

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-535856

(P2008-535856A)

(43) 公表日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 116 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-505608 (P2008-505608)	(71) 出願人	507251918
(86) (22) 出願日	平成18年4月7日 (2006.4.7)		ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダ
(85) 翻訳文提出日	平成19年12月4日 (2007.12.4)		イアグノスティクス インコーポレイテッ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/013174		ド
(87) 国際公開番号	W02006/110594		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
(87) 国際公開日	平成18年10月19日 (2006.10.19)		62-8097, エミリービル, ピー
(31) 優先権主張番号	60/669,855		. オー. ボックス 8097, インテ
(32) 優先日	平成17年4月7日 (2005.4.7)		レクチュアル プロパティー - アール
(33) 優先権主張国	米国 (US)		440
		(71) 出願人	506099937
			サグレス ディスカバリー, インコーポ
			レイテッド
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
			62-8097, エミリービル, ピー
			. オー. ボックス 8097
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の診断、検出および治療における S E M A 4 D

(57) 【要約】

本発明は、癌関連遺伝子の分野に属する。具体的には、本発明は、S E M A 4 D 遺伝子、または、この遺伝子によってコードされるタンパクの有無に基づいて癌を検出、または、癌を発症する可能性を検出する方法に関する。本発明はさらに、S E M A 4 D 遺伝子を上方または下方調整するための方法および分子も提供する。特定の実施態様では、この癌は、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S E M A 4 D の発現産物のレベルを調節することを含む、患者の癌を治療する方法であって、該癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌から成る群より選択される、方法。

【請求項 2】

前記患者に、前記 S E M A 4 D 発現産物のレベルを調節する抗体、核酸、またはポリペプチドを投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記発現産物の発現レベルが、少なくとも 2 倍の変化だけ上方または下方調整される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記癌が腫瘍増殖の抑制または腫瘍容積の低下によって治療される、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記癌が、癌細胞の侵襲性を緩和することによって治療される、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記発現産物がタンパクまたは m R N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

第 1 時点における前記発現産物のレベルが、第 2 時点における同じ発現産物のレベルと比較され、該第 1 時点と比較した場合の、該第 2 時点における発現産物のレベルの増加が、癌の進行を示す、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ヌクレオチドが、配列番号 7 の配列を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

S E M A 4 D 活性を調節することを含む、患者の癌を治療する方法であって、該 S E M A 4 D 活性が、細胞増殖、細胞成長、細胞の運動性、転移、細胞移動、細胞の生存、および腫瘍形成性から成るグループから選ばれ、かつ、該癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌から成る群より選択される、方法。

【請求項 10】

前記患者に対し、前記 S E M A 4 D 活性を抑制する抗体、核酸、またはポリペプチドを投与することを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体が中和化抗体である、請求項 2 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 または 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗体が、少なくとも 1×10^8 K a の親和性で S E M A 4 D ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体である、請求項 2 または 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記モノクローナル抗体が、癌細胞成長、腫瘍形成、細胞生存、および癌細胞増殖の内の一つ以上を抑制する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、1 本鎖抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または F a b 断片である、請求項 2 または 10 に記載の方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

コントロールに比べて S E M A 4 D の過剰発現によって特徴づけられる患者の癌を治療する方法であって、該患者の S E M A 4 D 活性を調節することを含む、方法。

【請求項 17】

前記 S E M A 4 D 活性が、細胞増殖、細胞成長、細胞の運動性、転移、細胞移動、細胞の生存、遺伝子発現、および腫瘍形成性から成る群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記患者に対し、前記 S E M A 4 D 活性を抑制する抗体、核酸、またはポリペプチドを投与することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

患者サンプルにおいて S E M A 4 D の差次的発現の証拠を検出することを含む癌の診断方法であって、S E M A 4 D の差次的発現の証拠が、癌の診断を示し、該癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌から成る群より選択される、方法。

【請求項 20】

差次的発現の証拠が、S E M A 4 D の発現産物のレベルを測定することによって検出される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記発現産物がタンパクまたは m R N A である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

タンパクの発現レベルが、S E M A 4 D ポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて測定される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記抗体が画像化剤に連結される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記患者サンプルにおける S E M A 4 D 遺伝子の発現産物のレベルが、コントロールと比較される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】

前記コントロールが、前記患者サンプルにおけるものと同じ組織タイプの既知の正常組織である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記サンプルにおける発現産物のレベルが、前記コントロールと比べて増加している、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

S E M A 4 D の発現産物の証拠を検出することを含む、患者サンプルにおける癌性細胞の検出方法であって、該サンプルにおける S E M A 4 D の発現の証拠が、該サンプルにおける細胞が癌性であることを示す、方法。

【請求項 28】

前記細胞が、乳房細胞、結腸細胞、腎臓細胞、肝細胞、肺細胞、リンパ球、卵巣細胞、すい臓細胞、前立腺細胞、子宮細胞、子宮頸細胞、膀胱細胞、胃細胞、または皮膚細胞である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記発現産物の証拠が、画像化剤に連結する抗体を用いて検出される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

患者における癌の進行を評価する方法であって、第 1 時点における生物サンプルの S E M A 4 D の発現産物のレベルを、第 2 時点における同じ発現産物のレベルと比較することを含み、該第 1 時点に対して、該第 2 時点における該発現産物のレベルの変化は該癌の進行を示し、該癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌から成る群より選択される

10

20

30

40

50

、方法。

【請求項 3 1】

子宮頸癌、腎臓癌、卵巣癌、すい臓癌、および皮膚癌から成る群から選ばれる癌を診断する方法であって、

(a) 第 1 個体の第 1 組織タイプを含む第 1 サンプルにおける S E M A 4 D の m R N A レベルを測定すること；

(b) (a) の m R N A レベルを、

(1) 該第 1 個体の正常組織タイプを含む第 2 サンプルにおける m R N A レベル、または、

(2) 罹患していない個体から得られた正常組織タイプを含む第 3 サンプルにおける m R N A レベルと比較することを含み、

(a) の m R N A レベルと、該第 2 サンプルまたは該第 3 サンプル中の m R N A レベルとの間での少なくとも 2 倍の差は、該第 1 個体が、癌を有するか、または癌に罹り易いことを示す、方法。

【請求項 3 2】

前記 (a) の m R N A レベルと、前記第 2 サンプルまたは前記第 3 サンプル中の m R N A レベルとの間での少なくとも 3 倍の差は、前記第 1 個体が、癌を有するか、または癌に罹り易いことを示す、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

抗癌活性に対するスクリーニング法であって、

(a) S E M A 4 D を発現する細胞を、候補抗癌剤と接触させること；および、

(b) 該候補抗癌剤の存在下と不在下との間で該細胞中の S E M A 4 D 発現レベルに少なくとも 2 倍の差を検出することを含み、

該候補抗癌剤の存在下と不在下との間での該細胞中の S E M A 4 D 発現レベルにおける少なくとも 2 倍の差は、該候補抗癌剤が抗癌活性を持つことを示し、該癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌から成る群より選択される、方法。

【請求項 3 4】

前記候補抗癌剤の存在下と不在下との間での、前記細胞中の S E M A 4 D 発現レベルにおける少なくとも 3 倍の差は、該候補抗癌剤が抗癌活性を持つことを示す、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記候補抗癌剤が、抗体、小型有機化合物、小型無機化合物、またはポリヌクレオチドである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記ポリヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

S E M A 4 D の発現産物に結合する抗体による治療に感受性である患者を同定するための方法であって、該患者からの生物サンプルにおける該遺伝子の発現産物レベルを測定することを含む、方法。

【請求項 3 8】

哺乳動物における癌を診断または検出するためのキットであって、該キットは、

S E M A 4 D 腫瘍細胞抗原に特異的に結合する、上記の実施態様の内のいずれか一つによる抗体またはその断片、または免疫結合体またはその断片；

該抗体と、該 S E M A 4 D 腫瘍細胞抗原の間の結合反応を検出するための一つ以上の試薬；および、

任意に該キットを使用するための説明書を含み、

該癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌から成る群より選択される、キッ

10

20

30

40

50

ト。

【請求項 39】

癌を診断するためのキットであって、該キットは、ストリンジェントな条件の下で S E M A 4 D 遺伝子にハイブリダイズする核酸プローブ；該 S E M A 4 D 遺伝子を増幅するためのプライマー；および、任意に該キットを使用するための説明書を含み、該癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌から成る群より選択される、キット。

【請求項 40】

S E M A 4 D の発現産物に対して特異的な 1 種以上の抗体またはオリゴヌクレオチドを含む組成物。

10

【請求項 41】

従来の癌薬剤をさらに含む、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

薬学的に受容可能な賦形剤をさらに含む、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 43】

前記 1 種以上のオリゴヌクレオチドが、配列番号 7 の配列を持つ、請求項 40 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

（関連出願への相互参照）

本出願は、2005 年 4 月 7 日に出願された米国連続番号 60 / 669, 855（この全体が、参考として本明細書に援用される）の優先権を主張する。

【0002】

（発明の分野）

本発明は癌関連遺伝子の分野に属する。具体的には、本発明は S E M A 4 D または S E M A 4 D 遺伝子産物の差次的発現に基づいて癌を検出、または、癌を発症する可能性を検出する方法に関する。本発明はさらに、S E M A 4 D または S E M A 4 D 遺伝子産物を調節することによって癌を検出、診断、および治療する方法および分子も提供する。

【背景技術】

30

【0003】

（発明の背景）

癌遺伝子は、癌を誘起する可能性のある遺伝子である。癌発生は、様々なメカニズム、例えば、癌遺伝子を含むウィルスによる細胞の感染、宿主ゲノムにおける癌原遺伝子（癌遺伝子となる可能性を持つ正常遺伝子）の活性化、および、癌原遺伝子および癌抑制遺伝子の突然変異を含むメカニズムによって起こる場合がある。癌発生は、基本的には、体細胞進化（すなわち、突然変異、および変種の自然選択であって、増殖制御が次第に失われる）によって促進される。これらの体細胞突然変異の標的となる遺伝子は、その突然変異表現型が優勢であるか劣勢であるかに応じて、それぞれ、癌原遺伝子また癌抑制遺伝子として分類される。

40

【0004】

ヒトの癌の外に、動物の癌にも関わることで知られるウィルスがいくつかある。ここで特に興味深いのは、それ自身は癌遺伝子を含まないウィルスである。それは、遅形質転換型レトロウィルスである。このウィルスは、宿主のゲノムに入り込み、様々なやり方で隣接癌原遺伝子に影響を及ぼすことによって癌を誘発する。プロウィルス挿入突然変異が、レトロウィルスのライフサイクルの通常の結果である。感染細胞では、レトロウィルスゲノム（プロウィルスと呼ばれる）の DNA コピーが宿主のゲノムに組み込まれる。新しく組み込まれたプロウィルスは、c i s において、または組み込み部位の近傍において、二つのメカニズムのどちらかによって遺伝子発現に影響を及ぼす。I 型挿入突然変異は、プロウィルスの長い末端反復列（L T R）内に調節配列（エンハンサーおよび／またはプロ

50

モーター)があるため、近位遺伝子の転写を上方調整する。遺伝子のイントロンまたはエキソンの内部に配される I I 型挿入突然変異は、プロウィルスの長い末端反復列 (L T R) 内に調節配列 (エンハンサーおよび/またはプロモーター)があるため、前記遺伝子の転写を上方調整することが可能である。さらに、I I 型挿入突然変異は、オープンリーディングフレーム内に直接組み込まれる場合、または、両側がコード配列に挟持されるイントロン内に組み込まれる場合のいずれかによってコード領域が短縮される可能性があり、これは、短縮されたまたは不安定な転写/タンパク産物をもたらす可能性がある。挿入部位、またはその近傍における配列の分析によって、いくつかの新規癌原遺伝子が特定された。

【0005】

リンパ腫および白血病に関しては、AKVマウス白血病ウイルス (MLV) または SL3-3 MLV などのレトロウィルスは、感受性の高い新生マウスに接種した場合、または、生殖系列に保持された場合、癌の強力な誘発因子となる。挿入部位を分析することで、多くの配列がリンパ腫または白血病の誘発に関連していることが判明した; Sorensen et al., J. Virology 74:2161 (2000); Hansen et al., Genome Res. 10 (2):237-43 (2000); Sorensen et al., J. Virology 70:4063 (1996); Sorensen et al., J. Virology 67:7118 (1993); Joosten et al., Virology 268:308 (2000); および、Li et al., Nature Genetics 23:348 (1999) を参照されたい。これらの全ては参照することにより本明細書に明確に組み込まれる。癌、特に、乳癌、前立腺癌、および上皮起源の癌に関しては、哺乳類レトロウィルス、マウス乳癌ウイルス (MMTV) は、感受性の高い新生マウスに接種した場合、または、生殖系列に保持された場合、癌の強力な誘発因子となる。Mammary Tumour in the Mouse, edited by J. Hilgers and M. Sluyser; Elsevier/North-Holland Biomedical Press; New York, N. Y.。

【0006】

ある特定の生細胞における遺伝子発現パターンは、その細胞の現在の状態について特徴的である。細胞の状態、またはタイプのほとんど全ての相違は、1種以上の遺伝子の RNA レベルの相違に反映される。その特徴が解明されていない遺伝子同士の発現パターンを比較することによって、それら遺伝子の機能について手がかりが得られることがある。数百または数千の遺伝子の発現に関する高処理量分析は、(a) 複雑な遺伝子疾患の特定、(b) 組織と病状の間の、経時の差次的遺伝子発現の分析、および、(c) 薬剤の発見および毒物学研究に役立つ可能性がある。ある種の遺伝子の発現レベルの増減は、癌生物学と相関する。例えば、癌遺伝子は、癌発生の正の調節因子であり、一方、癌抑制遺伝子は、癌発生の負の調節因子である。(Marshall, Cell, 64:313-326 (1991); Weinberg, Science, 254:1138-1146 (1991))。

【0007】

癌を治療するために近年、免疫療法、または、治療目的のための抗体の使用が行われている。受動的免疫療法は、癌治療にモノクローナル抗体の使用を含む。例えば、Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6th Edition (2001) Chapt. 20 pp. 495-508 を参照されたい。これらの抗体の内在的、治療的生物活性は、癌細胞の増殖または生存の直接的抑制、および、生体免疫系のナチュラルキラー細胞のキラー活性を増強する能力を含む。これらの薬剤は、単独で投与しても、あるいは、放射線照射、または化学療法剤と組み合わせて投与してもよい。それぞれ、リンパ腫および乳癌の治療に対し認可されているリツキサン (登録商標) およびハーセプチン (登録商標) は、そのような治療剤の二つの例である。それとは別に、抗体は、該抗体が有毒剤と結合される抗体結合体を作製するのに使用さ

10

20

30

40

50

れ、腫瘍に対して特異的に結合することによって、その薬剤を腫瘍に向けさせる。マイロターゲット（登録商標）は、白血病の治療のために使用される、認可抗体結合体の例である。しかしながら、これらの抗体は、癌の原因ではなく、癌そのものを標的とする。

【0008】

抗癌療法におけるもう一つの方法は、癌の原因となる癌原遺伝子を標的とすることである。癌の発病を検出するために、癌の原因となることが特定された遺伝子を監視すること、したがって、それを標的として癌を治療することが可能である。

【0009】

SEMA4Dは、セマフォリン・ファミリーに属する、150kDaの表面抗原である。(Herold C. et al., (1995) Int Immunol; 7(1): 1-8) SEMA4Dの膜結合形は、N-末端シグナル配列、次いでSemaドメイン、Ig様ドメイン、リシン豊富な領域、疎水性膜貫通ドメイン、および細胞原形質尾部を持つ(Hall KT et al., (1998) PNAS, 93(21): 11780-5)。細胞外ドメインは、N-結合グリコシル化部位と推定される部位を含む。細胞原形質ドメインは、チロシンリン酸化部位、および、セリンリン酸化のための複数の部位を含む。SEMA4Dは、ホモ二量体を形成するが、SemaドメインのC647が二量体形成には必要である。細胞外ドメインの放出は、メタロプロテアーゼ依存性であり、リン酸化によって調節される(Elhabazi A. (2001) J Immunol; 166(7): 4341-70)。SEMA4Dの受容体としては、Plexin-B1(Vikis HG (2000) PNAS 97(23): 12457-62)および、CD72(Kumanogoh A (2000) Immunity, 13(5): 621-31)が挙げられる。

【0010】

セマフォリン・ファミリーのメンバーは、軸索のガイドに関与し、SEMA4Dは、体液性および細胞性免疫反応の調節に役割を果たしていると考えられている。SEMA4Dノックアウトマウスは、免疫系に欠陥を示す。免疫反応に関与しているのであるから、SEMA4Dは、癌患者のT細胞およびB細胞を刺激するのに使用することが可能なのではないかと示唆されている(JP2001048803および特許文献1)。SEMA4Dはまた、血管形成にも関与しており(非特許文献1)、侵襲的細胞増殖にも役割を果たしているようである(非特許文献2および非特許文献3)。SEMA4Dはまた、T細胞とも関わりがあることが言われているが、B細胞、非ホジキン病リンパ腫とは関係がない(非特許文献4)。

【特許文献1】国際公開第97/17368号パンフレット

【非特許文献1】Basile JR, Cancer Res (2004); 64(15): 5212-24

【非特許文献2】Conrotto P et al., Oncogene (2004) 23(30): 5131-7

【非特許文献3】Giordano S. et al., Nat Cell Biol (2002) 4(9): 720-4

【非特許文献4】Dorfman DM et al., Am J Pathol (1998) 153(1): 255-62

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の概要)

ある局面では、本発明は、SEMA4Dの発現産物のレベルを調節することを含む、患者の癌を治療する方法を提供する。ある実施態様では、癌は、リンパ腫、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌である。

【0012】

10

20

30

40

50

ある局面では、本発明は、コントロールに比べてS E M A 4 Dの過剰な発現によって特徴づけられる患者の癌を治療する方法を提供する。ある実施態様では、方法は、患者のS E M A 4 D遺伝子発現を調節することを含む。

【0013】

ある局面では、本発明は、S E M A 4 D活性を調節することを含む、患者の癌を治療する方法を提供する。ある実施態様では、S E M A 4 D活性は、細胞増殖、細胞成長、細胞の運動性、転移、細胞移動、細胞の生存、および腫瘍形成性から成る群から選ばれる。

【0014】

ある局面では、本発明は、患者サンプルにおいてS E M A 4 Dの差次的発現の証拠を検出することを含む癌診断法を提供する。ある実施態様では、S E M A 4 Dの差次的発現の証拠が、癌の診断になる。

10

【0015】

ある局面では、本発明は、患者サンプルの中に癌細胞を検出する方法であって、S E M A 4 Dの発現産物の証拠を検出することを含む方法を提供する。ある実施態様では、サンプル中のS E M A 4 Dの発現の証拠は、該サンプル中の細胞は癌性であることを示す。

【0016】

ある局面では、本発明は、患者における癌の進行を評価する方法であって、第1時点における生物サンプルのS E M A 4 Dの発現産物のレベルを、第2時点における同じ発現産物のレベルと比較することを含む方法を提供する。ある実施態様では、第1時点に対して、第2時点における発現産物のレベルの変化は、癌の進行を示す。

20

【0017】

ある局面では、本発明は、癌を診断する方法であって、

(a) 第1個体の第1組織タイプを含む第1サンプル中のS E M A 4 Dのm R N Aレベルを測定すること；

(b) (a)のm R N Aレベルを、

(1) 前記第1個体の正常組織タイプを含む第2サンプル中のm R N Aレベルと、または、

(2) 罹患していない個体から得られた正常組織タイプを含む第3サンプル中のm R N Aレベルと、

比較することを含む方法を提供する。ある実施態様では、(a)のm R N Aレベルと、第2サンプルまたは第3サンプル中のm R N Aレベルの間に少なくとも2倍の差があることは、第1個体が、癌を有するか、または癌に罹り易いことを示す。

30

【0018】

ある局面では、本発明は、抗癌活性に対するスクリーニングであって、

(a) S E M A 4 Dを発現する細胞を、候補抗癌剤と接触させること；および、

(b) 該候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞中のS E M A 4 D発現レベルの間に少なくとも2倍の差を検出することを含むスクリーニングを提供する。ある実施態様では、候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞中のS E M A 4 D発現レベルとの間での少なくとも2倍の差は、候補抗癌剤が抗癌活性を持つことを示す。

【0019】

ある局面では、本発明は、患者について、S E M A 4 Dの発現産物に結合する抗体による治療に対し感受性を持つかどうかを特定する方法であって、該患者からの生物サンプル中の遺伝子の発現産物レベルを測定することを含む方法を提供する。

40

【0020】

ある局面では、本発明は、哺乳動物において癌を診断または検出するためのキットを提供する。ある実施態様では、キットは、先行実施態様の内のいずれか一つによる抗体またはその断片、免疫結合体またはその断片を含む。ある実施態様では、抗体または断片は、S E M A 4 D腫瘍細胞抗原に特異的に結合する；前記抗体と、前記S E M A 4 D腫瘍細胞抗原の間の結合反応を検出するための一つ以上の試薬。ある実施態様では、キットは、該キット使用のための案内を含む。

50

【0021】

ある局面では、本発明は、癌を診断するためのキットであって、ストリンジェントな条件の下で S E M A 4 D 遺伝子にハイブリダイズする核酸プローブ； S E M A 4 D 遺伝子を増幅するためのプライマーを含むキットを提供する。ある実施態様では、キットは、該キット使用のための案内を含む。

【0022】

ある局面では、本発明は、 S E M A 4 D の発現産物に対して特異的な 1 種以上の抗体またはオリゴヌクレオチドを含む組成物を提供する。

【0023】

本発明の上記および他の局面は、下記の、本発明の詳細な説明において明らかにされよう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

(詳細な説明)

本発明は、癌の治療、診断、および画像記録、特に、 S E M A 4 D 関連癌の治療、診断、および画像記録のための方法および組成物を提供する。

【0025】

従来、癌原遺伝子は、「プロウィルス標識追跡」と呼ばれる過程を用いてヒトにおいて特定されている。この過程では、マウスモデルによる癌原遺伝子を分離するのに、挿入突然変異機構によって活動する遅形質転換レトロウィルスが用いられる。あるモデルでは、未感染動物では癌発生率が低く、感染動物では、癌の発生率が高い。用いたレトロウィルスの多くは、変換された宿主癌原遺伝子、または病原性の、種間作動性ウィルス遺伝子を持っていないので、癌発生率の上昇は、宿主癌原遺伝子にプロウィルスが組み込まれた影響の直接的結果であることが知られる。プロウィルスの組み込みはランダムなので、稀な組み込み遺伝子が、増殖上有利な特典を与える宿主の癌原遺伝子を「活性化」し、この稀な事象から、新規プロウィルスが腫瘍におけるクローン配分を持つことになる。化学薬品、放射線照射、または自発性欠陥と違って、癌原遺伝子挿入突然変異は、既知の配列を持つ都合のよい大きさの遺伝子マーカー（プロウィルス）が突然変異部位に存在するために、簡単にその場所の特定が可能である。クローンとして組み込まれたプロウィルスの両脇に隣接する宿主配列は、様々の方策を用いてクローンすることが可能である。一旦これらの配列が手に入れば、次に、このタグ付き癌原遺伝子を特定することが可能である。二つ以上の独立した腫瘍において同じ座位にプロウィルスが存在することは、癌原遺伝子が、このプロウィルスの組み込み部位に、またはその近くに存在することの第 1 証拠となる（Kim et al, Journal of Virology, 2003, 77:2056-2062; Mikkers, H and Berns, A, Advances in Cancer Research, 2003, 88:53-99; Keoko et al. Nucleic Acids Research, 2004, 32:D523-D527）。これは、ゲノムが、ランダムな挿入が観察可能な集合化を起こすには大きすぎるからである。検出される集合化があるとすると、それが何であれ、それは、生物学的選択（すなわち、腫瘍表現型）のまぎれもない証拠である。さらに、プロウィルス組み込み遺伝子のパターン（方向も含む）から、各集合における標的遺伝子の所在特定を比較的単純なものとする必要な位置情報が得られる。挿入突然変異機構によって癌を起こすことが知られる、三つの哺乳類レトロウィルスは、FeLV（ネコにおいて白血病／リンパ腫）、MLV（マウスおよびラットにおいて白血病／リンパ腫）、およびMMTV（マウスにおいて乳癌）である。マウスモデルにおいて癌原遺伝子が特定されたならば、そのヒトのオルソログには癌原遺伝子という注記が付き、さらに探求が行われることになる。

【0026】

したがって、その配列が、宿主生物のゲノムに挿入されると癌をもたらす原癌レトロウィルスを用いることによって、癌に関わる宿主遺伝子を特定することが可能となる。次に

、これらの配列を、診断、予後診断、調節因子（作用因子および拮抗因子の両方を含む）、抗体生産（免疫療法および画像記録のための）等を含む、いくつかの異なるやり方で使用することが可能となる。しかしながら、当業者にはお分かりのように、本発明において特定されたもののよう、一つのタイプの癌において特定された癌原遺伝子は、他のタイプの癌にも同様に関与する確率が非常に高い。

【0027】

S E M A 4 D 遺伝子は、乳癌（乳房の腺癌：葉および管部分）、結腸癌、卵巣癌（卵巣腺癌：漿膜、乳頭漿膜、内膜、および明細胞）、すい臓癌（すい臓の腺癌：管部分）、前立腺癌、リンパ系癌（急性T細胞白血病、急性リンパ芽球白血病、非ホジキンリンパ腫、未分化リンパ腫、大細胞リンパ腫）、および腎臓癌（腎臓細胞腺癌）の治療および診断のための、細胞膜関連標的として特定されている。上皮癌細胞タイプが、Q P C R 分析によって過剰発現が明らかにされたそれらの患者腫瘍サンプルに一致する。このことは、この遺伝子が、乳房、結腸、リンパ系、卵巣、すい臓、前立腺、および腎臓の癌と相関を持つこと、したがって、上記癌およびその他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

10

【0028】

したがって、本発明は、生物サンプル中に癌性細胞を検出するための方法であって、S E M A 4 D 遺伝子の配列または発現レベルを調べることを含む方法を提供する。

【0029】

S E M A 4 D 遺伝子は、M M T V および M L V プロウィルスの I 型および I I 型組み込みを受け、組み込みが認められるのは8通りの場合においてであった。この遺伝子は、患者の腫瘍サンプルを用いると、サンプルされた乳癌組織の33%、サンプルされた卵巣癌組織の87%、サンプルされたすい臓癌組織の40%においてm R N A レベルで過剰発現することが認められた。この遺伝子はまた、サンプルされた結腸および前立腺癌においても過剰発現するのが認められた（t-検定）。このことは、この遺伝子は、乳房、すい臓、卵巣、結腸、および前立腺の癌と相関すること、したがって、これらの疾患の診断および治療の有望な標的となることを意味する。

20

【0030】

本明細書で用いる「癌関連遺伝子」とは、S E M A 4 D 遺伝子を指す。

【0031】

これらの遺伝子は、本明細書に記載される方法を用いて特定され、その正当性が裏付けられた。

30

【0032】

ある実施態様では、方法は、癌関連遺伝子の、1種以上（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の発現産物の発現レベルを測定することを含み、コントロールレベルと異なる発現レベルは、病気であることを示すとする。

【0033】

ある実施態様では、発現産物はタンパクである。ただし、それに代わるものとして、m R N A 発現産物を検出してもよい。タンパクを用いる場合、そのタンパクは、該タンパクに特異的に結合することが好ましい抗体によって検出されることが好ましい。「特異的に結合する」という用語は、抗体は、他の関連ポリペプチドに対するその親和度よりも、その標的ポリペプチドに対し、実質的により大きい親和度を持つことを意味する。本明細書で用いる「抗体」という用語は、元の、そのままの分子ばかりでなく、問題の抗原決定基に結合することが可能な、その断片、例えば、F a b、F (a b ') 2、およびF v も指す。「実質的により大きな親和度」とは、他の関連ポリペプチドに対する親和度と比べ、本発明の標的ポリペプチドに対する親和度に測定可能な上昇があることを意味する。ある実施態様では、親和度は、標的ポリペプチドに対し、1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍以上である。

40

【0034】

ある実施態様では、抗体は、 10^{-4} M 以下、 10^{-7} M 以下、 10^{-9} M 以下の解離

50

定数を持つ、高い親和度の下に、または、ナノモル以下の親和度（0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 nM、またはそれ以下）で結合する。

【0035】

mRNA発現産物を用いる場合、ある実施態様では、mRNAとプローブの間のハイブリッド複合体の形成を可能とする条件下で、組織サンプルを該プローブと接触させ、かつ、複合体の形成を検出することによって該産物を検出する。ある実施態様では、厳格ハイブリダイゼーション条件が用いられる。

【0036】

癌関連遺伝子それ自体は、SEMA4Dをコードする核酸発現産物とプローブの間のハイブリッド複合体の形成を可能とする条件下で、生物サンプルを該プローブと接触させ、かつ、プローブと生物サンプルの核酸との間の複合体の形成を検出することによって検出される。ある実施態様では、複合体の形成の欠如は、その癌関連遺伝子配列における突然変異を示す。

【0037】

方法は、形成される複合体の量を、コントロール組織が用いられた場合に形成される複合体量と比較することを含み、コントロールとサンプルの間に形成される複合体の量に差のあることが癌の存在を示すものとする。ある実施態様では、正常組織と比べた場合の、試験組織によって形成される複合体の量の差は、増加または減少である。ある実施態様では、形成される複合体の量における2倍の増加または減少は疾患を示す。ある実施態様では、形成される複合体の量における3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または場合によっては100倍の増加または減少は、疾患を示す。

【0038】

ある実施態様では、本発明の方法において使用される生物サンプルは、組織サンプルである。しかしながら、ある実施態様では、組織は、乳房組織、肺組織、肝臓組織、リンパ組織、卵巣組織、すい臓組織、前立腺組織、子宮組織、または皮膚組織から選ばれる。

【0039】

本発明はまた、患者における癌の進行を評価する方法であって、第1時点における生物サンプル中のSEMA4Dの発現を、第2時点における同じ発現産物の発現と比較することを含み、第1時点に対し、第2時点における発現の増加または減少、あるいは、発現速度の増加または減少が、癌の進行を示すとする方法を提供する。

【0040】

本発明はまた、SEMA4Dのポリペプチド発現産物に結合する抗体、および、前記抗体と前記ポリペプチドの間の結合反応の検出に有用な試薬を含む、癌診断用キットを提供する。ある実施態様では、抗体は、SEMA4Dのポリペプチド産物に対し特異的に結合する。

【0041】

さらに、本発明は、ストリンジェントな条件の下に、癌関連遺伝子にハイブリダイズする核酸プローブ、該癌関連遺伝子を増幅するためのプライマー、および、要すれば任意に、病气診断を促進するための、プローブおよびプライマーの使用説明を含む、癌診断用キットを提供する。

【0042】

本発明はさらに、癌の治療に使用される、抗体、核酸、または、SEMA4Dの発現産物の発現を調節するために好適に使用されるタンパクも提供する。

【0043】

したがって、本発明は、患者における癌の治療法であって、1種以上（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の、SEMA4Dの発現産物のレベルを調節することを含む方法を提供する。ある実施態様では、本法は、患者に対し、治療的有効量の抗体、核酸、または、前記発現産物のレベルを調節するポリペプチドを投与することを含む。

10

20

30

40

50

【0044】

したがって、本発明はさらに、癌の治療、検出、または診断のための薬剤の製造における、抗体、核酸、または、SEMA4Dの発現産物のレベルを調節するポリペプチドの使用を提供する。ある実施態様では、発現レベルは、遺伝子、mRNA、またはコードされるタンパクに対する作用によって調節される。ある実施態様では、発現は上方または下方調整される。例えば、調節変化は、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または場合によっては100倍であってもよい。

【0045】

本発明に従って使用するのに好適な抗体は、癌関連タンパクが、癌細胞の上に、またはその内部に発現される時、該タンパクに対して特異的であってもよい。例えば、癌細胞において発現される癌関連タンパクのグリコシル化パターンは、これらの癌関連タンパクが非癌細胞において発現される場合、その同じタンパクのグリコシル化パターンとは異なる可能性がある。ある実施態様では、本発明による抗体は、癌細胞のみに発現される癌関連タンパクに対して特異的である。これは、治療的抗体として特別の価値を持つ。抗標的抗体はさらに、標的の、スプライス変異種、欠失、挿入、および／または置換突然変異に結合してもよい。

【0046】

本発明による治療的使用に好適な抗体は、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を発揮する。ADCCとは、細胞介在性反応であって、Fc受容体を発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞上の結合抗体を認識し、次いで、標的細胞の分解をもたらす反応である(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290)。本発明による治療的使用に好適な抗体は、抗体依存性細胞介在性食作用(ADCP)を発揮してもよい。ADCPは、細胞介在性反応であって、Fc受容体を発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞上の結合抗体を認識し、次いで、食作用を引き起こす反応である。これらの過程は、その表面に、IgG抗体のFc領域に対する受容体を持つナチュラルキラー(NK)細胞によって仲介される。IgG細胞を、癌細胞を含む「外来の」膜結合細胞上のエピトープに対して作製した場合、該抗体のFab領域は、その癌細胞と反応する。次に、NK細胞が、その抗体のFc領域に結合する。

【0047】

エフェクター機能、例えば、抗体の、抗原依存性細胞介在性細胞傷害活性(ADCC)および／または補体依存性細胞傷害性(CDC)の強化に関して本発明の抗体を修飾することが望ましい場合の実験態様では、該抗体のFc領域に一つ以上のアミノ酸置換を導入し、この領域に架橋性ジスルフィド結合を形成することも可能である(総説に関しては、Weiner and Carter (2005) Nature Biotechnol 23(5):556-557を参照)。このようにして生成されるホモ二量体は、侵入能力が改善され、および／または、補体介在性細胞殺作用および抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)が高められる可能性がある。Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)、およびShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照されたい。抗癌活性が強化されたホモ二量体抗体はまた、Wolf et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)の記載したような、ヘテロの二官能基クロスリンカーを用いて調製してもよい。それとは別に、二重Fc領域を持ち、したがって、補体分解およびADCC能が強化された抗体を遺伝子工学的に作製することも可能である。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照されたい。Fc領域内部のグリコシル化が修飾された抗体を生産することも可能である。例えば、炭水化物さにおけるフコース含量を下げることによって、抗体の内在的ADCC活性は強化される(例えば、WO006173

10

20

30

40

50

9に記載されるBioWaのPotillegent（商標）ADCC強化技術を参照されたい）。それとは別に、細胞系統において、分岐型非フコシル化オリゴサッカリド鎖を加えた抗体を生産することも可能である（US6,602,684参照）。これらの技術は両方とも、エフェクター細胞におけるFcガンマIIIIa受容体に対する親和度が増し、したがってADCC効率が高まった抗体を生産する。Fc領域はさらに、本発明の抗体の血清半減期を変えるように遺伝子工学的に加工することも可能である。Abdegは、FcRnサルベージ受容体に対する親和度が強化された加工抗体であり、したがって、通例のIgGよりも短い半減期を持つ（Vaccaro et al., (2005) Nature Biotechnology 23(10):1283-1288を参照）。血清半減期を延ばすには、FcRnとの親和度を下げるとされる特異的突然変異をFc領域に導入することが可能である（Hinton et al., (2004) J Biol Chem 297(8):6213-6216参照）。本発明の抗体はまた、血清半減期を変える、他の機構、例えば、血清アルブミン結合ドメイン(dAb)を用いて修飾することも可能である（例えば、WO05035572を参照）。ADCC活性の向上、血清半減期の変更、または抗体タンパクの安定性の増大を実現するために、加工されたFcドメイン（例えば、XmAB（商標）、WO05077981を参照）を本発明の抗体に組み込みこんでもよい。

10

【0048】

ある実施態様では、本発明に従って治療用に用いられる抗体は、ADCCを誘発するのに効果的であり、標的に結合し、ADCC活性を持つことによって癌細胞の生存を変動させる。抗体は、ADCC活性を高めるように加工することも可能である（例えば、US20050054832A1、Xencor Inc. およびそこに引用されている文献を参照）。

20

【0049】

ある実施態様では、これらの方法で使用される核酸タイプは、アンチセンス構築体、リボザイム、または、例えば、siRNAを含むRNAiである。

【0050】

癌は、腫瘍増殖の抑制、腫瘍容積の低下、または、それに代わるものとして、癌細胞の侵襲性を抑えることによって処置してもよい。ある実施態様では、前述の治療法は、手術、ホルモン破壊療法、放射線療法、または化学療法の一つ以上と組み合わせて用いられる。例えば、患者がすでに化学療法を受ける態勢にある場合、前述の発現産物のレベルを変える本発明の化合物も一緒に投与してよい。化学療法剤、ホルモン剤、および／または放射線療法剤および本発明の化合物は、同時に、別々に、または継時的に投与されてもよい。

30

【0051】

ある実施態様では、前述の方法の一つによって検出または治療される癌は、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、リンパ系癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、または皮膚癌の中から選ばれる。

【0052】

本発明は、患者サンプルにおけるSEM4D遺伝子産物の差次的発現の証拠を検出することを含む癌診断法を提供する。遺伝子の差次的発現の証拠が、癌の診断になる。ある実施態様では、遺伝子の差次的発現の証拠は、遺伝子の発現産物のレベルを測定することによって検出される。ある実施態様では、発現産物は、タンパクまたはmRNAである。ある実施態様では、タンパクの発現レベルは、そのタンパクに特異的に結合する抗体を用いて測定される。ある実施態様では、抗体は画像形成剤に連結される。ある実施態様では、患者サンプル中の遺伝子の発現産物のレベルは、コントロールと比較される。ある実施態様では、コントロールは、患者サンプルと同じ組織タイプの、既知の正常組織である。ある実施態様では、サンプル中の発現産物のレベルは、コントロールに比べて増加する。

40

【0053】

本発明はまた、患者サンプル中に癌細胞を検出する方法であって、SEMA4Dの発現

50

産物の証拠を検出することを含む方法を提供する。サンプルにおける遺伝子の発現の証拠は、そのサンプル中の細胞が癌性であることを示す。ある実施態様では、癌は、乳房細胞、肺細胞、肝臓細胞、リンパ系細胞、卵巣細胞、すい臓細胞、前立腺細胞、子宮細胞、または皮膚細胞である。ある実施態様では、発現産物の証拠は、画像形成剤に連結する抗体を用いて検出される。

【0054】

本発明は、患者における癌の進行を評価する方法であって、第1時点における生物サンプル中のSEMA4Dの発現産物のレベルを、第2時点における同じ発現産物のレベルと比較することを含む方法を提供する。第1時点に対し、第2時点における発現産物レベルの変化は、癌の進行を示す。ある実施態様では、癌は、乳癌、肝臓癌、肺癌、リンパ系癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、または皮膚癌である。

10

【0055】

本発明はさらに、癌を診断する方法であって、(a)第1個体の第1組織タイプを含む第1サンプル中のSEMA4DのmRNAレベルを測定すること；および、(b)(a)のmRNAレベルをコントロールと比較することを含む方法を提供する。(a)のmRNAレベルと、第2サンプルまたは第3サンプル中のmRNAレベルの間に少なくとも2倍の差を検出することは、第1個体が、癌を抱えている、または癌に罹り易い性質を持つことを示す。ある実施態様では、コントロールサンプルは、第1個体の正常組織タイプを含む。ある実施態様では、コントロールサンプルは、罹患していない個体から得られた正常組織タイプを含む。ある実施態様では、第1サンプルにおけるmRNAレベルと、コントロールの間に少なくとも3倍の差があることが、第1個体が、癌を有するか、または癌に罹り易いことを示す。

20

【0056】

本発明は、抗癌活性に対するスクリーニング法であって、(a)SEMA4Dを発現する細胞を、候補抗癌剤と接触させること；および、(b)該候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞中のSEMA4D発現レベルの間に少なくとも2倍の差を検出することを含むスクリーニング法を提供する。候補抗癌剤の不在下における細胞中の遺伝子発現レベルと比べ、存在下における細胞中の遺伝子発現レベルとの間での少なくとも2倍の差は、候補抗癌剤が抗癌活性を持つことを示す。ある実施態様では、候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞中の遺伝子発現レベルとの間での少なくとも3倍の差は、候補抗癌剤が抗癌活性を持つことを示す。ある実施態様では、候補抗癌剤は、抗体、小型有機分子、小型無機分子、またはポリヌクレオチドである。ある実施態様では、候補抗癌剤は、モノクローナル抗体である。ある実施態様では、候補抗癌剤は、ヒトの、またはヒト化抗体である。ある実施態様では、ポリヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。ある実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号7の配列を持つオリゴヌクレオチドである。

30

【0057】

本発明はまた、哺乳動物において癌を診断または検出するためのキットを提供する。ある実施態様では、キットは、抗体またはその断片、または、免疫結合体またはその断片を含む。ある実施態様では、抗体または断片は、SEMA4D腫瘍細胞抗原に特異的に結合する。キットはさらに、抗体と、腫瘍細胞抗原の間の結合反応を検出するための一つ以上の試薬を含む。ある実施態様では、キットは、該キット使用のための案内を含む。

40

【0058】

本発明はさらに、癌を診断するためのキットを提供する。ある実施態様では、キットは、ストリンジェントな条件の下でSEMA4Dにハイブリダイズする核酸プローブを含む。キットはまた、癌関連遺伝子を増幅するためのプライマーを含む。ある実施態様では、キットは、該キット使用のための案内を含む。

