 0 D M、C O L O 3 2 0 H S R、C O L O - 6 7 8、H T - 2 9、K M 1 2、L S 1 0 3 4、S W 1 1 1 6 は、A T C C 寄託機関(Manassas, Virginia)、D S M Z (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)、J C R B (日本の細胞バンク)又は E C A C C (

10

20

30

40

50

ヨーロッパの細胞培養株寄託機関)から得て、10%熱不活性ウシ胎児血清、2 mMのL-グルタミンおよび10 mMのHEPESを添加したRPMI-1640培地で培養した。

【0077】

細胞障害性アッセイ

可溶性黄色テトラゾリウム塩(MTT)を青いホルマザン結晶に還元する生存細胞の能力に基づいた比色アッセイであるMTTアッセイ(Promegaから入手のCellTiter96(登録商標)Non-Radioactive Cell Proliferation Assay)を用いてApo2L/TRAILまたはDR5抗体で処理した後の生存細胞の量を測定した。MTTアッセイは、様々な濃度(0~1000 ng/ml)のApo2L/TRAIL又はDR5抗体を含有する96ウェルプレートの培養ウェルに、予め混合した好適な色素溶液を添加することにより行った。4時間のインキュベーションの間、生細胞は、色素溶液のテトラゾリウム成分をホルマザン(formazan)産物に変換する。次いで、溶解液/停止液を培養ウェルに添加して、ホルマザン産物を溶解し、96ウェルプレート読み取り機(SpectraMax)を使用して570 nmの吸光度を記録した。読み取った570 nmの吸光度は、増殖アッセイにおいて、通常使用される細胞の数に正比例する。ホルマザン産物の吸光度の最大が570 nmであり、純粋な溶液が青く見えるにもかかわらず、アッセイ終了時の色は青ではなく、培養液中の他の成分(血清、酸性化フェノールレッドおよび非還元MTTを含む)と関連して存在するホルマザンの量に依存する。

細胞の力価測定を行うことによって、細胞数を最大限に利用して、アッセイの線形範囲の上限に近いアッセイシグナルを産生した。種類が異なる細胞は異なるレベルの代謝活性を有するので、各細胞株ごとに行った。試験する多くの腫瘍細胞は、1ウェル当たり5,000から20,000個の細胞を用いた。

【0078】

以下は、行ったアッセイの工程ごとの説明である：

1. 保存培養物の細胞をバイオアッセイに使用した。
2. 細胞数とトリパンプルー生存度を測定し、最終的に1ウェル当たり5,000~20,000個の細胞を懸濁した。
3. 96ウェルプレートへ50 µlの細胞懸濁液を分注した。
4. プレートを37 °Cの加湿した5%CO₂大気中にて終夜インキュベートした。
5. 0から1,000 ng/mlの範囲の様々な濃度のApo2L/TRAIL又はDR5抗体を含有する50 µlの培養液を96ウェルプレートの試料に添加した。50 µlの培養液(Apo2L/TRAIL又はDR5抗体なし)および100 µl培養液(細胞なし)をコントロールとした。

すべての実験は3日間で3通り行った。ウェルの総容積は100 µl/ウェルであった。

6. プレートを37 °Cの加湿した5%CO₂大気中で72時間インキュベートした。
7. 各々のウェルに15 µlの色素溶液を添加した。
8. プレートを37 °Cの加湿した5%CO₂大気中で最大4時間インキュベートした。
9. 各々のウェルに100 µlの溶解液/停止液を添加した。
10. プレートを37 °Cで終夜インキュベートした。
11. 96ウェルプレート読み取り機を使用して570 nm波長の吸光度を記録した。750 nmの参照波長を用いて、細胞片、指紋および他の非特異的な吸光度によって、生じるバックグラウンドを減算した。

12. ネガティブコントロールの吸光度値の平均を、ブランク値(空試験値)として用いて、他の全ての読み取り値から減算した。各濃度のApo2L/TRAIL又はDR5抗体の吸光度値の平均を、ポジティブコントロールの吸光度値の平均で割って(100%生存細胞-無処理細胞)、生存細胞の量(%)を算出した。

13. Apo2L/TRAIL又はDR5抗体の濃度(X軸、対数値)に対するパーセント生存細胞(Y軸)をプロットして、50%の生存細胞に相当するX軸値(ng/ml)の位置を決めることによって、IC50値を決定した。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 9 】

Affymetrix標識プロトコール

すべての試料についてOD 260 / 280を読み取り、試料をBioAnalyzerにかけた。

5 μ gの高純度の総RNAを用いた。

A. First Strand cDNA合成:

1. プライマーハイブリダイゼーション

DEPC-H₂O $x \mu$ l ボルテックスによって混合。少し遠心。

RNA (5 μ g) $y \mu$ l 10分間70 でインキュベート。

スパイク(Spike)(5 μ gに対して1:4で保存液を希釈) 1μ l 少し遠心して氷上に置く。 10

T7-(dT)₂₄プライマー 1μ l

容量 12μ l

2. 温度調節

5 x First Strand cDNAバッファ 4μ l

各試料に 7μ lを(混合物の 7μ lを左側に)添加。

0.1 M DTT 2μ l ボルテックスによって混合。少し遠心。

10 mM dNTP混合液 1μ l 2分間42 でインキュベート。

容量 7μ l

3. First Strand合成

1μ lのSSII RTを各々の試料に加える。 20

SSII RT 1μ l 上下にピペティングするか、軽くボルテックスをかけて混合。少し遠心。

総容積 20μ l 1時間42 でインキュベート。

【 0 0 8 0 】

B. Second Strand cDNA合成

1. First Strand反応物を氷上に置く。しばらく遠心してチューブの側面の凝集塊を落とす。

2. 以下のSecond Strandマスター混合液を作る。

DEPC処理H₂O 91μ l

5 x Second Strand反応バッファ 30μ l 30

10 mM dNTP混合液 3μ l

10 U / μ l DNAリガーゼ 1μ l

10 U / μ l DNAポリメラーゼI 4μ l

2 U / μ l RNアーゼH 1μ l

総容積 130μ l

3. 130μ lのSecond Strandマスター混合液を 20μ lのFirst Strand cDNAに加える。(最終的な容量 = 150μ l)

4. 上下にピペティングするか、軽くボルテックスをかけて混合。少し遠心。

5. 冷却用ウォーターバスにて16 で2時間インキュベート。

6. 2μ lの[10 U] T4 DNAポリメラーゼを添加。上下にピペティングするか、軽くボルテックスをかけて混合。少し遠心。 40

7. 16 で5分間インキュベート。

8. 10μ lの0.5 M EDTAを加える。軽くボルテックスにかける。少し遠心。

9. cDNAの精製手順に進むか、その後の使用のために -20 で保存。

【 0 0 8 1 】

二本鎖cDNAの精製(GeneChip 試料精製 Module)

1. 600μ lのcDNA結合バッファを 162μ lの最終的な二本鎖cDNA合成調製物に添加。

3秒間ボルテックスにかけて混合。

2. 混合物の色が黄色(cDNA合成反応を含まないcDNA結合バッファと同様)であ 50

ることを確認。

混合物の色が橙又は紫である場合、 $10\ \mu\text{l}$ の $3\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム、 $\text{pH}\ 5.0$ を加えて混合する。

混合物の色は黄色に変化する。

3. $2\ \text{ml}$ の収集チューブにセットした cDNA 精製スピncラムに $500\ \mu\text{l}$ の試料を入れて、

$8,000\times g$ 以上($10,000$ 回転数/分以上)で1分間遠心。流れ出たものを有害廃棄物として廃棄。

4. 残りの混合物($262\ \mu\text{l}$)とともにスピncラムを再び流し、上記のように遠心した。

流れ出たものを有害廃棄物として廃棄して、収集チューブを廃棄した。

5. 新しい $2\ \text{ml}$ の収集チューブ(購入品)に、スピncラムを移す。スピncラムに $750\ \mu\text{l}$ の cDNA 洗浄液を注入する。 $8,000\times g$ 以上($10,000$ 回転数/分以上)で1分間遠心。

流れ出たものを廃棄する。

6. スピncラムの蓋を開け、最大速度($25,000$ の $\times g$ 以下)で5分間遠心。第二のバケツを用いて遠心器内にcラムを置く。キャップが回転に対して反対方向に向くように隣接しているバケツを越えてキャップを位置する、すなわち回転が時計回りの場合、反時計回りにキャップを配置する。これによって、キャップへの損傷を防ぐ。

流れ出たものと収集チューブを廃棄する。

7. $1.5\ \text{ml}$ の収集チューブ内にスピncラムを移す。スピncラム膜上に $10\ \mu\text{l}$ の cDNA 溶出バッファを注入する。 cDNA 溶出バッファが膜上へ直接分配されることを確認する。

室温で1分間インキュベートして、最大速度($25,000\times g$ 以下)で1分間遠心して溶出させる。

【0082】

I V T反応の準備と実施

Enzo: バイオアレイ高収率 RNA転写物標識キット(Part No. 900182)

1. $10\ \mu\text{l}$ の精製した二本鎖 cDNA を用いる。

2. 以下のI V Tマスター混合物を作る:

蒸留水または脱イオン化水 $12\ \mu\text{l}$

$10\times$ H Y 反応バッファ $4\ \mu\text{l}$

$10\times$ ビオチン標識リボヌクレオチド $4\ \mu\text{l}$

$10\times$ D T T $4\ \mu\text{l}$

$10\times$ R Nアーゼインヒビター混合物 $4\ \mu\text{l}$

$20\times$ T 7 RNAポリメラーゼ $2\ \mu\text{l}$

総容積: $30\ \mu\text{l}$

3. $30\ \mu\text{l}$ のI V Tマスター混合物を $10\ \mu\text{l}$ の二本鎖 cDNA に加える。(総容積 = $40\ \mu\text{l}$)

4. 上下にピペッティングするか、軽くボルテックスをかけて混合。少し遠心。

5. すぐにチューブを 37°C のウォーターバスに置く。5時間インキュベートする。

6. すぐにRNAを精製しない場合は -20°C に貯蔵。

【0083】

ビオチン標識 cRNA の精製(GeneChip 試料精製 Module)

1. $60\ \mu\text{l}$ の H_2O をI V T反応に加えて、3秒間ボルテックスにかけて混合する。

2. $350\ \mu\text{l}$ のI V T cRNA 結合用バッファを試料に加えて、3秒間ボルテックスにかけて混合する。

3. $250\ \mu\text{l}$ のエタノール($96\sim 100\%$)を溶解物に加えて、ピペッティングによって、ウェルを混合する。遠心分離しない。

4. $2\ \text{ml}$ の収集チューブに配置したI V T cRNA 精製スピncラムに、試料(7

10

20

30

40

50

00 μ l)を添加する。

8,000 \times g以上(10,000回転数/分以上)で15秒間遠心分離する。

5. もう一度溶出物をカラムに通す。

8,000 \times g以上(10,000回転数/分以上)で15秒間遠心分離する。

流れ出たものを有害廃棄物として廃棄して、収集チューブを廃棄する。

6. 新しい2mlの収集チューブ(購入品)内にスピncラムを移す。

7. 500 μ lのIVT cRNA洗浄バッファを加えて、8,000 \times g以上(10,000回転数/分以上)で15秒間遠心して洗浄する。

流れ出たものを廃棄する。

8. 500 μ lの80%(v/v)エタノールをスピncラムに注入し、

8,000 \times g以上(10,000回転数/分以上)で15秒間遠心分離する。流れ出たものを廃棄する。

9. スピncラムのキャップを開け、最大速度(25,000 \times g以下)で5分間遠心する。

流れ出たものと収集チューブを廃棄する。

10. 新しい1.5mlの収集チューブにスピncラムを移す。

11. 11 μ lの無RNアーゼ水をスピncラム膜上に直接注入する。1分間放置する。最大速度(25,000 \times g以下)で1分間遠心する。

12. 10 μ lの無RNアーゼ水をスピncラム膜上に直接注入する。1分間放置する。

最大速度(25,000 \times g以下)で1分間遠心する。

【0084】

cRNA(IVT生成物)の定量化

吸光度分析法を用いてRNA収率を測定する。260nmの1ODが40 μ g/mlのRNAに等しくなる定値を適用する。

260nmおよび280nmのODをチェックして試料濃度および純度を測定する。

純粋なRNAの2.0に近いA260/A280比を維持する(1.9と2.1との間の比は許容範囲内である)。

出発原料として総RNAを用いた場合のcRNAの定量化では、調整されたcRNA収率を算出して非標識の総RNAの超過量を示さなくてはならない。100%超過量を見積もって、以下の式にあてはめて調整されたcRNA収率を決定する：

調整されたcRNA収率 = RNA_m (総RNA_i)(y)

RNA_m = IVT後の測定したcRNAの量(μ g)

総RNA_i = 総RNAの開始量(μ g)

y = IVTで用いたcDNA反応の分画

【0085】

標的物調節のためのcRNA断片化

断片化のために、調整されたcRNA濃縮物を使用する。

1. 8 μ lのRNAとH₂Oに対して2 μ lの5 \times 断片化バッファを添加。

20 μ g cRNA 1~32 μ l

5 \times 断片化バッファ 8 μ l

無RNアーゼ水で40 μ lにする

総容積： 40 μ l

2. 94 で30分間インキュベート。インキュベーション後すぐに氷上に置く。

【0086】

ハイブリダイゼーション標的物の調整

1. 20 \times 真核生物のハイブリダイゼーションコントロールとオリゴB2を65 で5分間暖める。

Affymetrix GeneChip真核生物のハイブリダイゼーションコントロールキット、Part # 900362(150rxnsに対して)

10

20

30

40

50

2. 軽く混合して遠心して側面の付着物を落とす。
3. マスター混合物(断片化したcRNA濃縮物が0.5 µg / µlである場合):

標準的アレイ(µl)	最終濃度
断片化されたcRNA 15 µg 30	0.05 µg / µl
オリゴB2(3 nM) 5	50 pM
20×コントロールスパイク 15 (Bio、B、C、D、Cre)	1.5、5、25、100 pM
ニシン精液DNA 3	0.1 mg / ml
アセチル化BSA 3	0.5 mg / ml
Hu cot-1 DNA(1 mg / ml) 30	0.1 mg / ml
2×MES Hybバッファ 150	1×
H2O 64	
終容量 300	
4. 270 µlのマスター混合物をチューブ内に分注して、各々のチューブに30 µlの断片化cRNAを添加。これをハイブリダイゼーション混合物とする。
5. プロブアレイを使用の直前に室温に戻す。
6. プロブアレイを1×MES Hybバッファで満たして、45 で60回転数/分、10分間、回転式オープンでインキュベート。
7. ハイブリダイゼーション混合物を99 のウォーターバスで5分間加熱する。
8. ハイブリダイゼーション混合物を45 のウォーターバスに移し5分間置く。
9. ハイブリダイゼーション混合物を最大速度で5分間遠心分離する。
10. プロブアレイから1×MES Hybバッファを取り除く。
11. プロブアレイを200 µlのハイブリダイゼーション混合物で満たす。
12. 粘性の斑点(Tough-Spots)を有する隔壁(septa)を密閉する。
13. 45、60回転数/分で19時間、プロブアレイをハイブリダイズさせる。
14. Affymetrixプロトコールに従ってプロブアレイを洗浄し、着色し、スキャンする。

10

20

【0087】

Affymetrix材料

部材	販売元	カタログ #	
T7-(dT)24 プライマー	Biosearch Technologies	custom	
コントロールスパイク	in-house	-	
Superscript II/5×First Strandバッファ/0.1M DTT	Invitrogen	18064-014	
5×Second Strandバッファ	Invitrogen	10812-014	
10mM dNTP	Invitrogen	18427-088	
10U/ul 大腸菌DNA リガーゼ	Invitrogen	18052-019	
10U/ul 大腸菌DNA ポリメラーゼI	Invitrogen	18010-025	
2U/ul RNアーゼ H	Invitrogen	18021-071	
10U/ul T4 DNA ポリメラーゼ	Invitrogen	18005-025	
0.5M EDTA	Sigma	E-7889	10
ENZO 高収率 RNA転写物標識キット	AffymetrixまたはENZO	900182 (ENZO)	
GeneChip試料精製Module	Affymetrix	900371	
アセチル化ウシ血清アルブミン	Invitrogen	15561-020	
ヤギIgG - 試薬精度	Sigma	I-5256	
抗ストレプトアビジン抗体(ヤギ), ビオチン化	Vector Labs	BA-0500	
R-フィコエリトリンストレプトアビジン	Molecular Probes	S-866	
20×SSPE	BioWhittaker	51214	
真核生物コントロールキット	Affymetrix	900362	
水, 分子生物学的の精度	Ambion	9934	
ヒトCot-1 DNA	Roche	1-581-074	
5M NaCl 無RNアーゼ, 無DNアーゼ	Ambion	9760	
Antifoam 0-30	Sigma	A-8082	20
10% Tween-20	Pierce Chemical	28320	
MES遊離酸一水和物	Sigma	M5287	
MESナトリウム塩	Sigma	M3885	
EDTA ジナトリウム塩, 0.5M溶液	Sigma	E7889	
Tough Spots, Label Dots	USA Scientific	9902	
GeneChip ハイブリダイゼーションオープン640	Affymetrix	800139	
GeneChip スキャナー3000 w/ワークステーション	Affymetrix	00-0074	
Fluidics Station	Affymetrix	00-0081	
オートローダーw/外部バーコード読み取り機	Affymetrix	00-0129	

【 0 0 8 8 】

量的 P C R

c D N A 合成 :

30

成分	容量 (μL)
10×RT バッファ	10
25×dNTP 混合液	4
10×ランダムプライマー	10
MultiScribe RT (50U/μL)	5
無 RN アーゼ H2O	21
RNA (100ng)	50
終容量	100

40

【 0 0 8 9 】

インキュベーション条件 :

2 5 で 1 0 分間

3 7 で 2 時間

A B I プリズム 7 7 0 0 配列決定検出器を用いた T a q M a n 反応 :

成分	容量 (μL)
TaqMan ユニバーサル PCR 基本混合液 (2×)	25
TaqManプローブ (20×) (Assays-on-Demand™)	2.5
cDNA (100ng)	2
H2O	20.5
終容量	50

【 0 0 9 0 】

サーマルサイクル条件：

95 で10分間

40 サイクル：95 で15秒間

60 で1分間

・TaqManプローブ：Assays-on-Demand™(TaqMan(登録商標) MGBプローブ、FAM™色素標識)

・内在性コントロールであるGAPDHの増幅(プローブ濃度100nM、フォワードおよびリバースプライマー濃度200nM)を行い、各反応液に加えた試料RNA(cDNA)の量を標準化する。

標準曲線法を用いて相対的な定量を行った。内在性コントロールへの正規化される定量のために、標的および内在性コントロールの両方について標準曲線を作製した。各実験試料については、標的および内在性コントロールの量は、適当な標準曲線から決定した。次いで、標的量を内在性コントロール量で割って標準化された標的値を求めた。実験試料のうちの一つを較正物質又は1×試料とした。次いで、各々の正規化した標的値を較正物質正規化標的値で割って、相対的な発現レベルを求めた。