【0059】

本発明は、患者の癌を治療するための方法を提供する。ある実施態様では、方法は、SEMA4Dの発現産物のレベルを調節することを含む。ある実施態様では、本発明は、患

50

者に対し、抗体、核酸、または、発現産物のレベルを調節するポリペプチドを投与することを含む。ある実施態様では、発現産物のレベルは、少なくとも2倍上方または下方調整される。ある実施態様では、癌は、腫瘍増殖の抑制、または腫瘍容積の低下によって治療される。ある実施態様では、癌は、癌細胞の侵襲性を抑えることによって治療される。ある実施態様では、発現産物はタンパクまたはmRNAである。ある実施態様では、第1時点における発現産物の発現レベルが、第2時点における同じ発現産物の発現レベルと比較され、その際、第1時点に対し、第2時点の発現の増加または減少は、癌の進行を示す。

【0060】

本発明はまた、SEMA4D活性を調節することを含む、患者の癌を治療する方法を提供する。ある実施態様では、SEMA4D活性は、細胞増殖、細胞成長、細胞の運動性、転移、細胞移動、細胞の生存、または腫瘍形成性である。ある実施態様では、本法は、患者に対し、抗体、核酸、または、SEMA4D活性を抑制するポリペプチドを投与することを含む。ある実施態様では、抗体は中和抗体である。ある実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。ある実施態様では、モノクローナル抗体は、少なくとも 1×10^8 K_aの親和性でSEMA4Dポリペプチドに結合する。ある実施態様では、モノクローナル抗体は、癌細胞成長、腫瘍形成、細胞生存、および癌細胞増殖の内の一つ以上を抑制する。ある実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、1本鎖抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、またはFab断片である。

【0061】

本発明はまた、コントロールに対してSEMA4Dの過剰発現によって特徴づけられる患者において癌を治療する方法を提供する。ある実施態様では、本法は、患者におけるSEMA4D活性を調節することを含む。ある実施態様では、SEMA4D活性は、細胞増殖、細胞成長、細胞の運動性、転移、細胞移動、細胞の生存、遺伝子発現、および腫瘍形成性から成る群から選ばれる。ある実施態様では、癌は、子宮頸癌、腎臓癌、卵巣癌、すい臓癌、および皮膚癌から成る群から選ばれる。ある実施態様では、本法は、患者に対し、抗体、核酸、または、SEMA4D活性を抑制するポリペプチドを投与することを含む。

【0062】

本発明はさらに、患者について、SEMA4Dの発現産物に結合する抗体による治療に対し感受性を持つかどうかを特定する方法であって、該患者からの生物サンプル中の遺伝子の発現産物レベルを測定することを含む方法を提供する。

【0063】

本発明はさらに、癌の治療、診断、または検出のための組成物を提供する。ある実施態様では、組成物は、SEMA4Dの発現産物に対して特異的な抗体またはオリゴヌクレオチドを含む。ある実施態様では、組成物はさらに、従来の癌製剤を含む。ある実施態様では、組成物は製薬組成物である。ある実施態様では、組成物は、滅菌注入剤である。

【0064】

本発明はさらに、癌細胞の増殖を調節する候補薬剤を特定するアッセイであって、(a) 候補薬剤の存在下に、SEMA4Dの、1種以上（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の発現産物を検出すること；および、(b) 発現レベルを、該候補抗癌剤の不在下における発現レベルと比較することを含み、発現の差が、候補薬剤が、癌関連遺伝子の発現産物の発現レベルを調節することを示すとするアッセイを提供する。

【0065】

本発明はまた、SEMA4Dの発現レベルを修飾する薬剤を特定する方法であって、(a) 本発明の前述の実施態様のいずれかに挙げられるSEMA4Dを発現する細胞を、候補抗癌剤と接触させること；および、(b) 該細胞に対する候補薬剤の作用を定量することを含み、発現レベルにおける変化は、候補細胞が発現を調節することが可能であることを示すとする方法を提供する。

【0066】

ある実施態様では、候補薬剤は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、または小型有機分子である。

【0067】

本発明はまた、生物サンプルにおける癌を検出するための方法であって、前述のように、リンパ腫、白血病、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌、または皮膚癌と相関するSEMA4Dの配列または発現レベルを定量することを含む方法を提供する。

【0068】

定義

本発明は、SEMA4Dは癌の発生に関わることを特定する。したがって、この遺伝子は「SEMA4D遺伝子」と呼ばれる。

【0069】

「SEMA4D」は、NCBI公開データベースにおいて遺伝子座位ID10507によって参照される「セマフォリン4D」遺伝子を意味する。この遺伝子は、アクセス番号NM_006378の下に参照されるmRNA（配列番号1）であって、かつ、アクセス番号NP_006369（配列番号2）の下に参照されるポリペプチドをコードするmRNAを持つ。関連配列として、BC054500（配列番号3＝ヌクレオチド配列；配列番号4＝アミノ酸配列）、AAH54500（配列番号5）、BX648216（配列番号6）、U60800（配列番号7＝ヌクレオチド配列；配列番号8＝アミノ酸配列）、AAC50810（配列番号9）およびQ92854（配列番号10）が挙げられる。SEMA4Dは膜結合タンパクである。

【0070】

したがって、この遺伝子によってコードされるSEMA4Dポリペプチドは、「癌関連ポリペプチド」または「癌関連タンパク」と呼ばれる。これら癌関連ポリペプチドをコードする核酸配列は、「癌関連ポリヌクレオチド」と呼ばれる。SEMA4D遺伝子をコードおよび／または発現する細胞は、「癌関連細胞」と呼ばれる。SEMA4D遺伝子をコードする細胞は、「癌関連遺伝子型」を持つと言われる。癌関連タンパクを発現する細胞は、「癌関連表現型」を持つと言われる。「癌関連配列」とは、SEMA4D遺伝子から得られるポリペプチドおよびポリヌクレオチド両配列を指す。「癌関連核酸」は、SEMA4D遺伝子を含むDNAの外に、その遺伝子から得られるmRNAおよびcDNAも含む。

【0071】

本明細書の文脈における「関連」とはSEMA4Dヌクレオチドまたはタンパク配列は、正常組織に比べ、癌において差次的に発現され、活性化され、不活性化され、または変えられることを意味する。後述するように、癌関連配列は、癌において上方調整される（すなわち、高レベル発現される）ものばかりでなく、下方調整される（すなわち、低レベル発現される）ものも含む。癌関連配列はまた、変化を受けた配列（すなわち、短縮化配列、または、点突然変異を含む、置換、欠失、または挿入を有する配列）で、同じ発現プロフィールか、変化プロフィールのいずれかを示す配列も含む。一般に、癌関連配列は、ヒトのものである。しかしながら、当業者には了解されるように、他の生物の癌関連配列も、病気の動物モデルおよび薬剤評価において有用である可能性があり、したがって、他の、哺乳類、げっ歯類（ラット、マウス、ハムスター、モルモット等）を含む脊椎動物、霊長類、および家畜動物（ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ等を含む）からの癌関連配列を特定してもよい。ある実施態様では、前核細胞性癌関連配列も有用である可能性がある。他の生物由来の癌関連配列も後述の技術を用いて獲得されてよい。

【0072】

癌関連配列は、組み換え核酸を含む。「組み換え核酸」とは、本明細書で用いる場合、もともとインビトロで、一般には、ポリメラーゼまたはエンドヌクレアーゼによって核酸を操作することによって、通常天然では見られない形に形成された核酸を意味する。した

10

20

30

40

50

がって、組み換え核酸とはまた、直線形の分離核酸、あるいは、通常は接続されないDNA分子を連結することによってインビトロで形成されるベクターにおいてクローンされる分離核酸であり、これらは共に、本発明の目的のためには組み替えと見なされる。組み換え核酸が作製され、宿主細胞または生物に再導入されると、該核酸は、インビトロ操作によらず、宿主細胞のインビボ細胞機構を用いて複製することが分かる。しかしながら、このような核酸は、組み換え的に生産されたものである限り、その後インビボで複製しようとも、本発明の目的のためには依然として組み換え、または分離されたものと見なされる。本明細書で用いる「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのどちらであってもよい、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形である。この用語は、分子の一次構造のみを指す。したがって、この用語は、2本鎖および1本鎖DNAおよびRNAを指す。用語はまた、既知のタイプの修飾、例えば、従来技術で既知の標識、メチル化、「キャップ」、1個以上の天然のヌクレオチドの、類縁体による置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、無荷電結合（例えば、フォスフォロチオエート、フォスフォロジチオエート等）を有するポリヌクレオチド、ぶら下がり成分、例えば、タンパク（例えば、ヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーリシン等）を含むもの、介在因子（例えば、アクリジン、プソラレン等）を有するもの、修飾結合（例えば、アルファアノマー核酸等）を有するもの、の外に、ポリヌクレオチドの未修飾形が挙げられる。

【0073】

本明細書で用いる、指定の配列から「得られた」ポリヌクレオチドとは、指定のヌクレオチド配列の領域と一致する、ほぼ少なくとも約6ヌクレオチド、少なくとも約8ヌクレオチド、少なくとも約10-12ヌクレオチド、および、少なくとも約15-20ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチド配列を指す。「一致」とは、指定の配列と相同、または相補的であることを意味する。ある実施態様では、ポリヌクレオチド配列が得られた領域の配列は、癌関連遺伝子に特有な配列に対して相同的、または相補的である。

【0074】

「組み換えタンパク」とは、組み換え技術を用いて、すなわち、前述の組み換え核酸の発現を通じて作製されるタンパクである。組み換えタンパクは、少なくとも一つ以上の特徴で、天然のタンパクとは区別される。例えば、タンパクは、それが、野生型宿主では通常関連するタンパクおよび化合物のあるもの、またはその全てから分離、または切り離されて精製され、したがって実質的に純粋であってもよい。例えば、分離タンパクは、天然状態では通常関連する物質で、任意のサンプルのタンパク総量の、少なくとも約0.5重量%、または少なくとも約5重量%を占める物質の内の少なくとも若干量を含まない。実質的に純粋なタンパクは、タンパク総量の約50-75重量%、少なくとも約80重量%、または少なくとも約90重量%を含む。この定義は、異なる生物または宿主細胞から得られた癌関連細胞の生産も含む。それとは別に、タンパクは、誘起可能なプロモーターまたは高発現プロモーターを用いることによって、通常見られるよりも有意に高い濃度で調製され、そのために、該タンパクが高濃度レベルで作製されるようになってよい。それとは別に、タンパクは、通常天然に見られない形で、例えば、後述するように、エピトプタグ、またはアミノ酸置換、挿入、および欠失の付加に見られるような形で作製されてもよい。

【0075】

本明細書で用いる「タグ」、「配列タグ」、または「プライマータグ配列」という用語は、そのようなタグを担持する1団のポリヌクレオチドを特定するのに使われる特定の核酸配列を伴うオリゴヌクレオチドを指す。同じ生物ソースからのポリヌクレオチド同士が、ある特定の配列タグに共有的に結びつけられると、その後の分析において、このポリヌクレオチドをその起源に従って特定することが可能である。配列タグはまた、核酸増幅反応のプライマーとしても使用される。

【0076】

「マイクロアレイ」とは、固相支持体の表面に形成される、それぞれが定められた区域

10

20

30

40

50

を持つ、好ましくは不連続の領域から成る直線的、または二次元アレイである。マイクロアレイにおける不連続領域の密度は、単一固相支持体の表面において検出される標的ポリヌクレオチドの全数によって決められるが、好ましくは少なくとも約 $50/\text{cm}^2$ 、より好ましくは少なくとも約 $100/\text{cm}^2$ 、さらに好ましくは少なくとも約 $500/\text{cm}^2$ 、およびさらに好ましくは少なくとも約 $1,000/\text{cm}^2$ である。本明細書で用いる DNA マイクロアレイは、標的ポリヌクレオチドを増幅またはクローンするために使用されるチップ、またはその他の表面に載せられるオリゴヌクレオチドプライマーのアレイである。アレイにおける各特定グループのプライマーの位置は既知であるから、標的ポリヌクレオチドの正体は、該マイクロアレイにおいて特定の位置に対するその結合に基づいて決めることが可能である。

10

【0077】

「リンカー」とは、制限部位を含む合成オリゴデオキシヌクレオチドである。リンカーは、DNA 断片の末端に平滑末端結合されて制限部位を設けてもよい。この部位は、その後、断片をベクター分子に挿入してクローンする際に使用される。

【0078】

「ラベル」という用語は、アッセイサンプルにおける標的ポリヌクレオチドの存在を示す検出可能な信号を生成することが可能な組成物を指す。好適なラベルとしては、放射性同位元素、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発光成分、磁気粒子、生物発光成分等が挙げられる。ラベルとしては、分光光度計測、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的手段、または、他の任意の手段によって検出される任意の組成物であってよい。「ラベル」という用語は、検出可能な物理的性質を持つ任意の化学基または成分、または、化学基または成分が、検出可能な物理的性質を発揮するようにさせる任意の化合物、例えば、基質の、検出可能な産物への変換を触媒する酵素を指す。「ラベル」という用語はさらに、特定の物理的性質の発現を抑制する化合物を含む。ラベルはまた、結合ペアであって、ペアの他方が検出可能な物理的性質を持つペアの一員である化合物であってもよい。

20

【0079】

「支持体」という用語は、通例の支持体、例えば、ビーズ、粒子、ディップスティック、線維、膜、および、シランまたはシリケート支持体、例えば、ガラススライドを指す。

【0080】

「増幅する」という用語は、広い意味で、増幅産物の創成を意味するために用いられる。増幅産物は、例えば、付加的標的分子、または標的様分子、または、標的分子に対して相補的な分子等であって、サンプル中に標的分子のあることで形成される分子を含んでもよい。標的が核酸である状況では、増幅産物は、DNA または RNA ポリメラーゼ、または逆転写酵素によって酵素的に作製することが可能である。

30

【0081】

本明細書で用いる「生物サンプル」とは、個体から単離された組織または流体サンプルであって、例えば、血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚、気道、腸管、および泌尿生殖管、涙液、唾液、乳汁、細胞（血球を含むがこれに限定されない）、腫瘍、器官、および、インビトロ細胞培養成分のサンプルを含むサンプルを指すが、ただしこれらに限定されない。

40

【0082】

本明細書で用いる「生物ソース」という用語は、それから標的ポリヌクレオチドが得られたソースを指す。ソースは、前述の任意の形の「サンプル」であってもよく、例えば、細胞、組織、または流体であってもよいが、ただしこれらに限定されない。「異なる生物ソース」とは、同じ個体の異なる細胞／組織／器官を指してもよく、あるいは、同じ種の異なる個体の細胞／組織／器官を指してもよく、あるいは、異なる種から得られた細胞／組織／器官であってもよい。

【0083】

癌－関連遺伝子

50

SEMA4Dは、膜結合タンパクである。この遺伝子は、MMTVおよびMLVプロウイルスのI型およびII型組み込みを受け、組み込みが認められるのは8通りの場合においてであった。この遺伝子は、患者の腫瘍サンプルを用いると、サンプルされた乳癌組織の33%、サンプルされた卵巢癌組織の87%、サンプルされたすい臓癌組織の40%においてmRNAレベルで過剰発現することが認められた。この遺伝子はまた、サンプルされた結腸および前立腺癌においても過剰発現するのが認められた(t-検定)。このことは、この遺伝子は、乳房、すい臓、卵巢、結腸、および前立腺の癌と相関すること、したがって、これらの疾患の診断および治療の有望な標的となることを意味する。

【0084】

この遺伝子のみの発現であっても癌を引き起こすのに十分である。それとは別に、この遺伝子の発現の増大が、癌を起こすのに十分である。さらに別態様として、この遺伝子の発現が、ある閾値レベルに達するか、それを超えると誘発される可能性がある。閾値レベルは、発現の「正常な」コントロールレベルと比べた場合の、遺伝子発現の増大または減少パーセントとして表してもよい。いずれにしろ、SEMA4Dの発現レベルの変化は癌と相関する。

【0085】

本発明はさらに、上に参照した遺伝子の相同体、断片、および機能的等価物の使用も可能とする。相同体は、上に参照した完全遺伝子配列に基づいてもよいが、一般には、後述するように、相同性プログラムまたはハイブリダイゼーション条件を用いて決められる。癌関連遺伝子の相同体は、該癌関連遺伝子と、好ましくは約75%を超える(すなわち、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも92、少なくとも94、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98、少なくとも99%以上)相同性を持つ。このような相同体は、スプライス変異種、欠失、付加、および/または置換突然変異を含んでよく、一般に機能的類似性を持つ。

【0086】

本明細書の文脈における相同性とは、配列の類似性または同一性を意味する。相同性目的のための一つの比較法は、配列ミスを含む配列を、適正な配列と比較することである。この相同性検査は、従来技術で既知の標準技術、例えば、局所相同性アルゴリズム、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) による; ホモロジー整列アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) による; 類似性探索法、Pearson & Lipman, PNAS USA 85:2444 (1988) による; これらのアルゴリズムのコンピュータ化実行(GAP、BESTFIT、FASTA、および、TFASTA、Wisconsin Geneticsソフトウェアパッケージ、Genetics Computer Group, 575 Science Drive, マジソン、ウィスコンシン州による)、Best Fit 配列プログラム、Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12:387-395 (1984) 記載を含む技術を、いくつかの実施態様ではデフォルト設定を用い、または検査結果に基づいて、用いることによって決定される。

【0087】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、漸進的ペア組み合わせ整列を用い、関連配列グループから複数の配列整列を創成する。該アルゴリズムはさらに、整列を創成するのに用いた集合関係を示すツリーをプロットする。PILEUPは、Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987) の漸進的整列法の単純化版を用いるが、この方法は、Higgins & Sharp CABIOS 5:151-153 (1989) によって記載されるものと近似する。有用なPILEUPパラメータとしては、3.00のデフォルトギャップウェイト、0.10のデフォルトギャップ長、および重みづけした末端ギャップが挙げられる。

【0088】

有用なアルゴリズムのもう一つの例は、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) アルゴリズムである。これは、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) および Karlin et al., PNAS USA 90:5873-5787 (1993) に記載される。特に有用なBLASTプログラムは、Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996) ; <http://blust.wustl.edu/> から入手されるWU-BLAST-2 プログラムである。WU-BLAST-2 は、いくつかの探索パラメータを使用するが、これらの多くはデフォルト値に設定される。調整可能なパラメータは下記の値によって設定される。すなわち、overlap span=1、overlap fraction=0.125、word threshold (T)=11 である。HSP S および HSP S2 パラメータは、ダイナミック数値で、特定の配列の組成、および、対象配列が探索される、特定のデータベースの組成に応じてプログラム自身によって定められる。しかしながら、これらの値は、感度を増すように調整されてもよい。パーセントアミノ酸配列同一値は、整列領域における、マッチした同一残基の数を、「長い方の」配列の残基の全数で割ることによって決められる。「長い方の」配列とは、整列領域においてもっとも多くの実際の残基を有する配列である (WU-BLAST-2 によって整列スコアを最大化するために導入されるギャップは無視される)。

【0089】

整列は、整列される配列の中にギャップを導入することを含んでもよい。さらに、癌関連遺伝子のものよりも多い、または少ないヌクレオチドを含む配列については、相同性パーセントは、ヌクレオチド全数に対する、相同なヌクレオチドの数に基づいて決められると理解される。したがって、本明細書に特定される配列よりも短い配列の相同性は、その短い方の配列の中のヌクレオチドを用いて決められる。

【0090】

本発明のある実施態様では、中等から高等のストリンジェントな条件の下で、本明細書に提示されるポリヌクレオチド配列、またはその断片、または、その相補配列に対してハイブリダイズすることが可能なポリヌクレオチド組成物が提供される。ハイブリダイゼーション技術は、分子生物学技術においてよく知られる。例示のために挙げるのであるが、本発明のポリヌクレオチドの、他のポリヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションを調べるための、好適な中等度のストリンジェントな条件は、5 x SSC (「クエン酸ナトリウム生食液」; 9 mM NaCl, 0.9 mM クエン酸ナトリウム)、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) において準備洗浄すること; 50-60°C、5 x SSCで一晩ハイブリダイズすること; 次に、それぞれ、0.1% SDSを含む2 x、0.5 x、および0.2 x SSCで65°Cで20分の洗浄を2回行うことを含む。当業者であれば、ハイブリダイゼーションの厳格度は簡単に操作が可能であること、例えば、ハイブリダイゼーション液の塩含量、および/または、ハイブリダイゼーションが行われる温度を変えることによって簡単に操作されることを理解するであろう。例えば、ある実施態様では、好適な高い厳格度のハイブリダイゼーション条件は、前述のものを含むが、ただし、ハイブリダイゼーションの温度を、例えば、60-65°C、または65-70°Cに上げる。ストリンジェントな条件は、フォルムアミドのような脱安定化剤を加えることによって実現される。

【0091】

したがって、本出願および配列リストを通じて特定された核酸、またはその相補体に対して、高い厳格度の下でハイブリダイズする核酸は、癌関連配列と考えられる。高い厳格度条件は従来技術で既知である。

例えば、Manniat et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989, および Short Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al., を参照されたい。なお、この両方を引用することにより本

出願に含める。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、異なる状況では異なる。比較的長い配列は、高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸ハイブリダイゼーションのための詳しいガイドが、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)に見られる。一般に、ストリンジェントな条件は、ある定められたイオン強度pHにおける特定配列の熱融解点 (T_m) よりも約5–10℃低くなるように選ばれる。 T_m は、標的に対して相補的なプローブの50%平衡時 (標的配列が過剰に存在する時、 T_m では、プローブの50%が平衡時に占拠される) に標的配列にハイブリダイズする (定められたイオン強度、pH、および核酸濃度の下で) 温度である。ストリンジェントな条件は、pH7.0から8.3において、塩濃度が、約1.0M未満のナトリウムイオン、通常、約0.01から1.0Mのナトリウムイオン濃度 (または他の塩)、温度は、短いプローブ (例えば、10から50ヌクレオチド) では少なくとも約30℃、長いプローブ (例えば、50ヌクレオチドよりも長いもの) では少なくとも約60℃である。もう一つの実施態様では、比較的厳格度の低いハイブリダイゼーション条件が用いられる。例えば、従来技術で既知のやり方の通りに中等から低厳格度条件が用いられる。Maniatis and Ausubel 上記およびTijssen 上記を参照されたい。

10

【0092】

20

癌関連遺伝子発現の検出

癌関連遺伝子はクローンし、要すれば、その構成部分を再結合して、全癌関連核酸を形成してもよい。その天然ソース、例えば、プラスミドまたは他のベクターに含まれている状態から単離したならば、あるいは、直線的核酸セグメントとしてベクターから切り出したならば、この組み換え癌関連核酸は、さらに、他の癌関連核酸、例えば、さらに別のコード領域を特定および単離するために使用することが可能である。この核酸はさらに、癌関連核酸およびタンパクの修飾体または変異体を作製するための「前駆体」核酸として使用することが可能である。この癌関連遺伝子のヌクレオチド配列はまた、癌関連遺伝子に対して特異的なプローブを設計するために使用することも可能である。

【0093】

30

この癌関連核酸は、いくつかのやり方で使用される。癌関連核酸に対してハイブリダイズ可能な核酸プローブを作製し、バイオチップに付着させ、スクリーニングおよび診断法、または、遺伝子治療および／またはアンチセンス応用に使用することが可能である。それとは別に、癌関連タンパクのコード領域を含む癌関連核酸を、癌関連タンパクの発現のために発現ベクターに挿入し、再び、スクリーニングのため、または患者への投与のために使用することが可能である。

【0094】

遺伝子発現を定量するための、そのような一つのシステムは、動的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。動的PCR、特異的核酸配列の増幅と定量の同時的遂行を可能とする。特異性は、標的部位を挟持する1本鎖核酸に選択的に付着するように設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーによって得られる。このオリゴヌクレオチドプライマーペアは、標的配列の各鎖に対して、特異的、非共有結合複合体を形成する。これらの複合体は、2本鎖DNAの反対方向へのインビトロ転写を促進する。反応混合物の温度サイクル変化は、プライマー結合、転写、核酸の再融解による個々の鎖への解離から成る連続サイクルを創成する。結果は、標的dsDNA産物の指数関数的増加である。この産物が、介在性染料または配列特異的プローブの使用によってリアルタイムで定量される。SYBR (登録商標) グリーンIは、dsDNAに選択的に結合する介在性染料の例であり、dsDNAの増加と同時に蛍光信号の増加をもたらす。TaqMan (登録商標) 技術によって使用されるものと同様の配列特異的プローブは、蛍光発色団、および、オリゴヌクレオチドの反対末端に共有的に結合する消光分子から成る。このプローブは、二つのプライ

40

50

マーの間の標的DNA配列に選択的に結合するように設計される。PCR反応の際にDNA鎖が合成されると、蛍光発色団は、ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によってプローブから切断され、信号の脱消光をもたらす。このプローブ発信法は、介在性染料法よりも特異的であるが、いずれの場合も、信号強度は、生産されるdsDNA産物に比例する。いずれのタイプの定量法も、各ウェルが、対象の核酸配列に対して特異的なプライマーおよび／またはプローブを表す、多数ウェル液相アレイに使用が可能である。組織または細胞系統のメッセンジャーRNAについて用いた場合、プローブ／プライマー反応アレイは、対象とする複数の遺伝子産物の発現を同時に定量することが可能である。G e r m e r, S., e t a l., G e n o m e R e s. 10: 258-266 (2000) ; H e i d, C. A., e t a l., G e n o m e R e s. 6, 986-994 (1996) を参照されたい。 10

【0095】

DNAマイクロアレイ技術における最近の進歩によって、単一の固相支持体の上で多数の標的癌関連核酸分子について大規模なアッセイを実行することが可能となっている。米国特許第5,837,832号(C h e e e t a l.) および関連特許出願は、サンプル中の特異的核酸配列のハイブリダイゼーションおよび検出のための、オリゴヌクレオチドプローブアレイの固定法を記載する。対象組織から単離された、対象標的ポリヌクレオチドは、DNAチップにハイブリダイズされ、特異的配列は、点状のプローブ位置における、標的ポリヌクレオチドの指向性、およびハイブリダイゼーションの程度に基づいて検出される。アレイの一つの重要な用法は、異なる細胞における、多くの場合、対象細胞およびコントロール細胞における、遺伝子発現プロファイルを比較し、それぞれの細胞の間に遺伝子発現に差があれば、それを特定する差次的遺伝子発現分析にある。このような情報は、ある特定の細胞、または組織タイプに発現される遺伝子のタイプの特定、および、発現プロファイルに基づいて癌の病態を診断するのに有用である。 20

【0096】

通常、対象サンプルから得られるRNAに対し逆転写を行い、標識されたcDNAを得る。米国特許第6,410,229号(L o c k h a r t e t a l.) を参照されたい。次に、このcDNAは、チップ、またはその他の表面の上に既知の順序で配置された、既知配列のオリゴヌクレオチドまたはcDNAにハイブリダイズされる。標識cDNAがハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの位置は、そのcDNAに関する配列情報を与える。一方、標識され、ハイブリダイズしたRNAまたはcDNAの量からは、対象とするRNAまたはcDNAの相対的発現に関する推定が得られる。S c h e n a, e t a l. S c i e n c e 270: 467-470 (1995)。例えば、ヒト癌における遺伝子発現パターンを分析するためのcDNAマイクロアレイの使用が、D e R i s i, e t a l. (N a t u r e G e n e t i c s 14: 457-460 (1996)) に記載されている。 30

【0097】

癌関連核酸に対応する核酸プローブを作製してもよい。通常、これらのプローブは、開示される癌関連遺伝子に基づいて合成される。バイオチップに付着される核酸プローブは、癌関連核酸、すなわち、標的配列(サンプルの標的配列、または、例えば、サンドイッチアッセイの場合であれば他のプローブ配列)に対し実質的に相補的となるように設計され、標的配列と本発明のプローブとの間に特異的ハイブリダイゼーションが起こるようにする。後述するように、この相補性は完全である必要はない。すなわち、標的配列と、本発明の1本鎖核酸の間のハイブリダイゼーションを妨げる恐れのある、いかなる数の塩基対ミスマッチもあってならないというほど完全である必要はない。ヌクレオチドレベルにおける遺伝子の全体相同性は、約40%以上、約60%以上、または約80%以上であること、さらに、約8-12ヌクレオチド以上の対応する連続配列があることが期待される。しかしながら、突然変異の数が、ハイブリダイゼーションの最低ストリンジェントな条件下でもハイブリダイゼーションが起こりえないほど大きい場合には、その配列は、標的配列の相補鎖ではない。したがって、本明細書で用いる「実質的に相補的」とは、プロー 40 50

ブが、本明細書に略述する正常な反応条件下、特に高いストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるほど標的配列に対して十分な相補性を持つことを意味する。ある配列が、本発明に従って癌関連遺伝子に対し固有であるかないかは、従来技術で既知の技術によって決めることが可能である。例えば、その配列が、未感染宿主または他の生物体に存在するかどうかを定めるには、データバンク、例えば、Gene Bankの配列とその配列を比較することも可能である。配列はまた、癌を誘発することが知られるものを含めた他のウィルス性介在因子の既知の配列と比較することも可能である。

【0098】

ある実施態様では、SEMA 4 D発現の検出に好適なプローブは、SEMA 4 Dの非保存領域に対して特異的である。「非保存領域」とは、SEMAPHORINファミリーの他のメンバーとの平均相同性よりも低い領域を指す。これらの非保存領域における、他のSEMAPHORINファミリーに対する類似性は、50%よりも低いことが好ましい。

【0099】

Q-PCRによるSEMA 4 Dの検出のために好適なプライマーおよびプローブは、a) GG T G C C T G T G T T C T A T G C A C T C T 配列番号1、b) G A C A G G T T G T A G G C G C A C A C T 配列番号2、およびc) A C C C C A C A G C T G A A C A A C G T G G G 配列番号3である。

【0100】

核酸プローブは一般に1本鎖であるが、一部1本鎖、一部2本鎖であってもよい。プローブの鎖の数は、標的配列の構造、組成、および性質によって決められる。一般に、オリゴヌクレオチドプローブは、約6、8、10、12、15、20、30から約100塩基長、約10から約80塩基、または、約30から約50塩基長の範囲を持つ。ある実施態様では、全遺伝子がプローブとして使用される。ある実施態様では、最大数百塩基の、はるかに長い核酸を使用することも可能である。プローブは、当業者に既知の条件下で、相補的鋳型鎖に対し十分特異的である。プローブ配列と、それが、ハイブリダイゼーション時、ハイブリダイズする、相補的鋳型（標的）配列との間のミスマッチの数は、一般に、FASTAで定量した場合（デフォルト設定）、15%、10%、または5%を超えない。

【0101】

オリゴヌクレオチドプローブは、核酸に通常認められる、天然のヘテロ環塩基（ウラシル、シトシン、チミン、アデニン、およびグアニン）の外に、修飾された塩基および塩基類縁体を含んでもよい。プローブの標的配列に対するハイブリダイゼーションを妨げないものである限り、どのような修飾された塩基または塩基類縁体であっても本発明の実施において有用である。プローブの糖またはグリコシド部分は、デオキシリボース、リボース、および／または、これらの糖の修飾形、例えば、2'-O-アルキルリボースを含んでもよい。ある実施態様では、糖成分は、2'-デオキシリボースである。しかしながら、プローブの標的配列にハイブリダイズする能力を妨げない限り、任意の糖成分の使用が可能である。

【0102】

プローブのヌクレオシド単位は、従来技術で既知のように、フォスフォジエステルバックボーンによって連結されてもよい。ある実施態様では、ヌクレオチド間連結は、プローブの特異的ハイブリダイゼーションを妨げない限り、当業者に既知の任意の連結、例えば、フォスフォロチオエート、メチルフォスフォネート、スルファメート（例えば、米国特許第5,470,967号）、およびポリアミド（すなわち、ペプチド核酸）を含んでもよいが、ただし、これらに限定されない。ペプチド核酸は、Nielsen et al. (1991) Science 254:1497-1500、米国特許第5,714,331号およびNielsen (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10:71-75に記載される。

【0103】

プローブはキメラ分子であってもよい、すなわち、1種を超えるタイプの塩基または糖

10

20

30

40

50

サブユニットを含んでもよく、および／または、連結は、同じプライマーの中に1種を超えるタイプを持ってもよい。プローブは、従来技術で知られるように、その標的配列に対するハイブリダイゼーションを促進する成分、例えば、介在因子および／または小溝結合因子を含んでもよい。塩基、糖、およびヌクレオシド間バックボーンの変異種の外、プローブにおけるぶら下がり基の存在も、プローブが、配列特異的やり方で、その標的配列に結合する能力を妨げない。既知のものも、開発中のものも含めて、多数の構造的修飾の使用が、この境界内で可能である。本発明によるプローブは、シグナル増幅を可能とする構造的特徴を持っていると好都合である。そのような構造的特徴は、例えば、Urdea et al. (Nucleic Acids Symp. Ser., 24:197-200 (1991)) または欧州特許EP-0225, 807に記載されるものと同様の枝つきDNAプローブである。さらに、プローブを形成する、様々のヘテロ環塩基、糖、ヌクレオシド、およびヌクレオチドの調製、および、指定の特異的配列のオリゴヌクレオチド調製のための合成法は、従来技術において開発研究が十分に行われており、既知である。オリゴヌクレオチド合成の手法は、米国特許第5, 419, 966号の教示を取り込む。

【0104】

標的核酸における多型および／または二次構造、データの冗長等を受容するため、特定の標的核酸に対し複数のプローブが設計される。配列当たり1個を超えるプローブが使用される、ある実施態様では、単一標的癌関連遺伝子の異なるセクションに対する重複プローブ、または複数プローブが使用される。すなわち、ある特定の標的に対し、2個、3個、4個以上が、ただし3個が好ましいが、冗長度に合わせて使用される。プローブは、重複してもよいし（すなわち、ある配列を共有する）、または、SEMA4Dの別々の配列に対して特異的であってもよい。本発明に従って複数の標的ポリヌクレオチドが検出される場合、ある特定の標的ポリヌクレオチドに対応する各プローブ、またはプローブグループは、マイクロアレイの別々の区域に置かれる。

【0105】

プローブは、溶液として、例えば、ウェル、またはマイクロアレイの表面上に置かれるか、または、固相支持体に付着される。使用が可能な固相支持体の例としては、プラスチック、セラミック、金属、樹脂、ゲル、および膜が挙げられる。固相支持体の有用なタイプとしては、プレート、ビーズ、磁気材料、マイクロビーズ、ハイブリダイゼーションチップ、膜、結晶、セラミック、および自己形成性単層が挙げられる。ある実施態様は、2次元または3次元基質、例えば、ゲル、または複数のプローブ結合部位を有するハイブリダイゼーションチップ (Pevzner et al., J. Biomol. Struct. & Dyn. 9:399-410, 1991; Maskos and Southern, Nuc. Acids Res. 20:1679-84, 1992) を含む。ハイブリダイゼーションチップは、膨大なプローブアレイを構築するのに使用され、アレイは次に標的核酸にハイブリダイズさせられる。このチップのハイブリダイゼーションパターンの分析は、標的ヌクレオチド配列の特定を助ける。パターンは、手動で、またはコンピュータで分析することが可能であるが、ハイブリダイゼーションによる位置的配列決定は、コンピュータ分析および自動化に最適であるのは明瞭である。配列再構成のために開発されたアルゴリズムおよびソフトウェアは、本明細書に記載される方法に適用が可能である (R. Drmanac et al., J. Biomol. Struct. & Dyn. 5:1085-1102, 1991; P. A. Pevzner, J. Biomol. Struct. & Dyn. 7:63-73, 1989)。

【0106】

当業者には認識されるように、核酸は、様々なやり方で固相支持体に対し付着、または固定することが可能である。本明細書では、「固定」とは、核酸プローブと固相支持体の間の連結または結合は、後述する、結合、洗浄、分析、および除去の条件の下で安定であるほど十分である。結合は、共有的であっても、非共有的であってもよい。本明細書における「非共有的結合」およびその文法的等価用語は、静電的、親水的、および疎水的相互作用の内の一つ以上を意味する。非共有的結合に含まれるものとして、分子、例えば、

ストレプトアビジンの、支持体に対する共有付着、および、ビオチニル化プローブの、ストレプトアビジンに対する非共有付着が挙げられる。本明細書における「共有結合」およびその文法的等価用語は、二つの成分、固相支持体およびプローブが、少なくとも一つの結合、例えば、シグマ結合、パイ結合、および配位結合によって付着されることを意味する。共有結合は、プローブと固相支持体との間に、架橋リンカー、または、固相支持体またはプローブのいずれか、または両分子に特異的反応基を含めることによって直接形成することが可能である。固定はまた、共有および非共有相互作用の組み合わせを含んでもよい。

【0107】

核酸プローブは、固相支持体に対し、共有結合、例えば、結合剤による接合、あるいは、共有または非共有結合、例えば、静電的相互作用、水素結合、または抗体-抗原結合、あるいは、それらの組み合わせによって付着されてもよい。典型的結合剤としては、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、*Staphylococcus aureus* タンパク A/IgG 抗体Fc 断片、および、ストレプトアビジン/タンパク A キメラ (T. Sano and C. R. Cantor, *Bio/Technology* 9:1378-81 (1991))、または、これらの薬剤の誘導体または組み合わせが挙げられる。核酸は、光切断性接着、静電的接着、ジスルフィド結合、ペプチド結合、ジエステル結合、またはこの種の結合の組み合わせによって固相支持体に付着されてもよい。アレイもまた、選択的に解放可能な接着、例えば、4, 4'-ジメトキシトリチルまたはその誘導体によって固相支持体に対し付着されてもよい。有用であることが判明している誘導体としては、3 または 4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-メチル-安息香酸、N-スクシニミジル-3 または 4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-メチル-安息香酸、N-スクシニミジル-3 または 4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-ヒドロキシメチル-安息香酸、N-スクシニミジル-3 または 4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-クロロメチル-安息香酸、および、これらの酸の塩が挙げられる。

【0108】

当業者には認識されるように、プローブは、様々なやり方でバイオチップに付着させることが可能である。本明細書に記載する場合、核酸は、先ず合成され、次いでバイオチップに付着されるか、あるいは、バイオチップの上で直接合成される。

【0109】

バイオチップは、適切な固相基質を含む。本明細書で用いる「基質」または「固相支持体」または、他の文法的に等価な用語は、核酸プローブの付着または連結に好適な、不連続な個別部位を含むように修飾され、かつ、少なくとも一つの検出法の実施を可能とする任意の材料を意味する。本発明の固相支持体は、ヌクレオチドハイブリダイゼーションおよび合成を支持するのに好適であれば、任意の固相材料および構造であってもよい。固相支持体は、プライマーを固定することが可能で、逆転写酵素反応を実施することが可能な、少なくとも一つの、実質的に堅固な表面を含む。ポリヌクレオチドマイクロアレイ要素が安定に連結される基質は、様々な材料、例えば、プラスチック、セラミック、金属、アクリルアミド、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレン酢酸ビニル、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリエチレンオキシド、ポリシリケート、ポリカーボネート、テフロン (登録商標)、フルオロカーボン、ナイロン、シリコンゴム、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリ酢酸、ポリオルソエステル、ポリプロピルマレート、コラーゲン、グリコサミノグリカン、およびポリアミノ酸を含む材料から製造される。基質の形状は、二次元、または三次元、例えば、ゲル、膜薄層フィルム、ガラス、プレート、円筒、ビーズ、磁気ビーズ、光ファイバー、繊維等であってもよい。アレイの一つの形は、三次元アレイである。一つのタイプの三次元アレイは、標識付きビーズの集合である。各標識付きビーズは、異なるプライマーを付着させる。標識は、発信手段、例えば、色 (Lumindex, Illumina)、および電磁場 (Pharmaseq) によって検出可能であり、かつ、標識ビーズの信号は、遠隔地点から検出することも可能である (例えば、光ファイバーを用いて)。固相支持体のサイズは、

DNAマイクロアレイ技術に有用な、標準的マイクロアレイサイズの内の任意のものであってよく、サイズは、本発明の反応を実行するのに使用される特定の機械にフィットするように合わせてもよい。

【0110】

バイオチップの表面およびプローブに、その後両者を付着させるために、化学反応基による誘導体を形成してもよい。例えば、バイオチップには、化学的官能基、例えば、アミノ基、カルボキシ基、オキシ基、およびチオール基を含む、アミノ基が特に好ましい、官能基による誘導体を形成してもよい。ただし、官能基はこれらに限定されない。これらの官能基を用いて、プローブは、プローブに付着させることが可能である。例えば、アミノ基を含む核酸は、アミノ基を含む表面に、例えば、従来技術で既知のリンカー、例えば、よく知られるホモ、またはヘテロ二官能基リンカーを用いて付着させることが可能である(1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155-200を参照されたい。なお、この文献を引用することにより本明細書に含める)。さらに、ある場合には、付加リンカー、例えば、アルキル基(置換およびヘテロアルキル基を含む)を使用してもよい。

10

【0111】

オリゴヌクレオチドは、従来技術で既知のやり方で合成され、固相支持体の表面に付着されてもよい。当業者には理解されるように、5'または3'末端のいずれを固相支持体に付着させてもよく、あるいは、付着は、内部のヌクレオチドを介して行われてもよい。別の実施態様では、固相支持体に対する固定は、極めて強いが、しかし非共有的であってもよい。例えば、ビオチニル化オリゴヌクレオチドを作製し、ストレプトアビジンによって共有的に被われる表面に結合させ、付着を形成することも可能である。

20

【0112】

アレイは、任意の従来技術に従って作製してよく、例えば、ポリヌクレオチドマイクロアレイ要素を事前に形成し、次に、それに表面を安定に連結させてもよい。それとは別に、従来技術で既知のように、オリゴヌクレオチドは、表面において合成されてもよい。いくつかの異なるアレイ形態、およびその製法が、当業者には知られており、WO 95/25116およびWO 95/35505(フォトリソグラフィ技術)、米国特許第5,445,934号(フォトリソグラフィによるインサイチュ合成)、米国特許第5,384,261号(機械的に導かれる流路によるインサイチュ合成)、および、米国特許第5,700,637号(滴下、プリンティング、または結合による合成)に開示される。なお、これらの開示の全体を引用することにより本明細書に含める。DNAをビーズに結合するためのもう一つの方法は、DNAの末端に付着した特異的リガンドを用い、ビーズに付着するリガンド結合性分子に連結させる。可能なリガンド結合性パートナーペアとしては、ビオチン-アビジン/ストレプトアビジン、または各種抗体/抗原ペア、例えば、ジゴキシゲニン-抗ジゴキシゲニン抗体(Smith et al., "Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA Molecules by Using Magnetic Beads," Science 258:1122-1126 (1992))が挙げられる。DNAの支持体に対する共有的化学的付着は、DNAの5'-リン酸塩を、フォスフォアミデート結合を介してコートされた微小球に連結させる標準的結合剤を用いることによって実現される。オリゴヌクレオチドの固体状態基質に対する固定法は十分に確立されている。Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(11):5022-5026 (1994)を参照されたい。オリゴヌクレオチドを固体状態基質に付着させる一つの方法が、Guo et al., Nucleic Acids Res. 22:5456-5465 (1994)に記載される。固定は、ロボットによる配置技術と組み合わせた、インサイチュDNA合成(Maskos and Southern, Nucleic Acids Research, 20:1679-1684 (1992))、または、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドの共有的

30

40

50

付着 (Guo et al., 上記) によって実現される。

【0113】

発現産物

本明細書で用いる「発現産物」という用語は、両核酸、例えば、SEMA4D遺伝子の転写および／または翻訳によって生産される、mRNA、およびポリペプチド産物を指す。

【0114】

ポリペプチドは、成熟タンパクの形として存在してもよいし、あるいは、先行部分、前駆体部分、または先行前駆体部分の切断によって活性化されて活性成熟ポリペプチドを生産する、先行性、前駆体、または先行前駆体タンパクであってもよい。このようなポリペプチドでは、先行、前駆体、または先行前駆体配列は、リーダーすなわち分泌配列であってもよいし、あるいは、成熟ポリペプチド配列の精製のために用いられる配列であってもよい。このようなポリペプチドは、「癌関連ポリペプチド」と呼ばれる。

【0115】

「癌関連ポリペプチド」という用語はまた、例えば、断片、相同体、融合体、および突然変異のような変異種を含む。相同なポリペプチドは、Smith-Waterman相同性探索アルゴリズムを用いて定量した場合、癌関連ポリペプチドと、少なくとも80%以上（すなわち、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも91、少なくとも92、少なくとも93、少なくとも94、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98、少なくとも99%）の配列同一性を持つ。なお、上記アルゴリズムは、ギャップ開放ペナルティ12およびギャップ延長ペナルティ2とし、62のBLOSUM行列式を備えたアフィンギャップ探索を用いる。このSmith-Waterman相同性探索アルゴリズムは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489に教示される。変種ポリペプチドは、天然に、または非天然的にグリコシル化される。すなわち、このポリペプチドは、対応する天然タンパクで見られるグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを持つ。

【0116】

突然変異としては、アミノ酸置換、付加、または欠失が挙げられる。アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であってもよいし、あるいは、非本質的アミノ酸を除去する置換、例えば、グリコシル化部位、リン酸化部位、アセチル化部位を変える置換、または、機能に必要なでない1個以上のシステイン残基を置換または欠失することによって折りたたみミスを最小化するための置換であってもよい。保存的アミノ酸置換は、全体的電荷、疎水性／親水性、および／または、置換されたアミノ酸の立体的形状を保存するものである。このようなタンパク変種は、タンパクの特定領域（例えば、機能的ドメイン、および／または、ポリペプチドがタンパクファミリーの一員である場合は、共通配列と関連する領域）の生物活性を保持するか、または強化するように設計されてもよい。次に、このような変種は、検出または治療法に使用してもよい。変異種を生産するためのアミノ酸変異の選択は、アミノ酸の取り扱い易さ（内部対外部）（例えば、Go et al., Int. J. Peptide Protein Res. (1980) 15:211を参照）、変異ポリペプチドの熱安定性（例えば、Querol et al., Prot. Eng. (1996) 9:265を参照）、所望のグリコシル化部位（例えば、Olsen and Thomsen, J. Gen. Microbiol. (1991) 137:579を参照）、所望のジスルフィド架橋（例えば、Clarke et al., Biochemistry (1993) 32:4322; and Wakarchuk et al., Protein Eng. (1994) 7:1379を参照）、所望の金属結合部位（例えば、Toma et al., Biochemistry (1991) 30:97, and Haezerebrouck et al., Protein Eng. (1993) 6:643を参照）、および、プロリンループにおける所望の置換（例えば、Masul et al., Appl. Env. Microbiol. (1994) 60:3579を参照）に基づいてもよい。システイン除去ムテインは、USPN 4, 959, 314に

10

20

30

40

50

開示される方法によって生産することが可能である。

【0117】

変種はまた、本明細書に開示されるポリペプチドの断片、特に、生物学的に活性な断片、および／または、機能的ドメインに対応する断片を含む。対象とする断片は、通常、長さが、少なくとも約8アミノ酸(aa)、10aa、15aa、20aa、25aa、30aa、35aa、40aaから少なくとも約45aa、通常、長さが少なくとも約50aa、少なくとも約75aa、少なくとも約100aa、少なくとも約125aa、少なくとも約150aaで、少なくとも約200aa、少なくとも約300aa、少なくとも約400aaであってもよく、長さが少なくとも500aaと同じまたはそれ以上であってもよいが、通常、長さが約1000aaを超えないものであり、その場合、その断片は、本明細書に提示されるポリヌクレオチドの内の任意の一つ、またはその相同体の配列を持つポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと同一のアミノ酸鎖を持つ。本明細書に記載されるタンパク変種は、本発明の範囲内にあるポリヌクレオチドによってコードされる。この遺伝子コードは、対応する変種を構築するための適切なコドンを選択するために使用することが可能である。

10

【0118】

SEMA4D遺伝子の発現レベルの変化は、その遺伝子およびその産物が癌に関与することを示す可能性がある。ある実施態様では、形成される複合体量の2倍増加または減少は、病気であることを示す。ある実施態様では、形成される複合体量の、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または場合によっては100倍の増加または減少は病気であることを示す。

20

【0119】

癌関連ポリペプチドは、野生型アミノ酸配列よりも短くてもよいし、長くてもよいが、その等価的コードmRNAは、野生型mRNAと類似するように修飾されてもよい。したがって、本明細書中の野生型配列の一部または断片も、癌関連ポリペプチドの定義の中に含まれる。さらに、前述したように、癌関連遺伝子は、従来技術を用い、さらに別のコード領域、したがってさらに別のタンパク配列を得るために使用することが可能である。

【0120】

ある実施態様では、癌関連ポリペプチドは、野生型配列と比べると、癌関連ポリペプチド誘導体または変異種である。すなわち、より詳細に後述するように、この癌関連ポリペプチド誘導体は、少なくとも一つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を含む。このアミノ酸置換、挿入、または欠失は、癌関連ポリペプチドの中の任意の残基に見られてもよい。

30

【0121】

癌関連ポリペプチドのアミノ酸配列変異種も含まれる。これらの変異種は、三つのクラス、置換性、挿入性、または欠失性変異種の一つ以上に属する。これらの変異種は、通常、カセットまたはPCR突然変異誘発、または、その他の従来技術で既知の技術を用いて、癌関連タンパクをコードするDNAにおいて部位特異的突然変異誘発して、該変異種をコードするDNAを生産し、次いで、前述のように、該DNAを組み替え細胞培養体において発現することによって調製される。しかしながら、最大約100-150残基を持つ、癌関連ポリペプチド断片変異種は、確立された技術によるインビトロ合成によって調製される。アミノ酸配列変異種は、該変異種の指定の性質による特徴を持つ。これによって、該変異種は、天然に見られる対立遺伝子変異種、または、癌関連ポリペプチドのアミノ酸配列の種間変異とは隔てられる。この変異種は、通常、天然の類縁体と質的に同じ生物活性を示す。ただし、より詳細に後述するように、修飾された特徴を持つ変異種を選択することも可能である。

40

【0122】

アミノ酸配列変異を導入するための部位または領域は指定されるが、変異それ自体は指定する必要はない。例えば、任意の部位における突然変異の働きを最適化するには、標的コドンまたは領域にランダム突然変異誘発を実行し、発現した癌関連ポリペプチド変異種を、所望の活性についてスクリーニングしてもよい。既知の配列を持つDNAの指定の部

50

位に置換突然変異を作製する技術はよく知られる。例えば、M13プライマー突然変異誘発およびLAR突然変異誘発がそれである。突然変異のスクリーニングは、癌関連タンパク活性のアッセイによって実行される。

【0123】

アミノ酸置換は、通常、単一残基性であるが、もちろん複数残基性であってもよい。挿入は、通常、約1から20アミノ酸の桁で行われるが、それより相当に大きな挿入も容認される。欠失は約1から約20残基の範囲を持つが、ある場合には、欠失はそれよりもはるかに大きくてもよい。

【0124】

置換、欠失、挿入、または、それらの任意の組み合わせを用い、最終的に一つの誘導体に達することも可能である。一般に、分子の変化を最小とするため、これらの変化は少数のアミノ酸に対して行われる。しかしながら、ある状況では、それよりも大きな変化も容認される。癌関連ポリペプチドの特徴について僅かな変化が望ましい場合、置換は一般に下記の表に従って行われる。

【0125】

【表1】

表1

元の残基

例示の置換

Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

置換が、表1に示したもののよりも保守的でない場合、機能または免疫学的内容において実質的变化が起こる。例えば、置換は全長で実行されると、下記の内の一つ以上が著明に影響される。すなわち、変化領域におけるポリペプチドバックボーン構造（例えば、アル

ファ螺旋またはベータシート構造) ; 標的部位における分子の荷電または疎水性 ; および、側鎖の容量である。一般に、ポリペプチドの性質にもっとも大きな変化をもたらすと予想される置換は、(a) 親水性残基、例えば、セリルまたはトレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、またはアラニルによって置換される ; (b) システインまたはプロリンが、任意の他の残基によって置換される ; (c) 陽性電荷側鎖、例えば、リシル、アルギニル、またはヒスチジルが、陰性電荷残基、例えば、グルタミル、またはアスパルチルによって置換される ; または (d) 容量大な側鎖を持つ残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を持たないもの、例えば、グリシンによって置換される場合である。

【0126】

10

変異種は、通常、天然の類縁体と質的に同じ生物活性を発揮し、同じ免疫反応を起こす。ただし、変異種はまた、修飾された特徴を持つ場合がある。

【0127】

癌関連ポリペプチド自体が発現されて、検出および治療法に使用されてもよい。該ポリペプチドはさらに、上記方法における使用を助けるために修飾されてもよい。

【0128】

癌関連ポリペプチドの共有的修飾を、例えば、スクリーニングにおいて利用してもよい。一つのタイプの共有的修飾は、癌関連ポリペプチドの、選ばれた側鎖、またはNまたはC-末端残基と反応することが可能な有機的誘導体形成剤と、癌関連ポリペプチドの標的アミノ酸残基を反応させることを含む。二官能基架橋剤による誘導体形成は、より詳細に後述するように、抗癌関連抗体の精製法、またはスクリーニングアッセイに使用される水溶性支持基質または表面に、例えば、癌関連ポリペプチドを架橋するのに有用である。一般的に用いられる架橋剤としては、例えば、1, 1-ビス(ジアザアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシニミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能基イミドエステル、例えば、ジスクシニミルエステル、例えば、3, 3'-ジチオビス(スクシニミジルプロピオネート)、二官能基マレイミド、例えば、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン、および、メチル-3-[(p-アジドフェニル) ジチオ] プロピオイミデートのような薬剤が挙げられる。

20

【0129】

他の修飾としては、グルタミルおよびアスパラギン残基の脱アミド化により、それぞれ、対応するグルタミルおよびアスパルチルの生成、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリル、トレオニル、またはチロシル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、N-末端アミンのアセチル化、および任意のC-末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

30

【0130】

本発明の範囲内に含まれるSEMA4Dポリペプチドのもう一つのタイプの共有的修飾は、ポリペプチドの元々のグリコシル化パターンを変えることを含む。「元々のグリコシル化パターンを変える」とは、本発明の目的のためには、元の配列の癌関連ポリペプチドに見られる1種以上の炭水化物成分を欠失すること、および/または、元の配列の癌関連ポリペプチドに見られない1箇所以上のグリコシル化部位を付加することを意味することが意図される。

40

【0131】

癌関連ポリペプチドに対するグリコシル化部位の付加は、そのアミノ酸配列を変えることによって実現される。変更は、例えば、元の配列の癌関連ポリペプチドに対し、1個以上のセリンまたはトレオニン残基を付加することによって、または、1個以上のセリンまたはトレオニン残基を(O-結合グリコシル化部位)と置換することによって実行してもよい。癌関連アミノ酸配列は、任意に、DNAレベルにおける変化を通じて、特に、その

50

癌関連ポリペプチドをコードするDNAをあらかじめ選ばれた塩基において突然変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生成されるように変えてもよい。

【0132】

癌関連ポリペプチドにおける炭水化物成分の数を増すもう一つの手段は、該ポリペプチドに対しグリコシドを化学的または酵素的に結合させることである。このような方法は、従来技術、例えば、1987年9月11日発行のWO87/05330、およびAppl. in and Wriston, LA Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載される。

【0133】

癌関連ポリペプチドにおける炭水化物成分の除去は、化学的または酵素的に、あるいは、グリコシル化の標的となるアミノ酸残基をコードするコドンを突然変異的に置換することによって実現してもよい。化学的脱グリコシル化技術は、従来技術で既知であり、例えば、Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)、およびEdge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981)に記載される。ポリペプチドにおける炭水化物成分の酵素的切断は、Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987)によって記載する各種のエンドおよびエキソグリコシダーゼを用いることによって実現することが可能である。

【0134】

癌関連ポリペプチドの、もう一つのタイプの共有的修飾は、各種非タンパクポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンの内の一つに対し、癌関連ポリペプチドを、米国特許第4,640,835;4,469,689;4,301,144;4,670,417;4,719,192;または4,179,337号に記載するように、連結することを含む。

【0135】

癌関連ポリペプチドはまた、キメラ分子を形成するようにして修飾してもよい。キメラ分子の形成は、別の、異種のポリペプチドまたはアミノ酸配列に対し癌関連ポリペプチドを融合させることを含む。ある実施態様では、このようなキメラ分子は、癌関連ポリペプチドと、抗タグ抗体が選択的に結合が可能なエピトープを提示するタグポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般に、癌関連ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に置かれるが、ある場合には内部的融合も容認される。このようなエピトープタグ型癌関連ポリペプチドは、そのタグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することが可能である。さらに、エピトープタグを付加することによって、癌関連ポリペプチドが、抗タグ抗体、または、エピトープタグに結合する別のタイプのアフィニティー基質を用いるアフィニティー精製によって簡単に精製されるようになる。別の実施態様では、キメラ分子は、癌関連ポリペプチドと、免疫グロブリン、または、免疫グロブリンの特定領域との融合を含んでもよい。キメラ分子の二価形態にとっては、そのような融合が、IgG分子のFc領域と形成することが可能である。

【0136】

様々のタグポリペプチドおよびそれらそれぞれの抗体が、従来技術でよく知られる。例として、ポリ-ヒスチジン (poly-his)、またはポリ-ヒスチジン-グリシン (poly-his-gly) タグ; flu HA タグポリペプチドおよびその抗体 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol., 3:2159-2165 (1988)); c-myc タグおよび、それに対する 8F9、3C7、6E10、G4、B7、および 9E10 抗体 (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)); および Herpes Simplex ウィルス糖タンパク D (gD) タグ、および、その抗体 (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)) が挙げられる。その他のタグポリペプチドとしては、フラグ-ペプチド (Hopp et al., BioTechnology, 6:120

10

20

30

40

50

4-1210 (1988)) ; K T 3 エピトープペプチド (M a r t i n e t a l . , S c i e n c e , 255 : 192-194 (1992)) ; チューブリンエピトープペプチド (S k i n n e r e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 266 : 15163-15166 (1991)) ; および、T 7 遺伝子 10 タンパクペプチドタグ (L u t z - F r e y e r m u t h e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 87 : 6393-6397 (1990)) が挙げられる。

【0137】

それとは別に、癌関連タンパクファミリーの他の癌関連タンパク、および他の生物から得られた癌関連タンパクを、後述のようにクローンし、発現させてもよい。したがって、ヒト、または他の生物から他の癌関連タンパクを見つけるために、プローブ、または変性ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) のプライマー配列を用いてもよい。当業者には理解されるように、特に有用なプローブおよび／または P C R プライマー配列として、癌関連核酸配列の一意区域が挙げられる。従来技術において一般に知られるように、P C R プライマーは、長さが、約 15 から約 35、または約 20 から約 30 ヌクレオチド長であり、必要に応じてイノシンを含む。P C R 反応の条件は従来技術でよく知られる。

【0138】

さらに、後述するように、付加配列の解明、エピトープまたは精製タグの付加、他の融合配列の付加等によって、S E M A 4 D によってコードされるものよりも長い癌関連タンパクを作製することが可能である。

【0139】

癌関連タンパクはまた、癌関連核酸によってコードされるものとして特定されてもよい。したがって、癌関連タンパクは、本明細書に述べるように、上に挙げた S E M A 4 D 遺伝子にハイブリダイズする核酸、またはその相補体によってコードされる。

【0140】

癌関連ポリペプチドの発現

S E M A 4 D から得られる核酸を用いて、癌関連タンパクを発現する様々の発現ベクターを作製することが可能であり、次に、このタンパクは、前述のようにスクリーニングアッセイに用いられる。発現ベクターは、自己複製能力を持つ染色体外ベクターであってもよいし、または、宿主のゲノムに組み込まれるベクターであってもよい。一般に、これらの発現ベクターは、癌関連タンパクをコードする核酸に連結する、転写および翻訳調節核酸を含む。「調節配列」という用語は、ある特定の宿主生物中の、動作可能に連結したコード配列の発現に必要な D N A 配列を指す。前核細胞にとって好適な調節配列としては、例えば、プロモーター、任意にオペレータ配列、およびリボソーム結合部位が挙げられる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化信号、およびエンハンサーを利用することが知られる。

【0141】

核酸は、別の核酸配列に対して機能的関係に置かれた場合に、「動作可能に連結」される。例えば、先行配列または分泌リーダーの D N A は、それが、ポリペプチドの分泌に参加する先行タンパクとして発現される場合、ポリペプチドの D N A と動作可能に連結される。プロモーターまたはエンハンサーは、それが、コード配列の転写に影響を及ぼす場合に、該コード配列と動作可能に連結され；リボソーム結合部位は、転写を促進するように配置された場合に、コード配列と動作可能に連結される。一般に、「動作可能に連結」するとは、連結された D N A 配列同士が連続しており、分泌リーダーの場合には、連続で、読み枠の中にある。しかしながら、エンハンサーは連続的である必要はない。連結は、都合のよい制限部位に対するライゲーションによって実現される。もしもそのような部位が存在しない場合には、従来の実技に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。転写および翻訳調節核酸は、一般に、癌関連タンパクの発現に使用される宿主細胞にとって適正である。例えば、B a c i l l u s から得られた転写および翻訳調節核酸は、B a c i l l u s における癌関連タンパクの発現に用いることが好ましい。様々な宿主細胞に対し、数多くの、適切なタイプの発現ベクター、および

調節配列が従来技術で知られる。

【0142】

一般に、転写および翻訳調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および終止配列、翻訳開始および終止配列、およびエンハンサーまたはアクチベーター配列を含んでよいが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、調節配列は、プロモーター、および転写開始および終止配列を含む。

【0143】

プロモーター配列は、構成的プロモーター、誘発可能プロモーターのいずれであってもよい。プロモーターは、天然のプロモーター、ハイブリッドプロモーターのいずれであってもよい。1種を超えるプロモーター要素を組み合わせたハイブリッドプロモーターも従来技術で既知であり、本発明において有用である。

【0144】

さらに、発現ベクターは、添加要素を含んでもよい。例えば、発現ベクターは、二つの複製システムを持ってもよい。そうすることによって、該ベクターを、2種類の生物において維持することが、例えば、発現のために哺乳動物または昆虫細胞において、そして、クローニングと増幅のために前核細胞宿主において維持することが可能になる。例えば、発現ベクターを組み込むために、発現ベクターは、宿主細胞ゲノムに対して相同な少なくとも一つの配列、好ましくは、発現構築体を挟持する二つの相同配列を含む。組み込みベクターは、ベクターに含められる適切な相同配列を選択することによって、宿主細胞の特異的座位に向けられる。組み込みベクターの構築体は従来技術でよく知られる。

【0145】

ある実施態様では、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能とする、選択可能なマーカー遺伝子を含む。抗生物質耐性遺伝子を含む選択遺伝子は、従来技術でよく知られており、使用される宿主細胞に応じて変動する。

【0146】

SEMA4Dタンパクは、癌関連タンパクをコードする核酸を含む発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を、癌関連タンパクの発現を誘発し、生起させるのに適切な条件下で培養することによって生産される。癌関連タンパク発現にとって適切な条件は、発現ベクターおよび宿主細胞の選択によって変動するが、当業者であれば、通例の実験を通じて簡単に確かめられる。例えば、発現ベクターにおける構成的プロモーターの使用は宿主細胞の成長および増殖を最適にするが、一方、誘発性プロモーターの使用は、誘発のための適切な増殖条件を必要とする。さらに、ある実施態様では、収穫のタイミングが重要である。例えば、昆虫細胞発現において使用されるバキュロウィルスシステムは、細胞融解性ウィルスであるので、生産収率にとって収穫時期の選択が決定的に重要である。

【0147】

適切な宿主細胞としては、酵母、細菌、古細菌、真菌、および昆虫、植物細胞および、哺乳類細胞を含む動物細胞が挙げられる。特に興味あるのは、*Drosophila melanogaster*細胞、*Saccharomyces cerevisiae*、およびその他の酵母、*E. coli*、*Bacillus subtilis*、Sf9細胞、C129細胞、293細胞、*Neurospora*、BHK、CHO、COS、HeLa細胞、THP1細胞系統（マクロファージ細胞系統）、およびヒト細胞および細胞系統である。

【0148】

ある実施態様では、SEMA4Dタンパクは、哺乳動物細胞において発現される。哺乳類発現システムも従来技術で既知であるが、レトロウィルスシステムを含む。好ましい発現ベクターシステムは、WO97/27212（PCT/US97/01019）、およびWO97/27213（PCT/US97/01048）に一般的に記載されるレトロウィルスベクターシステムである。この両方を、引用することにより本明細書に含めることを明言する。哺乳類プロモーターとして特に有用なのは、哺乳類ウィルス遺伝子から得られるプロモーターである。なぜなら、このウィルス遺伝子は高度に発現されることが多

く、広く各種宿主に適用されるからである。例としては、SV40 初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウィルスLTRプロモーター、アデノウィルス大型後期プロモーター、herpes simplexウィルスプロモーター、およびCMVプロモーターが挙げられる。通常、哺乳類細胞によって認識される転写終止およびポリアダニル化配列は、翻訳終止コドンの3'側に位置する調節領域であり、したがって、プロモーター要素と共に、コード配列に隣接する。転写ターミネータおよびポリアダニル化信号の例は、SV40から得られるものを含む。

【0149】

哺乳動物宿主を始め、他の宿主の中に外来核酸を導入するための方法は、従来技術においてよく知られているが、用いられる宿主に応じて変動する。技術としては、デキストラ 10
ン介在トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン介在性トランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔、ウィルス感染、リボソームにおけるポリヌクレオチドの封入、および、DNAの核への直接マイクロインジェクションが挙げられる。

【0150】

ある実施態様では、癌関連タンパクは細菌システムにおいて発現される。細菌発現システムは従来技術でよく知られる。バクテリオファージから得られたプロモーターを使用してもよく、これは従来技術で既知である。さらに、合成プロモーターおよびハイブリッドプロモーターも有用である。例えば、tacプロモーターは、trpおよびlacプロモーター配列のハイブリッドである。さらに、細菌プロモーターは、細菌のRNAポリメラーゼに結合し、転写を起動することが可能な非細菌起源の天然プロモーターを含むことが 20
可能である。機能的プロモーター配列の外に、効率的なリボソーム結合部位が望ましい。発現ベクターはまた、細菌における癌関連タンパクの分泌を実現するシグナルペプチド配列を含んでもよい。このタンパクは、培養媒体の中に分泌されるか（グラム陽性細菌）、または、細胞の内膜と外膜の間に配される原形質周辺空間に分泌される（グラム陰性菌）。細菌発現ベクターはまた、形質転換された細菌株の選択を可能とする選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよい。好適な選択遺伝子としては、細菌を薬剤、例えば、アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、およびテトラマイシンに対して耐性を持たせる遺伝子を含む。選択可能なマーカーはまた、生合成 30
遺伝子、例えば、ヒスチジン、トリプトファン、およびロイシンの生合成経路にある遺伝子を含む。これらの成分は集められて、発現ベクターに挿入される。細菌用発現ベクターは従来技術においてよく知られているが、中でも、Bacillus subtilis、E. coli、Streptococcus cremoris、およびStreptococcus lividansのためのベクターが挙げられる。細菌発現ベクターは、従来技術においてよく知られる技術、例えば、塩化カルシウム処理、電気穿孔等を用いて、細菌の中に変形導入される。

【0151】

癌関連タンパクは、昆虫細胞において生産されてもよい。昆虫細胞形質転換用発現ベクター、特に、バキュロウィルス系発現ベクターは従来技術においてよく知られる。

【0152】

ある実施態様では、癌関連タンパクは、酵母細胞において生産されてもよい。酵母発現システムは、従来技術でよく知られており、Saccharomyces cerevisiae、Candida albicansおよびC. maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilisおよびK. lactis、Pichia guillierimondiiおよびP. pastoris、Schizosaccharomyces pombe、およびYarrowia lipolytica用の発現ベクターが挙げられる。 40

【0153】

SEMA4Dタンパクはまた、従来技術でよく知られる技術を用いて融合タンパクとして作製されてもよい。したがって、例えば、モノクローナル抗体作製の際。所望のエピトープが小さければ、免疫原を形成するために、癌関連タンパクを担体タンパクに融合させ 50

てもよい。それとは別に、癌関連タンパクは、発現を増すために、またはその他の理由で、融合タンパクとして作製してもよい。例えば、癌関連タンパクが癌関連ペプチドである場合、発現目的のために、該ペプチドをコードする核酸を、他の核酸に連結してもよい。

【0154】

癌

ある実施態様では、本発明の方法によって検出、診断、または治療される癌は、乳癌（乳房の腺癌：葉および管部分）、結腸癌、卵巣癌（卵巣腺癌：漿膜、乳頭漿膜、内膜、および明細胞）、すい臓癌（すい臓の腺癌：管部分）、前立腺癌、リンパ系癌（急性T細胞白血病、急性リンパ芽球白血病）、および腎臓癌（腎臓細胞腺癌）が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

【0155】

抗体

ある実施態様では、本発明は、SEMA4Dポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いる。「特異的に結合する」という用語は、抗体が、他の関連ポリペプチドに対して持つ親和度よりも、SEMA4Dポリペプチドに対して実質的により大きな親和度を持つことを意味する。本明細書で用いる「抗体」という用語は、未処理の分子、および、問題の抗原決定基に結合することが可能な、その断片、例えば、Fab、F(ab')₂、およびFvを指す。「実質的により大きな親和度」とは、他の関連ポリペプチドに対する親和度と比べると、本発明の標的癌関連ポリペプチドに対する親和度において測定可能な増加があることを意味する。ある実施態様では、親和度は、標的癌関連ポリペプチドに対し少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、10³倍、10⁴倍、10⁵倍、10⁶倍以上である。

【0156】

ある実施態様では、抗体は、10⁻⁴M以下、10⁻⁷M以下、10⁻⁹M以下の解離定数を持つ、高い親和度の下に、または、ナノモル以下の親和度（0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1nM、またはそれ以下）で結合する。抗体は、プロテアーゼドメインに対して特異的に結合してもよい。

【0157】

例えば、免疫療法のために抗体を生成するためにSEMA4Dポリペプチドを用いなければならない場合、ある実施態様では、癌関連ポリペプチドは、全長タンパクと、少なくとも一つのエピトープまたは決定基を共有する。本明細書で言う「エピトープ」または「決定基」とは、抗体、またはMHCとの関連においてT細胞受容体を生成、および／または、に結合するタンパクの一部を意味する。したがって、ある場合、より小さい癌関連ポリペプチドに対して作製された抗体も、全長タンパクに対して結合することが可能である。ある実施態様では、エピトープは一意である。すなわち、一意のエピトープに対して生成される抗体同士は、ほとんど、または全く交差反応性を示さない。

【0158】

SEMA4Dによってコードされるポリペプチド配列は、該ポリペプチドのいくつかの好ましい領域を決めるために分析されてもよい。高い抗原性の領域は、DNASTAR分析によって得られるデータから決定される。決定は、免疫反応起動過程において抗原認識が行われる環境において、ポリペプチドの表面に露出される可能性の高いポリペプチドの領域を表す値が選ぶことによって行われる。例えば、癌関連遺伝子配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を、DNASTARコンピュータアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて分析してもよい（DNASTAR, Inc., マジソン、ウィスコンシン州、ワールドワイドウェブdnastar.comを参照されたい）。

【0159】

ある実施態様では、本発明の抗体は、SEMA4Dの非保存領域に対して特異的である。「非保存的領域」とは、セマフォリンファミリーの他のメンバーとの平均相同性がより低い領域を指す。ある実施態様では、これらの非保存領域における他のセマフォリンファミリーメンバーとの類似性は、50%よりも低い。

【0160】

ある実施態様では、本発明の抗体は、SEMA4Dポリペプチドのオルソログ、ホモログ、パラログまたはその変異種、またはそれらの組み合わせおよび、サブメンバーの組み合わせに結合する。ある実施態様では、本発明の抗体は、SEMA4Dポリペプチドのオルソログに結合する。ある実施態様では、本発明の抗体は、SEMA4Dポリペプチドのホモログに結合する。ある実施態様では、本発明の抗体は、SEMA4Dポリペプチドのパラログに結合する。ある実施態様では、本発明の抗体は、SEMA4Dポリペプチドの変異種に結合する。ある実施態様では、本発明の抗体は、SEMA4Dポリペプチドのオルソログ、ホモログ、パラログまたはその変異種、またはそれらの組み合わせおよび、サブメンバーの組み合わせに結合しない。

10

【0161】

DNA STARコンピュータアルゴリズムによって通常得られるポリペプチドの特徴としては、Garnier-Robsonアルファ領域、ベータ領域、転回領域、およびコイル領域 (Garnier et al. J. Mol. Biol., 120:97 (1978)) ; Chou-Fasmanアルファ領域、ベータ領域、および転回領域 (Adv. in Enzymol., 47:45-148 (1978)) ; Kyte-Doolittle親水性領域および疎水性領域 (J. Mol. Biol., 157:105-132 (1982)) ; Eisenbergアルファおよびベータ両性領域 ; Kaplun-Schulz屈曲性領域 ; Emini表面形成領域 (J. Virol., 55 (3) : 836-839 (1985)) ; および Jameson-Wolf高い抗原性を持つ領域 (CABIOS, 4 (1) : 181-186 (1988)) が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。Kyte-Doolittleの親水性領域および疎水性領域、Emminiの表面形成領域、および、Jameson-Wolfの高い抗原指数を持つ領域 (Jameson-Wolfプログラムのデフォルトパラメータを用いて特定される、1.5以上の抗原指数を持つ、4個以上の連続アミノ酸を含む領域) が、高度の抗原性の可能性を示すポリペプチド領域を決定するのに通常使用される。タンパクに対する抗体を調製するための一つの方法は、該タンパクの全てまたは一部のアミノ酸配列を選択および調製し、その配列を化学的に合成し、それを適切な動物、通常はウサギ、ハムスター、またはマウスに注入することである。癌関連タンパクに対する抗体生産のための候補として、親水性領域にあり、したがって、成熟タンパクの中に露出する可能性の高いオリゴペプチドを選択することが可能である。さらにそれ以外のオリゴペプチドも、例えば、抗原指数、Wellington, G. W. et al., FEBS Lett. 188:215-218 (1985) を用いて決めることが可能である。

なお、この文献を引用することにより本明細書に含める。

20

30

【0162】

本明細書で用いる「抗体」という用語は、従来技術で知られる抗体断片、例えば、Fab、Fab2、1本鎖抗体 (例えば、Fv)、キメラ抗体等を、全体抗体の修飾によって生産されたものであれ、組み換えDNA技術を用いて新規に合成したものであれ含む。

【0163】

本発明はまた、標的タンパクに対して特異的なSMIP、または結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパクである抗体を提供する。これらの構築体は、抗体エフェクター機能を実行するのに必要な免疫グロブリンドメインに融合した抗原結合ドメインを含む、1本鎖ポリペプチドである。例えば、WO03/041600、米国特許出願公開第20030133939号、および米国特許出願公開第20030118592号を参照されたい。

40

【0164】

ポリクローナル抗体を調製する方法は、熟練した当業者には既知である。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫化剤、および要すればアジュバントを1回以上注入することによって哺乳動物の中に誘発することが可能である。通常、免疫化剤および/またはアジュバントは、複数回皮下または腹腔内に注入することによって哺乳動物に注入される。免疫化

50

剤は、図の核酸によってコードされるタンパク、またはその断片、またはその融合タンパクを含んでもよい。免疫化される哺乳動物において免疫原性であることが知られるタンパクに免疫化剤を接合することは有用である場合がある。このような免疫原性タンパクの例として、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、および大豆トリプシン阻害剤が挙げられる。使用してもよいアジュバントの例として、フロインドの完全アジュバント、およびMPL-TDMアジュバント（モノフォスフォリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート）が挙げられる。免疫化プロトコールは、当業者によって面倒な実験をせずとも選択されよう。

【0165】

ある実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975) の記載するものと同様のハイブリドーマ法によって調製される。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が、通常、免疫化剤によって免疫化されて、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生産する、または生産することが可能なリンパ球を誘起する。それとは別に、リンパ球をインビトロで免疫化してもよい。免疫化剤は、通常、癌関連ポリペプチド、またはその断片、またはその融合タンパクを含む。一般に、ヒト起源の細胞が望ましい場合は、抹消血リンパ球（“PBL”）が、非ヒト哺乳動物起源が望ましい場合は、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。次に、このリンパ球は、適当な融合剤、例えば、ポリエチレングリコールを用いて、恒久細胞系統に融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103）。恒久細胞系統は、通常、形質転換された哺乳類細胞、特に、げっ歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髄細胞である。通常、ラットまたはマウスの骨髄細胞系統が用いられる。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合していない恒久細胞の増殖または生存を抑制する1種以上の物質を含む適切な培養媒体の中で培養される。例えば、もしも親細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRRT）を欠くと、ハイブリドーマ用の培養媒体は、通常、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（「HAT培地」）を含み、これは、HGPRT-欠損細胞の増殖を阻止する。

【0166】

モノクローナル抗体技術は、研究、診断、および治療の実施に用いられる。モノクローナル抗体は、インビトロ診断のためにラジオイムノアッセイ、固相酵素免疫測定法、免疫細胞病理学、およびフローサイトメトリーにおいて、および、インビボでは、ヒトの疾患の診断および免疫療法のために使用されている。Waldmann, T. A. (1991) Science 252:1657-1662。特に、モノクローナル抗体は、正常組織は避けながら、悪性病巣を標的とするのが望ましい場合の癌の診断および治療に広く応用されている。例えば、Frankel等に交付された米国特許第4,753,894号；Ring等に交付された第4,938,948号；および、Bjorn等に交付された第4,956,453号を参照されたい。

【0167】

SEMA4Dに対するモノクローナル抗体は、乳房、結腸、リンパ系、卵巣、すい臓、前立腺、および腎臓の癌の診断法において、単独で、または、他の癌関連マーカーの検出法と組み合わせて使用される。

【0168】

抗体は、二重特異的抗体であってもよい。ある実施態様では、その結合特異性の内の一方は、癌関連ポリペプチド、またはその断片に対して特異的であり、他方は、他の任意の抗原、好ましくは、細胞表面タンパク、または受容体、または受容体サブユニット、好ましくは腫瘍特異的な細胞表面タンパクに対して特異的である。ある実施態様では、結合特異性の一方は、SEMA4D、SEMA4Dのプロテアーゼドメインに対してである。

【0169】

ある実施態様では、癌関連ポリペプチドに対する抗体は、後述するように、癌関連ポリペプチドの生物機能を抑える、または除去することが可能である。すなわち、抗癌関連ポリペプチド抗体（ポリクローナルか、または好ましくはモノクローナル）の、癌関連ポリペプチド（または、癌関連ポリペプチドを含む細胞）に対する添加は、癌関連ポリペプチド活性を抑えるか、除去することがある。ある実施態様では、本発明の抗体は、活性において少なくとも25%、少なくとも約50%、または少なくとも約95-100%の低下をもたらす。

【0170】

ある実施態様では、SEMA4Dポリペプチドに対する抗体は、ヒト化抗体である。「ヒト化」抗体は、実質的に非ヒト動物種の免疫グロブリンから得られた抗原結合部位、および、ヒト免疫グロブリンの構造および／または配列に基づく分子の、残余の免疫グロブリン構造を有する分子を指す。抗原結合部位は、定常ドメインに融合された完全な可変ドメインを含んでもよいし、あるいは、可変ドメインの適切なフレームワーク領域に移植した相補性決定領域(CDR)のみを含んでもよい。抗原結合部位は、野生型であってもよいし、あるいは、修飾されたもの、例えば、ヒトの免疫グロブリンにもっと緊密に似るように修飾されたものであってもよい。それとは別に、ヒト化抗体は、親の、非ヒト抗体の抗原結合性を保持するか、実質的に保持するが、ヒトに投与した場合、親の抗体と比べて、免疫原性の低下を示すキメラ抗体から得られてもよい。本明細書で用いる「キメラ抗体」という用語は、通常は、異なる動物種から由来する二つの異なる抗体から得られた配列を含む抗体を指す（例えば、米国特許第4,816,567号を参照）。通常、これらのキメラ抗体では、軽鎖および重鎖の可変域は、1種の哺乳類から得られた抗体の可変域を模倣し、一方、定常部分は、別の種から得られた抗体の配列と相同である。もっとも典型的には、キメラ抗体は、ヒトおよびマウスの抗体断片を、一般に、ヒトの定常領域とマウスの可変領域を含む。ヒト化抗体は、ヒト抗体（アクセプター抗体）の相補性決定領域(CDR)を、非ヒト抗体（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、またはウサギの抗体で、所望の特異性、アフィニティー、および能力を持つ抗体によって置換することによって得られる。ある実施態様では、ヒトの「アクセプター」抗体のFvフレームワーク残基は、ドナー抗体の、対応する、非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、輸入CDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、可変領域の実質的に全て、または少なくとも一つ、通常は二つを含み、CDR領域の全て、または実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、フレームワーク残基(FR)領域の全て、または実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンの共通配列である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常域(Fc)の少なくとも一部は、通常、ヒト免疫グロブリンのものを含む(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992))。このようなキメラ形のはっきりとした利点は、例えば、非ヒト宿主生物の、簡単に入手できるハイブリドーマまたはB細胞を用いて得られる可変領域を、例えば、ヒト細胞調製物から得られた定常域と組み合わせて、好適に既知のソースから得ることができることである。可変領域は調製が簡単であるという利点を持ち、かつ、その特異性はそのソースによって影響されない一方、定常域がヒトであれば、抗体を注入した場合、非ヒトソースから得られた定常域を注入した場合に得られるであろうと思われるよりも、ヒト被験者において免疫反応を惹起する可能性は低い。しかしながら、この定義は、この特定の例にのみ限定されない。

【0171】

ヒト化抗体は、親マウスのモノクローナル抗体よりも、ヒトにおいて免疫原性が低いのであるから、この抗体は、はるかに低いアナフィラキシー危険度の下にヒトの治療のために使用することが可能である。したがって、この抗体は、ヒトに対するインビボ投与を含む治療用途、例えば、新生物疾患の治療における放射線増感剤としての使用、または、例

10

20

30

40

50

えば、癌治療の副作用を抑える方法における使用において好まれる。非ヒト抗体をヒト化する方法は、従来技術でよく知られる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトソースから、1個以上の、非ヒトアミノ酸残基をその中に導入させる。これら非ヒトアミノ酸残基はよく輸入残基と呼ばれる。通常、これは、輸入可変ドメインから取られる。ヒト化は、事実上、Winterと共同研究者の方法に従って、げっ歯類のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列によって置換することによって行われる (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988))。したがって、このようなヒト化抗体は、未加工のヒト可変領域よりも実質的に少ない部分が、非ヒト動物種の対応配列によって置換されるキメラ抗体である (米国特許第4,816,567号)。実際、ヒト化抗体は、あるCDR残基と、恐らくあるFR残基が、げっ歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されるヒト抗体である。