【 0 0 9 1 】

FACS/Flow血球計算(2°抗体染色プロトコール)：

すべてのインキュベーションとスピンを4で行い、チューブが冷蔵庫内にはない場合は氷上に置いた。

1. 使用する細胞株を特定することによって、チューブ形式を決定し、対象の抗体および任意の特定の処理条件を決定した。

a. コントロール：

i. 蛍光色素が発光スペクトルに重なり合う場合は非染色2°抗体と較正物質。

b. 実験：

チューブ	細胞株	時間(分)	1° 抗体	2° 抗体
1	例として COLO-205	0	—	—
2	例として COLO-205	0	—	抗マウス-FITC
3	例として COLO-205	0	抗シアリルイスA	抗マウス-FITC
4	例として COLO-205	0	抗 CD15s (シアリルイス X)	抗マウス-FITC

【 0 0 9 2 】

2. FACSチューブを標識。

a. BDファルコン12×75mmポリスチレン丸底。カタログ#：352052

3. 染色のために細胞を調製する。

a. 付着細胞をAccutase又はトリプシンで処理する。

i. Innovative Cell Technologies Inc, Accutase。

ii. Gibco, トリプシン カタログ#：25200-106。

b. 細胞が懸濁したら、残りの工程を行う。

4. 15 mL又は50 mLの円錐形のチューブに細胞を分注する。
5. 細胞を4で1,200回転数/分、5分間回転させる。
6. 上清を吸引する。
7. 細胞を5 mLのFACSバッファ中に再懸濁する。
8. 細胞を4で1,200回転数/分、5分間回転させる。
9. 上清を吸引する。
10. 細胞をブロッキングバッファ中に再懸濁する。
- a. 必要とされるブロッキングバッファの容量を決定する：
- i. 一細胞株当たり多くのチューブ/1本のチューブ当たり100 μ lの処理×ブロッキングバッファ。 10
- ii. 100 μ lのブロッキングバッファにつき、 1×10^6 細胞個。
11. 100 μ lの細胞を適当なチューブに分注。
- a. 予め決定したチューブ形式に基づく。
- 【0093】
12. 1°抗体を適当なチューブに加える。
- a. ルイスA：
- i. 1チューブにつき10 μ lの0.2 μ g/ μ l貯蔵物を使用。
1. 終濃度2 μ gである。
- ii. Chemicon：抗シアリルルイスA カタログ#：MAB2095。 20
- b. ルイスX：
- i. 1チューブにつき5 μ lの0.5 μ g/ μ l貯蔵物を使用。
1. 終濃度は2.5 μ gである。
- ii. BD Pharmingen：CD15(シアリルルイスX)。カタログ#：551344。
13. 4で30分間インキュベート。
14. 1 mLのFACSバッファを各チューブに加える。
15. 細胞を4で1200回転数/分、5分間スピンさせる。
16. 上清を吸引する。
17. 穏やかにチューブをしぼって、ペレットを除去する。
- a. 「ラック」-12×75 mmチューブラックの表面全体に対してチューブを反応 30
させる。
18. 処置14-17を繰り返す。
19. 100 μ lのブロッキングバッファを各チューブに加える。
20. 適当なチューブに2°抗体を加える。
- a. 1チューブにつき10 μ lを使用。
- b. Jackson、ヤギ-抗マウスFITC。カタログ#：115-096-068。
21. 4で30分間インキュベート。
22. 処置14-17を2回繰り返す。
23. 細胞をFACSバッファ/PI中に再懸濁する。
- a. 必要とされる容量の決定： 40
- i. 1チューブにつき1 mLの溶液を必要とする。
- ii. PI = 1 mLのバッファにつき1 μ l。
- b. 分子プローブ(ヨウ化プロピジウム)。カタログ#：P3566。
24. 冷却バケツ又は冷却したチューブラックにチューブを置く。
25. アルミニウム箔で覆い、許可が必要な操作であるためFACS研究室に持って行き、試料の採取と分析を行った。
- 【0094】
- 5%ブロッキングバッファ：
1. 総容積の5%のFBS。
2. FACSバッファ。 50

3. 溶液を0.2 μmのフィルタでろ過する。

FACSバッファ:

1. PBS 980 mL。

2. 0.25 M EDTA 8 mL。

3. FBS 20 mL。

4. 溶液を0.2 μmのフィルタでろ過する。

【0095】

免疫組織化学手順: シアリルルイスA

抗体: シアリルルイスA AB-1

クローン: 121SLE

供給元: NeoMarkers

カタログ番号 MS-279-P

Ig種: マウス

IHC方法: パラフィン

前処置: なし

IHC処理: Autostainer

アイソタイプ: マウスIgM

処理種: ヒト

IgG濃度: 200 μg/mL

【0096】

通常の手順:

蒸留水に対する脱パラフィン化させ、水和させる。

ベクターアビジンビオチンブロックシステムにより内在性ビオチンをブロック。

TBSにてすすぐ: 2回交換して各々5分間ずつ行う。

10%正常ウマ血清にて室温で30分間ブロックする。

10%正常ウマ血清にて5 μg/mLに希釈したマウスモノクローナルシアリルルイスA抗体とともに切片を室温で60分間インキュベートする。

10%正常ウマ血清にて5 μg/mLに希釈したマウスアイソタイプIgMをネガティブコントロールとして用いた。

TBSにてすすぐ: 2回交換して各々5分間ずつ行う。

ビオチン化ウマ抗マウス抗体とともに切片をインキュベート、10%正常ウマ血清にて1:200に希釈して室温に30分間置く。

TBSにてすすぐ: 2回交換して各々5分間ずつ行う。

希釈したベクターABC溶出システムにて切片を室温で30分間インキュベートする。

TBSにてすすぐ: 2回交換して各々5分間ずつ行う。

Pierce Metal Enhanced DABにて切片を5分間インキュベート。

Running Tap水中で5分間すすぐ。

Mayersヘマトキシリンにて1分間対比染色。

Running Tap水中で5分間すすぐ。

Richard-Allan青色試薬にてヘマトキシリンを1分間処理して青くする。

Running Tap水中で2分間すすぐ。

合成マウント展色剤中で脱水し、精製してマウントする。

【0097】

免疫組織化学手順: シアリルルイスX

抗体: マウス抗シアリルルイスX

クローン: KM93

供給元: Chemicon

カタログ番号 MAB2096

Ig種: マウス

IHC方法: パラフィン

10

20

30

40

50

前処置 : DAKO Target Retrieval

I H C 処理 : Autostainer

アイソタイプ : マウス I g M

処理種 : ヒト

I g G 濃度 : 1 0 0 u g / m l

【 0 0 9 8 】

通常の手順 :

蒸留水に対する脱パラフィン化させ、水和させる。

K P L ブロック溶液にて内在性ペルオキシダーゼ活性を止める。水にて 1 : 1 0 に希釈して、室温にて 4 分間置く。

蒸留水にて 5 分間すすぐ。

沸騰槽中に 2 0 分間置いて 9 9 まで予め熱した DAKO Target Retrieval (S1700) 中でインキュベートする。沸騰槽から取り出して 2 0 分間冷ます。

ベクターアビジンピオチンブロッキングシステムにより内在性のピオチンをブロックする。

1 0 % 正常ウマ血清にて室温で 3 0 分間ブロックする。

1 0 % 正常ウマ血清にて 5 μ g / m l に希釈したマウスモノクローナルシアリルルイス X 抗体とともに切片を室温で 6 0 分間インキュベートする。

1 0 % 正常ウマ血清にて 5 μ g / m l に希釈したマウスアイソタイプ I g M をネガティブコントロールとして用いた。

T B S にてすすぐ : 2 回交換して各々 5 分間ずつ行う。

ピオチン化ウマ抗マウス抗体とともに切片をインキュベート、1 0 % 正常ウマ血清にて 1 : 2 0 0 に希釈して室温に 3 0 分間置く。

T B S にてすすぐ : 2 回交換して各々 5 分間ずつ行う。

希釈したベクター A B C 溶出システムにて切片を室温で 3 0 分間インキュベートする。

T B S にてすすぐ : 2 回交換して各々 5 分間ずつ行う。

Pierce Metal Enhanced DAB にて切片を 5 分間インキュベート。

Running Tap 水中で 5 分間すすぐ。

Mayers ヘマトキシリンにて 1 分間対比染色。

Running Tap 水中で 5 分間すすぐ。

Richard-Allan 青色試薬にてヘマトキシリンを 1 分間処理して青くする。

Running Tap 水中で 2 分間すすぐ。

合成マウント展色剤中で脱水し、精製してマウントする。

【 0 0 9 9 】

実験結果 :

実験は前述の方法および材料を使用して行った。後述するように、これらの実験の結果は、図 6 - 1 3 に示す。

図 6 では、A p o 2 L (+ 0 . 5 % ウシ胎児血清「 F B S 」 又は 1 0 % F B S) 又は D R 5 モノクローナル抗体「 m a b 」 (架橋あり「 X L 」 又は、架橋なし、 + 0 . 5 % ウシ胎児血清「 F B S 」 又は 1 0 % F B S) のアポトーシス活性に対して感受性であるか抵抗性であるか、および F U T 3、F U T 6、シアリルルイス A およびシアリルルイス X の発現について、2 8 の大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株を分析して得たデータの概略図を示す。

図 7 では、定量的 P C R で測定した、D R 5 抗体に対する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性と、F U T 3 の発現の比較を示す。

図 8 では、F A C S によって測定した、D R 5 抗体 (+ 架橋剤) に対する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性または抵抗性と、シアリルルイス X または A の発現の比較を示す。

図 9 A では、F U T 3 の発現と様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性または抵抗性との相関を分析するための、スピアマン順位相関検査を示す。

10

20

30

40

50

図9Bでは、様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性(「感受性」)又は抵抗性(「抵抗性」)と、FUT3とシアリルルイスA/X発現との統計学的有意差と、DR5抗体のアポトーシス活性に対するそれぞれの細胞株の感受性を分析するフィッシャー正確試験の結果を示す。