【0172】

非ヒト免疫グロブリン由来の抗原結合部位を含む、いくつかの「ヒト化」抗体分子が記載されている。すなわち、ヒトの定常ドメインにげっ歯類V領域とその関連CDRを融合させたキメラ抗体 (Winter et al. (1991) Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224; Shaw et al. (1987) J Immunol. 138:4534-4538; and Brown et al. (1987) Cancer Res. 47:3577-3583); 適当なヒト抗体定常ドメインとの融合前に、ヒトの支持性FRに移植したげっ歯類CDR (Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536; and Jones et al. (1986) Nature 321:522-525); および、組み換え的に重層させたげっ歯類FRによって支持されるげっ歯類CDR (1992年12月23日公開の欧州特許出願公開第519,596号) が挙げられる。

【0173】

ヒト抗体は、従来技術で既知の各種技術、例えば、ファージディスプレイライブラリ [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)] を含む技術を用いて生産される。Cole等およびBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991))。ヒト化抗体は、各種の方法、例えば、(1) ヒトのフレームワークおよび定常領域に非ヒト相補性決定領域 (CDR) を移植すること (従来技術で「ヒト化」と呼ばれる過程)、または、それとは別に、(2) 非ヒト可変ドメイン全体を移植し、表面残基を置換することによって、表面をヒト様表面で「覆う」ことである (従来技術で「重層化」と呼ばれる過程) によって実現される。本発明では、ヒト化抗体は、「ヒト化」抗体と「重層化」抗体の両方を含む。同様に、ヒト抗体は、ヒトの免疫グロブリン座位を、トランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子を部分的に、または完全に不活性化したマウスに導入することによって作製される。チャレンジされると、ヒト抗体生産が観察されるが、それは、遺伝子再編成、集合、および抗体レパートリを含めた全ての点で、ヒトで見られる抗体生産にきわめて近似する。この方法は、例えば、米国特許第5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016号、および、下記の科学的出版物に記載される。すなわち、Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Longberg et al., Nature 368 856-859 (1994);

Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995); Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81: 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28: 489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31 (3): 169-217 (1994); and Kettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4 (7): 773-83 (1991)である。これらのそれぞれを引用することにより本明細書に含める。本発明の抗体はまた、米国特許第5, 766, 886号に論じられるヒトの加工技術によっても生産される。なお、この特許を引用することにより本明細書に含める。

【0174】

「相補性決定領域」という用語は、天然の免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和度および特異性を定めるアミノ酸配列を指す。例えば、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242 (1991)を参照されたい。「定常域」という用語は、抗体分子の、エフェクター機能を与える部分を指す。本発明では、マウス定常域は、ヒトの定常域によって置換される。重鎖定常域が、五つの異性形、すなわち、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、またはミューの内の任意のものから選ばれる。抗体をヒト化する一つの方法は、非ヒト重鎖および軽鎖配列を、ヒトの重鎖および軽鎖配列に揃えること、その整列に基づいて非ヒトフレームワークおよびヒトフレームワークを選択し前者を後者で置換すること、分子モデルを造りヒト化配列の立体配置を予測すること、および、親抗体の立体配置と比較することを含む。この過程に次いで、CDRの構造を妨げるCDR領域残基の復帰突然変異を行い、これを、最終的に、ヒト化配列モデルの予測立体配置が、親非ヒト抗体の非ヒトCDRの立体配置に緊密に近似するまで繰り返す。このようなヒト化抗体について、例えば、Ashwell受容体を介する捕捉および排除をやり易くするようさらに誘導体形成を行う。例えば、米国特許第5, 530, 101および5, 585, 089号を参照されたい。これらの特許を引用することにより本明細書に含める。

【0175】

癌関連ポリペプチドに対するヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン座位を含むように加工されたトランスジェニック動物を用いて生産することが可能である。例えば、WO98/24893は、ヒトIg座位を有するトランスジェニック動物を開示する。この動物は、内因性の重鎖および軽鎖座位が不活性化されたために機能的内因性免疫グロブリンを生産することができない。WO91/10741はまた、免疫原に対して免疫反応を呈する非霊長類哺乳動物トランスジェニック宿主を開示する。この動物では、抗体は、霊長類定常および/または可変領域を持ち、内因性免疫グロブリンコード座位は置換されるか、不活性化される。WO96/30498は、哺乳動物において免疫グロブリン座位を修飾し、定常または可変領域の全てまたは一部を置換して、修飾抗体分子を形成するための、Cre/Loxシステムの使用を開示する。WO94/02602は、不活性化された内因性Ig座位、および機能的ヒトIg座位を有する非ヒト哺乳動物宿主を開示する。米国特許第5, 939, 598号は、トランスジェニックマウスの作製法を開示する。このマウスは、内因性重鎖を欠如し、1種以上の異種性定常域を含む、外来性免疫グロブリン座位を発現する。

【0176】

前述のトランスジェニック動物を用い、選ばれた抗原分子に対して免疫反応を引き起こすことが可能であり、抗体生産細胞が動物から取り出され、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを生産するために使用される。免疫化プロトコール、アジュバント等は従来技術で既知であり、例えば、WO 96/33735に記載されるようにして、トランスジェニックマウスの免疫化に使用される。モノクローナル抗体は、対応するタンパクの生物活性または生理作用を抑制または中和する能力に関して試験することが可能である。

【0177】

ある実施態様では、前述のSEMA4Dポリペプチド、およびその変異種を用いて、前述のトランスジェニック動物を免疫化してもよい。従来技術で既知の方法を用いてモノクローナル抗体が作製され、抗体の特異性が、単離された癌関連ポリペプチドを用いて試験される。ヒトまたは霊長類の癌関連ペプチド、またはそのエピトープを調製する方法としては、化学的合成、組み換えDNA技術、または生物サンプルからの単離が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ペプチドの化学的合成は、例えば、固相ペプチド合成のための古典的Merrifield法(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963. この文献を引用により含める)、高速自動化複数ペプチド合成システムにおけるFMOC戦略(E. I. du Pont de Nemours Company, Wilmington, DE) (Caprino and Han, J. Org. Chem. 37:3404, 1972. この文献を引用により含める)によって実行することが可能である。

【0178】

ポリクローナル抗体は、抗原を注入し、次いで、適当な間隔でブーストを追加することによってウサギまたはその他の動物を免疫化することによって調製される。それに代わる動物として、マウス、ラット、ニワトリ、モルモット、ヒツジ、ウマ、サル、ラクダ、およびサメが挙げられる。動物は放血し、血清は、精製された癌関連タンパクに対し、通常、ELISAによって、あるいは、癌関連タンパクの活動を阻止する能力に基くバイオアッセイによって定量する。鳥類、例えば、ニワトリ、七面鳥等を用いる場合には、抗体は、卵黄から単離することが可能である。モノクローナル抗体は、MilsteinおよびKohlerの方法にならって、免疫化マウスから得られた脾臓細胞を、連続的に複製する腫瘍細胞、例えば、骨髓細胞またはリンパ腫細胞と融合することによって調製することが可能である(Milstein and Kohler, Nature 256:495-497, 1975; Gutfre and Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981. これらを引用することにより含める)。このようにして形成されたハイブリドーマ細胞は、制限希釈法によってクローンされ、上清は、抗体生産に関して、ELISA、RIA、またはバイオアッセイによって定量される。

【0179】

標的タンパクに特異的に結合するという、抗体の固有の能力は、タンパクの過剰発現を処置するための方法を提供する。したがって、ある実施態様では、本発明は、癌関連ポリペプチドの過剰発現を含む疾患の予防または治療法であって、その癌関連タンパクに対する特異的抗体によって患者を治療する方法を提供する。

【0180】

癌関連タンパクにたいする、ポリクローナルであれモノクローナルであれ、特異的抗体は、前述の従来技術で既知の任意の好適な方法によって生産することが可能である。例えば、マウスまたはヒトのモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術によって生産することが可能であり、またはそれとは別に、癌関連タンパク、免疫学的に活性なその断片、または抗イディオタイプ抗体、またはその断片を動物に投与して、その癌関連タンパクを認識し、結合することが可能な抗体の生産を誘発する。このような抗体は、抗体クラス、す

なわち、I g G、I g A、I g M、I g D、および I g E、または鳥類種の場合には I g Y の内の任意のクラス、および、抗体の内の任意のサブクラスから得られたものであってもよい。

【0181】

ある実施態様では、本発明の抗体は中和抗体である。ある実施態様では、抗体は標的抗体である。ある実施態様では、抗体は、標的に結合するの内部に取り込まれる。ある実施態様では、抗体は、標的に結合しても内部に取り込まれず、表面に留まる。

【0182】

本発明の抗体は、問題の腫瘍細胞抗原に結合すると速やかに取り込まれるのか、または、結合後に細胞表面に留まるのか、それぞれの能力についてスクリーニングされる。ある実施態様では、例えば、あるタイプの免疫結合体の構築において、取り込みが毒素成分の放出に必要な場合、抗体の侵入能力が望まれる。それとは別に、抗体が、A D C C または C D C を促進するために使用されるのであれば、抗体が細胞表面に留まる方がより望ましい。これらのタイプの振る舞いを区別するためにスクリーニング法を用いることも可能である。例えば、腫瘍細胞抗原保持細胞を次のように用いてもよい。すなわち、該細胞は、ヒトの I g G 1（コントロール抗体）、または、本発明の抗体の内の一つと、約 1 μ g / m L の濃度において、氷上で（内部の取り込みを阻止するために 0.1 % アジ化ナトリウムと共に）、または 37 $^{\circ}$ C で（アジ化ナトリウム無添加）3 時間インキュベートされる。次に、細胞は、冷却染色バッファー（P B S + 1 % B S A + 0.1 % アジ化ナトリウム）で洗浄され、氷上にてヤギ抗ヒト I g G - F I T C によって 30 分染色する。幾何平均蛍光強度（M F I）を、F A C S C a l i b u r . で記録する。アジ化ナトリウムの存在下に氷上で本発明の抗体とインキュベートした細胞と、アジ化ナトリウム無添加の状態では 37 $^{\circ}$ C で観察された細胞との間に、M F I に差が観察されない場合、抗体は、内部に取り込まれず、むしろ細胞表面に結合したままであることが疑われる。一方、もしも、細胞をアジ化ナトリウム無添加の状態では 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした時に、表面染色性抗体に減少が認められたならば、抗体は、内部侵入が可能であるものであることが疑われる。

【0183】

抗体結合体

ある実施態様では、本発明の抗体は接合される。ある実施態様では、接合抗体は、癌の治療、癌の診断、または癌細胞の画像記録に有用である。

【0184】

診断応用のためには、抗体は通常検出可能な成分によって標識される。数多くのラベルが市販されているが、それらは通常、下記のカテゴリーに分類することが可能である。

【0185】

(a) 放射線核種、例えば、後述するもの。抗体は、例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , V o l u m e s 1 a n d 2 , C o l i g e n e t a l . , E d . W i l e y - I n t e r s c i e n c e , N e w Y o r k , N . Y . , P u b s . (1 9 9 1) によって標識され、放射能は、シンチレーションカウンティングによって測定される。

【0186】

(b) 蛍光ラベル、例えば、希土類キレート剤（ユーロピウムキレート剤）、またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリスリン、およびテキサス赤が市販されている。蛍光ラベルは、例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y 上記に開示される技術を用いて抗体に接合することが可能である。蛍光は、蛍光測度計を用いて定量される。

【0187】

(c) 各種酵素基質ラベルが市販されているが、米国特許第 4, 275, 149 号が、これらの内のいくつかについて検討している。この酵素は、一般に、発色性物質の化学的变化を触媒し、その発色は、様々な技術によって測定される。例えば、酵素は、基質の色変化を触媒し、その変化を分光光度計によって測定してもよい。それとは別に、酵素は、

基質の蛍光、または化学的発光を変えてもよい。蛍光の変化を定量するための技術は前述した。化学的発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、次に測定可能な（例えば、化学的発光メータを用いて）光を発射するか、または、蛍光アクセプターにエネルギーを付与する。酵素ラベルの例としては、ルシフェラーゼ（例えば、蛍光ルシフェラーゼ、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-ジヒドロフタラジンジオン、マレートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）、アルカリフォスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ（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-フォスフェートデヒドロゲナーゼ）、ヘテロ環オキシダーゼ（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等が挙げられる。抗体に酵素を接合する技術は、O'Sullivan et al., 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)に記載される。

【0188】

抗体はまた、インビボ診断アッセイにも使用される。ある実施態様では、抗体は、腫瘍の場所が、免疫シンチグラフィによって特定されるように放射線核種によって標識される。便利のために、本発明の抗体は、キット、すなわち、診断アッセイを実行するための案内を載せて、指定量の試薬の組み合わせを包装したものとして提供される。抗体が酵素によって標識される場合、キットは、酵素によって要求される、基質および補因子（例えば、検出可能な、発色団または蛍光発色団を供給する基質前駆体）を含んでもよい。さらに、他の添加物、例えば、安定剤、バッファー（例えば、ブロックバッファー、または分解バッファー）等が含まれてもよい。各種試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適にする試薬の溶液濃度を実現するよう広く変動してよい。特に、試薬は、乾燥粉末、通常、凍結乾燥粉末で、溶けると、適切な濃度を持つ試薬溶液を供給する賦形剤を含む粉末として提供される。

【0189】

ある実施態様では、抗体は、1個以上のマイタンシン分子に接合されてもよい（例えば、抗体1分子当たり約1から約10マイタンシン分子）。マイタンシンは、例えば、May-SS-Meに変換され、次にMay-SH3に還元され、修飾された抗体と反応させられて（Charl et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)）マイタンシノイド-抗体免疫結合体を形成する。ある実施態様では、この結合体は、約10-11MのIC50を持つ（総覧については、Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212）きわめて強力なマイタンシン誘導体DM1（N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-マイタンシン）（例えば、2002年12月12日発行WO02/098883を参照）、またはDM4（N2'-デアセチル-N2'-(4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル)-マイタンシン）（例えば、2004年12月2日公開WO2004/103272を参照）であってもよい。

【0190】

ある実施態様では、抗体結合体は、1個以上のカリケアマイシンに接合される抗腫瘍細胞抗原抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で2本鎖DNA破断を形成することが可能である。使用が可能なカリケアマイシンの構造的類縁体としてはガンマ₁I、アルファ₂I、アルファ₃I、N-アセチル-ガンマ₁I、PSAG、およびシータ₁Iが挙げられる（Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993) and Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998)）。さらに

米国特許第 5, 714, 586 ; 5, 712, 374 ; 5, 264, 586 ; および 5, 773, 001 号を参照されたい。なお、これらをそれぞれ引用によって本明細書に含めることを明言する。

【0191】

ある実施態様では、抗体は、多くの癌において過剰に生産される酵素によって活性形として放出される薬剤前駆体に接合される。例えば、抗体結合体は、ドキソルビシンの薬剤前駆体と共に作製され、その際、活性成分が、プラスミンによって結合体から放出される。プラスミンは、多くの癌組織において過剰に生産されることが知られる (Decay et al, (2004) FASEB Journal 18 (3) : 565-567)。

10

【0192】

ある実施態様では、抗体は、酵素的に活性な毒素およびその断片に接合される。ある実施態様では、毒素としては、ただしこれらに限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、エキソトキシンA鎖 (Pseudomonas aeruginosa由来)、Pseudomonas エンドトキシン、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファーサルシン、Aleurites fordii タンパク、ジアンチンタンパク、Phytolacca americana タンパク (PAPI、PAPII、および PAPS)、リボヌクレアーゼ (Rnase)、デオキシリボヌクレアーゼ (Dnase)、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパク、momordica charantia 阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。例えば、1993年10月28日発行WO93/21232を参照されたい。ある実施態様では、毒素は、内在的免疫原性は低く、癌細胞が該毒素に対して耐性を持つ機会を抑える作用機序を持つ。

20

【0193】

ある実施態様では、本発明の抗体と、免疫モジュレータとの間に結合体を作製される。例えば、ある実施態様では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドの使用が可能である。これらの分子は、強力な免疫原で、抗原特異的抗体反応を誘発することが可能である (Datta et al, (2003) Ann N. Y. Acad. Sci 1002 : 105-111を参照)。さらに別の免疫調節性化合物としては、幹細胞増殖因子、例えば「S1因子」、リンパトキシン、例えば腫瘍壊死因子 (TNF)、造血因子、例えばインターロイキン、コロニー刺激因子 (CSF)、例えば顆粒球コロニー刺激因子 (GCSF)、顆粒球マクロファージ刺激因子 (GM-CSF)、インターフェロン (IFN)、例えばインターフェロンアルファ、ベータ、またはガンマ、エリスロポエチン、およびトロンプオエチンが挙げられる。

30

【0194】

ある実施態様では、放射性接合抗体が提供される。ある実施態様では、そのような抗体は、P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Th-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, および Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255, およびそれらの組み合わせ、そのサブメンバーの組み合わせを用いて作製される。ある実施態様では、ホウ素、ガドリニウム、またはウラニウム原子が、抗体に接合される。ある実施態様では、ホウ素原子は B-10、ガドリニウム原子は Gd-157 で、ウラニウム原子は U-235 である。

40

50

【0195】

ある実施態様では、放射性核種結合体は、20から10,000keVのエネルギーを持つ放射性核種を有する。放射性核種は、1000keV未満のエネルギーを持つオージェエミッター、20から5000keVのエネルギーを持つPエミッター、または、2000から10,000keVのエネルギーを持つアルファまたは‘a’エミッターであってもよい。

【0196】

ある実施態様では、ガンマー、ベーター、またはポジترون発射同位元素である放射性核種を含む診断用放射性結合体が提供される。ある実施態様では、放射性核種は、20から10,000keVのエネルギーを持つ。ある実施態様では、放射性核種は、 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{97}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{13}Li 、および ^{197}Hg から成る群から選ばれる。

【0197】

ある実施態様では、本発明の抗体は、光学活性剤または造影剤である診断剤に接合される。光学活性化合物は、発色団または染料のような化合物を含んでもよい。造影剤は、例えば、常磁性イオンであって、該イオンが、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジウム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(II)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、およびエルビウム(III)から成る群から選ばれる金属を含む。造影剤はまた、X線技術またはコンピュータ断層写真における放射線不透過化合物、例えば、ヨウ素、イリジウム、バリウム、ガリウム、およびタリウム化合物であってもよい。放射線不透過化合物は、バリウム、ジアトリゾエート、エチオダイズド油、クエン酸ガリウム、イオカルミン酸、イソセタミン酸、イオダミド、イオジパミド、イオドキサミン酸、イオグルタミド、イオヘキサール、イオパミドール、イオパノイン酸、イオプロセミン酸、イオセファミン酸、イオセリン酸、イオスラミドメグルミン、イオセミチン酸、イオタスル、イオテトリン酸、イオタルミン酸、イオトロキシニン酸、イオキサグル酸、イオキシトリゾイン酸、イボデート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾエート、プロピリオドン、および塩化タリウムから成るグループから選ばれてもよい。ある実施態様では、診断用免疫結合体は、超音波強化剤、例えば、本発明の抗体に接合されるガス充満リボソームを含んでもよい。診断用免疫結合体は、様々の処置、例えば、腫瘍または癌の診断および検出、手術時、内視鏡、または血管内観側を含む方法のために使用されてもよい。

【0198】

ある実施態様では、抗体結合体は、様々の二官能基タンパク結合剤、例えば、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能基誘導体(例えば、ジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル(例えば、ジスクシニミジルスベレート)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンジル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス-活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を用いて作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vittetta et al. Science 238:1098(1987)に記載するようにして調製することが可能である。炭素14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、抗体に放射性核種を接合するための例示のキレート剤である。WO94/11026を参照されたい。リンカーは、細胞における細胞

10

20

30

40

50

傷害性毒素の放出を促進するために「切断可能リンカー」であってもよい。例えば、酸感受性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー（Charl et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)）を用いてもよい。薬剤は、炭水化物成分を通じて、本発明の抗体に連結されてもよい。

【0199】

ある実施態様では、組み換え技術またはペプチド合成を用いて、本発明の抗体と細胞傷害剤とを含む融合タンパクを作製してもよい。ある実施態様では、細胞傷害剤と接合される抗癌抗原抗体を含むこのような免疫結合体が患者に投与される。ある実施態様では、免疫結合体、および／または、この結合体が結合する腫瘍細胞抗原タンパクは細胞によって取り込まれ、該免疫結合体の結合する癌細胞に対する殺作用における治療効力が強調される。ある実施態様では、細胞傷害剤は、癌細胞の核酸を標的とするか、または干渉する。このような細胞傷害剤の例としては、マイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼ、およびDNAエンドヌクレアーゼが挙げられる。

【0200】

ある実施態様では、抗体は、癌の事前標的のために「受容体」（例えば、ストレプトアビジン）に接合される。この抗体－受容体結合体は患者に投与され、次いで、未結合結合体を、排出剤によって循環から取り去り、次に、細胞傷害剤（例えば、放射性核種）に接合した「リガンド」（例えば、アビジン）を投与する。

【0201】

ある実施態様では、抗体は、標的細胞リゾチーム内部で放出される細胞傷害性分子に接合される。例えば、薬剤モノメチルアウリスタチンE（MMAE）が、バリナーシトルリン結合を介して接合される。この結合は、抗体結合体が、内部に取り込まれた後、タンパク分解性酵素カテプシンBによって切断される（例えば、2003年4月3日公開のWO 03/026577を参照）。ある実施態様では、MMAEは、切断可能な成分として、ヒドラゾン官能性を含む酸感受性リンカーを用いて抗体に付着される（例えば、2002年11月11日公開のWO 02/088172を参照）。

【0202】

抗体依存性酵素介在薬剤前駆体治療（ADEPT）

ある実施態様では、本発明の抗体はまた、抗体を、薬剤前駆体活性化酵素に接合することによってADEPTに使用されてもよい。この酵素は、薬剤前駆体（例えば、ペプチジル化学療法剤、WO 81/01145参照）を、活性を持つ抗癌剤に変換する。例えば、WO 88/07378および米国特許第4,975,278号を参照されたい。

【0203】

ある実施態様では、ADEPTに有用な免疫結合体の酵素成分は、薬剤前駆体に対し、それをより活性の高い、細胞傷害性の形に変換するように作用するものである限り、任意の酵素を含む。

【0204】

ADEPTに有用な酵素としては、リン酸塩含有薬剤前駆体を遊離薬剤に変換するのに有用なアルカリフォスファターゼ；硫酸塩含有薬剤前駆体を遊離薬剤に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤である5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有薬剤前駆体を遊離薬剤に変換するのに有用なプロテアーゼ、例えば、テルモリシン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン（例えば、カテプシンBおよびL）；D-アミノ酸置換基を含む薬剤前駆体を変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化薬剤前駆体を遊離薬剤に変換するのに有用なカルボキシヒドレート切断酵素、例えば、ベーターガラクトシダーゼ、およびノイラミニダーゼ；ベーターラクタムを持つように誘導体形成された薬剤を遊離薬剤に変換するのに有用なベーターラクタマーゼ；および、アミン窒素において、フェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基を持つように誘導体形成された薬剤を、それぞれ、遊離薬剤に変換するのに有用なペニシリンアミダーゼ、

例えば、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、酵素活性を持つ抗体、従来技術では「アブザイム」とも呼ばれるが、これを、本発明の薬剤前駆体を、遊離の活性薬剤に変換するのに使用することが可能である（例えば、Massey, Nature 328:457-458 (1987)を参照）。抗体-アブザイム結合体は、該アブザイムを癌細胞集団に輸送するために、本明細書に記載される方法で調製することが可能である。

【0205】

ある実施態様では、ADEPT酵素は、従来技術で既知の技術、例えば、前述のヘテロ二重官能基架橋試薬を用いることによって抗体に共有的に結合させることが可能である。ある実施態様では、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に対して連結される、本発明の抗体の少なくとも抗原結合部分を含む融合タンパクは、従来技術でよく知られる組み換えDNA技術を用いて構築される（例えば、Neuberger et al., Nature, 312:604-608 (1984)を参照）。

【0206】

ある実施態様では、細胞傷害性ではなく、細胞静止的に作用する抗体の特定は、処理されないコントロール培養体と比べて、処理された標的細胞培養体の生存率を測定することによって実現される。生存率は、従来技術で既知の方法、例えば、Cell Titer-Blue（登録商標）細胞生存率アッセイ、またはCell Titer-Glo（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（Promega, それぞれ、カタログ番号G8080およびG5750）を用いて検出することが可能である。ある実施態様では、抗体は、前述の手段で測定した場合に細胞死の証拠が全く得られないが、処理が、コントロール培養体に比べて細胞数に減少をもたらした場合、抗体は、細胞静止性能力を持つと考えられる。

【0207】

ある実施態様では、従来技術で既知のアッセイによってADCCを促進する抗体を特定するために、インビトロスクリーニングアッセイが実行される。例示のアッセイは、インビトロADCCアッセイである。クロム51-標識標的細胞を調製するために、腫瘍細胞系統を、組織培養プレートにて培養し、PBSに溶解した滅菌10mM EDTAを用いて収集した。分離細胞を、細胞培養媒体で2度洗浄した。細胞（ 5×10^6 ）を、200 μ Ciのクロム51（New England Nuclear/DuPont）で、37°Cで1時間時々攪拌しながら標識した。標識細胞を、細胞培養媒体で3回洗浄し、 1×10^5 細胞/mLの濃度に再懸濁した。細胞は、オプソニゼーション無しで、または、オプソニゼーションを行ってアッセイした。オプソニゼーションは、PBMCアッセイでは100 ng/mLおよび1.25 ng/mLで、NKアッセイでは20 ng/mLおよび1 ng/mLで試験抗体とインキュベートすることによっていった。抹消血単核球は、正常で、健康なドナーからヘパリン血を収集し、等量のリン酸バッファー生食液（PBS）で希釈して調製した。次に、この血液を、LYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM（登録商標）（LSM:Oregon Teknika）の上に重層し、メーカーの指示に従って遠心した。単核球を、LSM-血漿境界面から収集し、PBSにて3回洗浄した。エフェクター細胞を、細胞培養媒体において、最終濃度が 1×10^7 細胞/mLとなるように懸濁した。LSMによる精製後、NK細胞分離キットおよび磁気カラム（Miltenyi Biotec）をメーカーの指示に従って用いる陰性選択によってナチュラルキラー（NK）細胞をPBMCから分離した。分離NK細胞を収集し、洗浄し、細胞培養媒体において最終濃度が 2×10^6 細胞/mLとなるように再懸濁した。NK細胞が間違いなくNK細胞であることを、フローサイトメトリー分析によって確認した。エフェクター：標的比の変動は、マイクロタイタープレート（100 μ L最終容量）の各列にそってエフェクター（PBMCかNKのいずれか）細胞を連続的に2倍希釈することによって調製する。エフェクター細胞の濃度は、PBMCについては 1.0×10^7 /mLから 2.0×10^4 /mLの範囲、NKについては 2.0×10^6 /mLから 3.9×10^3 /mLの範囲である。エフェクター細胞の定量後、100 μ Lのクロム51-標識標的細胞（オプソニン添加、または無添加）を、プレートの各ウェルに 1×10^5

細胞／mLで加えた。これによって、最初、PBMCについてはエフェクター：標的比が100：1、NK細胞については20：1が得られた。全てのアッセイは二重に行い、各プレートは、自発的分解（エフェクター細胞無し）および完全分解（標的細胞プラス100μLの1%硫酸ドデシルナトリウム、1N水酸化ナトリウム）に対するコントロールを含む。プレートを37℃で18時間インキュベートし、その後、細胞培養上清を、上清収集システム（Skatron Instrument, Inc.）を用いて収集し、Minaxi auto-gamma 5000シリーズガンマカウンター（Packard）で1分カウントした。結果は、式：%細胞傷害性＝（サンプルcpm－自発性分解）／（全体分解－自発性分解）×100を用いパーセント細胞傷害性として表した。

【0208】

CDCを促進する抗体を特定するのに、当業者であれば、従来技術で既知のアッセイを実行してもよい。一つの例示のアッセイは、インビトロCDCアッセイである。インビトロで、CDC活性は、試験抗体無添加で、または、各種濃度の試験抗体の存在下に、ヒト（または、それに代わるソースの）補体含有血清と、腫瘍細胞抗原発現細胞をインキュベートすることによって測定することが可能である。次に、細胞傷害性は、ALAMAR BLUE（登録商標）（Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202 163-171 (1997)）を用いて生細胞を定量することによって測定する。コントロールアッセイは、抗体無しで、また、抗体を添加するが、熱不活性化血清を用いて、および／または、問題の腫瘍細胞抗原を発現しない細胞を用いて行う。それとは別に、赤血球細胞を、癌抗原、または、癌抗原から得られたペプチドでコートし、次にCDCを、赤血球分解を観察することによって定量してもよい（例えば、Karjalainen and Mantyjärvi, Acta Pathol Microbiol Scand [C]. 1981 Oct; 89 (5) : 315-9を参照）。

【0209】

細胞死を誘起する抗体を選択するには、例えば、PI、トリパンブルー、または7AAD取り込みによって示される膜完全性の喪失を、コントロールに対して定量してもよい。一つの例示のアッセイは、癌抗原発現細胞を用いるPI取り込みアッセイである。このアッセイによれば、腫瘍細胞抗原発現細胞を、Dulbeccoの改変イーグル培養液（DMEM）：HamF-12（50：50）に、10%熱不活性化FBS（Hyclone）および2mM L-グルタリニンを添加した培養液において培養する。（このようにして、アッセイは、補体および免疫エフェクター細胞無添加の下に行われる。）腫瘍細胞を、100×20mm皿に3×10⁶／皿の密度で撒き、一晚放置して付着させた。次に、媒体を除去し、新鮮な媒体のみ、または、10μg/mLの適切なモノクローナル抗体を含む媒体で置換した、細胞を、3日間インキュベートする。各処理後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって分離した。次に細胞を、1200rpm 4℃で5分遠心し、ペレットを3mLの氷冷Ca²⁺結合バッファー（10mM Hepes, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂）に再懸濁し、35mmストレイナーキャップ付き12×75チューブ（チューブ当たり1mL、処理グループ当たり3チューブ）に分液投下し、細胞塊を除去した。次に、チューブにPI（10μg/mL）を投下する。サンプルは、FACSCAN（商標）フローメーターおよびFACSCONVERT（商標）CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson）を用いて分析してもよい。PI取り込みの定量によって、統計的に有意なレベルの細胞死を誘起する抗体を、細胞死誘発性抗体として選んだ。

【0210】

抗体はさらに、PET撮像剤として¹⁸F-アネキシンを用い、インビボにおいてアポトーシス活性についてもスクリーニングした。この処置において、アネキシンVが¹⁸Fによって標識され、試験中の抗体による投与後に試験動物に与えられる。アポトーシス過程でもっとも早期に見られる事象の一つは、細胞膜の内側からのフォスファチジルセリンの外部細胞表面への脱出であり、その表面においてアネキシンと接触する。次に、動物に

10

20

30

40

50

ついてPET画像記録を行う(Yeagle et al, J Nucl Med, 2005 Apr; 46(4): 658-66を参照)。動物はさらに屠殺し、個々の器官または腫瘍を摘出し、標準プロトコールに従ってアポトーシスマーカーについて分析する。

【0211】

ある実施態様では、癌は、ある遺伝子発現産物の過剰発現によって特徴づけられるが、本出願はさらに、癌抗原を過剰発現しないと考えられる癌を治療する方法も提供する。癌における癌抗原発現を定量するには、各種の診断／予後診断アッセイが利用可能である。ある実施態様では、遺伝子発現産物の過剰発現は、IHCによって分析される。癌バイオプシーから得られたパラフィン包埋組織切片に対しIHCアッセイを実施してもよく、下記のような癌抗原タンパク染色強度基準が与えられる。

スコア0：染色が観察されないか、膜染色が、癌細胞の10%未満に観察される。

スコア1+：僅かな／かろうじて検出可能な膜染色が、癌細胞の10%以上に検出される。細胞は、その膜の一部においてのみ染色される。

スコア2+：弱から中等の膜の完全な染色が、癌細胞の10%以上に観察される。

スコア3+：中等から強度の、膜の完全な染色が、癌細胞の10%以上に観察される。

【0212】

癌抗原過剰発現評価においてスコア0または1+を持つ癌は、癌抗原を過剰発現していないものと特徴づけられてよいが、一方、スコア2+または3+を持つ癌は、癌抗原を過剰に発現するものと特徴づけられる。

【0213】

それとは別に、またはそれに加えてさらに、FISHアッセイ、例えば、INFORM(商標)(Ventana, アリゾナ州によって販売)または、PATHVISION(商標)(Vysis, イリノイ州)は、ホルマリン固定、パラフィン包埋癌組織に対して実行し、その癌における癌抗原過剰発現の程度(もしあれば)を定量してもよい。

【0214】

さらに、抗体は、例えば、ポリマーに共有接合させて化学的に修飾し、それによって循環半減期を延長することが可能である。各抗体分子が、1個以上(すなわち、1、2、3、4、5個以上)のポリマー分子に付着される。ポリマー分子は、リンカー分子によって抗体に付着されるのが好ましい。ポリマーは、一般に、合成ポリマーまたは天然ポリマーで、例えば、任意に置換される直鎖または分枝鎖ポリアルキレン、ポリアルケニレン、またはポリオキシアルキレンポリマー、または分枝または非分枝ポリサッカリド、例えば、ホモまたはヘテロポリサッカリドであってもよい。ある実施態様では、ポリマーは、ポリオキシエチレンポリオール、およびポリエチレングリコール(PEG)である。PEGは、室温で水溶性であり、一般式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ を持つ。式においてRは水素、または保護基、例えば、アルキルまたはアルカノール基であってもよい。ある実施態様は、保護基は、1から8個の炭素を持つ。ある実施態様では、保護基はメチルである。符号nはプラスの整数で、1と1,000の間、2と500の間にある。ある実施態様では、PEGは、1000から40,000、2000から20,000、3,000から12,000の平均分子量を持つ。ある実施態様では、PEGは、少なくとも一つのヒドロキシ基を持つ。ある実施態様では、ヒドロキシは、末端ヒドロキシ基である。ある実施態様では、活性化されて、阻害剤の上で遊離アミノ基と反応するのはこのヒドロキシ基である。しかしながら、反応基のタイプおよび量は、本発明の、共有的に接合されるPEG/抗体を実現するために変動してよい。ポリマー、および、それらをペプチドに付着させる方法が、米国特許第4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; および4,609,546号に示される。なお、これらの全体を引用により本明細書に含める。

【0215】

ラベル表示および検出

ある実施態様では、本発明の癌関連核酸、タンパク、および抗体は標識される。上に論じた結合体例の多くは、非抗体にも関連することに注意しなければならない。これらの例

10

20

30

40

50

の関連の度合いに応じて、それらは、本明細書に含まれる。

【0216】

本明細書における「標識された」とは、化合物が、該化合物の検出を可能とする、少なくとも一つの要素、同位元素、または化学的化合物を付着させることを意味する。一般に、ラベルは三つのクラスに分類される。a) 放射性であっても、重い同位元素であってもよい同位元素ラベル；b) 抗体または抗原であってもよい免疫ラベル、c) 発色または蛍光染料。ラベルは、癌関連核酸、タンパク、および抗体の任意の位置に組み込んでよい。例えば、ラベルは、直接または間接に、検出可能な信号を生成することができなくてはならない。検出可能な成分は、放射性同位元素、例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I 、蛍光または化学発光化合物、例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ルシフェリン、または酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼであってもよい。ラベルに抗体を接合するには、従来技術で既知の任意の方法、例えば、Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biotechnology, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); and Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982)に記載されるものを含めた方法を用いてよい。

10

【0217】

対象発現産物の検出は、当業者に既知の任意の方法を用いて実現することが可能である。「発現を検出する」または「レベルを検出する」とは、生物サンプルにおける生物マーカータンパクまたは遺伝子の量または存在を決定する手段を意味することが意図される。したがって、「発現を検出する」とは、生物マーカーが、発現されない、検出可能なほど発現されない、低レベルで発現される、正常レベルで発現される、または過剰に発現されると決定される場合を含む。ある実施態様では、抗腫瘍細胞抗原治療法の作用を定量するためには、腫瘍細胞抗原発現新生細胞を含む試験生物サンプルを、抗腫瘍細胞抗原治療剤と、治療剤が細胞反応を誘発することができるほど十分な時間接触させ、次に、対象とする1種以上の生物マーカーの発現レベルを、抗腫瘍細胞抗原治療剤無添加のコントロール生物サンプルの発現レベルと比較する。ある実施態様では、新生細胞のコントロール生物サンプルは、中性物質または陰性コントロールと接触させる。例えば、ある実施態様では、腫瘍細胞抗原に結合しない非特異的免疫グロブリン、例えば、IgG1が陰性コントロールとして使用される。検出は、発現産物の時間的変化の監視を可能とするほどの時間経過に亘って行われる。検出はまた、抗腫瘍細胞抗原治療剤の様々な濃度に対する暴露と共に行われ、それによって、対象とする任意の生物マーカーのための「用量反応」曲線が得られる。

20

30

【0218】

癌表現型の検出

一旦発現され、要すれば、精製されると、癌関連タンパクおよび核酸は、いくつかの用途に有用である。ある実施態様では、遺伝子の発現レベルが、癌表現型における様々な細胞状態において定量される。すなわち、正常組織および癌組織（および、ある場合には、後述するように、予後に関わる、リンパ腫の様々な重度について）における遺伝子の発現レベルが評価され、これから発現プロファイルが得られる。ある特定の細胞状態、または発達時点の発現プロファイルは、ほぼ、その状態の「指紋」である。二つの状態が、何か特定の遺伝子を似たように発現させている時に、いくつかの遺伝子を同時に評価すると、その細胞に固有の遺伝子発現プロファイルが得られる。様々な状態における細胞の発現プロファイルを比較することによって、これらの状態のそれぞれについて、どの遺伝子が重要なのかに関する情報が得られる。次に、ある特定の患者の組織について、それが、正常な組織の遺伝子発現プロファイルを持つのか、それとも癌組織の遺伝子発現プロファイルを持つのか診断を実行し、または、確かめてもよい。

40

【0219】

50

本明細書で用いる「差次的発現」またはその等価的表現は、細胞の内部、および細胞間における、遺伝子の時間的および／または細胞発現パターンにおける質的および量的な違いを指す。したがって、ある差次的に発現される遺伝子は、例えば、正常対癌組織における活性化または不活性化を含め、その発現を質的に変化させることが可能である。すなわち、遺伝子は、別の状態に対し、特定の状態でスイッチオンまたはスイッチオフされることがある。当業者には明白なように、二つ以上の状態の任意の比較を実行してよい。このように質的に調節される遺伝子は、ある状態または細胞タイプにおいて、その状態または細胞タイプでは標準技術によって検出可能であるが、その両方では検出されない発現パターンを示す。それとは別に、決定は、発現が増加または減少という点で定量的である。すなわち、遺伝子の発現は上方調整されて、転写物量の増加をもたらす、あるいは、下方調整されて、転写物量の減少をもたらす。発現が異なる程度は、後述する標準的特徴解明技術、例えば、Affymetrix GeneChip（商標）発現アレイ、Lockhart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996)の使用によって定量できるほど十分大きなものでありさえすればよい。上記文献を引用により本出願に含めることを明言する。他の技術としては、定量的逆転写PCR、ノーザン分析、およびRNase保護が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。前述したように、発現の変化（すなわち、上方調整または下方調整）は、少なくとも約2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または場合によっては100倍以上であってもよい。

【0220】

当業者には明らかなように、これは、遺伝子転写物、またはタンパクレベルのどちらかを評価することによって実行される。すなわち、遺伝子発現量は、遺伝子転写体のDNAまたはRNA等価物に対する核酸プローブを用いることによって監視され、かつ、遺伝子発現レベルの定量、あるいはそれとは別に、最終遺伝子産物そのもの（タンパク）は、例えば、癌関連タンパクに対する抗体、および標準的免疫アッセイ（ELISA等）、または、他の技術、例えば、質量分析アッセイ、2Dゲル電気泳動アッセイ等を含む技術を用いることによって監視することが可能である。したがって、癌関連遺伝子に対応するタンパク、すなわち、ある特定の癌表現型、すなわち、リンパ腫において重要であると特定されたタンパクを、その癌に対して特異的な診断試験において評価することが可能である。

【0221】

ある実施態様では、遺伝子発現監視が実行され、いくつかの遺伝子が同時に監視される。しかしながら、発現プロファイルを調製するためには、複数のタンパク発現監視も同様に実行が可能である。それとは別に、これらのアッセイは個別的に実行されてもよい。

【0222】

ある実施態様では、癌関連核酸プローブは、ある特定の細胞における癌関連配列の検出と定量のために、本明細書に記載されるやり方でバイオチップに付着されてもよい。このアッセイは、従来技術で既知の通りに実行される。当業者には了解されるように、任意の数の異なる癌関連配列をプローブとして使用してよいが、単一配列アッセイが用いられる場合もあれば、本明細書に記載される複数の配列が用いられる場合もある。さらに、固相アッセイが記載されるけれども、任意の数の溶液系アッセイも同様に実行が可能である。

【0223】

ある実施態様では、正常組織に比べ、癌において上方調整または下方調整される癌関連配列を検出するために、固相および溶液系アッセイの両方が使用される。癌関連配列が変更されたが、同じ発現プロファイルを示す、または異なる発現プロファイルを示す場合でも、タンパクは本明細書に記載するやり方で検出される。