【0100】

図10では、DcR1又はDcR2レセプターの発現に関する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の比較(定量的PCRによって測定したもの)と、Apo2L又はDR5抗体に対する特定の細胞株の状態(感受性が抵抗性か)を示す。

図11では、DcR1又はDcR2レセプターの発現に関する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の比較(FACSによって測定したもの)と、Apo2L又はDR5抗体に対する特定の細胞株の状態(感受性が抵抗性か)を示す。

図12では、4つの結腸直腸癌細胞株、CaCo2(Colo2)、SW1417、DL D-1およびColo205のシアリルルイスAおよびXの免疫組織化学的染色と、FACSで測定されるシアリルルイスAおよびXの発現との相関と、Apo2L/TRAILに対する感受性との相関を示す。結腸直腸癌細胞株のColo2は全く染色されず、SW1417はわずかに染色されたのみであり、またはFACSではシアリルルイス抗原はそれぞれ陰性およびわずかに陽性であり、Apo2L/TRAILに抵抗性を示した。結腸直腸癌細胞株のDL D-1およびColo205は、それぞれシアリルルイス抗原に対して中程度および強い染色を示し、FACSではそれぞれ中程度の陽性および強い陽性を示し、Apo2L/TRAILに対して感受性を示した。

図13では、正常大腸粘膜、正常肝組織、原発性大腸癌および大腸癌転移の組織試料におけるシアリルルイスAおよびXの発現を示すIHC実験の概要を示す。組織マイクロアレイで配列させた正常大腸および原発性大腸癌の組織試料をIHC実験で試験し、正常肝および転移性大腸癌の組織試料をそれぞれガラススライドに載せた。シアリルルイスAおよびXの発現の範囲と免疫組織化学染色強度は、正常大腸組織、原発性大腸癌、転移性大腸癌の順に増加した。正常肝細胞はシアリルルイスAに関してシアリルルイスXに関しても染色されなかった。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】ヒトApo-2リガンドcDNA(配列番号:2)のヌクレオチド配列およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:1)を示す。ヌクレオチド位置447の「N」は、ヌクレオチド塩基が「T」又は「G」であってもよいことを示すために用いる。

【図2A】完全長ヒトDR4のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:4)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:3)を示す。また、ヒトDR4のそれぞれのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、Pan等, Science, 276:111(1997)に報告される。

【図2B】完全長ヒトDR4のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:4)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:3)を示す。また、ヒトDR4のそれぞれのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、Pan等, Science, 276:111(1997)に報告される。

【図3A】1998年11月19日の国際公開公報98/51793に公開されるヒトDR5の411のアミノ酸配列(配列番号:5)を示す。

【図3B】ヒトDR5の転写スプライシング変異体は当分野で公知である。1998年8月20日の国際公開公報98/35986に公開される、このDR5スプライシング変異体は図3Bおよび図3Cに示されるヒトDR5の440のアミノ酸配列(配列番号:6)をコードする。

【図3C】ヒトDR5の転写スプライシング変異体は当分野で公知である。1998年8月20日の国際公開公報98/35986に公開される、このDR5スプライシング変異体は図3Bおよび図3Cに示されるヒトDR5の440のアミノ酸配列(配列番号:6)をコードする。

【図3D-1】完全長ヒトDcR1のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:7)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:8)を示す。また、ヒトDcR1(およびその特

10

20

30

40

50

定のドメイン)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列のそれぞれは、国際公開公報 98 / 58062 に記載される。

【図3D-2】完全長ヒトDcR1のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:7)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:8)を示す。また、ヒトDcR1(およびその特定のドメイン)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列のそれぞれは、国際公開公報 98 / 58062 に記載される。

【図3D-3】完全長ヒトDcR1のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:7)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:8)を示す。また、ヒトDcR1(およびその特定のドメイン)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列のそれぞれは、国際公開公報 98 / 58062 に記載される。

【図3E-1】完全長ヒトDcR2のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:9)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:10)を示す。ヒトDcR2(およびその特定のドメイン)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列のそれぞれは、国際公開公報 99 / 10484 に示される。

【図3E-2】完全長ヒトDcR2のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:9)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:10)を示す。ヒトDcR2(およびその特定のドメイン)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列のそれぞれは、国際公開公報 99 / 10484 に示される。

【図4】完全長ヒト(1,3/1,4)フコシルトランスフェラーゼ(FUT3)のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:11)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:12)を示す。これらの配列は、GenBank受託番号HSU27328に対応しており、Kukowska-Latallo 等, Genes Dev. 1990 Aug, 4(8): 1288-303の実施例に記述されている。

【図5】完全長ヒト(1,3)フコシルトランスフェラーゼ(FUT6)のcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:13)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号:14)を示す。これらの配列は、GenBank受託番号HSU27333に対応しており、KoszdinおよびBowen, Biochem Biophys Res Commun. 1992 Aug 31, 187(1): 152-7の実施例に記述されている。

【図6】Apo2L(+0.5%ウシ胎児血清「FBS」又は10%FBS)又はDR5モノクローナル抗体「mab」(架橋あり「XL」又は、架橋なし、+0.5%ウシ胎児血清「FBS」又は10%FBS)のアポトーシス活性に対して感受性であるか抵抗性であるか、およびFUT3、FUT6、シアリルルイスAおよびシアリルルイスXの発現について、28の大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株を分析して得たデータの概略図。

【図7】定量的PCRで測定した、DR5抗体に対する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性と、FUT3の発現の比較を示す。

【図8】FACSによって測定した、DR5抗体(+架橋剤)に対する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性または抵抗性と、シアリルルイスXまたはAの発現の比較を示す。

【図9A】FUT3の発現と様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性または抵抗性との相関を分析するための、スピアマン順位相関検査を示す。

【図9B】様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の感受性(「感受性」)又は抵抗性(「抵抗性」)と、FUT3とシアリルルイスA/X発現との統計学的有意差と、DR5抗体のアポトーシス活性に対するそれぞれの細胞株の感受性を分析するフィッシャー正確試験の結果を示す。

【図10】DcR1又はDcR2レセプターの発現に関する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の比較(定量的PCRによって測定したもの)と、Apo2L又はDR5抗体に対する特定の細胞株の状態(感受性が抵抗性か)を示す。

【図11】DcR1又はDcR2レセプターの発現に関する様々な大腸癌細胞株ないし結腸直腸癌細胞株の比較(FACSによって測定したもの)と、Apo2L又はDR5抗体に対する特定の細胞株の状態(感受性が抵抗性か)を示す。

【図12A】4つの結腸直腸癌細胞株、CaCo2、SW1417、DLD-1およびC

10

20

30

40

50

【 2 B 】

701 CAGGCAATGG ACATAATA TGGGTGATT TGGTGTGAC TTTGGTGT
 GTCCGTTACC TGTATTATAT ACCCACTAAA ACCAACAATG AAACCAACAA
 235 GlyAsnG1 yHisAsn1e TrpValIleL euValValTh rLeuValVal

751 CCGTTGCTGT TGGTGGCTGT GCTGATTGTC TGTGTGTGCA TCGGCTCAGG
 GGCAACGACA ACCACCGACA CGACTAACAG ACAACAACGT AGCCGAGTCC
 ProLeuLeuL euValAlaVa lLeuIleVal CysCysCysI leGlySerGly

801 TTGTGGAGGG GACCCCAAGT GCATGGACAG GGTGTGTTT TGGCGCTTGG
 AACACCTCCC CTGGGGTTCA CGTACCTGTC CCACACAAG ACCGCGAAC
 268 CysGlyGly AspProLysC ysMetAspAr gValCysPhe TrpArgLeuG

851 GTCTCCTACG AGGGCCTGGG GCTGAGGACA ATGCTCACAA CGAGATTCTG
 CAGAGGATGC TCCCGGACCC CGACTCCTGT TACGACTGTT GCTCTAAGAC
 yLeuLeuAr gGlyProGly AlaGluAspA snAlaHisAs nGluIleLeu

901 AGCAACGCGAG ACTCGCTGTC CACTTTCGTC TCTGAGCAGC AAATGGAAAG
 TCGTTGCCCT TSAGCGACAG GTGAAAGCAG AGACTCGTCG TTTACCTTTC
 301 SerAsnAlaA spSerLeuSe rThrPheVal SerGluGlnG lnMetGluSe

951 CCAGGAGCCG GCAGATTGA CAGGTGTCAC TGTACAGTCC CCAGGGGAGG
 GGTCTCGCGC CCTCTAAACT GTCCACATGT ACATGTCAGG GGTCCCTCC
 rGlnGluPro AlaAspLeuT hrGlyValTh rValGlnSer ProGlyGluAla

1001 CACAGTGTCT GCTGGGACCG GCAGAACCTG AAGGGTCTCA GAGGAGGAGG
 GTGTCACAGA CGACCTGGC CGTCTTCGAC TTCCAGAGT CTCTCTCTCC
 335 GlnCysLe uLeuGlyPro AlaGluAlag luGlySerGi nArgArgArg

1051 CTGCTGCTTC CAGCAATGG TGCTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT
 GACGACCAAG GTCCGTTTACC ACGACTG3GG TGACTCTGAG ACTACGACAA
 LeuLeuValP roAlaAsnG1 yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe

1101 CTTTGACAAG TTTGCAACA TCGTGCCCTT TGACTCTGAG GACCACTCA
 GAAACTGTTT AAACGTTTGT AGCACGGGAA ACTGAGGACC CTGGTCGAGT
 368 PheAspLys PheAlaAsnI leValProPh eAspSerTrp AspGlnLeuM

1151 TGAGGCAAGT GGAACCTCAG AAAAATGAGA TCGATGTGGT CAGAGCTGGT
 ACTCCGTCGA CTTGGAGTGC TTTTACTCT AGCTACACCA GTCTCGACCA
 etArgGlnLe uAspLeuThr LysAsnGluI leAspValVa lArgAlaGly