【0224】

ある実施態様では、癌関連タンパクをコードする核酸が検出される。癌関連タンパクをコードするDNAまたはRNAは検出されてよいけれども、特に興味あるのは、癌関連タンパクをコードするmRNAを検出する方法である。サンプルにおけるmRNAの存在は、癌関連遺伝子が転写されてmRNAを形成したことの表示であり、タンパクが発現され

ることを示す。mRNAを検出するためのプローブは、そのmRNAに対して相補的で、それと塩基対を形成する、任意のヌクレオチド／デオキシヌクレオチドプローブであり、オリゴヌクレオチド、cDNA、またはRNAを含むが、ただしこれらに限定されない。プローブはまた、本明細書に定義される検出可能な標識を含んでいなければ成らない。一つの方法では、調べられる核酸を、ナイロン膜のような固相支持体の上に固定し、そのサンプルにプローブをハイブリダイズさせた後に、mRNAは検出される。非特異的に結合したプローブを除去するために洗浄した後、ラベルが検出される。別の方法では、mRNAの検出はインサイチュで実行される。この方法では、透過性を高められた細胞または組織サンプルを、検出可能に標識された核酸プローブに、プローブが、標的mRNAにハイブリダイズするのに十分な時間接触させる。非特異的に結合したプローブを除去するために洗浄した後、ラベルが検出される。例えば、癌関連タンパクをコードするmRNAに対して相補的なジゴキシゲニン標識リボプローブ（RNAプローブ）は、ジゴキシゲニンを抗ジゴキシゲニン二次抗体に結合させ、ニトロブルーテトラゾリウムおよび5-ブロモ-4-クロロ-3-インドールフォスフェートによって現像することによって検出される。

【0225】

本明細書に記載される3クラスのタンパク（分泌、膜貫通、または細胞内タンパク）のどれも診断用アッセイで使用される。癌関連タンパク、抗体、核酸、修飾タンパク、および癌関連配列を含む細胞が診断用アッセイで使用される。このアッセイは、個別の遺伝子、または、対応するポリペプチドのレベルについて、または複数セットのアッセイとして行われる。

【0226】

本明細書に記載され、定義されるように、癌関連タンパクは、白血病、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、皮膚癌、およびリンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫、および非ホジキンリンパ腫、ただしこれらに限定されない、を含む癌のマーカーとして使用される。癌が疑われる組織または患者におけるこれらのタンパクの検出は、癌のタイプの診断を可能にする。癌の診断には、当業者に既知の数多くの方法が使用される。

【0227】

癌関連タンパクを検出するのに抗体を用いてもよい。一つの方法は、ゲル（通常は変性、還元したゲルであるが、等電点電気泳動ゲルを含む、他の任意のタイプのゲルであってよい）に対する電気泳動によってサンプルまたは患者からタンパクを分離する。タンパクの分離後、癌関連タンパクを、その癌関連タンパクに対して誘起した抗体によるイムノブロッティングによって検出する。イムノブロッティング法は、当業者にはよく知られる。この方法に用いられる抗体は、前述のように標識されていてもよい。

【0228】

ある実施態様では、SEMA4Dタンパクに対する抗体は、インサイチュ撮像技術に用いられる。この方法では、細胞を、癌関連タンパク（単数または複数）に対する多くの抗体の内の一つに接触させる。洗浄して非特異的抗体結合を除去した後、抗体または複数の抗体の存在が検出される。ある実施態様では、抗体は、検出可能な標識を含む二次抗体とインキュベートすることによって検出される。別の方法では、癌関連タンパク（単複）に対する一次抗体が検出可能な標識を含む。別の方法では、複数の一次抗体のそれぞれが、異なる、検出可能な標識を含む。この方法は、特に、複数の癌関連タンパクの同時的スクリーニングに使用される。当業者には了解されるように、本発明においては、外にも、数多くの組織学的撮像技術が有用である。

【0229】

標識は、異なる波長の発射を検出し、識別することの可能なフルオロメーターにおいて検出されてもよい。さらに、この方法では、蛍光活性化細胞ソーター（FACS）の使用が可能である。

【0230】

血液サンプルから癌を診断するのに抗体を使用してもよい。前述したように、いくつか

の癌関連タンパクは、分泌／循環分子である。したがって、血液サンプルは、分泌された癌関連タンパクの有無について探査または試験すべきサンプルとして有用である。前記した免疫アッセイ技術、例えば、ELISA、イムノブロットィング（ウェスタンブロットィング）、免疫沈降法、BIACORE技術等の内のどれか一つによって癌関連タンパクを検出するには、当業者には理解されるように、抗体が使用される。

【0231】

組織アレイに対する、標識癌関連核酸プローブのインサイチュハイブリダイゼーションを実行してよい。例えば、癌関連組織および／または正常組織を含む組織サンプルのアレイが作製される。次に、従来技術で知られる通りのインサイチュハイブリダイゼーションが実行される。

10

【0232】

個体と標準の間の発現フィンガープリントを比較する時、当業者は、診断のみならず予後判定も実行することが可能であることが理解される。さらに、診断を示す遺伝子は、予後を示す遺伝子とは異なることがあることが理解される。

【0233】

前述したように、癌関連タンパク、抗体、核酸、修飾タンパク、および、癌関連配列を含む細胞は、予後判定アッセイに用いることが可能である。前述のように、長期予後の観点から、癌の重度と相関する遺伝子発現プロファイルが生成される。この場合も、これは、タンパクまたは遺伝子レベルで実行される。前述のように、癌関連プローブが、組織または患者における癌関連配列の検出および定量的ためにバイオチップに付着される。アッセイは、診断に関して概略されたように進められる。

20

【0234】

スクリーニングアッセイ

本明細書に記載される癌関連遺伝子配列の内のどれも薬剤スクリーニングアッセイに使用してよい。癌関連タンパク、抗体、核酸、修飾タンパク、および、癌関連配列を含む細胞は、薬剤スクリーニングアッセイにおいて、すなわち、「遺伝子発現プロファイル」またはポリペプチドの発現プロファイルに対する、薬剤候補の作用を評価するために用いることが可能である。一つの方法では、発現プロファイルは、候補薬剤による処理後、発現プロファイルについて、遺伝子の監視を可能とするために、高処理能力スクリーニング技術と組み合わせることが好ましい。Z l o k a r n i k , e t a l . , S c i e n c e 279, 84-8 (1998)、Heid, et al., Genome Res., 6: 986-994 (1996)。

30

【0235】

ある実施態様では、癌関連タンパク、抗体、核酸、修飾タンパク、および、癌関連配列を含む細胞がスクリーニングアッセイに用いられる。すなわち、本発明は、癌の表現型を調節する組成物を求める新規スクリーニング法を提供する。前述のように、これは、遺伝子発現の調節因子を求めるか、またはタンパク活性の調節因子を求めるスクリーニングによって実行される。同様に、これは、個別の遺伝子またはタンパクレベルについて、または「遺伝子発現プロファイル」に対する薬剤候補の作用を評価することによって行われる。ある実施態様では、発現プロファイルが、好ましくは時々高処理能力スクリーニング技術と組み合わせて、候補薬剤による処理後、発現プロファイルについて、遺伝子の監視を可能とするために使用される。Z l o k a r n i k 上記参照。

40

【0236】

薬剤の遺伝子発現に対する作用を評価するために、各種アッセイを実行してよい。ある実施態様では、アッセイは、個別の遺伝子またはタンパクレベルに行われてもよい。すなわち、候補生体活性剤は、遺伝子調節の調節に関してスクリーニングされてもよい。「調節」とはしたがって、遺伝子発現または活性の増加と減少の両方を含む。調節の量は、正常組織対癌組織における出発時の変化に依存するが、少なくとも約10%、少なくとも50%、少なくとも100-300%、および少なくとも300-1000%またはそれ以上の変化を指す。したがって、もしも遺伝子が、正常組織と比べ、癌において4倍の増加

50

を示したならば、約4倍の減少が望ましい。正常組織に比べ癌において10倍の減少がある場合は、候補薬剤としては、発現の10倍の増加が望ましい。それとは別に、癌関連配列が変えられたが、同じ発現プロフィール、または変化発現プロフィールを示した場合、タンパクは、本明細書に略述したように検出される。

【0237】

当業者には了解されるように、調節は、遺伝子またはタンパクレベルでの評価によって実行される。すなわち、遺伝子発現の量は、核酸プローブを用いて監視してもよいし、遺伝子発現レベル、または、遺伝子産物そのもののレベルの定量は、例えば、癌関連タンパクに対する抗体、および標準的イムノアッセイを用いることによって監視することが可能である。それとは別に、タンパクによる結合および生体活性アッセイを後述のように実行してもよい。

10

【0238】

ある実施態様では、いくつかの遺伝子が同時に監視される。すなわち、複数のタンパク発現監視も可能であるが、一つの発現プロフィールが調製される。

【0239】

ある実施態様では、癌関連核酸プローブは、ある特定の細胞における癌関連配列の検出および定量のために、本明細書で略述されるとおりにバイオチップに付着される。このアッセイはさらに詳しく後述される。

【0240】

ある実施態様では、候補生物活性剤が、分析前に細胞に加えられる。さらに、ある特定のタイプの癌を調節する、癌関連タンパクを調節する、癌関連タンパクに結合する、または、癌関連タンパクと抗体の間の結合を妨げる、候補生物活性剤を特定するためのスクリーニング法が提供される。

20

【0241】

本明細書で用いる「候補生物活性剤」または「薬剤候補」またはその文法的等価物は、生物活性剤について試験される、任意の分子、例えば、タンパク、オリゴペプチド、小型有機または無機分子、ポリサッカリド、ポリヌクレオチド等を記述する。生物活性剤は、癌の表現型を直接・間接に変えることができ、癌関連タンパクに結合し、および／または、その生物活性を調節することができ、核酸配列およびタンパク配列の両方を含む癌関連配列の発現を調節することができる薬剤である。ある実施態様では、候補薬剤は、例えば、正常な組織フィンガープリントに比べて、癌関連表現型を抑制する。同様に、候補薬剤は、重度の癌関連表現型を抑制することが好ましい。一般に、複数のアッセイ混合物が、様々な薬剤濃度と一緒に平行に移動させられて、様々な濃度に対する差別反応が得られる。通常、これらの濃度の内の一つが、陰性コントロールとして、すなわち、ゼロ濃度、または検出レベル以下濃度のサンプルとして使われる。

30

【0242】

ある実施態様では、候補薬剤は、SEMA4Dタンパクの作用を中和する。「中和する」とは、タンパクの活性が、抑制または拮抗され、そのため、細胞に対し実質的にまったく作用を持たなくなり、したがって癌の重度を下げ、癌の発生を阻止することを意味する。

40

【0243】

候補薬剤は、多数の化学的クラスを含むが、ただし典型的には、有機または無機の分子で、好ましくは、100を超えるが、約2500ダルトン未満の分子量を持つ小型の有機化合物である。ある実施態様では、小型分子は、2000未満、1500未満、1000未満、または500Da未満である。候補薬剤は、タンパクとの機能的結合、特に、水素結合のために必要な官能基を含み、典型的には、少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基を含み、好ましくは、化学官能基の内の少なくとも二つを含む。候補薬剤は、多くの場合、上記官能基の内の一つ以上によって置換される、環状炭素、またはヘテロ環構造、および／または芳香環、またはポリ芳香環構造を含む。候補薬剤はまた、生体分子、例えば、ペプチド、サッカリド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピ

50

リミジン、それらの誘導体、構造的類縁体、または組み合わせを含む生体分子の中に認められる。

【0244】

本発明の方法において使用するのに好適な、他のSEMA4D拮抗剤、例えば、小型分子拮抗剤は、当業者には明白であろう。ある実施態様では、ある単一セマフォリンファミリーメンバーに対し抗体の特異性が際立っている場合、その抗体は魅力的な選択肢となる。もう一つ考慮すべき点は、SEMA4Dは、細胞の表面に発現されるので、標的の対象として有望な候補となる。

【0245】

候補薬剤は、合成または天然化合物から成るライブラリーを含む広範なソースから得られる。例えば、多様な有機化合物および生体分子のランダムな、指向性合成にとって、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む数多くの手段が利用可能である。ある実施態様では、細菌、真菌、植物、および動物抽出物という形での天然化合物のライブラリーが利用可能であり、あるいは、簡単に作製が可能である。さらに、天然または合成的に作製されたライブラリーおよび化合物は、通例の化学的、物理的、および生化学的手段によって簡単に修飾される。既知の薬剤も、指向性、またはランダムな化学的修飾、例えば、アシル化、アルキル化、エステル化、または、アミド化によって構造的類縁体を生産することが可能である。

【0246】

ある実施態様では、候補生物活性剤はタンパクである。「タンパク」とは、本明細書では、少なくとも二つの共有的に結合されるアミノ酸であって、タンパク、ポリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチドを含む。タンパクは、天然のアミノ酸およびペプチド結合で構成されていてもよいし、または、合成ペプチド様構造であってもよい。したがって、本明細書で用いる「アミノ酸」または「ペプチド残基」とは、天然のアミノ酸と合成アミノ酸の両方を意味する。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン、およびノルロイシンは、本発明の目的のためにはアミノ酸と考えられる。「アミノ酸」はまた、イミノ酸残基、例えば、プロリンおよびヒドロキシプロリンも含む。側鎖は、(R)または(S)のいずれかの形状を持ってもよい。ある実施態様では、アミノ酸は、(S)またはL-形状である。非天然性側鎖が用いられる場合、非アミノ酸置換基が、例えば、インビボ分解を阻止、または遅らせるために使用されてもよい。

【0247】

ある実施態様では、候補生物活性剤は、天然タンパク、または天然タンパクの断片である。したがって、例えば、タンパク、または、タンパク様細胞抽出物のランダムな、または指向性の消化物を含む細胞抽出物を使用してもよい。このようにして、前核および真核細胞タンパクのライブラリーが、本発明の方法のスクリーニングのために作製されてもよい。ある実施態様では、ライブラリーは、細菌、真菌、ウィルス、および哺乳類タンパクから成る。ある実施態様では、ライブラリーは、ヒトタンパクのライブラリーである。

【0248】

ある実施態様では、候補生物活性剤は、約5から約30アミノ酸、約5から約20アミノ酸、または約7から約15アミノ酸から成るペプチドである。このペプチドは、前述したように、天然のタンパクの消化物、ランダムペプチド、または「偏倚」ランダムペプチドであってもよい。本明細書における「ランダム化」または文法的等価物は、各核酸およびペプチドは、それぞれ、事実上ランダムなヌクレオチドおよびアミノ酸から成ることを意味する。一般にこれらのランダムペプチド（または、核酸、後述）は化学的に合成されるものであるから、これらの核酸またはペプチドは、任意の位置に、任意のヌクレオチドまたは任意のアミノ酸を取り込むことが可能である。合成過程は、配列の全長に亘って可能な組み合わせの全てまたは大部分の形成を可能とするように設計され、そのようにして、ランダム化された候補生物活性タンパク様薬剤のライブラリーを形成する。

【0249】

ある実施態様では、ライブラリーは完全にランダム化される。すなわち、どの位置にも

配列の優位性または定常性はない。ある実施態様では、ライブラリーは偏倚される。すなわち、配列の中のいくつかの位置は定常に維持されるか、または、少数の可能性の中から選ばれる。例えば、ある実施態様では、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基は、ある定められたクラス、例えば、疎水性アミノ酸、親水性残基、核酸結合ドメインの形成、システインの形成、架橋結合、SH-3ドメインのプロリン、リン酸化部位のセリン、トレオニン、チロシン、またはヒスチジンに向って立体的に偏倚する（小型か、または大型）残基等のクラスの中でランダム化される。

【0250】

ある実施態様では、候補生物活性剤は核酸である。一般にタンパクについて記載されるように、核酸候補生物活性剤も天然の核酸、ランダム核酸、または「偏倚」ランダム核酸であってもよい。別の実施態様では、候補生物活性剤は、有機化学成分であるが、この数多くのものが、文献で利用が可能である。

10

【0251】

SEMA4D遺伝子の発現プロフィールの変化を調べるアッセイでは、候補薬剤が加えられ、細胞がある期間インキュベートされた後、分析される標的配列を含む核酸サンプルが調製される。標的配列は、既知の技術を用いて調製され（例えば、前述のように、RNAから標識cDNAへと変換）、好適なマイクロアレイに添加される。例えば、ヌクレオシドにラベルを共有的に付着させてインビトロ逆転写が行われる。ある実施態様では、核酸は、本明細書に定められるラベル、特に、ビオチン-FITC、またはPE、Cy3、およびCy5によって標識される。

20

【0252】

当業者には了解されるように、これらのアッセイは、直接ハイブリダイゼーションアッセイであってもよく、あるいは、複数のプローブの使用を含む「サンドイッチアッセイ」を含んでもよい。これは、一般に、米国特許第5,681,702、5,597,909、5,545,730、5,594,117、5,591,584、5,571,670、5,580,731、5,571,670、5,591,584、5,624,802、5,635,352、5,594,118、5,359,100、5,124,246、および5,681,697号に略述される。これら全てを引用により本明細書に含める。ある実施態様では、標的核酸は、前述のように調製され、ハイブリダイゼーション複体の形成を可能とする条件下で、複数の核酸プローブを含むバイオチップに加えられる。

30

【0253】

本発明には、様々なハイブリダイゼーション条件、前述のように、高度、中等度、および低度のストリンジェントな条件を含む条件が用いられてよい。アッセイは一般に、標的の存在下にのみラベルプローブハイブリダイゼーション複体の形成を可能とするストリンジェントな条件下に行われる。厳格度は、熱力学変数、例えば、温度、フォルムアミド濃度、塩濃度、カオトロピック塩濃度、pH、有機溶媒濃度等、ただしこれらに限定されない、を含む変数である工程パラメータを変えることによって調節することが可能である。これらのパラメータはまた、一般に米国特許第5,681,697号に略述されるように、非特異的結合を調節するのに使用することが可能である。したがって、ある実施態様では、いくつかの工程は、非特異的結合を抑えるため比較的高いストリンジェントな条件下で実施される。

40

【0254】

本明細書に記載される反応は、当業者には理解されるように、様々なやり方で実現されてよい。反応の成分は、後述の実施態様と同様、同時に、または継時的に、任意の順序で加えてもよい。さらに、反応は、アッセイのなかに、様々な他の試薬を含んでもよい。そのようなものとして、ハイブリダイゼーションおよび検出の最適化、および／または、非特異的または背景相互反応の抑制を促進する、塩、バッファー、中性タンパク、例えばアルブミン、界面活性剤等のような試薬が挙げられる。その他のやり方でアッセイの効率を向上させる試薬、例えば、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等を、サンプル調製法および標的の純度に応じて加えてもよい。さらに、固相または溶液系（すなわ

50

ち、動的PCR)のいずれかのアッセイを使用してよい。

【0255】

アッセイを行ったならば、データは、発現レベル、および、状態間、個別の遺伝子間の発現レベルの変化を定量し、遺伝子プロフィールを形成するために分析される。

【0256】

ある実施態様では、SEMA4Dが差次的に発現される遺伝子と特定した診断および予後判定応用の場合と同様、SEMA4Dの発現の変化を個別に試験するためのスクリーニングの実行が可能である。すなわち、単一遺伝子の発現調節の調節に関してスクリーニングを行うことが可能である。したがって、例えば、その有無が二つの状態の間で一意に異なる標的遺伝子の場合、その標的遺伝子の調節因子を求めてスクリーニングが行われる。

10

【0257】

さらに、候補薬剤に対して誘発される新規遺伝子を求めるスクリーニングを行うことが可能である。癌関連発現パターンを抑制し、正規の発現パターンをもたらし能力、または、単一の癌関連遺伝子発現プロフィールを調節し、正常組織の遺伝子の発現をなぞるようにさせる能力に基づいて候補薬剤を特定した後、前述のスクリーニングを実施して、その薬剤に対して特異的に調節される遺伝子を特定することが可能である。正常組織と、薬剤処理した癌関連組織の間で発現プロフィールを比較することによって、正常組織または癌関連組織では発現されないが、薬剤処理組織では発現される遺伝子が明らかにされる。これらの薬剤特異的配列は、癌関連遺伝子またはタンパクに関して本明細書に記載された方法の内の任意のものによって特定し、かつ使用することが可能である。ある実施態様では、これらの配列および、そのコードするタンパクは、薬剤処理細胞をマークまたは特定するために使用される。さらに、この薬剤によって誘発されるタンパクに対して抗体を誘起することが可能であり、この抗体は、処理される癌関連組織サンプルに対する新規治療剤を標的するのに用いられる。

20

【0258】

したがって、ある実施態様では、候補薬剤は、ある癌関連発現プロフィールを持つ癌関連細胞集団に対して投与される。本明細書において「投与する」または「接触する」とは、候補薬剤が、細胞に対して、該薬剤が、取り込みおよび細胞内活動によるものであれ、細胞表面における活動によるものであれ、その細胞に対し作用を及ぼすことを可能にするやり方で加えられることを意味する。ある実施態様では、タンパク様候補薬剤（すなわち、ペプチド）をコードする核酸を、ウィルス構築体、例えば、レトロウィルス構築体の中に、そのペプチド薬剤の発現が実行されるようなやり方で挿入してもよい。PCT US 97/01019を参照されたい。これを引用により本明細書に含めることを明言する。

30

【0259】

候補薬剤が細胞に投与されたならば、細胞は、要すれば洗浄され、ある期間、好ましくは生理的条件下で放置されてインキュベートされる。次に、細胞は収集され、新規遺伝子発現プロフィールが、本明細書に記載されるとおりに生成される。

【0260】

したがって、例えば、癌関連表現型を抑えるまたは抑制する薬剤を求めて癌関連組織をスクリーニングしてもよい。発現プロフィールの少なくとも一つの遺伝子は、薬剤が、癌関連活性に作用を及ぼすことを示す。癌関連表現型に関するこのような徴候を定めることによって、表現型を変える新規薬剤を求めるスクリーニングを工夫することが可能となる。この方法によれば、薬剤標的は既知である必要はなく、元の発現スクリーニングプラットフォームに現れる必要はなく、さらに、標的タンパクの転写物のレベルも変化する必要はない。

40

【0261】

ある実施態様では、前述したように、個別の遺伝子および遺伝子発現産物に対してスクリーニングが実施される。すなわち、ある特定の差次的に発現される遺伝子を、ある特定の状態において重要であると特定した後、該遺伝子の発現または該遺伝子産物のどちらかに対する調節因子に関してスクリーニングを実行することが可能である。癌関連タンパク

50

は、断片であってもよいし、あるいは、前述の癌関連遺伝子によってコードされる断片に対して全長タンパクであってもよい。ある実施態様では、配列は、前述のように、配列変異種である。

【0262】

ある実施態様では、癌関連タンパクは、約14から24アミノ酸長の断片である。ある実施態様では、断片は可溶性断片である。ある実施態様では、断片は、非膜貫通領域を含む。ある実施態様では、断片は、可溶性を助長するためにN末端Cysを有する。ある実施態様では、断片のC末端は、遊離酸のままとされており、N末端は、例えば、システインとの結合を助けるために遊離アミンである。

【0263】

ある実施態様では、癌関連タンパクは、前述したように、免疫原因子に接合される。ある実施態様では、癌関連タンパクは、BSAに接合される。

【0264】

ある実施態様では、SEM4Dの発現産物の生物機能を変えるためにスクリーニングが行われる。再び、ある遺伝子を、ある特定の状態において重要であると特定した後、該遺伝子に結合する薬剤、および／または、その遺伝子産物の生物活性を調節する薬剤に対するスクリーニングがさらに詳細に後述される。

【0265】

ある実施態様では、先ず、癌関連タンパクに結合することが可能な候補薬剤を見つけるためにスクリーニングが設計され、次に、これらの薬剤は、該候補薬剤の、癌関連タンパクの活性および表現型に対する調節能力を評価するアッセイにおいて使用される。このようにして、当業者には理解されるように、いくつかの異なるアッセイ、すなわち、結合アッセイおよび活性アッセイが実行される。

【0266】

ある実施態様では、結合アッセイが実行される。一般に、精製または単離遺伝子産物が使用される。すなわち、1種以上の癌関連核酸の遺伝子産物が作製される。一般に、これは、従来技術で既知のとおりに行われる。例えば、タンパク遺伝子産物に対して抗体が生成され、存在するタンパク量の定量のために標準的イムノアッセイが実施される。ある実施態様では、癌関連タンパクを含む細胞がこのアッセイに使用される。

【0267】

したがって、ある実施態様では、方法は、癌関連タンパクと候補生物活性剤を混ぜ合わせ、候補薬剤の、癌関連タンパクに対する結合を定量することを含む。ある実施態様は、ヒトまたはマウスの癌関連タンパクを利用するが、他の哺乳動物のタンパクも、例えば、ヒトの疾患の動物モデルの開発のために使用することが可能である。ある実施態様では、本明細書で略述したように、癌関連タンパクの変異種または誘導体を使用される。

【0268】

本発明の方法のある実施態様では、癌関連タンパクまたは候補薬剤は、分離されたサンプル受容区域を持つ不溶支持体（例えば、マイクロタイタープレート、アレイ等）に非瀰漫性に結合する。この不溶の支持体は、組成物が結合可能であり、可溶材料から簡単に分離することができ、かつその他の点で、スクリーニング全体の方法を妨げない限り、任意の組成物で構成されてよい。この支持体の表面は、固体であっても、多孔性であってもよく、好適であれば、任意の形状を持っていてよい。好適な不溶の支持体の例として、マイクロタイタープレート、アレイ、膜、およびビーズが挙げられる。これらは通常、ガラス、プラスチック（例えば、ポリスチレン）、ポリサッカリド、ナイロン、またはニトロセルロース、テフロン（登録商標）からできている。マイクロタイタープレートおよびアレイは、多数のアッセイが少量の試薬とサンプルを用い同時に実行が可能なので、特に好都合である。

【0269】

組成物の特定の結合法は、試薬と本発明の方法全体を妨げず、組成物の活性を維持し、非瀰漫性である限り、必須ではない。ある結合法は、抗体（タンパクが支持体に結合した

10

20

30

40

50

場合も、リガンド結合、または活性化配列を立体的に阻止することがない)の使用、「粘着性」またはイオン性支持体に対する結合、化学的架橋、表面でのタンパクまたは薬剤の合成等を含む。タンパクまたは薬剤の結合の後、過剰な、未結合材料は洗浄によって除去される。次に、サンプル受容区域を、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、またはその他の無毒のタンパクまたは他の成分とインキュベーションすることによってブロックしてもよい。

【0270】

ある実施態様では、癌関連タンパクが支持体に結合され、候補生物活性剤がアッセイに加えられる。ある実施態様では、候補薬剤が支持体に結合され、癌関連タンパクが加えられる。新規結合剤としては、特異的抗体、化学ライブラリーのスクリーニングによって特定された非天然結合剤、またはペプチド類縁体が挙げられる。特に興味あるのは、ヒトの細胞に対して低い毒性しか示さない薬剤に対するスクリーニングアッセイである。この目的のために多種のアッセイ、例えば、標識された、インビトロタンパク-タンパク結合アッセイ、電気泳動移動アッセイ、タンパク結合に対するイムノアッセイ、機能的アッセイ(リン酸化アッセイ等)等を含むアッセイの使用が可能である。

【0271】

癌関連タンパクに対する候補生物活性剤の結合の定量は、いくつかの方法で実行することが可能である。ある実施態様では、候補生物活性剤は標識され、結合は直接定量される。例えば、これは、癌関連タンパクの全てまたは一部を固相支持体に付着させ、標識候補薬剤を加え(例えば、蛍光ラベル)、過剰な試薬を洗い流し、かつ、標識が固相支持体の上にあるかどうかを決めることによって実行される。従来技術で知られるとおりの、各種ブロック工程および洗浄工程の利用が可能である。

【0272】

ある実施態様では、成分の内の一つだけが標識される。例えば、タンパク(またはタンパク様候補薬剤)は、 ^{125}I または蛍光発色団を用いてチロシン位置において標識されてもよい。それとは別に、一つを超える成分が別々のラベルで、例えば、タンパクに対しては ^{125}I で、候補薬剤に対しては蛍光発色団で標識されてもよい。

【0273】

ある実施態様では、候補生物活性剤の結合は、競合的結合アッセイの使用によって決定される。ある実施態様では、競争相手は、標的分子(すなわち、癌関連タンパク)に対し結合することが知られる結合成分、例えば、抗体、ペプチド、結合パートナー、リガンド等である。ある条件下では、生物活性剤と結合性成分の間には、結合性成分が生物活性剤を押し除ける形での、競合的結合がある場合がある。

【0274】

ある実施態様では、候補生物活性剤が標識される。候補生物活性剤または競争相手のどちらか、または両方が、先ず、タンパクに対し、結合がもしあれば、結合のために十分な時間添加される。インキュベーションは、最適な活性を促進するものであれば任意の温度で行ってよいが、通常4から40℃である。インキュベーション期間は、最適活性のために選ばれるが、さらに、高速で、高効率スクリーニングを促進するように最適化されてもよい。典型的には、0.1から1時間で十分である。過剰な試薬は、一般に、取り除かれ、または洗い流される。次に、第2成分が添加され、結合を指示する標識成分の有無が追跡される。

【0275】

ある実施態様では、競争相手が先ず添加され、次いで候補生物活性剤が加えられる。競争相手の押し退けが、候補生物活性剤が、癌関連タンパクに対して結合し、したがって、その癌関連タンパクの活性を調節する可能性を持つことの裏づけとなる。ある実施態様では、どちらかの成分が標識される。したがって、例えば、競争相手が標識された場合、洗浄液におけるラベルの存在が、薬剤による押し退けを示すことになる。ある実施態様では、候補生物活性剤が標識される場合、支持体の上の標識の存在が押し退けを示すことになる。

10

20

30

40

50

【0276】

ある実施態様では、候補生物活性剤が先ず添加され、インキュベーション、洗浄され、次に競争相手が添加される。競争相手による結合の欠如は、生物活性剤の方が高い親和度で癌関連タンパクに結合することを示すと考えられる。したがって、候補生物活性剤が標識されている場合、支持体の上のラベルの存在は、これに競争相手の結合の欠如が組み合わせると、候補薬剤は、癌関連タンパクに結合することが可能であることを示すと考えられる。

【0277】

ある実施態様では、方法は、癌関連性タンパクの活性を調節することが可能な複数の生物活性剤を特定するための差次的スクリーニングを含む。この実施態様では、方法は、癌関連タンパクと競争相手を第1サンプルにおいて混ぜ合わせることを含む。第2サンプルは、候補生物活性剤、癌関連タンパク、および競争相手を含む。競争相手の結合は、両サンプルにおいて定量されるが、この二つのサンプルの間の結合における変化または差は、癌関連タンパクに結合することが可能な、したがって、その活性を調節することが可能な薬剤の存在を示す。すなわち、競争相手の結合が、第1サンプルに対して第2サンプルにおいて異なっているとすると、薬剤は、癌関連タンパクに結合することが可能である。

【0278】

ある実施態様では、未処理の癌関連タンパクには結合するが、修飾された癌関連タンパクには結合することができない薬剤候補を特定するために差次的スクリーニングが利用される。癌関連タンパクの構造がモデル化され、その部位と相互作用を持つ薬剤を合成するための理論的薬剤設計において使用される。癌関連生物活性に影響を及ぼす薬剤候補もまた、薬剤について、そのタンパクの活性を強化するか、または抑える能力についてスクリーニングすることによって特定される。

【0279】

アッセイには陽性コントロールおよび陰性コントロールを使用してよい。ある実施態様では、全てのコントロールおよび試験サンプルは、統計的に有意な結果を得るために三重に実行される。全てのサンプルのインキュベーションは、薬剤がタンパクに結合するのに十分な時間行われる。インキュベーション後、全てのサンプルが洗浄され、非特異的結合材料を流され、結合した、一般には、標識された薬剤の量が定量される。例えば、放射性ラベルが用いられる場合、サンプルは、結合化合物の量を決めるためにシンチレーションカウンターでカウントされてもよい。

【0280】

他の、種々の試薬もスクリーニングアッセイに含まれてよい。そのようなものとして、最適なタンパク-タンパク結合を促進し、および／または、非特異的または背景相互作用を抑える試薬、例えば、塩、中性タンパク、例えばアルブミン、界面活性剤等が挙げられる。さらに、その他のやり方でアッセイの効率を上げる試薬、例えば、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等を加えてもよい。成分の混合物を、必要な結合を実現する限り、任意の順序で添加してもよい。

【0281】

癌関連タンパクの活性を調節する薬剤のスクリーニングを行ってもよい。ある実施態様では、癌関連タンパクの活性を調節することが可能な生物活性剤を選ぶスクリーニング法は、上述のような癌関連タンパクのサンプルに候補生物活性剤を加えること、および、癌関連タンパクの生物活性の変化を定量することを含む。「癌関連タンパクの活性を調節する」とは、活性の増大、活性の減少、または、現在の活性のタイプまたは種類の変化を含む。したがって、ある実施態様では、候補薬剤は、本明細書に定義されるとおりに、癌関連タンパクに結合し（これは必要でない場合もあるが）、その生物学的または生化学的活性を変えなければならない。方法は、一般に前述したようなインビトロスクリーニング法、および、癌関連タンパクの有無、分布、または活性または量における変化に関し細胞を調べるインビボスクリーニングの両方を含む。

【0282】

したがって、ある実施態様では、方法は、癌関連サンプルと候補生物活性剤を混ぜ合わせ、癌関連活性に及ぼす作用を評価することを含む。本明細書における「癌関連活性」またはその文法的等価物は、癌関連タンパクの生物活性、例えば、腫瘍誘発、例えば、細胞分裂、細胞増殖、癌増殖、癌細胞の生存、細胞の形質転換を含む腫瘍誘発への関与、の内の一つを意味する。ある実施態様では、癌関連活性は、上に特定した癌関連遺伝子から得られた核酸によってコードされるタンパクの活性化、またはタンパクによる活性化を含む。癌関連活性の阻害剤は、癌関連活性の内から任意に選ばれる一つ以上の活性の抑制因子である。

【0283】

ある実施態様では、癌関連タンパクの活性は増大し、ある実施態様では、癌関連タンパクの活性は減少する。したがって、生物活性剤は、ある実施態様では拮抗剤であり、ある実施態様では作用剤である。

【0284】

ある実施態様では、本発明は、癌関連タンパクの活性を調節することが可能な生物活性剤をスクリーニングする方法を提供する。方法は、上に定義した候補生物活性剤を、癌関連タンパクを含む細胞に投与することを含む。好ましい細胞タイプは、ほとんど全ての細胞を含む。細胞は、癌関連タンパクをコードする組み換え核酸を含む。ある実施態様では、候補薬剤のライブラリーが、複数の細胞に対して試験される。

【0285】

ある実施態様では、アッセイは、生理的信号、例えば、ホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、増殖因子、活動電位、化学療法剤を含む製剤、放射線、発癌物質、または他の細胞（すなわち、細胞対細胞接触）に対する、アッセイ前またはアッセイ後の暴露の有無について評価される。

【0286】

このようにして、生物活性剤が特定される。薬理活性を持つ化合物は、癌関連タンパクの活性を強化または妨害することができる。

【0287】

癌の診断と治療

本発明によって、癌細胞分裂を抑制する方法が提供される。ある実施態様では、癌増殖を抑制する方法が提供される。ある実施態様では、癌を持つ細胞または個体を治療する方法が提供される。

【0288】

方法は、癌抑制剤の投与を含む。ある実施態様では、癌抑制剤は、アンチセンス分子、製薬組成物、治療剤または小型分子、またはモノクローナル、ポリクローナル、キメラ、またはヒト化抗体である。ある実施態様では、治療剤は、抗体と結合される。ある実施態様では、治療剤はモノクローナル抗体と結合される。

【0289】

さらに、個体における癌細胞の検出または診断法が提供される。ある実施態様では、診断／検出剤は、本発明に従って癌関連タンパクに好んで結合する小型分子である。ある実施態様では、診断／検出剤は抗体である。

【0290】

本発明のある実施態様では、癌の動物モデル、特にリンパ腫、白血病、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、または皮膚癌の動物モデルを生成するのに使用される動物モデルおよびトランスジェニック動物が提供される。

【0291】

(a) アンチセンス分子

使用される癌抑制剤は、アンチセンス分子であってもよい。本明細書で用いられるアンチセンス分子は、癌分子の標的mRNA（センス）またはDNA（アンチセンス）配列に結合することが可能な、1本鎖核酸配列（RNAかDNA）を含む、アンチセンスまたは

10

20

30

40

50

センスオリゴヌクレオチドである。本発明による、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、一般に、約14から約30ヌクレオチドから成る断片を含む。任意のタンパクをコードするcDNA配列に基づいてアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを得る能力が、例えば、Stein and Cohen, Cancer Res. 48: 2659, (1988) and van der Krol et al., BioTechnologies 6: 958, (1988)に記載される。

【0292】

アンチセンス分子は、修飾または未修飾RNA, DNA, または混合ポリマーオリゴヌクレオチドであってもよい。これらの分子は、マッチ配列に特異的に結合し、立体的阻害またはRNAアーゼH酵素を活性化することによってペプチド合成の抑制をもたらす(Wu-Pong, Nov 1994, BioPharm, 20-33)。アンチセンス分子はまた、RNA処理、または、RNAの、核から細胞原形質への輸送を妨げることによってタンパク合成を変えることが可能である(Mukhopadhyay & Roth, 1996, Crit. Rev. in Oncogenesis 7, 151-190)。さらに、1本鎖DNAのRNAに対する結合は、ヘテロ二重鎖のヌクレアーゼ介在分解をもたらすことが可能である(Wu-Pong, 上記)。これまでRNAアーゼHの基質として作用することが明らかにされているバックボーン修飾DNA化合物は、フォスフォロチオエート、フォスフォロジチオエート、ボロントリフルオリデート、および2'-アラビノ、および2'-フルオロアラビノ含有オリゴヌクレオチドである。

【0293】

アンチセンス分子は、WO91/04753に記載されるように、リガンド結合分子と結合体を形成することによって、標的ヌクレオチド配列を含む細胞の中に導入されてもよい。好適なリガンド結合分子としては、細胞表面受容体、増殖因子、他のサイトカイン、または、細胞表面受容体に結合する他のリガンドが挙げらるが、ただしこれらに限定されない。リガンド結合分子の接合は、そのリガンド結合分子の、対応する分子または受容体に結合する能力を実質的に妨げない、あるいは、そのセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはその接合修飾体の、細胞への侵入を妨げないことが好ましい。ある実施態様では、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO90/10448に記載されるように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体を形成することによって標的核酸配列を含む細胞中に導入される。アンチセンス分子、または、ノックアウトおよびノックインモデルの使用は、治療法の外に、前述のスクリーニングアッセイにも実行が可能であることが理解される。

【0294】

(b) RNA干渉

RNA干渉とは、短い、干渉性RNA (siRNA) によって仲介される、動物における、配列特異的、翻訳後の遺伝子沈黙化の過程を指す(Fire et al., Nature, 391, 806 (1998))。植物における相当する過程は、翻訳後遺伝子沈黙化、またはRNA沈黙化と呼ばれ、さらに、真菌では鎮圧と呼ばれる。細胞におけるdsRNAの存在は、未だ完全に解明されていない機構を通じてRNAi反応を起動する。この機構は、dsRNA介在性の、タンパクキナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレートシンテターゼの活性化、これはリボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断をもたらすが、とは異なるようである(Sharp, P. A., RNA interference-2001, Genes & Development 15: 485-490 (2001)に総覧がある)。

【0295】

短鎖干渉性RNA (siRNA) とは、RNA干渉(RNAi) という名で知られる過程を通じて、培養哺乳類細胞において遺伝子の発現を抑制するように設計される、強力な配列特異的試薬である。Elbashir, S. M. et al., Nature 411: 494-498 (2001); Caplan, N. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-9747 (2001); Harbo

r t h, J. et al. J. Cell Sci. 114: 4557-4565 (2001)。「短鎖干渉性RNA」または“siRNA”とは、RNA干渉“RNAi”を実行することが可能な2本鎖核酸分子を指す(Kreutzer et al., WO00/44895; Zernicka-Goetz et al. WO01/36646; Fire, WO99/32619; Mello and Fire, WO01/29058参照)。本明細書で用いる場合、siRNA分子はRNA分子に限定されるが、さらに、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドを含む。siRNA遺伝子標的実験は、細胞に対する、siRNAの一過性の転送によって実行される(例えば、リボソーム介在性トランスフェクション、電気穿孔、またはマイクロインジェクションのような古典的な方法によって実現される)。

10

【0296】

siRNA分子は、15から30、18から25、または21から23ヌクレオチドRNAであり、長い2本鎖RNA(dsRNA)の、RNアーゼIII処理産物によく似た2から3ヌクレオチドの3'-オーバーハング、これが通常RNAiを起動する、によって特徴づけられる。細胞に導入されると、siRNA分子は、エンドヌクレアーゼ複合体(RNA誘発沈黙化複合体)の、まだよく特定されていないタンパクと集合する。次に、この複合体が、標的mRNAの切断を導く。標的mRNAの分解の結果、対応するタンパクの抑制に特徴的な特異的表現型を持つ細胞が得られる。従来のアンチセンス分子に比べて、siRNAが小型であるために、哺乳類細胞中に存在するdsRNA誘発性インターフェロンシステムの活性化が防がれる。これによって、30塩基対を超えるdsRNAによって、通常、体細胞内で引き起こされる非特異的表現型が回避される。

20

【0297】

小型RNA分子の細胞内転写は、siRNA鋳型を、通常、小型核RNA(snRNA)U6またはヒトのRNアーゼP RNA H1をコードする、RNAポリメラーゼIII(Pol III)転写ユニット中でクローンすることによって実現される。siRNAを発現するために二つの方法が開発されている。第1の方法では、siRNAを構成するセンスおよびアンチセンス鎖が、個別のプロモーターによって転写される(Lee, N. S. et al. Nat. Biotechnol. 20, 500-505 (2002); Miyagishi, M. & Taira, K. Nat. Biotechnol. 20, 497-500 (2002))。第2の方法では、siRNAは、折り返しステムループ構造として発現され、これが、細胞内処理後にsiRNAを生じる(Paul, C. P. et al. Nat. Biotechnol. 20: 505-508 (2002))。導入されたDNA鋳型から得られるsiRNAの内因性発現は、外来性siRNA輸送のいくつかの制限、特に、表現型の一過性の消失を克服すると考えられている。U6およびH1 RNAプロモーターは、Pol IIIプロモーターのタイプIIIのメンバーである。(Paule, M. R. & White, R. J. Nucleic Acids Res. 28, 1283-1298 (2000))。

30

【0298】

センスおよびアンチセンスsiRNAの同時発現は、標的遺伝子の沈黙化を仲介するが、一方、センスまたはアンチセンスsiRNA単独の発現は、標的遺伝子の発現にはあまり影響しない。合成siRNAの代わりに、プラスミドDNAをトランスフェクトする方が、RNアーゼの汚染の危険、および、化学的に合成されるsiRNAまたはsiRNA転写キットのコストを考えると、有利のようである。siRNAの安定な発現は、新規遺伝子治療応用、例えば、持続性ウィルス感染の治療を可能とする。siRNAの高度の特異性を考慮すると、この方法はまた、点突然変異、例えば、RASまたはTP53癌遺伝子転写物によって、疾患由来転写物を、残余の野生型対立遺伝子を変えることなく、標的とすることを可能とする。最後に、各種ゲノムの高処理配列分析によって、DNA依存性技術が、特に、小型化アレイによる表現型スクリーンと組み合わせられた場合、自動化、汎ゲノム機能喪失表現型分析のための、コスト当たり有効な代替策となる可能性がある(Ziauddin, J. & Sabatini, D. M. Nature 411: 107-

40

50

110(2001))。

【0299】

細胞中の長いdsRNAの存在は、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼIIIの活性を刺激する。ダイサーは、dsRNAを処理して、短鎖干渉性RNA(sRNA)と呼ばれるdsRNAの短い断片とする(Bernstein et al., 2001, Nature, 409:363(2001))。ダイサー活性から得られる短鎖干渉性RNAは、通常、約21-23ヌクレオチド長であり、約19塩基対の2重鎖を含む。ダイサーはまた、翻訳調節に関わる保存構造の先駆RNA由来の、21および22ヌクレオチドの小型一過性RNAの切断にも関与する(Hutvagner et al., Science, 293, 834(2001))。RNAi反応はまた、一般にRNA誘発沈黙化複合体(RISC)と呼ばれる、sRNAを含むエンドヌクレアーゼ複合体によっても特徴づけられる。この複合体は、sRNAに相同な配列を持つ1本鎖RNAの切断を仲介する。標的RNAの切断は、sRNA複合体のガイド配列に対して相補的な領域の真ん中で起こる(Elbashir et al., Genes Dev., 15, 188(2001))。

【0300】

本発明は、癌関連性配列に対してハイブリダイズすることが可能な配列を含む、単離された核酸分子を含む発現システムを提供する。ある実施態様では、この核酸分子は、該癌関連タンパクの発現を抑制することが可能である。細胞内部で癌関連遺伝子の発現を抑制する方法は、短いRNAのベクター指令発現を利用する。短いRNAは、それ自身で折り畳まって、癌関連mRNA配列と同一性を持つ2本鎖RNAを形成し、細胞内部において、この癌関連遺伝子の翻訳後沈黙化、すなわち、RNA干渉(RNAi)を誘発することが可能である。ある実施態様では、癌関連mRNA配列同一性を持つ、短い2本鎖RNAが細胞内に輸送されて、その癌関連遺伝子の翻訳後遺伝子沈黙化、すなわち、RNAiを起動する。様々の実施態様において、核酸分子は、少なくとも7マー、少なくとも10マー、または少なくとも20マーである。ある実施態様では、配列は一意である。ある実施態様では、sRNAオリゴヌクレオチドは、配列番号7の配列を持つ。

【0301】

本発明人等は、SEMA4Dに対する機能的sRNAは、ヒトの腫瘍細胞系統において増殖および細胞移動を阻止することを見出した。これは、前述の本発明の局面を支持する。

【0302】

(c) 製薬組成物

本発明によって覆われる製薬組成物は、活性剤として、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、または、本発明に開示される抗体を、治療的に有効な量において含む。「有効量」とは、臨床結果を含め、治癒的な、または所望の結果を実現するのに十分な量である。有効量は、1回以上の投与回数として投与することも可能である。本発明の目的のためには、アデノウィルスベクターの有効量は、病状の進行を緩和、寛解、安定化、逆転、低速化、または遅延するのに十分な量である。

【0303】

組成物は、癌を治療するばかりでなく、一次癌の転移を治療するのに使用することが可能である。さらに、製薬組成物は、従来の癌治療法と組み合わせて、例えば、放射線または従来の化学療法に対する腫瘍の感受性を高めるために使用することが可能である。「治療」、「治療すること」、「治療する」等は、本明細書では、一般に、所望の薬理学的および／または生理学的効果を実現することを指す。効果は、疾患、またはその症状を完全にまたは部分的に防ぐという点で予防的であってもよいし、および／または、疾患、および／または、疾患が原因の有害作用を部分的または完全に安定化また治癒するという点で治療的であってもよい。本明細書で用いる「治療」は、哺乳動物、特に、ヒトの疾患の全ての治療をカバーし、(a)病気または症状にかかり易い素因を持ちながら、まだそれに罹っていると診断されていない被験体において、その病気または症状の発生を防ぐこと；

(b) 病気の症状を抑制すること、すなわち、その悪化を止めること；または(c) 病気の症状を楽にすること、すなわち、病気または症状の寛解をもたらすことを含む。

【0304】

製薬組成物が、差次的に発現されるポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物に特異的に結合する抗体を含む場合、抗体は、治療部位への輸送のために薬剤と結合されてもよいし、あるいは、癌細胞、例えば、前立腺癌細胞を含む部位の画像記録を助けるために検出可能なラベルと結合されてもよい。抗体を、薬剤および検出可能なラベルに結合する方法は、検出可能なラベルを用いて画像記録する方法と同様、従来技術でよく知られる。

【0305】

ある実施態様では、本発明による抗体、および、製薬学的に好適な担体、賦形剤、または希釈剤を含む製薬組成物が提供される。ある実施態様では、製薬組成物はさらに、第2治療剤を含む。さらに別の実施態様では、第2治療剤は、癌化学療法剤である。

【0306】

本発明の目的のためには「患者」は、ヒトおよび他の動物、特に哺乳類、および生物体を含む。したがって、本法は、ヒトの治療と、獣医学的応用の両方に適用が可能である。ある実施態様では、患者は哺乳動物であり、好ましくは患者はヒトである。ひとつの標的癌患者集団は、最近癌の治療、特に、本明細書で言及した特異的な癌タイプについて治療を受けている全ての患者である。このような患者集団のサブセットは、ここ6ヶ月以内に以前に治療した癌の寛解を経験した人々、および、ここ6ヶ月において病気が進行した患者を含む。

【0307】

本明細書で用いる「治療的有効量」という用語は、病気または病状を治療、緩和、寛解、または予防するのに、または、検出可能な治療または予防効果を示すのに有効な治療剤の量を指す。効果は、例えば、化学的マーカーまたは抗原レベルによって検出される。治療効果はまた、物理的症状の沈静、例えば、体温の低下を含む。被験体に対する正確な有効量は、被験体のサイズおよび健康、病状の性質および程度、および、投与のために選ばれた治療剤、および治療剤同士の組み合わせに依存する。ある任意の状況における有効量は、通例の実験によって決められるが、臨床家の判断の範囲にある。本発明の目的のためには、有効用量は、一般に、投与される個体における本発明の組成物の量として約0.01 mg/kgから約5 mg/kg、約0.01 mg/kgから約50 mg/kg、または約0.05 mg/kgから約10 mg/kgである。

【0308】

製薬組成物はまた、薬学的に受容可能な担体を含んでもよい。「薬学的に受容可能な担体」という用語は、治療剤、例えば、抗体、ポリペプチド、遺伝子、およびその他の治療剤の投与のための担体を指す。この用語は、それ自体が、その組成物を受容する個体に対し有害な抗体の生産を誘起することがなく、不当な毒性の心配なく投与することが可能な任意の製薬学的担体を指す。好適な担体は、大型で、代謝の遅い巨大分子、例えば、タンパク、ポリサッカリド、ポリ酢酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、および、不活性ウィルス粒子である。このような担体は、当業者にはよく知られる。治療組成物における薬学的に受容可能な担体は、液体、例えば、水、生食液、グリセロール、およびエタノールを含むことが可能である。補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等もこのベヒクルの中に存在することが可能である。ある実施態様では、治療組成物は、溶液または懸濁液の注入物として調製され、また、注入前に液体ベヒクルにおいて溶液または懸濁液とするのに好適な固形として調製される。リボソームは、薬学的に受容可能な担体の定義の中に含まれる。薬学的に受容可能な塩、例えば、鉍酸塩、例えば、塩化水素物、臭化水素物、リン酸塩、硫酸塩等、および有機酸の塩、例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等も製薬組成物の中に存在することが可能である。薬学的に受容可能な賦形剤に関する徹底的な考察が、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (199

10

20

30

40

50

5) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkinsで見ることができる。

【0309】

製薬組成物は、様々な形、例えば、顆粒、錠剤、丸剤、坐剤、カプセル、懸濁液、塗布剤、ローション等として調製することが可能である。経口のおよび局所的使用のために好適な、製薬級有機または無機の担体および／または希釈液を用いて、治療的活性化合物を含む組成物を補うことが可能である。従来技術に既知の希釈液としては、水性媒体、植物および動物油および脂肪が挙げられる。安定化剤、湿潤剤、および乳化剤、浸透圧を変えるための塩、または、十分なpH値を確保するためのバッファー、および皮膚浸透強化剤も補助剤として使用することが可能である。

10

【0310】

本発明の製薬組成物は、患者に投与するのに好適な形で癌関連タンパクを含む。ある実施態様では、製薬組成物は、水溶性形として、例えば、薬学的に受容可能な塩として存在する。この塩は、酸添加塩および塩基添加塩の両方を含む。「薬学的に受容可能な酸添加塩」とは、遊離塩基の生物学的効果を維持しながら、生物学的、またはその他の点で有害な作用を持たず、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等、および有機酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、シナモン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等によって形成される。「薬学的に受容可能な塩基添加塩」とは、無機塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム塩等から得られるものを含む。特に好ましいのは、アンモニウム、カリウム、ナトリウム、カルシウム、およびマグネシウム塩である。薬学的に受容可能な有機性非毒性塩基より得られる塩としては、一級、二級、および三級アミン、天然の置換アミンを含む置換アミン、環状アミン、および塩基性イオン交換アミン、例えば、イソプロピラミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、およびエタノールアミンが挙げられる。

20

【0311】

製薬組成物はまた、下記の内の一つ以上を含んでもよい。すなわち、担体タンパク、例えば、血清アルブミン；バッファー；充填剤、例えば、微細結晶セルロース、ラクトース、コーンおよび他のでん粉；結合剤；甘味剤およびその他の香味剤；着色剤；および、ポリエチレングリコールである。添加剤は、従来技術でよく知られており、様々な処方で使用されている。

30

【0312】

所望の薬理活性を持つ化合物は、前述したように、生理学的に受容可能な担体において宿主に投与されてよい。製薬組成物は、様々なルート、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、脊髄腔内、脊髄下腔内、脳室内、経皮、または皮膚貫通投与（例えば、WO98/20734参照）、皮下、腹腔内、鼻腔内、経腸、局所、舌下、腔内、または直腸経由を含むルートに投与してよいが、ただしルートはこれらに限定されない。導入の方法に応じて、化合物は、様々なやり方で処方されてよい。処方における治療的活性化合物の濃度は、約0.1-100%重量/容量で変動してよい。一旦処方されたならば、本発明が考慮の対象とする組成物は、（1）直接被験体に投与される（例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、小型分子作用剤、または拮抗剤等として）；または（2）被験体から得られた細胞に体外で（例えば、体外遺伝子治療として）輸送される。組成物の直接輸送は、非経口的注入、例えば、皮下、腹腔内、静脈内または筋肉内、腫瘍内、または組織の介在空間への注入によって実現される。他の投与方式としては、経口および肺投与、坐剤、および経皮投与、針、および遺伝子ガン（ワールドワイドウェブのpowderject.comサイトを参照）、または微粒噴霧が挙げられる。投与治療は、単一投与スケジュールか、または複数投与スケジュールである。

40

【0313】

50

形質転換された細胞の体外輸送および、被験体への再移植のための方法は、従来技術で既知であり、例えば、WO 93/14778に記載される。体外応用において有用な細胞の例として、例えば、幹細胞、特に造血幹細胞、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、または癌細胞が挙げられる。一般に、体外およびインビトロ応用のための核酸輸送は、従来技術でよく知られるように、例えば、デキストラン介在トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン介在トランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔、ポリヌクレオチド（単複）のリボソーム内封入、および、DNAの核内への直接的マイクロインジェクションによって実現される。

【0314】

SEMA4Dの差次的発現が、増殖性障害、例えば、新形成、異形成、および過形成と相関することが判明したならば、その障害は、提示されたポリヌクレオチド、対応するポリペプチドまたは他の対応分子（例えば、アンチセンス、リボザイム等）に基づく治療剤を投与することによって治療に対応させることができる。別の実施態様では、障害は、例えば、正常細胞に比べて癌細胞において発現が増す遺伝子の遺伝子産物の機能の阻害剤（拮抗剤）として、あるいは、癌細胞において発現が低下する遺伝子産物に対する作用剤として（例えば、癌抑制因子として活動する遺伝子産物の活性を促進するように）低分子量薬剤の投与による治療に対応させることが可能である。

【0315】

本発明の製薬組成物の用量および投与手段は、治療組成物の特異的性質、患者の病状、年齢、および体重、病気の進行、および他の関連因子に基づいて決められる。例えば、ポリヌクレオチド治療組成物剤の投与は、局所的または全身的投与、例えば、注入、経口投与、パーティクルガンまたは経カテーテル投与、および局所投与を含む投与が挙げられる。治療的ポリヌクレオチド組成物は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドの少なくとも12、22、25、30、または35連続ntから成るポリヌクレオチドに動作可能的に連結されるプロモーターを含む発現構築体を含むことが好ましい。この治療組成物を、生体内の特定部位に直接投与するためには様々な方法の使用が可能である。例えば、小さな転移病巣の場所が特定されると、治療組成物は、腫瘍の塊の中の、いくつかの異なる場所に数回注入される。別に、腫瘍を支える動脈が特定されると、治療組成物は、その動脈の一つに、組成物を直接腫瘍に輸送するように注入される。壊死中心を持つ腫瘍は吸引され、組成物は、腫瘍の、今や空虚となった中心に直接注入される。アンチセンス組成物は、腫瘍の表面に、例えば、組成物を局所塗布することによって直接投与される。上記輸送法のあるものでは、補助としてX線撮影法が使用される。

【0316】

アンチセンスポリヌクレオチド、ゲノム未満ポリヌクレオチド、または、特定組織に対する抗体を含む治療組成物の標的照準輸送も使用が可能である。受容体介在性DNA輸送技術は、例えば、Findenis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338に記載される。ポリヌクレオチドを含む治療組成物は、遺伝子治療プロトコルにおける局所投与では、約100ngから約200mgの範囲のDNAとして投与される。約500ngから約50mg、約1μgから約2mg、約5μgから約500μg、および約20μgから約100μgのDNAも、遺伝子治療プロコル実施時使用が可能である。要因、例えば、作用法（例えば、コードされた遺伝子産物のレベルを強調する、または抑制する）、および、形質転換および発現の効率も、アンチセンスゲノム未満ポリヌクレオチドの最終的効力に必要な用量に影響するという点で考慮の対象となる。比較的大きな面積の組織において

比較的大きな発現が望ましい場合、明瞭な治療結果を実現するためには、比較的大量のアンチセンスゲノム未満ポリヌクレオチドが、または、例えば、腫瘍部位の、異なる隣接部位または近接組織部分に、連続投与プロトコルとして、数回投与する場合、同じ量が必要とされることがある。いずれにしろ、臨床治験における常例の実験が、最適治療効果のための特異的範囲を決定する。

【0317】

本発明の治療用ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子輸送ベヒクルを用いて輸送することが可能である。遺伝子輸送ベヒクルは、ウィルス起源のものであってもよいし、あるいは、非ウィルス起源のものであってもよい（一般的に、Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; and Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148を参照）。このコード配列の発現は、哺乳類の内因性または異種性プロモーターを用いて誘発することが可能である。コード配列の発現は、構成的、または調節的のいずれかであってもよい。

【0318】

所望のポリヌクレオチドの、所望の細胞における輸送と発現のためのウィルス系ベクターは、従来技術においてよく知られる。例示のウィルス系ベクターとしては、例えば、組み換えレトロウィルス（例えば、WO90/07936; WO94/03622; WO93/25698; WO93/25234; USPN5, 219, 740; WO93/11230; WO93/10218; USPN4, 777, 127; 英国特許第2, 200, 651号; EP0345242; およびWO91/02805を参照）、アルファウィルス系ベクター（例えば、シンドビスウィルスベクター、セムリキ森林ウィルス（ATCC VR-67; ATCC VR-1247）、ロス川ウィルス（ATCC VR-373; ATCC VR-1246）、およびベネズエラウマ脳炎ウィルス（ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532）、および、アデノ関連ウィルス（AAV）ベクター（例えば、WO94/12649, WO93/03769; WO93/19191; WO94/28938; WO95/11984およびWO95/00655を参照）挙げられるが、ただしこれらに限定されない。Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147に記載されるような、殺したアデノウィルスに連結されたDNAの投与の使用が可能である。

【0319】

非ウィルス輸送ベヒクルおよび方法、例えば、殺されたアデノウィルスのみに連結または非連結の、ポリ陽イオン縮合DNA（例えば、Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147を参照）；リガンド連結DNA（例えば、Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985参照）；真核細胞輸送ベヒクル細胞（例えば、US5, 814, 482; WO95/07994; WO96/17072; WO95/30763; およびWO97/42338参照）、および核電荷中和または細胞膜との融合も使用が可能であるが、ただしこれらに限定されない。未処理DNAも使用が可能である。例示の未処理DNA導入法は、WO90/11092およびUS5, 580, 859に記載される。遺伝子輸送ベヒクルとして作用することが可能なリポソームが、US5, 422, 120; WO95/13796; WO94/23697; WO91/14445; およびEP0524968に記載される。さらに別の方法が、Phillip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, およびWoffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581に記載される。

【0320】

使用に好適なさらに別の非ウィルス輸送として、機械的輸送システム、例えば、Woffendin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91(24):11581に記載される方法が挙げられる。さらに、コード配列、およびその発現産物も、光重合ヒドロゲル材料の沈着、または、電離放射によって輸送する

ことが可能である（例えば、U S 5, 2 0 6, 1 5 2 およびW O 9 2 / 1 1 0 3 3を参照）。コード配列輸送に使用が可能な、他の、好適な遺伝子輸送法としては、例えば、手動の遺伝子移送用パーティクルガン（例えば、U S 5, 1 4 9, 6 5 5参照）；移送遺伝子活性化のための電離放射の使用（例えば、U S P N 5, 2 0 6, 1 5 2およびW O 9 2 / 1 1 0 3 3参照）が挙げられる。

【0321】

ある実施態様では、癌関連タンパクおよび調節因子が、治療剤として投与され、前述のように処方される。同様に、癌関連遺伝子（全長配列、部分配列、または、癌関連コード領域の調節配列を含む）が、従来技術で知られるように、遺伝子治療応用において投与される。これらの癌関連遺伝子は、当業者には理解されるように、遺伝子治療（すなわち、ゲノムへの組み込みのため）としての、または、アンチセンス組成物としての、アンチセンスの応用を含めてもよい。

10

【0322】

したがって、ある実施態様では、細胞または生物における癌関連S E M A 4 D活性を調節する方法が提供される。ある実施態様では、方法は、内因性癌関連タンパクの生物活性を抑える、または除去する抗癌関連抗体を細胞に投与することを含む。ある実施態様では、方法は、癌関連タンパクをコードする組み換え核酸を細胞または生物に投与することを含む。当業者には理解されるように、このことは、任意の数の方法によって実現される。ある実施態様では、例えば、癌関連配列が癌において下方調整されている場合、癌関連発現産物の活性が、下記のやり方で促進される。すなわち、その細胞における癌関連発現の量を、例えば、内因性癌関連遺伝子を過剰発現させて増すか、あるいは、既知の遺伝子療法技術を用い、癌関連配列をコードする遺伝子を投与する。ある実施態様では、遺伝子治療技術は、例えば、P C T / U S 9 3 / 0 3 8 6 8に記載されるように、強化相同組み換え（E H R）による外来遺伝子の取り込みを含む。なお、上記特許文書の全体を引用により本明細書に含める。ある実施態様では、例えば、癌関連配列が、癌において上方調整されている場合、内因性癌関連遺伝子の活性を、例えば、癌関連アンチセンス核酸を投与することによって下げる。

20

【0323】

（d）ワクチン

ある実施態様では、癌関連遺伝子が、単一遺伝子、または複数の癌関連遺伝子の組み合わせとして、DNAワクチンとして投与される。未処理DNAワクチンは、一般に従来技術で既知である。B r o w e r, N a t u r e B i o t e c h n o l o g y, 1 6 : 1 3 0 4 - 1 3 0 5 (1 9 9 8)。

30

【0324】

ある実施態様では、本発明の癌関連遺伝子は、DNAワクチンとして使用される。DNAワクチンとしての遺伝子の使用法は、当業者にはよく知られているが、癌関連遺伝子、または癌関連遺伝子の一部を、癌の患者において発現されるように、プロモーターの制御の下に置くことを含む。DNAワクチン用として用いられる癌関連遺伝子は、癌関連の全長タンパクをコードすることも可能であるが、癌関連タンパク由来のペプチドを含む癌関連タンパクの部分にコードすることの方が好ましい。ある実施態様では、患者は、癌関連遺伝子から得られた複数のヌクレオチド配列を含むDNAワクチンによって免疫化される。同様に、複数の癌関連遺伝子、またはその部分によって患者を免疫化することも可能である。DNAワクチンによってコードされるポリペプチドの発現によって、癌関連タンパクを認識する、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、および抗体が誘発され、これらが、癌関連タンパクを発現する細胞を認識し、破壊または除去するのであろう。ただし、理論には拘束されない。

40

【0325】

ある実施態様では、DNAワクチンは、DNAワクチンと共に、アジュバント分子をコードする遺伝子を含む。このようなアジュバント分子は、DNAワクチンによってコードされる癌関連ポリペプチドに対する免疫原反応を増すサイトカインを含む。それ以外の、

50

またはそれに代わるアジュバントは、当業者には既知であり、本発明にも使用される。

【0326】

(e) 抗体

前述の癌関連抗体は、いくつかの用途で使用される。例えば、癌関連抗体は、標準的アフィニティークロマトグラフィーカラムに結合され、癌関連タンパクを精製するのに使用されてもよい。この抗体はまた、前述のように、癌関連タンパクに特異的に結合するので、ポリペプチドを阻止するものとして治療的に使用されてもよい。

【0327】

本発明はさらに、生物サンプルにおけるポリペプチドの有無を検出する、および／または、そのレベルを測定する方法を提供する。すなわち、癌関連ポリペプチドは、癌細胞において差次的に発現される癌関連ポリヌクレオチドによってコードされるが、そのコードされたポリペプチドに対して特異的な抗体によって検出または測定が可能である。この方法は、一般に、a) 前立腺癌細胞において差次的に発現される癌関連ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに対して特異的な抗体に、サンプルを接触させること；および、b) 抗体とサンプルの分子との間の結合を検出することを含む。

【0328】

適切なコントロールと比べて、コードされたSEMA4Dポリペプチドに対して特異的な抗体の特異的結合の検出は、コードされたポリペプチドがサンプル中に存在することの表示である。適切なコントロールとしては、コードされた癌関連ポリペプチドを含まないことが知られるサンプル、または、上昇レベルのポリペプチドを含まないことが知られるサンプルが挙げられる。例えば、正常組織、および、コードされたポリペプチドに対して特異的ではない抗体、例えば、抗-イディオタイプ抗体に接触させられたサンプルである。特異的抗体-抗原相互作用を検出するための各種の方法が従来技術で既知であり、例えば、標準的免疫組織学的方法、免疫沈降法、酵素免疫アッセイ、およびラジオ免疫アッセイを含む方法、ただしこれらに限定されない、が使用される。一般に、特異的抗体は、検出可能となるように、直接・間接に標識される。直接ラベルとしては、放射性同位元素；その生産物が検出可能な酵素（例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等）；蛍光ラベル（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン等）；蛍光発射金属、例えば、EDTAのような金属キレート基を介して抗体に付着した ^{152}Eu 、またはランタニドシリーズの他の金属；生物発光化合物、例えば、ルシフェリン、エクオリン（緑色蛍光タンパク）等が挙げられる。抗体は、不溶の支持体、例えば、ポリスチレンプレート、またはビーズに対して付着（結合）されてもよい。間接的ラベルとしては、コードされたポリペプチドに対して特異的な抗体（「一次抗体」）に対して特異的な二次抗体で、二次抗体は前述のように標識される；および、特異的結合ペアのメンバー、例えば、ビオチン-アビジン等が挙げられる。生物サンプルは、細胞、細胞粒子、または可溶性タンパクを固定することが可能な、固相支持体、または担体、例えば、ニトロセルロースに接触させられ、固定される。次に、支持体は、適切なバッファーによって洗浄され、次いで、検出可能に標識された特異的抗体によって接触される。検出法は従来技術で既知であり、検出可能ラベルによって発せられる信号に応じて適宜に選ばれる。検出は、一般に、適切なコントロールおよび適切な標準と比較して行われる。

【0329】

ある実施態様では、方法は、インビボ用に、例えば、癌細胞が存在する部位を特定するように適応される。この実施態様では、検出可能に標識される成分、例えば、癌関連ポリペプチドに対して特異的な抗体が、個体に投与され（例えば、注入によって）、標識細胞は、標準的画像記録技術、例えば、磁気共鳴画像法、コンピュータ断層撮影法等を含む技術によってその部位が特定される。このようにして、癌細胞は、差次的に標識される。

【0330】

(f) 癌の検出および診断のための他の方法

理論に拘束される意図はないが、本明細書に開示されるSEMA4D配列は、癌において重要なようである。したがって、癌関連遺伝子の突然変異または変異種による障害を確

10

20

30

40

50

定してもよい。ある実施態様では、本発明は、癌関連の変異遺伝子を含む細胞を特定する方法であって、細胞中の少なくとも一つの内因性癌関連遺伝子の配列の全てまたは一部を決定することを含む方法を提供する。当業者には理解されるように、これは、任意の数の配列決定技術によって実行することが可能である。ある実施態様では、本発明は、個体の癌関連遺伝子型を特定する方法であって、該個体の少なくとも一つの内因性癌関連遺伝子の配列の全てまたは一部を決定することを含む方法を提供する。この方法は、一般に、個体の少なくとも一つの組織において実行され、いくつかの組織、または、同じ組織の異なるサンプルの評価を含む。方法は、配列決定された癌関連遺伝子の配列を、既知の癌関連遺伝子、すなわち、野生型遺伝子と比較することを含んでもよい。当業者には理解されるように、いくつかの癌関連遺伝子の配列における変化は、病気の存在、病気を発症し易い傾向、または予後評価のいずれかの表示となる。

10

【0331】

次に、S E M A 4 D 遺伝子の全てまたは一部の配列を、既知の S E M A 4 D 遺伝子の配列と比較し、何かの違いがあるかどうかを決めることが可能である。これは、任意の数の既知の相同性プログラム、例えば、B e s t f i t 等を用いて実行することが可能である。ある実施態様では、患者の癌関連遺伝子と、既知の癌関連遺伝子の間に配列において差がある場合、それは、本明細書に述べるように、病的状態、または病的状態への傾向を示す。

【0332】

ある実施態様では、S E M A 4 D 遺伝子は、ゲノムにおける癌関連遺伝子のコピー数を定量するためのプローブとして使用される。例えば、ある癌は、染色体欠失または挿入を示し、遺伝子のコピー数の変化をもたらす。

20

【0333】

ある実施態様では、S E M A 4 D 遺伝子は、癌関連遺伝子の染色体位置を決めるためのプローブとして使用される。染色体位置のような情報は、特に、転座等の、染色体異常が、癌関連遺伝子座位に特定された場合、診断または予後評価の実施に使用される。

【0334】

本発明は、癌細胞を検出するために、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを使用する方法であって、被験体における癌の診断および癌の重度（例えば、腫瘍の等級、腫瘍負荷等）、被験体の予後判定、および、治療に対する被験体の反応性の評価（例えば、化学療法行程中または後における、例えば、腫瘍負荷の評価に基づいて治療効果の測定値を与えることによって）を助ける方法を提供する。検出は、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドの検出、および／または、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの検出に基づくことが可能である。本発明の検出法は、インビトロまたはインビボで、分離細胞において、または、全体組織で、または体液、例えば、血液、血漿、血清、尿等において実行することが可能である。

30

【0335】

ある実施態様では、癌細胞において差次的に発現される転写物の、細胞における発現を検出することによって、癌細胞を検出する方法が提供される。検出のためには、既知の種々の方法、例えば、前立腺癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによるハイブリダイゼーションによって転写物を検出すること；特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応による転写物の検出；前立腺癌細胞において差次的に発現される遺伝子に対してハイブリダイズするポリヌクレオチドをプローブとして用いる、細胞のインサイチュハイブリダイゼーションを含む既知の技術の内の任意のものの使用が可能である。ただし、技術はこれらに限定されない。この方法は、癌細胞において差次的に発現される遺伝子の m R N A レベルを検出および／または測定するために使用することが可能である。ある実施態様では、方法は、a) 本明細書に記載される、差次的に発現される遺伝子に対応するポリヌクレオチドに、ハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、サンプルを接触させること；および、b) もしあればハイブリダイゼーションを検出することを含む。

40

50

【0336】

差次的ハイブリダイゼーションの検出は、適切なコントロールと比較されると、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドの、サンプルにおける存在の表示となる。適切なコントロールとしては、例えば、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドを含まないことが知られるサンプル、および、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドと同じ「センス」を持つ標識ヌクレオチドの使用が挙げられる。ハイブリダイゼーションを可能とする条件は、従来技術で既知であり、既により詳細に記述してある。検出はまた、任意の既知の技術、例えば、インサイチュハイブリダイゼーション、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、RT-PCR（逆転写-PCR）、TMA、bDNA、およびNasba、および「ノーザン」またはRNAプロッティング、または適切に標識されたポリヌクレオチドを用いた、これらの技術の組み合わせによって実行することが可能であるが、ただし技術はこれらに限定されない。ポリヌクレオチドのためのラベルおよび標識法は、種々のものは従来技術で知られており、本発明のアッセイ法において使用が可能である。ハイブリダイゼーションの特異性は、適切なコントロールとの比較によって決めることが可能である。

10

【0337】

本明細書に提示されるポリヌクレオチドの、一般に、少なくとも10nt、少なくとも12nt、または少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが、種々の目的、例えば、前立腺癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドの検出および／または転写レベル測定のためのプローブとして使用される。当業者にはすぐに理解されるように、プローブは、検出可能に標識され、例えば、試験サンプルから得られた固定ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）を含むアレイと接触させられる。それとは別に、プローブをアレイの上に固定し、試験サンプルを検出可能に標識することも可能である。本発明の方法の、上記およびその他の変法も、十分関連分野に属し、本発明の範囲内にある。

20

【0338】

提示されるポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を検出するためにヌクレオチドプローブが使用される。ノーザンプロットでは、mRNAが電気泳動的に分離され、プローブに接触させられる。プローブは、ある特定のサイズのmRNA分子にハイブリダイズして検出される。ハイブリダイゼーションの量は、例えば、ある特定の条件下における、発現の相対量を求めることで定量される。プローブは、発現を検出するための、細胞に対するインサイチュハイブリダイゼーションのために使用される。プローブはまた、ハイブリダイズする配列の診断的検出のためにインビボで使用することも可能である。プローブは通常、放射性同位元素によって標識される。他のタイプの検出可能なラベル、例えば、発色団、蛍光発色団、および酵素を使用することも可能である。ヌクレオチドハイブリダイゼーションの他の例が、WO 92/02526およびUSPN 5,124,246に記載される。

30

【0339】

PCRは、少量の標的核酸を検出するためのもう一つの手段である（例えば、Mullis et al., Meth. Enzymol. (1987) 155:335; USPN 4,683,195; and USPN 4,683,202を参照）。標的核酸とハイブリダイズする二つのプライマーオリゴヌクレオチドを用いて、反応の下準備をする。プライマーは、本明細書に開示される癌関連ポリヌクレオチドの内部、3'および5'の配列から構成される。それとは別に、プライマーが、これらのポリヌクレオチドの3'および5'であるなら、プライマーは、それら、またはそれらの相補体にハイブリダイズする必要はない。熱安定的ポリメラーゼによって標的を増幅した後、増幅された標的核酸が、従来技術で既知の技術、例えば、サザンプロットによって検出される。mRNAまたはcRNAも、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)に記載されるような伝統的な技

40

50

術（例えば、サザンブロット、ノーザンブロット等）（例えば、PCR増幅無しで）によって検出することが可能である。一般に、ポリメラーゼ酵素によってmRNAから生成されるmRNAまたはcDNAは、ゲル電気泳動を用いて精製、分離され、固相支持体、例えば、ニトロセルロースに転送される。固相支持体は、標識プローブに暴露され、ハイブリダイズしていないプローブをすべて取り除くために洗浄され、標識プローブを含む2本鎖が検出される。

【0340】

PCR増幅を用いる方法は、単一細胞から取り出したDNAに対して実行することも可能である。ただし、少なくとも約 10^5 個の細胞を使うのが好都合である。ポリメラーゼ連鎖反応の使用は、Saiki et al. (1985) Science 239: 487に記載されており、当代技術の総覧が、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual" CSH Press 1989, pp. 14. 2-14. 33に見られる。検出可能ラベルを増幅反応に含めることも可能である。好適な検出可能なラベルとしては、蛍光発色団（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、テキサス赤、フィコエリスリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシフルオレセイン（6-FAM）、2', 7'-ジメトキシ-4', 5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、6-カルボキシ-2', 4', 7'-4, 7-ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、5-カルボキシフルオレセイン（5-FAM）、またはN, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）、放射性ラベル（例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 等）等が挙げられる。ラベルは、2段階システムであってもよい。このシステムでは、ポリヌクレオチドは、高い親和度の結合パートナー、例えば、アビジン、特異的抗体を持つビオチン、ハプテン等に接合され、結合パートナーは検出可能ラベルに接合される。ラベルは、プライマーの内的一方、または両方に接合されてよい。それとは別に、増幅に用いられるヌクレオチドのプールが標識される。こうすると、ラベルは、増幅産物の中に取り込まれる。

【0341】

検出法で使用される試薬は、キットの一部として提供することが可能である。したがって、本発明はさらに、癌細胞で差次的に発現されるポリヌクレオチドの存在および／またはレベルを検出する（例えば、差次的に発現される対象遺伝子によってコードされるmRNAの検出によって）、および／または、生物サンプルにおいて前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの存在および／またはレベルを検出するためのキットを提供する。これらのキットを用いる手順は、臨床検査室、実験研究室、開業医、または、私人としての個人によって実行することが可能である。癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを検出するための、本発明のキットは、該ポリペプチドに特異的に結合する成分を含んでもよく、その成分は、該ポリペプチド、またはその断片に結合する抗体であってもよい。前立腺癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドを検出するために用いられる本発明のキットは、そのようなポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする成分を含んでもよい。キットは、任意に、手順において有用な、別の成分、例えば、バッファー、現像試薬、ラベル、反応表面、検出法、コントロールサンプル、標準、案内、および解説的情報を提供してもよい。

【0342】

本発明はさらに、哺乳動物（例えば、ヒト）における新形成、または前新形成状態を検出／診断する方法にも関する。本明細書で用いる「診断」とは一般に、疾患または障害に対する、被験体の感受性の定量、被験体が、現在、疾患または障害を罹患しているかどうかに関する判断、疾患または障害に罹患する被験体の予後（例えば、転移前または転移した癌の状態、癌の段階、または治療に対する癌の反応性）を含む。

【0343】

「有効量」とは、臨床結果を含め、治癒的な、または所望の結果を実現するのに十分な量である。有効量は、1回以上の投与において投与することが可能である。

【0344】

「細胞サンプル」とは、個体から得られる様々なサンプルタイプをカバーし、診断または監視アッセイにおいて使用される。この定義は、生物学的起源の血液および他の液体サンプル、固体組織サンプル、例えば、バイオプシー標本、またはそれから得られる組織培養物、およびその子孫を含む。定義はさらに、その獲得後、何らかのやり方で操作された、例えば、試薬による処理、可溶化、または、ある成分、例えば、タンパクまたはポリヌクレオチドの濃縮等、操作されたサンプルも含む。「細胞サンプル」という用語は、臨床サンプルをカバーし、さらに、培養細胞、細胞上清、細胞分解物、血清、血漿、生物液、および組織サンプルを含む。

【0345】

本明細書で用いる場合、「新形成細胞」、「新形成」、「腫瘍」、「腫瘍細胞」、「癌」、および「癌細胞」（相互交換的に使用される）は、比較的自立的な増殖を示し、そのために、細胞増殖の著明な調節欠如（すなわち、脱調節細胞分裂）で特徴づけられる、異常な増殖表現型を呈する細胞を指す。新形成細胞は、悪性のことも、良性のこともありえる。

【0346】

「個体」、「被験体」、「宿主」、および「患者」は、本明細書では相互交換的に使用されるが、それに対して診断、処置、または治療が望まれる、任意の哺乳動物被験体、特に、ヒトを指す。他の被験体としては、ウシ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ等が挙げられる。これらの方法によって検出および／または診断が可能な状態の例として癌が挙げられる。適切な発現パターンを呈する遺伝子に対応するポリヌクレオチドは、被験体における癌を検出するために用いられる。癌のマーカーに関する総覧については、例えば、Hanahan et al. Cell 100:57-70 (2000)を参照されたい。

【0347】

ある実施態様では、検出／診断法は、(a)哺乳動物（例えば、ヒト）から生物サンプルを得ること、(b)サンプルにおいて、癌関連タンパクの存在を検出すること、(c)産物の量を、コントロールサンプルにおける量と比較することを含む。ある実施態様では、サンプルにおける癌関連遺伝子産物の上昇レベルの存在は、その被験体が、新形成、または、前新形成状態を有することを示す。

【0348】

本法で使用するのに好適な生物サンプルは、生物流体、例えば、血清、血漿、胸水、尿および脳脊髄液、CSF、組織サンプル（例えば、乳房腫瘍、または前立腺組織切片）が挙げられる。バイオプシーによって得られたサンプルも本発明の方法に使用することが可能である。細胞培養体、または、例えば、組織バイオプシーから得られた細胞抽出液も使用が可能である。

【0349】

ある実施態様では、化合物は、結合タンパク、例えば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、または、その抗原結合性断片であり、これらは、検出可能マーカー（例えば、蛍光発色団、発色団、または同位元素等）で標識することが可能である。適切な場合には、化合物は、固相支持体、例えば、ビーズ、プレート、フィルター、樹脂等に付着させることが可能である。複合体形成の決定は、該複合体を、第1化合物（すなわち、複合体）に特異的に結合する、さらに別の化合物（例えば、抗体）と接触させることによって実行される。第1化合物と同様、この別の化合物も、固相支持体に付着させることも、および／または、検出可能なマーカーによって標識することも可能である。

【0350】

本発明による癌関連タンパクの上昇レベルの特定は、アジュバント治療によって快方に向かうことが確からしい被験体（患者）の特定を可能とする。例えば、一次治療後の被験体（例えば、手術を受けた被験体）からの生物サンプルを、循環する癌関連タンパクの存在、正常集団の実験によって求めたタンパクの上昇レベルの存在についてスクリーニング

10

20

30

40

50

することが可能であり、その存在が確かめられれば、それは残留癌組織を示す。同様に、手術で摘出された腫瘍の切断部位からの組織を、産物の上昇レベルの存在（周囲組織に比べて）について調べ（例えば、免疫蛍光検査）、その存在が確かめられれば、それは腫瘍の切除の不完全を示す。このような被験体を特定することが可能となることは、治療を、特定の被験体の要求に合わせて適応させることが可能となる。非外科的治療、例えば、化学療法または放射線治療を受けた被験体も同様に、サンプルにおける、癌関連タンパクの上昇レベルの存在について監視することが可能であり、その存在が確かめられれば、それは連続治療の必要を示す。病気の段階分類（例えば、治療処方を最適化するために）も、例えば、癌関連タンパクに対して特異的な抗体と組み合わせたバイオプシーによって実現することが可能である。