1201 ACAGCAGGCC CAGGGATGC CTTGTATGCA ATGCTGATGA AATGGGTCAA
 TGTCTGCTCG GTCCCTTACG GAACATACGT TACGACTACT TTACCCAGTT
 401 ThrAlaGlyP roGlyAspAl aLeuTyrAla MetLeuMetL ysTrpValAs

1251 CAAAACCTGGA CGAAACGCTT CGATCCACAC CCTGCTGGAT GCCTTGGGA
 GTTTTACCTT GCCTTGGCGA GCTAGGTGTG GGACGACCTA CGGAACCTCT
 nLysThrGly ArgAsnAlaS erIleHisTh rLeuLeuAsp AlaLeuGluArg

1301 GGTGGAAGA GAGACATGCA AAAGAGAAGA TTCAGGACCT CTTGGTGGAC
 CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTTCTCTTCT AAGTCTGTGA GAACCACTG
 435 MetGluG1 uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp

1351 TCTGGAAAGT TCATCTACTT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCSTGTCCCTT
 AGACCTTCA AGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCGAGAC GGCACAGGAA
 SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySerA laValSerLeu

1401 GGAGTGA
 CCTCACT
 468 GluOP*

【 3 A 】

1 MEQRQGNAPASGARKRRCPCGPREARGARPGLRVPTLVLVVAALLVLSAESALITQD
 61 LAFQRAAPQKRSPSEGLCPGHHISEDRDCISCRYGQDYSTHWNDLLFLCRCTCD
 121 SGEVELSPCTTTRNTVQCCEEGTFRREDSPEMCRKRTGCPRGMVKGDQFWSDIQVH
 181 ~~RESGTITGVTTAAVVLVAVFVCKSLKLVKLPYLGKICSGGGDPERVDRSSQRPLGAE~~
 241 NVLNEIVSILQTFVPEQEMEVQSPAEPTGVNMLSPGESHLLEPAEAERSQRRLVPA
 301 NKGDPFETLRQCFDDFADLVFPDSWEPLMRKLGMDNETKVAEAAGHRDTLYTMLIKW
 361 VNKTRDASVHTLLDALETIGERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

【 3 B 】

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
 1 5 10 15

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro
 20 25 30

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
 35 40 45

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
 50 55 60

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
 65 70 75 80

Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
 85 90 95

Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
 100 105 110

Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro
 115 120 125

Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
 130 135 140

Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
 145 150 155 160

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
 165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro
 180 185 190

Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro
 195 200 205

Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val
 210 215 220

Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val
 225 230 235 240

Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Asp Pro Glu
 245 250 255

Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu
 260 265 270

Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu
 275 280 285

【 3 C 】

Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser
 290 295 300

Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser
 305 310 315 320

Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu
 325 330 335

Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp
 340 345 350

Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile
 355 360 365

Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr
 370 375 380

Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln
 405 410 415

Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu
 420 425 430

Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser *
 435 440

【 3 D - 1 】

1 GCTGTGGAA CTTCTCCAG CGCAGCAAT GAGCDAACA TTTCGTATG ATTTTGGG GTTTCAGC AGATCCAGG GGTGAGAGG GGTTCCTTC
 CGACACCTT CGACAGGTC GCGTCTTCA GTCGTTTCC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC
 101 GATTAGGAA CTCTGGGAG ATAGCGCCCG GCGCCCTCA TCGCGAGG AGGCTCCAG CGAGACCCA GAGCGGCTT CGGAAACATA CAGCGCCCG
 CCAATCCCT GAGACCTCT TCTCGCGCG CCGCGCGAGT ACCGCTCCG TCCGACGCTT TCCGACGCTT TCCGACGCTT TCCGACGCTT TCCGACGCTT
 201 GATCCCAAG ACCCTAACT TGTGTCTT CATCTCCG GTCCTCTC CAGCTCCAG TACTCTCC ACATCTCC GCGAGAGA AGTCTCCAG
 CTAGCTTC TGGATTTA AGCAGACA GATGAGCCG CAGAGCCG GTCAGTC ATAGAGCG TGTAGAGG GCGTCTCC GCGTCTCC GCGTCTCC GCGTCTCC
 4 IleProlys ThrLeuLys heValVala lleValala ValleuLeu roValleuLeu ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla
 301 GATCTCTG CCGCAGCA CAGAGCCG AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 37 GluHisVala laProLeuIle nliHisHis serPheLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 401 GATGAGGCT GATTAACG AGGCTTCA ACAATACC TTCTCTCC GATCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG
 71 GluLys IlePyrThr AmAlaSer snAmGluF serCysLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 501 GACGAGAG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 CCGCTCTG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG
 104 ThrArgAsp ThrValCysE yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 601 GATCTCTG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 137 GluHisVala laProLeuIle nliHisHis serPheLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 701 GATCTCTG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 171 SerProL yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys

【 3 D - 2 】

801 GATCTCTG CCGCAGCA CAGAGCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 CTAGAGAG GTCGAGAG TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA
 204 ThrProAla ProAlaLeu luLiuLys ThrHisSer ProLysThr roAlaProAla AlAlaGlu luTherThr hsrPheLys yIleuLys
 901 TCTCTCTT ACCTCTAT CAGCAGCA GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 AGAAGATA TGGAGATC CTGAGATC CCGATGAT AGATATCA GAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA
 237 SerSerHis yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 1001 CTACCTGA AGTTCAGT AGGCTCCG TCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG
 GATGAGCT TCAATCCA TCCGCGCG ACTCCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG
 1101 GCGCGCGG CAGAGAGA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA
 CCGCGCGG GTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT
 1 GATGGGAA CCGTCCAG CGCAGCAAT GAGCDAACA TTTCGTATG ATTTTGGG GTTTCAGC AGATCCAGG GGTGAGAGG GGTTCCTTC
 CGACACCTT CGACAGGTC GCGTCTTCA GTCGTTTCC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC TAARACCTC
 101 GATTAGGAA CTCTGGGAG ATAGCGCCCG GCGCCCTCA TCGCGAGG AGGCTCCAG CGAGACCCA GAGCGGCTT CGGAAACATA CAGCGCCCG
 CCAATCCCT GAGACCTCT TCTCGCGCG CCGCGCGAGT ACCGCTCCG TCCGACGCTT TCCGACGCTT TCCGACGCTT TCCGACGCTT TCCGACGCTT
 201 GATCCCAAG ACCCTAACT TGTGTCTT CATCTCCG GTCCTCTC CAGCTCCAG TACTCTCC ACATCTCC GCGAGAGA AGTCTCCAG
 CTAGCTTC TGGATTTA AGCAGACA GATGAGCCG CAGAGCCG GTCAGTC ATAGAGCG TGTAGAGG GCGTCTCC GCGTCTCC GCGTCTCC GCGTCTCC
 4 IleProlys ThrLeuLys heValVala lleValala ValleuLeu roValleuLeu ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla ThrAlaAla
 301 GATCTCTG CCGCAGCA CAGAGCCG AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 37 GluHisVala laProLeuIle nliHisHis serPheLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 401 GATGAGGCT GATTAACG AGGCTTCA ACAATACC TTCTCTCC GATCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG
 71 GluLys IlePyrThr AmAlaSer snAmGluF serCysLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 501 GACGAGAG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 CCGCTCTG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG
 104 ThrArgAsp ThrValCysE yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 601 GATCTCTG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 137 GluHisVala laProLeuIle nliHisHis serPheLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 701 GATCTCTG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 171 SerProL yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys

【 3 D - 3 】

401 GAGAGGCT GATTAACG AGGCTTCA ACAATACC TTCTCTCC GATCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG TCTCTCCG
 CTACCTGA AGTTCAGT AGGCTCCG TCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG
 71 GluLys IlePyrThr AmAlaSer snAmGluF serCysLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 501 GACGAGAG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 CCGCTCTG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG
 104 ThrArgAsp ThrValCysE yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 601 GATCTCTG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 CCGCTCTG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG
 137 GluHisVala laProLeuIle nliHisHis serPheLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 701 GATCTCTG ACATCTAT AGCTTCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 CCGCTCTG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG TGTACAGG
 171 SerProL yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 801 GATCTCTG CCGCAGCA CAGAGCCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 CTAGAGAG GTCGAGAG TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA TCTCTCTTA
 204 ThrProAla ProAlaLeu luLiuLys ThrHisSer ProLysThr roAlaProAla AlAlaGlu luTherThr hsrPheLys yIleuLys
 901 TCTCTCTT ACCTCTAT CAGCAGCA GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG GCGCAGCG
 AGAAGATA TGGAGATC CTGAGATC CCGATGAT AGATATCA GAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA CAGAGATA
 237 SerSerHis yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys yIleuLys
 1001 CTACCTGA AGTTCAGT AGGCTCCG TCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG
 GATGAGCT TCAATCCA TCCGCGCG ACTCCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG CCGCGCG
 1101 GCGCGCGG CAGAGAGA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA
 CCGCGCGG GTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT

【 3 E - 1 】

1 CCMATGCA CCGGTTCTA TCGATGAT TCCCGGGA TCCCTAGAG ATCCCTGAC
 61 CTGACACC GATCCGGA CTTTGCAG CCGCAACT AGCGGAGA TTTCTGATG
 121 ATTTTGGG CTTTGCAT ACCCTTCC TTCTCTCC GATCTGAG AGAAGTCT
 181 CCGACGCT CGAGGCTG AGCAGGCG TATCCAGAG CCGAGACAG GTCCGAACT
 9 P T A S A R A G R Y P G A R T A S G T
 241 AGACATGG TCTCGACC CAGATCCT AMGTCTCT TCTCTCTG TCTCTCTG
 29 P W L K I L K F V V F I V A V L
 301 CTGCGGTC GGTGTACT TGGCAGAT CCGCGGAG AGAAATTC CCGACAGA
 49 L P V R V D S A T I P R Q D E V P Q Q T
 361 GTGCGCCAC AGCAACAG GCGCGCTC BAGGCGAA AGTGTCCAG AGAATCTAT
 69 V A P Q Q Q R K S L K E E C P A G S H
 421 AGATCAGT ATATGAGC CTGTAACC TGCACAGG TGCACAGG GATGATTA CACATGCT
 89 R S E Y T G A C N P C T E G V D Y T I A
 481 TCCACAT TGGCTTCT CCGTCTCT TCGTCTCT TCGTCTCT TCGTCTCT TCGTCTCT TCGTCTCT TCGTCTCT TCGTCTCT
 54 S N L F S C L L C T A G V T G T A M C G T C A A C A A A P A A
 151 AGTCTCTG CACGACAG AGACAGCT TGTGATGT TGTGATGT TGTGATGT TGTGATGT TGTGATGT TGTGATGT TGTGATGT
 129 S C T T R D T V C Q C E K G S F Q D
 601 AAAAAAAAA CCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT
 149 K S F E H C R T C R T G C P R R G M V K
 661 GATGATGT GTACGCGG GATGATGT GATGATGT GATGATGT GATGATGT GATGATGT GATGATGT GATGATGT GATGATGT
 169 V S N C T P R S D I K C K N E S A S S
 721 AAAAAAAAA CCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT GCGCGGCT
 189 T G K T P C A A E E T V T T I L G M L A S
 781 CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT CCGTCTCT
 209 F Y H Y L I I V V L I I V V L I I V V V
 841 GCGTCTCT GCGGAGAA ATCAATCT TACCTCAA GCAATGCT AGTGTGGA
 229 G F S C R K K F I S Y L K G I C S G G G

【 3 E - 2 】

901 GAGGATCCCG AGCTGTGCA CAGATCTCTT TTCGGGGC GTTCTGTCC TTCACGATTT
249 G G P E R V K R V L F R R R S C P S R V
961 CTTGGGGGG AGGCAATGC CCGCAAGAG ACCCTGAGTA ACAGTACTT SCAGCCACC
269 P A E D N A R E T L S N R Y L Q P F I
1021 CAGCTCTCG AGCAGTAAT CCAAGTCTAG GAGCTGGCAG ACCTAAGAGG TGTGACTGTA
289 Q V S E Q E I Q G Q E L A E L T G V T V
1081 GAGTGTCCAG AGSAGACCA GCGTGTGCG GACAGCCAG AACCTGAGAG GTCCTCAGAG
309 E A A F E P Q R L L L E Q A E Q R
1141 AGGAGGCTGC TGGTTCAGT GAATGAGCT GACTCCCTG ACATCAGAC CTTCCTGAT
329 R R L L V P V D A D S A D I S I L D
1201 GCGTCCGCA CACTGAGAA AGSATAACA AAGAAACA TTCAGGACA ACTGTGGCC
349 A S A T L E E G H A K E T I Q D Q L V G
1361 FCCGAAAGC TGTGTAAGA AGAGAGTAG SCNAGCTCG CTACGCTCG CCGTGGAGG
369 S K L F Y E E D E A G S A T S C L
1321 AATCTCTCA GGAACCGGA GCTTCCCTA TTTACTTTC CTCTCCAMA GGGAGCAGC
1381 CTGAGAAA CAGTCCAGTA CTTGACCCAT GCCCACAA ACTCTACTT CAAATATGG
1441 GCAGCTTACC AATGGTCTTA GAATTTGTT AAGGACTTA GAGTAATTT TATGAATAC
1501 TCGCTGTGAT AAGCAACCG GAGAAATTA TATCAGATTC TTGGCTGCAT AGTATACGA
1561 TTTGTGATTA AGGCTGTTT TAGGCCATF CCGGTGGCT ATCCCTGTA TCCCAACT
1621 TTTAAGGCT GAGGAGGTT GATGCTTGA GCTCGGAGT TTAGGACAG CACTCATCC
1681 ACAATGAAAC TCCATCTCA TTTAAAGA AAAAATGAG TTTTAGATG TCATCTTTG
1741 CAGTCTTCA TCAAGAGCA AGTCTTTTT TCTGCTTCT ATATTGCAG CTCATCTCT
1801 ACTGCTGCT GCAATTAATG ACATCTACT ACAGATCCG CACAGCCCA TCGCTTCCC
1861 TTTAGTTTCA CTTAATGAG AACGGATTA TTTCTTATT ACCGTATTT TCAGTTTGG
1921 AATATTTTCA CTTAATGAG AACGGATTA TTTCTTATT ACCGTATTT TCAGTTTGG
1981 TGGATTTAC AGGTTTCCAC TTAGAGTTT GAGTTTMAG ATAGATTTT TGGGGCTTA
2041 CCCCACCTT AATTAGAGA AACATTTAT ATTGCTTAC TA

【 4 】

FUT3
構造フォシトランスフェラーゼ III

1 ATGGATCCCTGGGTCAGGACAGCCACATGGCCATGGCCGGCTGTCTGCCCCACCTG
METAspProLeuGlyAlaLalysProGlnTrpProTrpArgCysCysLeuThrLeu
61 CTATTTCAGCTGCTGGTGGCTGTGTTTCTTCTCTACTCCGCTGTCTCCGAGACGAT
LeuPheGlnLeuLeuValAlaCysPhePheSerYrLeuArgValSerArgAsp
121 GCCACTGATCCCTAGGGCTCCCATGGCTCCCGAGGACACCCACTCCACCCCGC
AlaThrGlySerProArgAlaProSerGlySerSerArgGlnAspThrProThrArg
181 CCCACCTCTGATCTGCTATGCAATGGCTTCCCATCCCTGTGGCTGTCTCCCGC
ProThrLeuLeuIleLeuLeuTrpThrTrpProPheHisIleProValAlaLeuSerArg
241 TGTTCAGCATGTCGCCGCGACGCGCATGCCACACTGCCACCCGACGGGTGATC
CysSerGluMETValProGlyThrAlaAspCysHisIleThrAlaAspArgLysValIyr
301 CGCAGGACACACCGT CATGCTGCACCATCGATATCATGTCACACCCCTAATCATCGC
ProGlnAlaAspThrValIleValHisHisTrpAspIleMETSerAsnProLysSerArg
361 CTCACACTTCCCGAGCCCGAGCGGACGCTGGATCGTGTCTCACTTGGAGCCACCC
CTProProSerProArgProGlnGlyGlnArgTrpIleTrpPheAsnLeuGluProPro
421 CCTAATCGCAGACCTGAGAGCCCTGGACAGTACTCAATCTCAGCATGCTCTACCC
ProAsnCysGlnHisLeuGluAlaLeuAspArgYrPheAsnLeuThrMETSerYrArg
481 AGCGACTCCGACATCTTACCGCCCTACGGCTGGCTGGAGCGTGGTCCGGCCGCTGCC
SerAspSerAspIlePheThrProYrGlyTrpLeuGluProTrpSerGlyGlnProAla
541 CACCCACCGCTCAGCTCTCGGCCACGACGCGTGGCTGGCCGGGTGTCCAGCTGG
HisProProLeuAsnLeuSerAlalysThrGluLeuAlaIleLeuLysValAsp
601 AACCCGACTCAGCCAGGCTCCGCTACTCCAGAGCCTGACGCTCATCTCAGGTGGAC
LysProAspSerAlaArgValArgYrYrGlnSerLeuGlnAlaHisLeuLysValAsp
661 GTGTACGACGCTCCACAGCCCTCCCGAGGGACGATGATGGAGCCGCTGCCGG
ValIyrGlyArgSerHisLysProLeuProLysGlyTrpLeuMETMETGluThrLeuSerArg
721 TACAAGTCTACCTGGCTTCCAGACTCCTTCCACCCCACTACATCAGCAGAGCTG
YrLysPheYrLeuAlaPheGlnAsnSerLeuHisProAspYrIleThrGlnLysLeu
781 TGGAGAACGCCCTCAGGCTGGCCCTGGCCGCTGGCTGGCCCGCAGCAGAAC
TrpArgAsnAlaLeuGluAlaTrpAlaValProValAlaLeuGlyProSerArgSerAsn
841 TACGAGAGTTCCTGCGACCCGACGCTTTCATCGAGCTGACGACCTCCAGCCCGCAG
YrGluArgPheLeuProProAspAlaPheIleHisValAspAspPheGlnSerProLys
901 CAGCTGGCCGCTACCTCGAGAGCTGAGACAGCCCGCCGCTACCTGACCTACTT
AspLeuAlaArgYrLeuGlnGluLeuAspLysAspHisArgYrLeuSerYrPhe
961 CCCTGGCCGACGCTGGCCCTCCGCTTCCAGCTGGCCTGATTTCTGCAAGGCC
ArgTrpArgGluThrLeuArgProArgSerPheSerTrpAlaLeuAspPheCysLysAla
1021 TGTGAAACTGACGCGAATCCAGCTACCGAGCGTCCGACGATACGGCTTGTGTC
CysTrpLysLeuGlnGluSerArgYrGlnThrValArgSerIleAlaAlaTrpPhe
1081 ACCTGA
ThrSTP

【 5 】

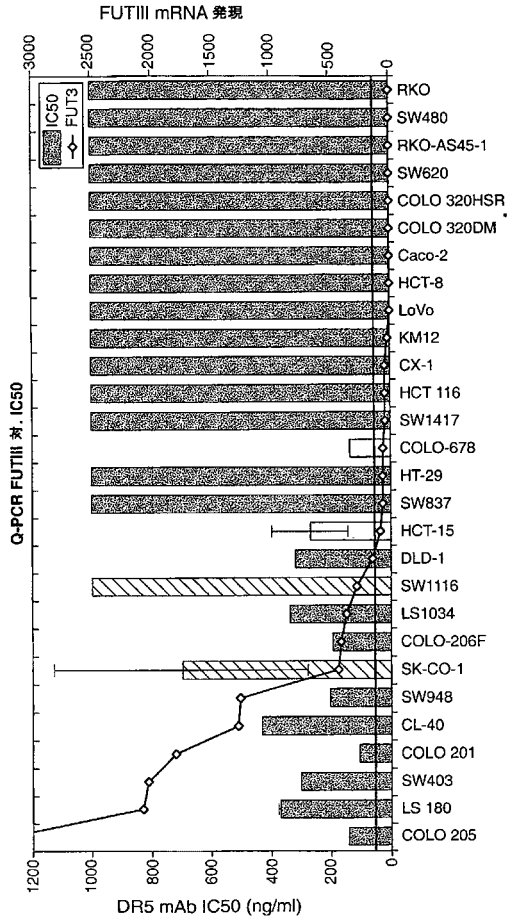
FUT6
構造フォシトランスフェラーゼ VI

1 ATGGATCCCTGGGTCAGGACAGCCACATGGCCATGGCCGGCTGTCTGCCCCACCTG
METAspProLeuGlyProAlalysProGlnTrpSerTrpArgCysCysLeuThrLeu
61 CIGTITCAGCTGCTGATGGCTGTGTTTCTTCTCTACTCCGCTGTCTCCGAGACGAT
LeuPheGlnLeuLeuValAlaCysPhePheSerYrLeuArgValSerArgAsp
121 CCCACTGTGATCCCTAATGGTCCGCTTCCACAGCAGCAGAGGACCCCGCCACTCC
ProThrValYrProAsnGlySerArgPheProAspSerThrGlyThrProAlaHisSer
181 ATCCCTCTGATCTGCTGTGACGCTGCCCTTTTACACACCCATAGCTCTGCCCGCTGC
IleProLeuIleLeuLeuTrpThrTrpProPheAsnLysProIleAlaLeuProArgCys
241 TCAGCATCTGCTGCTGGCAGCGCTGACTCCACATCACTGCCACCCGACAGGTGATCCA
SerGluMETValProGlyThrAlaAspCysAsnIleThrAlaAspArgLysValIyrPro
301 CAGCAGACCGCCCTCATGCTGCAACACACAGCTCATGTACAACCCCACTGCCACGCTC
GlnAlaAspAlaValIleValHisHisArgGluAlaMETIyrAsnProSerAlaGlnLeu
361 CCACGCTCCCGAGGGCGAGGGGACGATGATGATCTGTTCAAGCATGACTCCCGACGC
ProArgSerProArgArgGlnGlyGlnArgTrpIleTrpPheSerMETGlnSerProSer
421 CACTGCTGGACGCTGAAGGCGATGAGCGGATACTTCAATCTCAGCATGCTCTACCGCAGC
HisCysTrpGlnLeuLysAlaMETAspGlyYrPheAsnLeuThrMETSerYrAspSer
481 GACTCGACATCTTACGCCCTACGGCTGGCTGGAGCGGTGGTCCGCCAGGCTGCCAC
AspSerAspIlePheThrProYrGlyTrpLeuGluProTrpSerGlyGlnProAlaHis
541 CCACCCCTCAGCTCTCGCCACAGCCGAGCTGGTGGCTGGCAGTGTCCACACTGAGGG
ProProLeuAsnLeuSerAlalysThrGluLeuValAlaIleTrpAlaValSerAsnTrpGly
601 CCARAATCCCGCAGGCTGGCTACTACAGAGCCTCAGGCCACTCAGAGTGGACGCTG
ProAsnSerAlaArgValArgYrYrGlnSerLeuGlnAlaHisLeuLysValAspAla
661 TACGAGCCCTCCACAGCCCGCTGCCACGGAAACCATGATGGAGCCGCTGCTCCCGTAC
YrGlyArgSerHisLysProLeuProGlnGlyThrMETMETGluThrLeuSerArgIyr
721 AAGTCTATCTGGCTTCCAGACTCCTTGCACCCGCACTACATCAGCAGAGCTGTG
ArgAsnAlaLeuGluAlaTrpAlaValProValAlaLeuGlyProSerArgSerAsnYr
781 AGGAACCGCCCTGAGGCGCTGGCCGCTGCCGCTGGTGGCCCGCAGCAGACCACTAC
ArgHisAlaLeuGluAlaTrpAlaValProValAlaLeuGlyProSerArgSerAsnYr
841 CAGAGGTTCTGCCACCCGACGCTTCAITCCACCTGAGCAGCTTCCAGAGCCCGACAGC
GluArgPheLeuProProAspAlaPheIleHisValAspAspPheGlnSerProLysAsp
901 CTGGCCCGCTACCTGCAAGGACTGACACAGCCACAGCCCGCTACCTGAGCTACTTCC
LeuAlaArgYrLeuGlnGluLeuLysPheAspHisIleAlaArgYrLeuSerYrPheArg
961 TGGCCGACACGCTGGCCGCTCGCTTCTCAGCTGGCAGCTGCTTCTGCAAGGCCCTGC
TrpArgGluThrLeuArgProArgSerPheSerTrpAlaLeuAlaPheCysLysAlaCys
1021 TGGAACTGACGAGGAACTCAGGTTACGACAGCAGCCGATACGGCTTGTGACTGAC
TrpLysLeuGlnGluSerArgYrGlnThrArgGlyIleAlaAlaTrpPheThrSTP

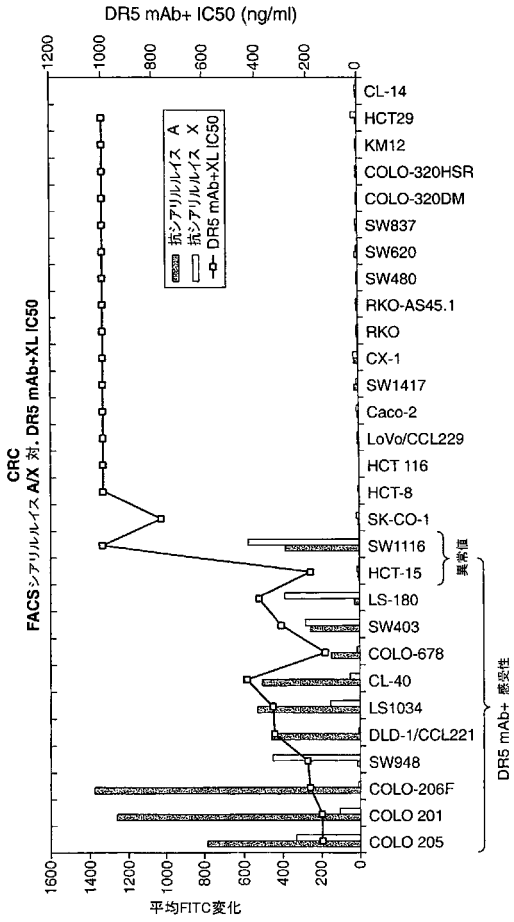
【 6 】

Table with columns for cell lines (細胞株), FUT3, FUT6, and FUT6/FUT3 ratios at various concentrations (Apr2L 0.5%, Apr2L 10%, DR5 mAb:XL 0.5%, DR5 mAb:10% FBS, DR5 mAb:10% FBS). Rows include cell lines like COLO 205, COLO 201, SW948, HCT-15, DLD-1, LS1034, C1-40, COLO-678, SW603, LS180, SK-OV-1, HCT-116, RKO-S46-1, SW680, Lovo, SW920, RKO, CX-1, HT-29, KM12, COLO 320HSR, COLO 320DM, SW1116, SW837, Caco-2, HCT-8, and SW1417.