10

【0351】

（g）動物モデルおよびトランスジェニック動物

癌関連遺伝子はまた、癌、特に、リンパ腫、白血病、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、すい臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、または皮膚癌の動物モデルを生成するのに使用される。当業者には理解されるように、特定された癌関連遺伝子が、癌関連組織において抑制、減退される場合、癌関連遺伝子に向けられたアンチセンスRNAが用いられる遺伝子治療技術も、遺伝子の発現を減退、抑制する。そのようなものとして作製される動物は、生物活性剤候補のスクリーニングに使用される、癌関連動物モデルとして役立つ。同様に、遺伝子ノックアウト技術は、例えば、適切な遺伝子標的ベクターによる相同組み換えの結果、癌関連タンパクの欠如をもたらす。要すれば、癌関連タンパクの組織特異的発現またはノックアウトも必要とされてもよい。

20

【0352】

癌関連タンパクは、癌において過剰発現されることも可能である。癌関連タンパクを過剰発現するトランスジェニック動物を生成することも可能である。所望の発現レベルに応じて、様々の強度のプロモーターが、トランスジーンを発現するのに用いられる。さらに、組み込まれたトランスジーンのコピー数は、定量し、トランスジーンが発現量の定量値と比較することが可能である。このような方法で作製された動物は、癌関連動物モデルとして使用され、さらに、癌を治療するための生物活性分子のスクリーニングにおいて有用である。

【0353】

併用療法

ある実施態様では、本発明は、癌に対してさらに効力を改善するために、二つ以上のSEMA4D抗体を含む組成物を提供する。二つ以上のSEMA4D抗体を含む組成物は、癌に罹っている、または、罹り易い傾向を持つヒトまたは哺乳動物に対して投与される。一つ以上の抗体がさらに、別の治療薬剤、例えば、細胞傷害性薬剤、または癌の化学療法剤と共に投与される。二つ以上の治療薬剤の共時投与は、それらの薬剤が治療作用を発揮する期間が重複している限り、それらの薬剤が同時に、または同じルートを通じて投与されることを要求しない。投与が異なる日または週に行われる場合と同様、同時投与または継時投与も考慮の対象となる。

30

【0354】

ある実施態様では、本発明の方法は、異なる種々の抗体の併用、または「カクテル」の投与を考慮する。このような抗体カクテルは、それらの抗体が、それぞれ異なるエフェクター機構を利用し、あるいは、細胞傷害性抗体を、免疫エフェクター機能に依存する抗体と直接組み合わせる限り、ある利点を持つと考えられる。このような併用抗体は、協同的治療効果を発揮する可能性がある。

40

【0355】

細胞傷害剤とは、細胞の機能を抑制または阻害し、および／または、細胞の破壊をもたらす物質を指す。この用語は、放射性同位元素（例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、および Re^{186} ）、化学療法剤、および、毒素、例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素的に活性な毒素、または合成毒素、またはそれらの断片を含むことが意図さ

50

れる。非細胞傷害剤とは、細胞の機能を抑制または阻害せず、および／または、細胞の破壊をもたらさない物質を指す。非細胞傷害剤は、活性化されると毒性を持つ薬剤を含む。非細胞傷害剤は、ビーズ、リポソーム、基質、または粒子（例えば、米国特許公報 2003/0028071 および 2003/0032995 を参照、なお、これらの引用により本明細書に含める）を含んでもよい。この薬剤は、本発明による抗体と接合、結合、連結、または連関されてもよい。

【0356】

ある実施態様では、従来の癌薬剤が、本発明の組成物と共に投与される。従来の癌薬剤は下記を含む。すなわち、

- a) 癌化学療法剤
- b) 追加剤
- c) 薬剤前駆体

癌化学療法剤としては、ただしこれらに限定されないが、アルキル化剤、例えば、カルボプラチンおよびシスプラチン；ナイトロジェンマスタードアルキル化剤；ニトロソウレアアルキル化剤、例えば、カルムスチン（BCNU）；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサート；フォリン酸；プリン類縁代謝拮抗剤、メルカプトプリン；ピリミジン類縁代謝拮抗剤、例えば、フルオロウラシル（5-FU）およびゲミタビン（Gemzar（登録商標））；ホルモン抗癌剤、例えば、ゴセレリン、レウプロリド、およびタモキシフェン；天然抗癌剤、例えば、アルデスレウキン、インターロイキン-2、ドセタキセル、エトポシド（VP-16）、インターフェロンアルファ、パクリタキセル（Taxol（登録商標））、およびトレチノイン（ATRA）；抗生物質天然抗癌剤、例えば、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシルビシン、ダウノマイシン、および、マイトマイシンCを含むマイトマイシン；およびビンカアルカロイド天然抗癌剤、例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン；ヒドロキシウレア；アセグラトン、アドリアマイシン、イフォスアミド、エノシタビン、エピチオスタノール、アクラルビシン、アンシタビン、ニムスチン、プロカルバジン塩酸、カルボクオン、カルボプラチン、カルモフル、クロロマイシンA3、抗癌ポリサッカリド、抗癌血小板因子、シクロフォスファミド（Cytosin（登録商標））、シゾフィラン、シタラピド（シストシンアラビノシド）、ダカルバジン、チオイノシン、チオテパ、テガフル、ドラスタチン、ドラスタチン類縁体、例えば、アウリスタチン、CPT-11（イリノテカン）、ミトザントロン、ビノレルビン、テニポシド、カルミノマイシン、エスペラミシン（例えば、米国特許第4,675,187号参照）、ネオカルジノスタチン、OK-432, ブレオマイシン、フルロン、プロクスリジン、ブスルファン、ホンバン、ペプロマイシン、ベスタチン（Ubenimex（登録商標））、インターフェロン-β、メピチオスタン、メトプロニトル、メルファラン、ラミニンペプチド、レンチナン、コリオルスベルシカラー抽出物、テガフル／ウラシル、エストラムスチン（エストロゲン／メクロレタミン）が挙げられる。

【0357】

癌患者の治療として使用されてよい追加剤としては、EPO、G-CSF、ガンシクロビル、抗生物質、レウプロリド；メプレジン；ジドブジン（AZT）；インターロイキン1から18、突然変異種および類縁体を含む；インターフェロン、またはサイトカイン、例えば、インターフェロンα、β、およびγホルモン、例えば、黄体化ホルモン放出ホルモン（LHRH）および類縁体、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）；成長ホルモン、例えば、形質転換増殖因子-β（TGF-β）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、神経増殖因子（NGF）、成長ホルモン放出因子（GHRF）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子相同因子（FGFHF）、肝細胞増殖因子（HGF）、およびインスリン増殖因子（IGF）；腫瘍壊死因子-αおよびβ（TNF-αおよびβ）；侵入阻害因子-2（IIF-2）；骨形成因子1-7（BMP1-7）；ソマトスタチン；チモシン-α-1；γ-グロブリン；スーパーオキシドジムスターゼ（SOD）；補体因子；抗脈管形成因子；抗原材料；および薬剤前駆体が挙げられる。

【0358】

薬剤前駆体とは、製薬学的活性物質の前駆体または誘導体で、親薬剤に比べて癌細胞に対して細胞傷害性が低いか、または非細胞傷害性であり、酵素的に活性化されるか、または変換されて、活性を持つ、またはより活性的な親形状を取る物質を指す。例えば、Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (eds.) pp. 247-267, Humana Press (1985) を参照されたい。薬剤前駆体としては、リン酸塩含有薬剤前駆体、チオフォスフェート含有薬剤前駆体、硫酸塩含有薬剤前駆体、ペプチド含有薬剤前駆体、D-アミノ酸修飾薬剤前駆体、グリコシル化薬剤前駆体、b-ラクタム含有薬剤前駆体、任意に置換されるフェノキシアセタミド含有薬剤前駆体、または任意に置換されるフェニルアセタミド含有薬剤前駆体、より活性の高い細胞傷害性遊離薬剤に転換される、5-フルオロシトシンおよび他の5-フルオロウリジン薬剤前駆体が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。本発明において使用される、誘導体形成されて薬剤前駆体に変換される細胞傷害性薬剤の例として、前述の化学療法剤が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

10

【0359】

細胞に細胞傷害性薬剤または診断剤を輸送する方法

20

本発明はまた、癌関連遺伝子を発現する、1個以上の細胞に、細胞傷害性薬剤または診断剤を輸送する方法を提供する。ある実施態様では、方法は、細胞傷害剤または診断剤に接合される、本発明の抗体、ポリペプチド、またはヌクレオチドを、細胞に接触させることを含む。このような結合体は上に論じた。

【0360】

アフィニティー精製

ある実施態様では、本発明は、アフィニティー精製のための方法および組成物を提供する。ある実施態様では、本発明の抗体は、固相、例えば、セファデックス樹脂、またはろ紙の上に、従来技術で既知の方法を用いて固定される。固定化された抗体は、精製されるべき、腫瘍細胞抗原タンパク（またはその断片）を含むサンプルに接触させられ、次いで、支持体は、適切な溶媒で洗浄される。溶媒は、腫瘍細胞の抗原タンパクを除き、サンプル中の事実上全ての物質を除去する。抗原は、固定抗体に結合される。最後に、支持体は、さらに別の適切な溶媒、例えば、グリシンバッファー、pH 5.0で洗浄され、この溶媒が、腫瘍細胞抗原タンパクを抗体から解放する。

30

【実施例】

【0361】

下記の実施例は、当業者に、本発明の製造法および使用法に関する完全な開示および記述を提供するために提示されるもので、本発明者達が自らの発明と見なすものの範囲を限定することを意図するものでもなければ、下記の実験が、実行される全てのそして唯一の実験であることを表すことを意図するものでもない。用いた数字（例えば、量、温度等）に関しては正確さを確保するために努めたけれども、若干の実験誤差および偏倚は考慮されなければならない。別様に指示しない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧は、大気圧であるか、ほぼ大気圧である。

40

【0362】

（実施例1：マウスにおける癌誘発後の挿入部位分析）

マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）、またはげっ歯類白血病ウイルス（MLV）のどちらかを用いてマウスに癌を誘発した。MMTVは、乳腺腺癌を、MLVは、各種の造血器官悪性腫瘍（主にT-またはB-細胞リンパ腫）を引き起こした。

【0363】

三つの感染ルートを用いた。（1）新生マウスに精製ウイルス調製品を注入、（2）哺

50

乳期におけるミルク滞在ウィルスによる感染、および（３）生殖系統（A k v r 1 および／またはM t v 2）を通じての遺伝的伝達である。各発症マウスの悪性腫瘍のタイプは、ホルマリン固定、パラフィン包埋パイプシー標本のH & E染色薄切切片の組織学的分析によって決定した。各腫瘍における全ての、組み込まれたプロウィルスクローンに隣接する、宿主DNA配列は、入れ子アンカーPCRによって回収した。PCRは、二つのウィル斯特異的プライマー、および、制限酵素消化腫瘍DNAに対して連結された、40bp 2本鎖DNAアンカーに対して特異的な二つのプライマーを用いて行った。宿主／ウィルス接合部断片を表す増幅バンドをクローンし、配列決定した。次に、宿主配列（「タグ」と呼ばれる）を用いて、マウスのゲノム配列についてBLAST分析した。

【0364】

次に、抽出されたマウスゲノムタグ配列を、www.ensembl.orgからダウンロードした、祖形マウスゲノム集合体（NCBI m33リリース）に対してマップした。45bp以上のタグ配列は、TimeLogic高速blastアルゴリズム、terblastを用いてゲノム上にマップされた。パラメータ設定は、-t=10 -X=1e-10 -v=20 -b=20 -R。短いタグ配列（<45bp）は、NCBIblastallアルゴリズムによってゲノムに対してマップされた。パラメータ設定は、-e1000 -FF-W9-v20-b20。次に、blast結果を合わせ、各タグ配列について、最高マッチに関してフィルターにかけた。最高マッチは、通常、タグ配列長の少なくとも30%において最低95%の同一性を要求する。一意の染色体位置を持つタグは、遺伝子コール過程に委ねられた。

【0365】

各個別のタグについて、三つのパラメータが記録された。すなわち、（１）マウス染色体割り当て、（２）取り込みが起こった塩基対座標、および（３）プロウィルス方向性である。この情報を使って、分析された全ての腫瘍から得られた利用可能な全てのタグが、マウスゲノムにマップされた。プロウィルス挿入突然変異の癌原遺伝子標的を特定するために、各インテグランドにおけるプロウィルスの組み込みパターンが、トランスクリプトームにおける全ての既知の遺伝子位置に対して分析された。二つ以上の独立した腫瘍において同じ座位にプロウィルスが存在することは、このプロウィルス組み込み部位に、またはその近傍に、癌原遺伝子が存在することを示す第一証拠となる。なぜなら、ゲノムは、ランダムな組み込みが、観察可能な集合化をもたらすことができないほど大きいものだからである。検出される集合化がもしあれば、それは、生物学的選択のまぎれもない証拠である。プロウィルス挿入突然変異の癌原遺伝子標的におけるヒトオルソログを特定するために、マウスおよびヒトのゲノムの相同領域の比較分析を行った。

【0366】

マウスのトランスクリプトームを表すのにEnsemblマウス遺伝子モデルおよびUCSCrefseqおよびknowngeneセットを用いた。前述のように、タグの染色体位置、および隣接遺伝子に対するプロウィルスの挿入方向に基づいて、各タグを、その直近遺伝子に割り当てた。遺伝子に連結するプロウィルス挿入は、二つのグループに分類された。すなわち、I型挿入、またはII型挿入である。挿入が、イントロンであれエキソンであれ、遺伝子座位の内部にある場合、II型挿入と表示された。そうでない場合、その挿入は、その挿入が下記の基準を満たす限り、I型挿入と表示された。その基準とは、1) 遺伝子座位の外部ではあるが、遺伝子の開始または終止位置から100キロ塩基以内にある、2) 上流挿入の場合、プロウィルスの方向が、遺伝子の方向に対して反対である、および、3) 下流挿入の場合、プロウィルスの方向が、遺伝子と同じである。この過程で発見された遺伝子または転写体には、NCBI座位リンク注記に基づく座位IDを割り当てた。少なくとも二つのウィルス挿入体を持つuniqマウス座位IDが、当代Oncogenome（商標）を構成する。

【0367】

このOncogenome（商標）におけるマウス遺伝子に対しヒトのオルソログを割り当てるために、MGIのマウス対ヒトオルソログ注記、およびNCBIホモログ注記を

10

20

30

40

50

用いた。オルソログ注記に矛盾または欠如が生じた場合、マウスおよびヒトゲノムの相同領域に関する比較分析を、UCSCまたはEnsemblゲノムブラウザーを用いて行った。ヒトのオーソログ遺伝子に、NCBIの座位リンクから得られた座位Idを割り当て、これらのヒト遺伝子をさらに、本明細書に記載する癌療法の標的可能対象として評価した。

【0368】

(実施例2：定量的RT-PCRの分析：比較的C_T法)

RT-PCR分析は、4つの大きな工程に分割した。1) 正常および腫瘍の一次組織からのRNA精製；2) 精製組織RNAから第1鎖cDNAを生成し、リアルタイム定量的PCRに使用；3) 384ウェル反応に合わせて特注したABI PRISM 7900 HT配列検出システムを用い、遺伝子発現用RT-PCRのセットアップ；4) 統計学的方法によってRT-PCRデータを分析し、癌において差次的に発現（上方調整）される遺伝子を特定する。これらのステップをより詳細に下記に説明する。

10

【0369】

A) 正常および腫瘍の一次組織からのRNA精製

これは、Qiagen RNeasy miniキットカタログ番号74106を用いて行った。組織塊は通常約30 µgのRNAをもたらし、これは、150 µlの溶出バッファーを用いた場合、約200 ng/µlの最終濃度となった。

【0370】

RNAをQiagenのプロトコールを用いて抽出した後、Molecular ProbesのRibogreen定量試薬を用いて、メーカーのプロトコールに従ってRNAの収率および濃度を定量した。

20

【0371】

抽出されたRNAが完全であることを、EtBr染色アガロースゲルにおいて、28 Sおよび18 Sバンドが等しい強度を持つかどうか定量して評価した。さらに、サンプルバンドは透明で、目に見えるべきであるとした。バンドが目視できない、または、ゲル通過中に汚れた場合、サンプルは廃棄した。

【0372】

抽出されたRNAの完全性を、さらにAgilent 2100を用いてメーカーのプロトコールに従って評価した。Agilent Bioanalyzer/“Lab-On-A-Chip”は、微小流体システムであり、RNAサンプルのエレクトロフェログラムを生成する。18 Sおよび28 Sバンドの比、および、基線の滑らかさを観察することによって、RNA分解レベルの定量を行った。28 S：18 S比が1未満のサンプルは廃棄した。

30

【0373】

RNAサンプルをさらに、抽出中のゲノムDNA汚染レベルを定量するためにRT-PCRによって調べた。一般に、RNAサンプルは、逆転写酵素無添加、または添加条件下で、有効性保証Taqmanプライマーおよび対象遺伝子のプライマーを用いて直接分析した。各ウェル5 µlの384ウェルフォーマットにおいて、反応当たり12.5 ngのRNAを4重に用いた。（2 µlのRNA + 3 µlのRT + またはRT-マスタミックス）。下記の温度サイクルパラメータを用いた（2工程PCR）。

40

【0374】

熱サイクルパラメータ

【0375】

【表 2】

工程	逆転写	Amp. Gold 活性化	PCR	
	維持	維持	40 サイクル	
			変性	アニール／伸長
温度	48°C	95°C	95°C	60°C
時間	30 分	10 分	15 秒	1 分

10

RNA サンプルは、合格品質と見なされるには下記の基準が要求された。

【0376】

a) 合格するには Ct 差が 7 Ct 以上でなければならない。それより低いものは「不合格」であり、再精製しなければならない。

【0377】

b) サンプルの平均 Ct は、平均（全サンプル）の 2 S T D E V （全サンプル）以内にななければならない。

【0378】

c) サンプルグループの外れを見つけるために条件付きフォーマットिंगを使用する。*RNA パネルに外れを含めない。

20

【0379】

d) RT 増幅または (Ct) は > 34 サイクルでなければならない。そうでないものは「不合格」である。

【0380】

e) ヒトゲノム DNA は、23 と 27.6 Ct の間にななければならない。

【0381】

サンプルが全ての QC ステップ（ゲル移動、ゲノム DNA のための Agilent および RT-PCR）に合格して初めて、RNA をパネルに集合させる。RNA は、cDNA 合成のために配置する。一般に、各腫瘍タイプについて、最低 10 個の正常および 20 個の腫瘍が必要であった（ある組織タイプが、扁平上皮癌と腺癌を持つ場合、各腫瘍タイプについて、20 サンプルを用いなければならない（各腫瘍タイプについて同じ 10 個の正常が用いられる）。一般に、パネル当たり、11 µg の RNA が必要とされた。少なくとも 2 µg の係数は容認された。すなわち、データベースに入るサンプルは、13 µg を持っていなければならない。そうでない場合は、cDNA アレイの際に落とされる。サンプル数は、ウェル A1 から始めて上昇順に配置され、96 ウェルフォーマットにおいて行を降下した。パネルの終端に 4 個のコントロールサンプルが置かれる。すなわち、hFB、hrRNA、hgDNA、および水である（この順に）。さらに別の NTC コントロール（水）がウェル A2 に置かれた。コントロールのロット番号は全て記録された。RNA サンプルは、ヌクレアーゼ無添加水における 100 ng/µl に対して正規化された。11 µg の RNA を用い、全体容量は 110 µl であった。注意：必要とされる RNA 濃度は、使用される特定の cDNA 合成キットに依存して変動することがある。100 ng/µl 未満の RNA サンプルをそのまま負荷した。正規化完了後、ブロックを、加熱シーラーを用い、フォイルによって、175 °C で 2 秒間密封した。フォイルが完全にシールされていることを確認するために、ブロックを目視で調べた。次に、手動のシーラーをフォイルの上に被せた。ブロックを -80 °C フリーザーに保存し、cDNA 合成に備えた。

30

40

【0382】

B) 精製組織 RNA から第 1 鎖 cDNA を、リアルタイム定量的 PCR のために生成。

【0383】

50

下記の反応混合物をあらかじめ設定した。

【0384】

【表3】

試薬	1 RXN 容量 (μl)	RXN
10X Taqman RT バッファー	1	
25mM 塩化マグネシウム	2.2	
10mM デオキシNPTS混合物	2	
50uM ランダムヘキサマー	0.5	
Rnase 阻害剤	0.2	
50u/ul MultiScribe 逆転写酵素	0.25	
水	0.85	

10

Hydraを用い、96ウェルブロックに配置されたRNA (11 μg) をドータープレートに分布し、96ウェルプレート当たり1 μgのcDNA合成を行った。これらのドータープレートそれぞれを用いて、下記の熱サイクルパラメータを用いてRT反応を設定した。

【0385】

【表4】

工程	インキュベーション	RT	RT 不活性化
	維持	維持	維持
時間	10分間	30分間	5分間
温度	25°C	48°C	95°C

20

熱サイクリングの完了後、プレートをサイクラーから取り出し、Hydraピペットを用いて、60 μlの0.016M EDTA溶液を各ウェルのcDNAにピペット投入した。各cDNAプレート (10プレート未満) を、2mlの96ウェルブロックにプールし、保存した。

30

【0386】

ABI PRISM 7900HT配列検出システムによる遺伝子発現用RT-PCRは、384-ウェル反応用の特注である。

【0387】

カクテルの作製

カクテルを下記のようにして作製した。

1. このプロトコールは、96サンプルのパネル用カクテル作製のために設計された。これは全体パネルの470 rxnsである。
2. FRT (順行および逆行プライマーおよび標的プローブ) 混合物を、-20°Cから取り出し、4°Cの解凍部に置いた。
3. 作製すべき最初の10 FRTを取り出し、冷却金属ラック、または氷上ラックに置いた。
4. 新しい1.5 ml カクテルチューブのキャップに標的番号と、側面に合成日時 (合成日付ラベルがFRTチューブにない場合、今日の日付とした) と、検査者のイニシャルとを作製した各FRTのチューブに一つラベルを貼った。
5. FRTチューブおよびカクテルチューブをラックにまとめ、簡単に経過を追えるようにした。
6. p200ピペッティングをスピード6で使用した。吸引を、液体の表面で行い、チューブの内側頂上近くで投下した。各吸引/投下ステップの終了ごとに先端を交換した。
6. 1 全てのカクテルチューブを開け、94 μlのAmbion水 (日毎に新鮮なもの

40

50

を注いだ)を加え、その後チューブを閉鎖した。

6. 2 F R Tを15回パルス状渦巻き回転し、その後10秒間遠心した。141 μ lのF R Tに対応するカクテルチューブの一つずつ加えた。

6. 3 最初の10個が終わったら、F R Tを直ちに-20℃に戻した(容量が10 μ l未満の場合、それらは棄却された)。

6. 4 カクテルを、運転準備ができるまで4℃で保存した(1日以上待機する場合は-20℃)。

6. 5 カクテルの運転準備ができたところで、マスターミックスをカクテルに加えた(ステップ2. 7参照)。

7. 次の10個のカクテルについて、ステップ1. 3から1. 6. 5を、最終的に全ての10
カクテルが作製されるまで繰り返した。

【0388】

【表5】

TaqMan マスターミックス	1 rxn 容量	470 RXNS	
TaqMan ユニバーサルマスターミックス ロット番号	2.5 μ l	1175 μ l	
順行プライマー保存液	0.1 μ l	47 μ l	} 141 μ l
逆行プライマー保存液	0.1 μ l	47 μ l	
プローブ保存液	0.1 μ l	47 μ l	
水	0.2 μ l	94 μ l	
最終容量	3.0 μ l	1410 μ l	

20

アレイ配置96ウェルプレートからの2 μ lのcDNAを3 μ lのTaqmanマスターミックスに加え、5 μ lのQPCR反応に備えた。

30

【0389】

SEMA4D遺伝子のQPCRに使用されるプライマーおよびプローブを表2に示す。

【0390】

(表2)

【0391】

【表6】

標的的特異的プライマー/プローブのセット				
遺伝子	Sgrs ID	順行プライマー	逆行プライマー	プローブ配列
SEMA4D	38	GGTGCCTGTGTTCTATG CACTCT (配列番号 4)	GACAGGTTGTAGGCGCA CACT (配列番号 5)	ACCCACAGCTGAACAACG TGGG (配列番号 6)

40

D) R T-P C Rデータを統計学的方法によって分析し、癌において差次的に発現される(上方調整される)遺伝子を特定する。

【0392】

正常および腫瘍サンプルにおける標的遺伝子の発現レベルを、A B I P R I S M 7

50

900HT配列検出システム（Applied Biosystems，カリフォルニア）による定量的RT-PCRを用いて定量した。方法は、参照（正規化因子）ハウスキーパー遺伝子（Pre-Developed TaqMan（商標）アッセイ試薬遺伝子発現定量化プロトコル、Applied Biosystems，2001）のコピー数と比較した場合の、標的鋳型の最初のコピー数の定量化に基づく。各PCRサイクルによるDNA産物の蓄積は、アンプリコン効率と最初の鋳型濃度に関連する。したがって、標的および正規化因子の増幅効率は同じでなければならない。開始時鋳型コピー数とDNA増幅効率に依存する閾値サイクル（ C_T ）は、PCR産物の成長が、その間指数関数的であるPCRサイクルである。各アッセイは四重に行った。したがって、任意のサンプルの標的遺伝子について4 C_T 値が得られた。同時に、ハウスキーパー遺伝子グループの発現レベルも同様に測定した。4重測定値内の外れを検出し、残りの3重測定値の標準偏差が、元の4重測定値の標準偏差と比較して30%以下である場合、棄却した。残りの C_T 値（ C_t または C_n と表示）の平均を計算し、下記の計算に用いた。

10

【0393】

データ正規化

正規化のために、「普遍正規化因子」を導入した。これは、分析用に利用可能なハウスキーパー組に基づく。簡単に言うと、ハウスキーパー遺伝子に対し、組織サンプルの全体パネルに亘る発現レベルの変動に従って重みづけを行った。同じ組織タイプの n サンプルについて、 k 番目のハウスキーパー遺伝子の重み（ w ）を、下記の式によって計算した。

20

【0394】

【表7】

$$\text{方程式 1} \quad w_k = \frac{1/S_k^2}{\sum_{k=1}^n 1/S_k^2}$$

式中、 S_k は、パネルにおける同じ組織タイプの全体サンプルに亘る、 k 番目ハウスキーパー遺伝子の標準偏差である。 i 番目のサンプルにおける全てのハウスキーパー遺伝子の平均発現（ M_i ）は、重みづけ最小二乗法を用いて推定し、 M_i と全ての M_i の平均との差を、 i 番目のサンプルの正規化係数 N_i として計算した（方程式2）。次に、 i 番目のサンプルにおける標的遺伝子の平均 C_t 値を、正規化係数 N_i を引くことによって正規化した。上記の正規化法の性能は、RT-PCRデータと、同じ組のサンプルから得られたマイクロアレイデータとの間の相関を比較することによって有効と保証された。すなわち、上記の正規化法を適用後、RT-PCRデータと、マイクロアレイデータとの間の相関は増した。

30

【0395】

【表8】

$$\text{方程式 2} \quad N_i = M_i - \frac{\sum_{i=1}^n M_i}{n}$$

40

有意に調節が外れた遺伝子の特定

腫瘍サンプル対正常サンプルにおいて、遺伝子が有意に上方調整されているかどうかを決めるために、二つの統計式、 t （方程式3）および受容者動作特性（ROC；方程式4）を計算した。

【0396】

【表 9】

$$\text{方程式 3} \quad t = \frac{\bar{C}_t - \bar{C}_n}{\sqrt{\frac{S_t^2}{n_t} + \frac{S_n^2}{n_n}}}$$

$$\text{方程式 4} \quad ROC(t_0) = P[C_t \leq C_n(t_0)]$$

10

式中、

【0397】

【表10】

$\bar{C}_t$ は腫瘍試料グループの C_t の平均であり、

$\bar{C}_n$ は腫瘍試料グループの C_n の平均であり、

S_t 、 S_n は、腫瘍および正常なコントロールグループの標準偏差であり、 n_t 、 n_n は、分析に用いられた腫瘍および正常サンプルの数である。 t の自由度 v' は下式として計算される。

20

【0398】

【表11】

$$\text{方程式 5} \quad v' = \frac{\left(\frac{S_t^2}{n_t} + \frac{S_n^2}{n_n} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_t^2}{n_t} \right)^2}{n_t - 1} + \frac{\left(\frac{S_n^2}{n_n} \right)^2}{n_n - 1}}$$

30

ROC 方程式において、 t_0 は、正常集団における受容された擬似陽性率であり、この研究では 0.1 に設定された。したがって、 $C_n(t_0)$ は、正常サンプルでは C_n の 10 パーセントであり、かつ、 $ROC(0.1)$ は、正常サンプルの 10 パーセンタイルよりも低い C_t を持つ腫瘍サンプルのパーセントである。 t 統計式は、正常サンプルと比べ、腫瘍サンプルにおいてより高い平均発現レベルを示す遺伝子を特定するが、ROC 統計式は、腫瘍のあるサブセットにのみ発現レベルの上昇が見られる遺伝子を特定するのにより好適である。ROC 統計式を使用することの原理は、Pepe, et al (2003) Biometrics 59, 133-142 に詳細に論じられている。帰無仮設下における t の分布は、正規分布仮説を回避する順列によって経験的に推定される。その際、我々は、サンプルに正常または腫瘍ラベルをランダムに割り当て、次に、上述の t 統計式 (t^P) を 2000 回計算した。 p 値は、実際サンプルの t を 2000 で割ったものよりも小さい t^P の数として計算した。ROC の変動性を見るために、サンプルを 2000 回ブートストラップし、各回ごとに、ブートストラップ ROC (ROC^b) を上記のように計算した。2000 ROC^b の 97.5% が、我々が正常集団に設定した受容可能な擬似陽性率 0.1 よりも大きければ、実際サンプルの ROC を統計的に有意と見なした。有意性を決定する閾値は、ROC では $> 20\%$ 発生、および T 検定 P 値では < 0.05 に設定した。

40

50

【0399】

前述の方法論を適用することによって、正常とサンプル組の間に3通りの仮設的分布をモデル化することができた。

【0400】

シナリオ I では、二つのサンプル集団（コントロールと疾患）間には、ほぼ完全な乖離があった。ROC も T 検定も、このシナリオに高い有意性を与える。シナリオ I I では、二つのサンプルは重複性分布を示すが、疾患サンプルのあるサブセットのみがコントロール（正常）集団とはっきりと異なる。ROC 法のみがこのシナリオを有意と判定する。シナリオ I I I では、疾患サンプル集団は、コントロール集団に完全に重複する。シナリオ I および I I とは対照的に、T 検定法のみがこのシナリオを有意と判定する。以上まとめると、二つの統計方法の組み合わせによって、サンプル集団内の標的遺伝子の発現パターンの特徴を正確に解明することができる。

【0401】

この試験の結果を下記の表 3 に示す。SEMA 4 D の過剰発現は、乳房、卵巣、結腸、前立腺、およびすい臓癌組織に見られた。

【0402】

【表 12】

ソース データ	分析法	癌のタイプ、対応する正常組織に対応する発生率(%)										
		乳房	頸部	結腸	リンパ系	肝臓	肺	卵巣	脾臓	前立腺	皮膚	子宮
Sagres Q- PCR	ROC	33%	ns	ns	ns	ns	ns	87%	40%	ns	ns	ns
	P- 値	0.047	0.235	0.00001	0.8645	0.105	0.233	0.00001	0.2145	0.0065	0.15	0.866

表 3：計算した場合は、ROC % 出現率を示す。出現率が有意でない場合、“t” 値を示す。ns = 有意ではないが、t 値を示さず。挿入数および挿入タイプも、使用したウィルスタイプと共に示す。

【0403】

個々の癌組織および非癌組織における遺伝子脱調整の結果を図 3 に示す。正常組織における発現プロファイリングを図 4 に示す。

【0404】

（実施例 3：ヒト癌細胞および組織における癌関連配列の検出）

前立腺癌および乳癌組織、および他のヒト癌組織、ヒト結腸、非癌前立腺を含む正常ヒト組織、および、他のヒト細胞系統から DNA を、Delli Bovi et al. (1986, Cancer Res. 46:6333-6338) の手順に従って抽出する。この DNA を、0.05M Tris HCl バッファー、pH 7.8、および 0.1mM EDTA を含む溶液に再懸濁し、回収された DNA の量を、Hoechst 33258 染料を用いてマイクロフルオロメトリーによって定量する。Cesarome, C. et al., Anal Biochem 100:188-197 (1979)。

【0405】

バッファー、Mg²⁺、およびヌクレオチド濃度に関して、メーカー（Perkin Elmer Cetus）の推薦する条件に従って、Taq ポリメラーゼを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実行した。熱サイクリングは DNA サイ클アーによって実行する。変性 94℃ で 3 分、その後、94℃ で 1.5 分の 35 サイクルか 50 サイクル、50℃ で 2 分、および 72℃ で 3 分である。癌関連遺伝子の選ばれた領域を増幅する PCR の能力を、クローンされた癌関連ポリヌクレオチド（単複）を陽性鋳型（単複）として用いて試験した。この鋳型を用いて、最適 Mg²⁺、プライマー濃度、および各種サイクリング温度の要件を求める。メーカーの推薦するマスターミックスを用いる。マスターミッ

クスの成分の可能なコンタミネーションを検出するために、鋳型無しの反応を定例として試験した。

【0406】

サザンブロッティングおよびハイブリダイゼーションは、Southern, E. M., (J. Mol. Biol. 98: 503-517, 1975) によって記載されるとおり、クローンされた標識配列を用い、ランダムプライマー法 (Feinberg, A. P., et al., 1983, Anal. Biochem. 132: 6-13) によって行う。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションは、6 x SSPE, 5 % Denhardt, 0. 5 % SDS、50 % フォルムアミド、100 μ g/ml の変性サケ卵丸DNAを含む溶液において、48℃で18時間インキュベーションして行った。次に、室温で2 x SSCで洗浄、37℃で0. 5 % SDS、最後に、0. 5 % SDS含有0. 1 x SSCに68℃で30分を行った (Sambrook et al., 1989, in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab. Press)。パラフィン包埋組織切片については、250 bp 配列を検出するように設計されたプライマーを用いて、Wright and Manos (1990, in "PCR Protocols", Innis et al., eds., Academic Press, pp. 153-158) の記載する条件に従う。

【0407】

(実施例4：宿主におけるクローンされたポリヌクレオチドの発現)

癌関連遺伝子のタンパク産物を調べるために、癌関連DNAの制限断片を、発現ベクターpMT2においてクローンし (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp16. 17-16. 22 (1989))、10 % FCS添加DMEMで培養したCOS細胞にトランスフェクトさせた。トランスフェクションは、リン酸カルシウム技術 (Sambrook, et al (1989) pp. 16. 32-16. 40、上記) を用いて行い、細胞分解物を、トランスフェクトさせたCOS細胞と、させないCOS細胞において、トランスフェクション後48時間調製した。分解物を、抗ペプチド抗体を用いイムノブロッティングによって分析した。

【0408】

免疫ブロッティング実験では、細胞分解物の調製および電気泳動は、標準法によって行う。タンパク濃度は、BioRadタンパクアッセイ溶液において定量する。半乾きの電気泳動産物をニトロセルロースに転送した後、膜を、500 mM NaCl、20 mM Tris、pH 7. 5、0. 05 % Tween-20 (TTBS) 5 % 乾燥ミルク添加にてブロックした。TTBSで洗浄し、二次抗体 (Amersham) とインキュベーションした後、検出をやり易くするために、強化化学的発光 (ECL) プロトコール (Amersham) を、メーカーが記載するとおりに実行する。

【0409】

(実施例5：ポリペプチドに対する抗体の生成)

癌関連遺伝子に固有のポリペプチドを、細菌または他の (例えば、酵母、バキュオウィルス) 発現システムで合成または単離し、ウサギ血清アルブミン (RSA) に、m-マレイミド安息香酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル (MBS) によって接合した (Pierce, Rockford, イリノイ州)。これらのペプチドによる免疫化プロトコールは、標準法に従って実施する。まず、免疫化前に、ウサギの準備放血を実施する。最初の免疫化は、フロインドの完全アジュバントおよび500 μ g の接合ペプチドまたは100 μ g の精製ペプチドを含む。先行注入の4週後に行われるその後の免疫化は全て、フロインドの不完全アジュバントおよび同量のタンパクを含む。免疫化後、放血を7から10日行った。

【0410】

抗体のアフィニティー精製のために、対応する癌関連ポリペプチドを、MBSによってRSAに接合し、さらに、CNBr活性化セファロース (Pharmacia, Uppsala、スウェーデン) に結合させる。抗血清を、10mM Tris-HCl、pH 7.5で10倍に希釈し、アフィニティー基質と一晚インキュベートした。洗浄後、結合抗体を、樹脂から、100mMグリシン、pH 2.5によって溶出した。

【0411】

(実施例6：癌関連ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の生成)

：非変性性アジュバント (Ribi, R730, Corixa, Hamilton, マサチューセッツ州) を、リン酸緩衝生理食塩水にて4mlに再水和した。次に、この再水和アジュバント100μlを、400μlのHankの平衡塩溶液で希釈し、次にこれを免疫化に用いた細胞ペレットとゆっくりと混ぜ合わせる。ほぼ500μgの接合ペプチドまたは100μgの精製ペプチド、およびフロインドの完全アジュバントを、週に1回、足蹠 (foot-pad) からBalb/cマウスに注入した。6週間の注入後、各免疫化した動物の尾部から1滴の血液を吸引し、FACS分析によって癌関連ポリペプチドに対する抗体の力価を試験した。力価が、少なくとも約1:2000に達した時に、マウスをCO₂チェンバーで屠殺し、頸部脱臼させた。ハイブリドーマ調製のためにリンパ節を収集した。もっとも高い力価を持つマウスから得られたリンパ球を、35%ポリエチレングリコール4000を用いてマウス骨髄腫細胞系統X63-Ag8.653と融合する。融合後10日目に、ハイブリドーマ上清を、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) によって、CAP-特異的モノクローナル抗体の存在についてスクリーニングした。各ハイブリドーマから得た調整済み媒体を、PC3、Colo-205、LnCap、またはPanC-1細胞の混合分液とインキュベートする。インキュベーション後、細胞サンプルを洗浄し、0.1ml希釈液に再懸濁し、1μg/mlの、ヤギ抗マウスIgGのFITC接合F(ab')₂断片に4℃で30分インキュベートする。細胞を洗浄し、0.5ml

FACS希釈液に再懸濁し、FACS細胞分析装置 (Becton Dickinson; San Jose, カリフォルニア州) を用いて分析した。さらに拡大、クローニング、および特徴解明のために、ハイブリドーマクローンを、FACSで評価した、癌関連ポリペプチドを発現する1種以上の細胞クローンの表面に対する、それらの結合に基づいて選ぶ。Ag-CA_xと表示された抗原、および、Ag-CA_x.1と表示される、その抗原のエピトープに結合する、mAb cancer関連と表示されるモノクローナル抗体を作製するハイブリドーマが選ばれる。

【0412】

(実施例7：癌関連抗原関連抗原を検出するためのELISAアッセイ)

組み換え技術によって生産される癌関連抗原に特異的に結合する抗体に関して血液サンプルを試験するために、下記の方法を用いる。組み換え癌関連抗原タンパクを精製した後、組み換えタンパクをPBSで5μg/mlに希釈する (500ng/100μl)。10マイクロリットルの希釈抗原溶液を、96ウェルImmulon1プレートの各ウェルに加え (Dynatech Laboratories, Chantilly, バージニア州)、次に、プレートを室温で1時間、または4℃で一晩インキュベートし、PBSに溶解した0.05% Tween 20で3回洗浄する。抗体の非特異的結合を抑えるためのブロッキングは、各ウェルに、200μlの1%の、ウシ血清アルブミンのPBS/Tween 20溶液を加えて、1時間インキュベーションすることによって実現する。ブロッキング液の吸引後、100μlの、ブロッキング液で1/16から1/2048の範囲で希釈した一次抗体液 (抗凝固処理全血、血漿、または血清) を加え、室温で1時間、または4℃で一晩インキュベートした。次にウェルを3回洗浄し、100μlの、西洋ワサビペルオキシダーゼ (Organon Teknica, Durham, ノースカロライナ州) に接合させたヤギ抗ヒトIgG抗体、PBS/Tween 20に1/500または1/1000で希釈させたもの、100μlのオフェニレンジアミンジヒドロクロリド (OPD, Sigma) 溶液を各ウェルに加え、5-15分インキュベートする。このOPD液は、5mg OPD錠を、50mlの1%メタノール水溶液に溶解し、使用直前に5

0 μ l の 30 % H_2O_2 を加えることによって調製する。反応は、25 μ l の 4 M H_2SO_4 を加えることによって停止させる。490 nm における吸収をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) によって読み取る。

【0413】

(実施例 8：癌細胞表面における癌関連抗原の特定および特徴解明)

癌細胞調製品の約 25 μ l の細胞バック容量を持つ細胞ペレットを、先ず、細胞を、水で 0.5 ml に希釈し、次いで凍結・解凍を 3 回繰り返すことによって分解する。溶液を 14,000 rpm で遠心する。細胞膜断片を含むペレットを、50 μ l の SDS サンプルバッファー (Invitrogen, Carlsbad, カリフォルニア州) に再懸濁する。サンプルを 80 $^{\circ}C$ で 5 分加熱し、次に 14,000 rpm で 2 分遠心し、不溶物質を除去する。