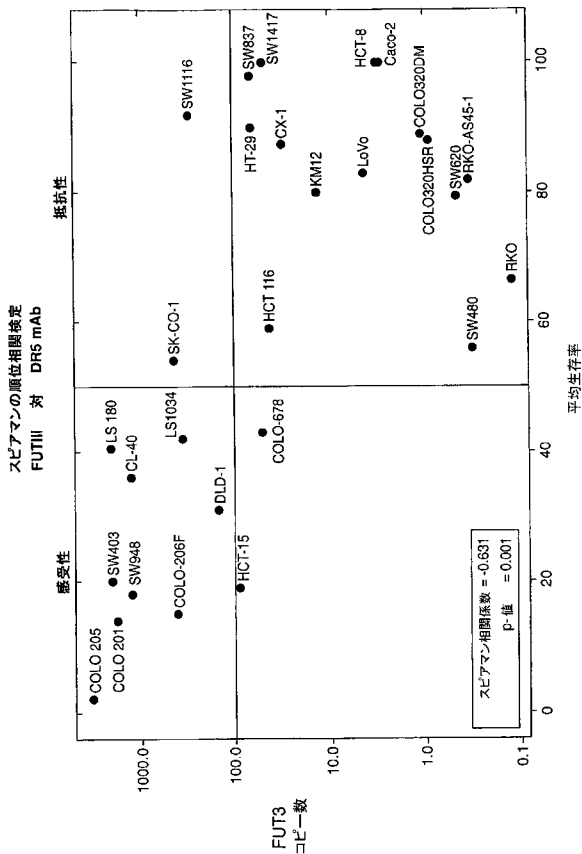
【 図 7 】



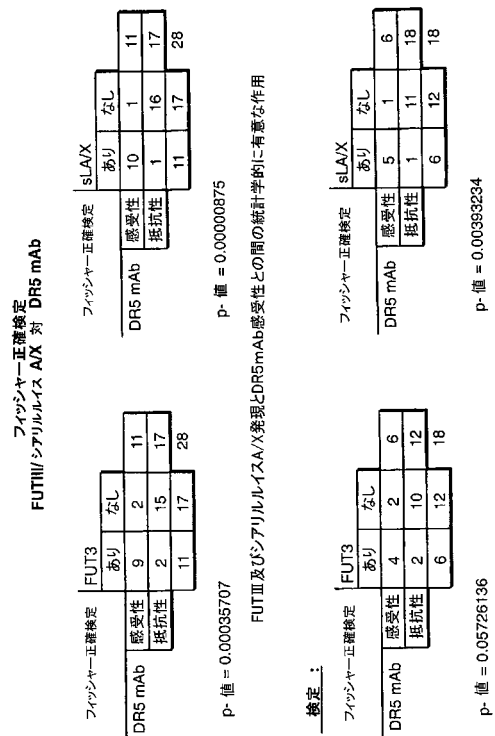
【 図 8 】



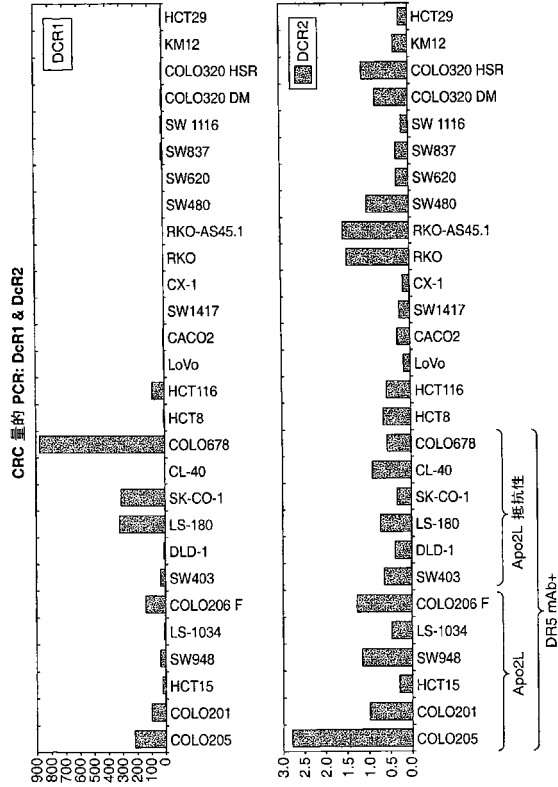
【 図 9 A 】



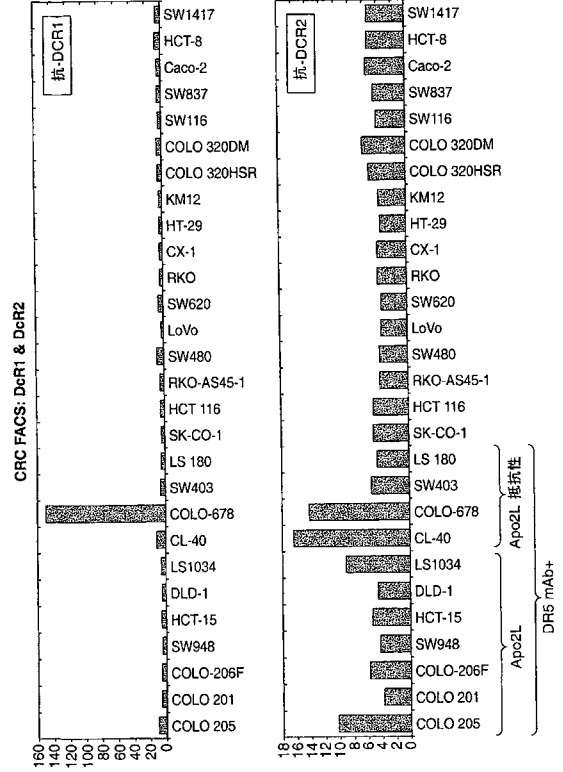
【 図 9 B 】



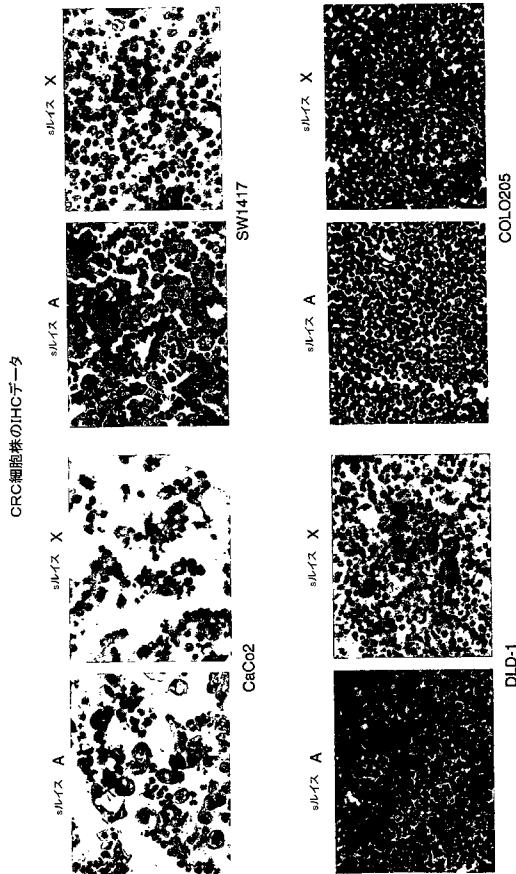
【 図 1 0 】



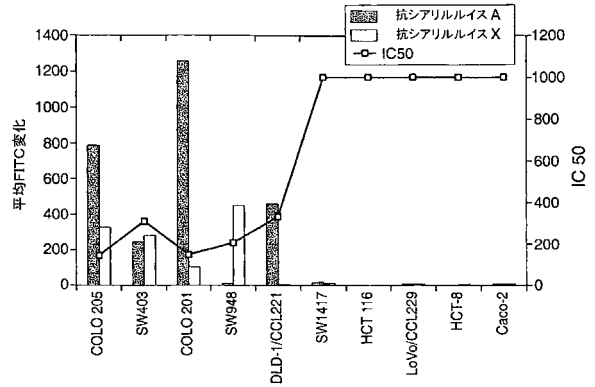
【 図 1 1 】



【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【 図 1 3 】

CRC 試料の IHC データ

- 原発性結腸直腸腺癌のシアリルイス A 染色 (結腸直腸 TMA)
74 症例のうち 37 症例が陽性 (50%) : その 37 症例のうち
19 が 1+
10 が 2+
8 が 3+ の染色強度
良性粘膜の 33 症例のうち 2 例 (6%) は陽性染色を示した、何れも 1+
- 原発性結腸直腸腺癌のシアリルイス X 染色 (結腸直腸 TMA)
75 症例のうち 47 症例が陽性 (63%) : その 47 症例のうち
25 が 1+
19 が 2+
3 が 3+ の染色強度
良性粘膜の 32 症例のうち 21 例 (66%) は陽性染色を示した
(19 症例が 1+、2 症例が 2+)
- 良性的肝組織は胆管上皮内小細胞および中間部肝内胆管に陽性染色を示し、肝細胞は陽性染色を示さない。
- 9 例の転移性結腸直腸腺癌のうち 8 例 (88%) がシアリルイス A および X 染色に陽性であった。
8 例のうち 7 陽性症例は強い染色を示した。これは、シアリルイス A および X 発現の高い有病率と、原発性結腸直腸腺癌と比較して転移との強い反応性を示す。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/573	A
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
			A 6 1 P	31/10	
			A 6 1 P	33/00	
			C 1 2 N	15/00	A

(56)参考文献 Azuma Y et al. , Expression of cell surface Lewis X and Y antigens and FUT4 mRNA is increased in Jurkat cells undergoing apoptosis , Biochim Biophys Acta , 2 0 0 4年 6月11日 , 1672(3) , 157-163

Goupille C et al. , alpha1,2Fucosyltransferase increases resistance to apoptosis of rat colon carcinoma cells , Glycobiology , 2 0 0 0年 4月 , 10(4) , 375-382

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 6 8

专利名称(译)	使用生物标志物的测定和方法		
公开(公告)号	JP5237638B2	公开(公告)日	2013-07-17
申请号	JP2007524925	申请日	2005-08-03
[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		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ワグナークラウスダブリュ		
发明人	ワグナー, クラウス ダブリュ.		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/48 G01N33/573 C12Q1/68 A61K38/00 A61K45/00 A61P37/02 A61P35/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P31/18 A61P35/02 A61P7/06 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P1/16 A61P31/20 A61P1/04 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P17/00 A61P11/00 A61P37/06 A61P31/04 A61P31/10 A61P33/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/1709 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/16 A61P29/00 C12Q1/48 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/573 G01N33/57419 G01N33/57438 G01N33/57446 G01N33/6863 G01N33/6893 G01N2333/91091 G01N2510/00 G01N2800/24 C12Q1/6851		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/574.B G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/573.A C12Q1/68.A A61K37/02 A61K45/00 A61P37/02 A61P35/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P25/00 A61P31/18 A61P35/02 A61P7/06 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P1/16 A61P31/20 A61P1/04 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P17/00 A61P11/00 A61P37/06 A61P31/04 A61P31/10 A61P33/00 C12N15/00.A		
优先权	60/599425 2004-08-06 US		
其他公开文献	JP2008509394A5 JP2008509394A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于测试哺乳动物组织或细胞样品中一种或多种生物标志物表达的方法和测定法。通过所公开的方法和测定，检测一种或多种生物标志物的表达预测组织或细胞样品是否对凋亡诱导剂如Apo2L / TRAIL和抗DR5激动剂抗体敏感。其意图。可以测试的特定生物标志物包括岩藻糖基转移酶，特别是岩藻糖基转移酶3 (FUT 3) 和/或岩藻糖基转移酶6 (FUT 6)，和唾液酸基路易斯A和/或X抗原。还提供了试剂盒和制品。