10

【0414】

サンプルを、メーカーの指示に従って、Tris-グリシン SDS (Invitrogen, Carlsbad, カリフォルニア州) に溶解した 4 から 20 % ポリアクリルアミド勾配ゲルを用いるウェスタンブロットによって分析する。別に、10 μ l のサンプルを、先ず、2 μ l のジチオスレイトール (100 mM) を加えて還元し、80 $^{\circ}C$ で 2 分加熱し、次いでもう一つのレーンに負荷する。あらかじめ染色した分子量マーカー See Blue Plus 2 (Invitrogen, Carlsbad, カリフォルニア州) を用い、ゲルの上の分子量を評価する。ゲルタンパクを、14.4 g/l のグリシン、3 g/l の Tris Base、10 % メタノール、および 0.05 % の SDS から成る転送バッファーを用いてニトロセルロース膜に転送する。この膜をブロックし、CAP-特異的モノクローナル抗体 (0.5 μ g/ml の濃度で) で探索し、メーカーの指示に従って、Invitrogen Western Breeze Chromogenic キット-抗マウスを用いて現像する。腫瘍細胞膜サンプルの還元サンプルにおいて、著明なバンドが、対応する癌関連タンパクの予想された分子量の 10 % 範囲内の分子量を移動するのが観察される。

20

【0415】

(実施例 9：ワクチンの調製)

本発明は、癌細胞によって生産される、または該細胞と関連する抗原として作用する、本発明のペプチドを用いて、患者の体内で癌関連ポリペプチドを発現する細胞に対する、免疫反応を刺激する方法にも関する。本発明のこの局面は、癌関連ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを発現する癌細胞または細胞に対し、ヒトにおいて免疫反応を刺激する方法を提供する。本方法は、ヒトに、免疫原量のポリペプチドを投与する工程を含み、該ポリペプチドは、(a) ヒト癌関連タンパクのアミノ酸配列、または、(b) ヒトの内因性レトロウィルス癌関連タンパクのアミノ酸配列を含むポリペプチドのムテインまたは変異種を含む。

30

【0416】

(実施例 10：治療試験の手段としてポリペプチドを発現するトランスジェニック動物の生成)

癌関連核酸は、前立腺癌関連遺伝子の機能または調節研究において、遺伝学的に修飾された非ヒト動物、または、その部位特異的遺伝子修飾を生成するために、あるいは、前立腺癌を含めた疾病の動物モデルを作製するために使用される。「トランスジェニック」という用語は、宿主細胞において安定に継代される、外来癌遺伝子 (単複) を有する遺伝学的に修飾された動物を含むことが意図される。この宿主細胞において、遺伝子 (単複) は、修飾タンパクを生産するように配列を変えられてもよく、または、リポーター遺伝子に、外来の癌関連 LTR プロモーターを動作可能的に連結させてもよい。トランスジェニック動物は、ゲノムの中にランダムに組み込まれた核酸構築体を通じて作製されてもよい。安定な組み込み用のベクターとしては、プラスミド、レトロウィルス、および他の動物ウィルス、YAC 等が挙げられる。興味深いものは、トランスジェニック哺乳類、例えば、ウシ、ブタ、ヤギ、ウマ等、特にげっ歯類、例えば、ラット、マウス等である。

40

50

【0417】

修飾された細胞または動物は、癌関連遺伝子の機能および調節の研究に有用である。例えば、一連の小さな欠失および／または置換を、癌関連遺伝子の中に作製して、発癌における様々な遺伝子の役割を決めてもよい。興味深い特定の構築体は、癌関連遺伝子発現、優勢陰性癌関連遺伝子突然変異、および癌関連遺伝子の過剰発現をブロックするためのアンチセンス構築体が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。癌関連遺伝子またはその変異種の、通常は発現されない、あるいは発達の異常な時期にしか発現されることのない細胞または組織における、発現が提供される。さらに、通常は生産されることのない細胞において癌関連タンパクの発現を実現することによって、細胞行動の変化を誘発することが可能である。

10

【0418】

ランダム組み込みのためのDNA構築体は、組み換えと仲介するために、相同性領域を含むことを要しない。好都合なことに、陽性および陰性選択用のマーカーが含まれる。哺乳類細胞をトランスフェクトするための各種技術については、Keown et al., Methods in Enzymology 185: 527-537 (1990)を参照されたい。

【0419】

胚性幹（ES）細胞については、ES細胞系統が用いられるか、または胚性細胞が、宿主、例えば、マウス、ラット、モルモット等から新たに獲得される。このような細胞は、適切な線維芽細胞フィーダー層で培養するか、または、適切な増殖因子、例えば、白血病抑制因子（LIF）の存在下に培養する。ES細胞が形質転換された場合、該細胞は、トランスジェニック動物を作製するのに使用することが可能である。形質転換後、細胞を適切な培養液中でフィーダー層の上にプレートする。構築体を含む細胞は、選択媒体を用いることによって検出される。コロニーが成長するのに十分な時間が経過した後、細胞は取り出され、構築体の組み込みに関して分析される。陽性のコロニーは、その後胚操作および胚盤胞注入のために用いられてよい。胚盤胞は、4から6週齢の排卵刺激された雌から得られる。ES細胞はトリプシン処理され、修飾された細胞が、胚盤胞の胚盤腔の中に注入される。注入後、胚盤胞は、擬似妊娠雌の各子宮角に戻される。次に、雌は臨月まで育成され、得られたキメラ動物は、構築体を抱える細胞についてスクリーニングされる。異なる表現型の胚盤胞およびES細胞を準備することによって、キメラ子孫は簡単に検出することが可能である。

20

30

【0420】

キメラ動物は、修飾遺伝子の存在についてスクリーニングされ、修飾体を含む雄および雌が掛け合わされ、ホモ接合の子孫を生産する。遺伝子変化が、発達のある時点で致死を引き起こした場合は、組織または器官は、同種移植片、コンジェニック移植片、または移植片、またはインビトロ培養物として維持される。トランスジェニック動物は、非ヒトである限り、実験動物、愛玩動物等の任意の動物であってもよい。トランスジェニック動物は、機能的実験、薬剤スクリーニング等、例えば、前立腺癌に対する候補薬剤の作用の決定、可能な治療薬または治療処方等の試験に使用される。

【0421】

40

（実施例11：CA特異的抗体による診断画像法）

本発明は、初回診察時に癌患者の病期段階を正確に判定するため、および、癌転移を早期検出するための、癌関連ポリペプチドに対する抗体の使用を含む。癌関連ポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体を用いるラジオイムノシンチグラフィは、さらに別の癌特異的診断テストを提供する。本発明のモノクローナル抗体は、癌の組織病理学的診断のために使用される。

【0422】

ヌードマウスにおける、ヒトの癌細胞から成る異種移植片の皮下移植が、本発明の、テクネチウム-99m (^{99m}Tc) - 標識モノクローナル抗体が、Marks, et al., Brit. J. Urol. 75: 225 (1995) によってセミノーマ細胞に

50

関して記載されたように、うまくこの異種移植片を画像記録することができるのかどうか試験するのに用いられる。癌関連ポリペプチドに対して特異的な各モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ腫瘍を抱えるBALB/cマウスの腹水から、タンパクAセファロースを備えたアフィニティークロマトグラフィーによって精製される。コントロールモノクローナル抗体、例えば、アビジン-特異的モノクローナル抗体 (Skea, et al., J. Immunol. 151:3557 (1993)) を含む精製抗体を、還元後、Mather, et al., J. Nucl. Med. 31:692 (1990) and Zhang et al., Nucl. Med. Biol. 19:607 (1992) の方法を用いて ^{99m}Tc で標識する。ヒト癌細胞を抱えるヌードマウスの腹腔内に200-500 μCi の ^{99m}Tc -標識抗体を注入する。注入から24時間後、動物から約8 cm離してセットした、6 mmのピンホールコリメータを備えたSiemensのZLC3700ガンマカメラを用いてマウスの画像を得る。画像記録後のモノクローナル抗体の生物分布を決定するために、正常な器官および腫瘍を摘出し、重量を計測し、組織および注入体サンプルの放射活性を測定する。さらに、抗腫瘍化合物に接合した癌関連抗原特異的抗体を、癌特異的化学的療法に使用する。

【0423】

(実施例12：免疫組織化学的方法)

癌患者の凍結組織サンプルを、最適切断温度 (OCT) 化合物に包埋し、イソペンタン中でドライアイスによって急速凍結した。Leica 3050 CMミクロトームによって、5 μm 厚で凍結切片を薄切し、vectaboundコートスライドに解凍マウントする。切片は、エタノールによって-20°Cで固定し、室温で一晩空気乾燥した。固定切片を-80°Cで使用時まで保存した。免疫組織化学のために、組織切片を回収し、先ずブロッキングバッファー (PBS, 5%正常ヤギ血清、0.1%Tween 20) で室温で30分インキュベートし、次に、ブロッキングバッファーに希釈した (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 癌関連特異的モノクローナル抗体とコントロールモノクローナル抗体と120分インキュベートした。次に、切片を、ブロッキングバッファーによって3回洗浄した。結合モノクローナル抗体を、0.1 M酢酸ナトリウムバッファー pH 5.05 および0.003%過酸化水素 (Sigmaカタログ番号H1009) に溶解した、ヤギ抗マウスIgG+IgM (H+L) F(ab')₂-ペルオキシダーゼ結合体およびペルオキシダーゼ基質ジアミノベンジジン (1 mg/ml 、Sigmaカタログ番号D5637) で検出した。染色スライドは、ヘマトキシリンでカウンターステインし、Nikon顕微鏡で検鏡した。

【0424】

癌関連タンパク (抗原) に対するモノクローナル抗体を用いて、各種組織から得られた細胞系統との反応性を調べた。様々な恒久細胞系統由来の細胞を、プロテアーゼを使わずに増殖表面から取り出し、OCT化合物に詰め、包埋した。細胞を凍結し、薄切し、次いで、標準的IHCプロトコールによって染色した。Cell Array (商標) 技術は、WO01/43869に記載されている。外科的切除によって得られた正常組織 (ヒト) を凍結し、スライドにマウントした。凍結切片を、Leica 3050 CMミクロトームによって、5 μm 厚で薄切し、vectaboundコートスライドに解凍マウントした。切片は、エタノールによって-20°Cで固定し、室温で一晩空気乾燥した。癌関連特異的モノクローナル抗体の正常組織に対する結合を定量するのにPolyMICA (商標) 検出キットを用いた。一次モノクローナル抗体は、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で用いた。

【0425】

(実施例13：siRNAトランスフェクション)

SEMA4Dに対するsiRNAを、SEMA4D遺伝子に対して相補的となるように設計した。SEMA4Dに対して使用されたsiRNAオリゴヌクレオチドを表4に示す。siRNAトランスフェクションは、トランスフェクション試薬販売業者 (Invitrogen) の推薦に従って行った。細胞をトランスフェクトするのに使用した最終siRNA濃度は、別様に指示しない限り、100 nMであった。一般に、細胞は、トランス

フェクション当日、30－50%集密度に増殖していた（例えば、48ウェルプレートではウェル当たり5000－20000個細胞）。

【0426】

表4

【0427】

【表13】

siRNAオリゴヌクレオチドの表			
遺伝子	Sgrs ID	siRNA 名称	標的配列
Sema4D	38	HSI0038-2	AAGTACATGCAGAGCACCACA; 配列番号7

10

Opti-MEM I (Invitrogen)、siRNAオリゴ、およびPlus Reagent (Invitrogen)の混合物を、Invitrogenによって推薦されるとおりに調製し、室温で15－20分インキュベートした。次に、この混合物を、適当量のOligofectamine (Invitrogen)と、Opti-MEM/siRNA/Plus Reagentの混合物中で合わせ、室温で15分インキュベートした。細胞培養媒体を、細胞含有ウェルから除去し、適当量のOpti-MEM Iによって置換した。適当量のsiRNA/Oligofectamineミックスを細胞に加えた。次に、細胞を37℃、5%CO₂で4時間インキュベートし、次いで、培養媒体を加えた。0日目、プレートを直ちに分析した。その後の時点で、トランスフェクション試薬/媒体混合物を、新鮮な細胞培養媒体によって置換し、細胞を、37℃、5%CO₂でインキュベートした。トランスフェクション混合物の容量を、組織培養プレート、すなわち、6－、48－、96－ウェルプレートに応じて増減させた。

20

【0428】

（実施例14：siRNAトランスフェクト細胞のQPCR分析のためのRNA抽出）

QPCR分析を実行するために、RNAeasy 96キット (Qiagen)を用い、トランスフェクト細胞からDNAを抽出する。実行は、メーカーの推薦に従った。一般に、細胞は、48ウェルプレートの1ウェルから収集し、分解し、RNAは、96ウェルRNAeasyプレートの1ウェルから収集する。

【0429】

（実施例15：siRNAトランスフェクト細胞の細胞増殖アッセイ）

増殖アッセイは、一般的アッセイ、例えば、Cell Titer Glo (Promega)またはWST-1 (Roche Applied Science)を用いて行い、かつ、メーカーの推薦に従って行った。一般に、アッセイは、三重に行った。増殖の抑制パーセントは、無規則化siRNAコントロールオリゴでトランスフェクトした細胞に対する相対値として計算した。

30

【0430】

図4は、RNAiによる、SEMA4D発現の沈黙化作用を示す。SEMA4D siRNAによる3－4日間の処理は、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘発した。図4Aでは、50nM siRNA HSI0038-2によってトランスフェクトされたOV CAR5およびIGR-OV1細胞では僅かな抗増殖作用が観察されたが、一方MDA-MB-231細胞では著明な抗増殖作用が観察された。図4Bに示すように、MDA-MB-231細胞における増殖抑制は、アポトーシスの増加と関連していた。MDA-MB-231細胞は、コントロールsiRNA（上段）、またはSEMA4D siRNA HSI0038-2（下段）によって50nMで72時間トランスフェクトされ、その後、アポトーシスの評価のためにアネキシンV/7-AAD染色によってトランスフェクトされた。初期段階のアポトーシス細胞の著明な増加（アネキシンV⁺/7-AAD⁻）が、コントロールsiRNAトランスフェクト細胞（2.9%）に対し、SEMA4D siRNA処理細胞（19.1%）に観察された。これらのデータは、SEMA4Dの発現が、調べた細胞系統における細胞増殖に、かつアポトーシスの阻止に必要であることを示

40

50

す。

【0431】

SEMA4D siRNAに対するWST-1アッセイの結果を図5に示す。見て取れるように、Sema4D（この図ではSGRSS0038と呼ばれる）によってRat-1細胞を安定にトランスフェクトすると、増殖の著明な増加がもたらされる。

【0432】

（実施例16：細胞移動のsiRNA抑制アッセイ）

細胞移動は、メーカーの指示に従って、QCM（商標）フィブロネクチン被覆細胞移動アッセイ（Chemicon International INC.）を用いて測定した。

【0433】

（実施例17：Rat-1安定細胞系統生成）

細胞はトリプシン処理し、1回PBSで洗浄し、細胞培養媒体[DMEM（グルタミン含有）+10%FBS（ウシ胎児血清）]に再懸濁し、および、ウェル当たり 2×10^6 細胞を、2mlの総容量として6ウェル培養プレートに撒いた。プラスミドDNA（2μg）を、100μlの血清無添加媒体と混ぜ合わせ、次いで、Superfectトランスフェクション試薬（Qiagen）を加え、10秒間渦巻き攪拌し、室温で10分インキュベートした。複合体が形成される間、細胞をPBSで2回洗浄した。次に、600ulのDMEM+10%FBSを複合体に加え、混ぜ合わせ、細胞含有ウェルに転送し、37℃で4時間インキュベートした。次に、2mlのDMEM+10%FBSを加え、次いで、37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。

【0434】

次に、細胞をトリプシン処理し、1mlのDMEM+10%FBS+800ug/ml G418に再懸濁し、様々な密度で（1：10、1：20から1：100まで）10cm皿に撒いた。皿を、37℃、5%CO₂で、G418耐性コロニーが形成されるまでインキュベートした。その後、個々のクローンを取り出し、1mlのDMEM+10%FBS+800ug/ml G418を含む24ウェル皿に転送した。

【0435】

クローン細胞をさらに拡張し、プラスミド発現による遺伝子産物の存在について、一般にウェスタンブロット分析によってスクリーニングした。

【0436】

（実施例18：軟寒天形質転換アッセイ）

0.7%および1%の低温融解アガロース（DNA級、J. T. Baker）溶液を、滅菌水で調製し、沸騰するまで加熱し、水浴中で40℃に冷却した。2X DMEM溶液を、10X粉末DMEM（Invitrogen）を水と混ぜ、1リットル容量当たり3.7gのNaHCO₃を加え、次いでFBSを20%まで加えた。0.75mlの培養媒体（事前に40℃に温めたもの）を、0.75mlの1%アガロース溶液と混ぜ合わせ、最終的にウェル当たり1.5mlの0.5%アガロース溶液を6ウェル皿に加えた。NIH-3T3で一過性にトランスフェクトさせたSEMA4D発現細胞、またはNIH-3T3ベクターコントロール細胞をトリプシン処理し、PBSで2回洗浄し、1mlのDMEM+10%FBS当たり50000細胞に希釈した。0.1mlのこの細胞懸濁液を、1mlの2X DMEM+20%FBSおよび1mlの0.7%アガロース溶液とゆっくりと混ぜ合わせ、最終的に1.5mlの懸濁液を、6ウェル皿に加えた。0.5%寒天が固化した。この寒天プレートを、加湿インキュベータ中で37℃、5%CO₂で10-14日インキュベートし、細胞には、3-4日置きに新鮮な1X DMEM+10%FBSを交換補給した。

【0437】

軟寒天形質転換の結果は、SEMA4D発現ベクターによって一過性にトランスフェクトされた細胞には停留依存性の無いことを示す。

【0438】

10

20

30

40

50

(実施例 19：マウス腫瘍形成性アッセイ)

Rat 1 安定細胞系統を、二つの T150 フラスコにて 70-80% の集密度となるまで培養した。細胞をトリプシン処理し、PBS にて 2 回洗浄し、PBS にて 10^7 、 10^6 、および 10^5 細胞/ml となるように再懸濁した。この細胞懸濁液は、マウスに注入するまで氷上に維持した。3-5 週齢の雌性 NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J マウスを JAX West の M-3 施設から入手し (UC Davis)、JAX West の West Sacramento 施設の分離ユニットにおいてケージ当たり 4 匹収容した。25 ゲージ針を用い、マウスに、0.1 ml の細胞懸濁液を、胸部の皮下 (1 匹のマウスについて 2 箇所) に注入した。腫瘍の形成が始まると、腫瘍の成長を、キャリパーで週に 2 回測定した。腫瘍は、鼻-尾および内側-外側の 2 方向で測定した。測定値は、幅 x 長さとして記録し、腫瘍容積は、変換式 (長さ x 幅²) / 2 を用いて計算した。

10

【0439】

図 6 は、SEMA4D の腫瘍形成性アッセイの結果を示す。コード SGRS038 は、SEMA4D をコードする遺伝子によって形質転換された細胞を表す。インビボ腫瘍増殖は、コントロールと比べ、SEMA4D をコードする遺伝子によってトランスフェクトされた細胞において著明に増加することが見て取れる。さらに、発癌アッセイは、この遺伝子が癌遺伝子であることを裏付ける。

【0440】

(実施例 20：フローサイトメトリーによる SEMA4D ハイブリドーマの試験)

細胞力価をヘモサイトメータによって定量した。適当容量の細胞を、1 から 2 個の、15 ml 円錐チューブに転送した。細胞を、Eppendorf の臨床遠心器において 1100 rpm、5 分、室温または 4℃ で遠心し、ペレットとした。ペレットを避けながら、媒体のほとんどを吸引した。ペレットを、チューブをたたくことによって残留媒体に再懸濁した。冷却染色バッファー (PBS、2% BSA、0.05% アジ化ナトリウム) をチューブ (単複) に、最終的に 5×10^5 細胞/ml 容量となるように加えた。細胞を、滅菌ピペティング槽に転送した。マルチチャンネルピペットを用いて、100 μ l を各ウェルに分液した。プレート (単複) を氷上で 10 分冷却した。次に、プレートを Eppendorf の臨床遠心器において 3000 rpm、3 分、室温で遠心し、細胞をペレットとした。上清は捨て、ひっくり返したプレートを布巾に当て、過剰な上清を除去した。マルチチャンネルピペットを用いて、50 μ l のハイブリドーマ mAb 上清、またはコントロールの抗体ミックス/上清を、マスタープレートのコラムから、細胞プレートの対応するコラムに転送した。細胞は、数回パイペティングすることによって再懸濁した。次に、プレートを氷上で 30 分冷却した。冷却洗浄バッファー (PBS、0.05% アジ化ナトリウム含有) を、新鮮なピペティング槽に投下した (プレート当たり約 20 ml)。8 チャンネルピペットを用いて、200 μ l を各ウェルに分液した。細胞をペレットとし、洗浄バッファーを除去した。2 回洗浄を行った。マルチチャンネルピペットを用いて、50 μ l の二次抗体ミックスを、プレート全体にコラムからコラムへ転送した。すなわち、ウェル当たり、3 μ l のヤギ (Fab' 2) 抗マウス IgG-PE である。暗黒中で氷上で 30 分プレートをインキュベートした。次に、細胞を 2 回洗浄し、暗黒中氷上で 30 分インキュベートした。プレートは、メーカーの指示に従って、Guava-PCA 装置によって読み取った。

20

30

40

【0441】

抗 SEMA4D モノクローナル抗体を用いるフローサイトメトリーの結果は図 7 に示され、SEMA4D の検出に B098 モノクローナル抗体の有効性を実証する。

【0442】

(実施例 21：免疫蛍光計測による SEMA4D ハイブリドーマの試験)

Jurkat および K562 細胞を、染色前、RPMI-1640 (L-グルタミン含有) および 10% FBS において 24 時間インキュベートした。細胞を収集し、PBS で 1 回洗浄し、カウントした。エッペンドルフチューブ 1 個当たり 50,000 細胞を投下した。細胞を、3,000 rpm で 5 分遠心した。細胞を染色するため、50 μ l の SE

50

MA4Dハイブリドーマ上清を1個のエッペンドルフチューブに加え、50 μ lのPBSをコントロールに加えた。チューブを室温で30分インキュベートした。次に、細胞を、1ml PBSで2回洗浄した。細胞を3,000 rpm、5分でペレットとし、4%フォルムアルデヒド(PBSで希釈)により室温で10分固定した。次に、この固定細胞を1mlのPBSで2回洗浄した。洗浄した細胞を3,000 rpm、5分でペレットとした。PBS(1:200)に溶解した抗マウスCy3接合抗体25 μ lを各チューブに加え、チューブを室温で20分インキュベートした。次に、細胞を1mlのPBSで2回洗浄し、細胞を3,000 rpm、5分でペレットとした。上清は捨てた。10 μ lのPBSを各チューブに加え、細胞を再懸濁した。DAPI含有Vectashieldを1滴(約15 μ l)ガラススライドに滴下した。5 μ lの再懸濁細胞をVectashieldに加え、混ぜ合わせた。カバースリップを、マイクロスライドの上に置いた。細胞を、DAPIおよびCy3チャンネルを通じて蛍光顕微鏡下に観察した。

10

【0443】

乳癌サンプルの染色は、主に神経およびリンパ球に見られた。上皮細胞には、目立った染色は観察されなかった。調べた8個の標本は全て同様の染色パターンを示した。卵巣癌の染色によって、8個の標本の内1個は、僅かな細胞原形質および膜の染色を示した。高い遺伝子発現を有する標本は、主に、リンパ球の染色を示した。膀胱、結腸、腎臓、肝臓、肺、すい臓、前立腺、および皮膚を含む、調べた他の腫瘍タイプは、リンパ球に局所の発現を示した。調べたリンパ腫サンプルでは、5個のリンパ腫の内3個が、B細胞および退形成リンパ腫において染色を示した。正常組織では、腎臓が、近位管および遠位管において染まっていた。一つの正常な脾臓標本において強力な免疫活性が、脾臓の小結節(白髄)に局在して観察された。他の組織で観察された唯一の著明な染色は、散在的な浸潤および神経末端であった。

20

【0444】

抗SEMA4Dモノクローナル抗体、およびSEMA4D上タグに対する抗体を用いた、タグ付きSEMA4Dを発現する生細胞の免疫蛍光法によって、このモノクローナル抗体がSEMA4Dを特異的に検出することが明らかにされた。このモノクローナル抗体はまた、免疫蛍光法によって、SEMA4D陽性細胞系統(Jurkat)を染色する一方、陰性のコントロール細胞系統(K-562)を染めることができなかった。

【0445】

(実施例22:アポトーシスプロトコール)

siRNAトランスフェクションプロトコールに従って、適切なsiRNAによって細胞をトランスフェクトした。所望の時点で、細胞を収集し、Guava TechnologiesのGuava Nexinキットから支給される試薬および案内を用いて、Annexin V-PEおよび7-AADによって染色した。フローサイトメトリー、データ獲得、および分析は、Guava-PCA(Guava Technologies)および分析ソフトウェアを用いて行った。

30

【0446】

アポトーシスアッセイの結果を図4Bに示す。

【0447】

(実施例23:発現データ)

表6は、ある範囲の腫瘍組織におけるSEMA4Dの発現レベルを示す。3種類の発現アッセイの結果が表に示される。注記U133A&B(アレイタイプコラム参照)は、Affymetrixオリゴヌクレオチド用発現アレイを使用したことを示す(ワールドワイドウェブサイト: affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=hg-u133-plus)。注記Chiron cDNAアレイによる結果は、Chironの社内スポット型cDNAアレイを用いて得られた。残りの結果は、Affymetrix U133 plus 2 oligoアレイを用いて得られた(ワールドワイドウェブサイト: affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx)

40

50

? product = hg-u133-plus)。

【0448】

最初の二つのアレイフォーマットの組織サンプルは、レーザーキャプチャーマイクロディセクション (LCD) (後述の定義参照) を用いて収集した。第3形のアレイ (U133 plus 2) の組織サンプルは、標準の手動ディセクション法を用いて収集した。

【0449】

差次的発現レベルは、各アレイタイプについて別々の方法で評価した。U133A & B および EVD アレイの結果は、定められた閾値の上または下に発現レベルを持つサンプルの数で表す。注記「2X一致」、または「0.5X一致」は、サンプルの数 (差次的発現レベルを示すサンプル%のコラムに示される) が、コントロール値よりも2X以上大きい発現レベルを持つ、または、コントロール平均の半分よりも小さい発現レベルを持つことを示す。したがって、これらは、遺伝子の上方または下方発現を示す (“t” ≤ 0.001の有意レベルで)。

【0450】

U133+2アレイの発現レベルは、80-50、または80-80パーセンタイル比で表される。結果は全て0.001%レベルの有意性においてt検定に合格した。80-50パーセンタイル比結果では、腫瘍サンプルの20%は、コントロールサンプルの50%と比べた場合、2倍レベルの過剰発現を上回る発現を持つ。80-80パーセンタイル比結果では、腫瘍サンプルの20%が、コントロールサンプルの80%と比べた場合、3倍の過剰発現を上回る発現を持つ。

【0451】

標的照準用腫瘍関連抗原の選択

腫瘍細胞および隣接正常細胞のレーザーディセクション、およびディセクトされた細胞からのRNAの生成

レーザーキャプチャーマイクロディセクション (LCM) を用いて、患者から、正常および癌組織を収集し、これらの組織から、当技術分野で周知の技術 (例えば、Ohyam et al. (2000) Biotechniques 29:530-6; Curran et al. (2000) Mol. Pathol. 53:64-8; Suarez-Quian et al. (1999) Biotechniques 26:328-35; Simone et al. (1998) Trends Geriatr 14:272-6; Conia et al. (1997) J. Clin. Lab. Anal. 11:28-38; Emmert-Buck et al. (1996) Science 274:998-1001を参照) を用いてRNAを調製した。LCMは、特定の細胞タイプの単離を実現し、事実上均一な細胞サンプルを提供するので、これからも同様に純粋なRNAサンプルが得られる。

【0452】

マイクロアレイ分析

cDNAの生成: ディセクトされた細胞から生成される全体RNAを用い、Affymetrix 2 サイクルcDNA合成キット (カタログ番号900432) によってcDNAを生成する。8 μlの全体RNAを、11 μLの反応において1 μLのT7-(dT)24プライマー (50 pmol/μL) と用いた。反応系は70°Cに12分加熱した。次に、この混合物を室温に5分冷却した。9 μLのマスターミックス (4 μL 5x 第1鎖cDNAバッファー、2 μL 0.1M DTT、1 μL 10mM dNTPミックス、2 μL Superscript II (600U/μL)) を加え、混合物を42°Cで2.5時間インキュベートした (混合物の総容量は20 μLであった)。氷上での冷却後、第2鎖合成を下記のように完了させた。上の混合物20 μLを、130 μLの第2鎖マスターミックス (91 μL水、30 μL 5x 第2鎖反応バッファー、3 μL 10mM dNTPミックス、1 μL 10U/μL e. coli DNAリガーゼ、4 μL 10U/μL E. coli DNAポリメラーゼI、1 μL 2U/μL e. coli RnアーゼH) と混ぜ合わせ、16°Cで2時間インキュベートした。氷上での冷

10

20

30

40

50

却後、dsDNAを反応混合物から単離した。簡単に言うと、QiaQuick PCT精製キットを用いた（Qiagen, カタログ番号28104）、および5容量のPBを1容量のcDNAの混合物に加えた。次に、cDNAをメーカーの指示に従ってQIAquickスピンカラム上で精製したところ、最終的に60μLを得た。

【0453】

ビオチン標識cRNAの作製。上に作製し、精製したcDNAを用い、下記のようにビオチン標識RNAを作製した。QIAquickカラムから回収した60μLのcDNAを、中等に加熱した高速真空で22μLの容量に下げた。次に、これを、ENZO BioArray高収率RNA転写キット（カタログ番号4265520）と共に用いた。簡単に言うと、4μL 10x HY反応バッファー、4μL 10xビオチン-標識リボヌクレオチド、4μL DTT、4μL Rnアーゼ阻害剤ミックス、および2μL T7 RNAポリメラーゼを含むマスターミックスを、22μLの精製cDNAに加え、37℃で4から6時間放置してインキュベートした。次に、Qiagen RNeasyキット（カタログ番号74104）をメーカーの指示に従って用いて反応系を精製した。

【0454】

cRNAの断片化。上のcRNA15から20μgを、8μLの5x断片化バッファー（200mM Tris-酢酸、pH8.1, 500mM 酢酸カリウム、150mM 酢酸マグネシウム）、および水と混合し、最終容量を40μLとした。混合物を94℃で35分インキュベートした。通常、この断片化プロトコールは、サイズにして35から200塩基の範囲を持つRNA分布を生成する。TAEアガロース電気泳動を用いて断片化を確認した。

【0455】

アレイハイブリダイゼーション。上の断片化cRNAを用いて、ハイブリダイゼーションカクテルを作製した。簡単に言うと、上記cRNAの40μLを、1mg/mLのヒトCot DNAおよび適当なコントロールオリゴヌクレオチドと混ぜ合わせた。さらに、3mgのニシン精子DNA（10mg/mL）を、150μL 2xハイブリダイゼーションバッファー（100mM MES、1M NaCl、20mM EDTA、0.01% Tween-20）および水と共に、最終容量が300μLとなるように加えた。次に、この溶液200μLをU133アレイ（Affymetrixカタログ番号900370）に負荷し、45rpmの定常速度で45℃で一晩インキュベートした。次に、ハイブリダイゼーションバッファーを除去し、アレイを洗浄し、メーカーのプロトコールに従って、200μLの、非厳格洗浄バッファー（6X SSPE、0.01% Tween-20）で、GeneChip Fluidicsステーション450（Affymetrix, カタログ番号00-0079）を用いて染色した。

【0456】

アレイを走査する。メーカーのプロトコールに従ってGeneChipスキャナ3000（Affymetrixカタログ番号00-0217）を用いて、上記のアレイを走査した。

【0457】

可能な腫瘍細胞抗原標的の選択。癌抗原は、隣接する健康組織、または、プールされた正常組織に対し、癌細胞（一次癌または転移癌のいずれか）における抗原の発現レベルを比較することによって、標的対象として選択した。選択した癌抗原は、周辺正常組織に対し、少なくとも3倍（300%）の発現増加を示した。この3倍増加は、プールされた、市販の正常組織サンプル（参照標準ミックスまたはRSM、プールは各組織タイプについて作製された）の大部分と比較しても見られた。下記の表は、それぞれの遺伝子に関するアレイ分析による倍数増加データを表示する。表において、数字は、正常組織と比較して、発現が2、3、または5倍の増加を示す、分析された患者サンプルのパーセントを表す。

【0458】

（表6）

10

20

30

40

50

【 0 4 5 9 】

【 表 1 4 】

遺伝子の 記号	アレイ タイプ	腫瘍型およびコン トロールの表示	結果のタイプ	組織試料 の平均数	試料数の 標準偏差	発現の異なる レベルを示す 試料 (%)	何倍差ま たは何% 差につい ての標準 偏差	反復実験数
SEMA4D	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	2X 一致	75.0	0.0	48.5	0.7	2.0
SEMA4D	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	2X 一致	33.0	0.0	22.5	2.1	2.0
SEMA4D	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応する もの	2X 一致	36.0	0.0	50.0	0.0	2.0
SEMA4D	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応 するもの	2X 一致	35.0	0.0	41.5	6.4	2.0
SEMA4D	U133A & B	結腸癌	2X 一致	26.0		35.0		1.0
SEMA4D	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0		30.0		1.0
SEMA4D	U133A & B	前立腺癌	<=0.5X 一致	22.0		23.0		1.0
遺伝子の 記号	アレイ タイプ	腫瘍型およびコン トロールの表示	結果のタイプ	組織試料 の平均数	試料数の 標準偏差	正常との差 (単位: 倍)	何倍差ま たは何% 差につい ての標準 偏差	反復実験数

【 0 4 6 0 】

【 表 1 5 】

SEMA4D	U133A & B	血液／リンパ癌腫の すべて 対 本質的 に正常	80-50 パーセンタイル 比	60.0		4.0		1.0
--------	--------------	-------------------------------	-----------------------	------	--	-----	--	-----

(実施例 2 4 : 配列)

【 0 4 6 1 】

【表 1 6】

配列番号 1; 受託番号 NM_006378:

gctgtaacactcaccgtgaaggtctgcagcttccactcccgagccagcgagaccacgaacccaccagaaggaagaa
actctgaacacatctgaacatcagaagggacagactccagacgcgccaccactctgctaaccacagatagtgga
agaaacccatgtgctgaaatgtttgacgacactgatgggttgactctgctaactggaatggcttattgtgcaagaa
agtacacctggtcgggtcctggggctcatctctagcaccagcaaagatttctgaagacgtctttctagaaatgac
tggaagtttcaagaggcataagatacagcatttctcttgaggccctgaagaagtatcaagtgggctttgacatt
gcgggtggtagagcgacccctcctcacctggagaactgggaaatgtggattctcagggaccgcgctgttcacgag
ctccaggtgtgctgctggccctggctcctggggcgctgagccgcacatctgcaatagcacacttgcccgccacctg
ctgccgtgagcctttgctgctgaagccctggggctcgctctacctgatgaggatgtgcacccccattagggggc
tgctcatggcccttgcaagtgtgtttgggacagcgatggcatttgacccataccccggatcacctgggagcaca
gagaggtgcacctgggtgcagtttcatgagccagacatctacaactactcagccttgctgctgagcgaggacaagg
acaccttgtagacataggtgccccgggagggcgtcttcgctgtgaacgcactcaacatctccgagaagcagcatgagg
tgtattggaaggtctcagaagacaaaaagcaaatgtgcagaaaaggggaaatcaaacagacagagtgctca
actacatccgggtgctgcagccactcagcgccacttccctttacgtgtgtgggaccaacgcattccagccggcct
gtgaccacctgaacttaacatccttttaagtttctggggaaaaatgaagatggcaaaggaagatgtccctttgacc
cagcacacagctacacatccgtcatggttgatggagaactttattcggggacgtcgtataattttttgggaagtg
aaccatcatctccgaaattcttcccacagtcctctgaggacagaatatgcaatcccttggtgaacgagccta
gtttcgtgtttgctgacgtgatccgaaaaagcccagacagccccgacggcgaggatgacaggggtctacttctct
tcacggaggtgtctgtggagtatgagtttgtgttcagggtgctgatccacggatagcaagagtgtgcaaggggg
accagggcgccctgaggacctgcagaagaaatggacctccttccctgaaagcccgactcatctgctcccgccag
acagcggcttggtcttcaatgtgctgcgggatgtcttcgtgctcaggtccccgggctgaaggtgcctgtgttct
atgcactcttcaccccacagctgaacaacgtggggctgtcggaagtgtgcgcctacaacctgtccacagccgagg
aggtcttctcccacgggaagtacatgcagagcaccacagtggagcagtcacacaccaagtgggtgcgctataatg
gccccgtacccaagccgcgccctggagcgtgcacagcagggcacgggcccgaactacaccagctccttga
atttgccagacaagacgctgcagttcgttaaagaccacctttgatggatgactcggttaacccaatagacaaca
ggcccaggttaatcaagaaagatgtgaactacaccagatcgtgggtggaccggacccaggccctggatgggactg
tctatgatgtcatgtttgtcagcacagaccggggagctctgcacaaagccatcagcctcagcacgctgttcaca
tcacgaggagaccagctcttccaggactttgagccagtcacagacctgctgctgtcttcaaagaagggaaca
ggtttgtctatgtggtcttaactcgggctgggtccagggcccgctggccttctgtgggaagcacggcacctgcg
aggactgtgtgctggcgcgggacccctactgcgcctggagcccgcacagcagctgcgtggctctgcaccaga
ccgagagccccagcaggggtttgattcaggagatgagcggcgatgcttctgtgtgcccggataaaagttaaaggaa
gttaccggcagcattttttcaagcaggtggcacagcggaaactgaaatgctccccaaaaatccaacctggccggg
tcttttggaaagtccagaatgacgtgttgaggccgagagccccaagtacggtcttatgggcagaaaaaacttgc
tcactttcaacttgtcagaaggagacagtgggggtgaccagtgcctgtcagaggagaggggttaagaacaaaacgg

10

20

30

40

tcttccaagtggtcgccaagcacgtcctggaagtgaagggtggttccaaagcccgtagtgggccccacaccttgtagcag
ttgttcagacagaaggttagtaggattgcccacaaagtgttgggtggcatccaccaagggtcttctccccaaccc
cagccgtgcaggccacctcctccggggccatcaccccttctctccaaagcctgcgcccacccggcacatcctgcgaac
caaagatcgtcatcaacacgggtccccagctccactcggagaaaaccatgtatcttaagtccagcgacaaccggcc
tctcatgtccctcttctcttcttcttcttgttctcttctctgctctcttttctacaactgctataagggatacc
tgcccagacagtgcttgaaattccgctcggccctactaattgggaagaagaagcccaagttagatttctgtgacc
gtgagcagagcctgaaggagacgttagtagagccagggagcttctcccagcagaatggggagcaccccaagccag
ccctggacacccggctatgagaccgagcaagacaccatcaccagcaaagtccccacggatagggaggactcacaga
ggatcgacgaccttctgcccagggaacaagccctttgaogtcaagtgtgagctgaagttcgctgactcagacgcag
atggagactgaggccggctgtgcatccccgctggtgcctcggctgcgacgtgtccaggcgtggagagttttgtgt
ttctcctgttcagtatccgagctctcgtgcagtgtcgcgtaggttagcccgcatcgtgcagacaacctcagtcctc
ttgtctattttctcttgggttgagcctgtgacttggtttctctttgtccttttggaaaaaatgacaatccttgcat
cccagtccttgtgttccgaagtcagtcggagtacttgaagaaggcccacgggcggcacggagttcctgagccctt
ctgtagtgggggaaaggtggctggacctctgttggctgagaagagcatcccttcagcttccccctcccgtagcag
ccactaaaagattatttaattccagatttgaaatgacatttttagtttatcagattggtaacttatcgctgttgt
ccagattggcacgaaccttttcttccacttaattattttttaggattttgctttgattgtgtttatgtcatggg
tcatttttttttagttacagaagcagatgtgttaatatttagaagaagatgtatatcttccagattttgttatat
at ttggcataaaaatacggcttacgttgcttaagattctcagggataaaacttcccttttgctaaatgcattctttct
gcttttagaaatgtagacataaacactccccggagccactcacctttttctttttcttttttttttttaact
ttattccttgagggaagcattgtttttggagagattttctttctgtacttcgttttacttttcttttttttaac
ttttactctctcgaagaagaggaccttccacatccacgaggtgggttttgagcaagggaaggtagcctggatga
gctgagtgaggccaggctggcccagagctgagatgggagtgccgtacaatctggagcccacagctgtcggtcaga
acctcctgtgagacagatggaaccttcacaagggcgccctttgggttctctgaacatctcctttctcttctgtctc
aattgcatacccactgcctgcccagactttctatccagcctcactgagctgccactactggaagggaaactgggc
ctcggtggccggggccgcgagctgtgaccacagcacctcaagcatacggcgctgttcttgcactgtcctgaag
atgtgaatgggtggttacgatttcaacactgggttaatttcacactccatctccccgcttggtaaatacccatcggg
aagagacttttttccatgggtgaagagcaataaaactctggatgtttgtgcgcgtgtgtggacagctcttatctcc
agcatgataggattttgaccattttgggtgtaaactttgtgttttataagattttaccttgtttttatttttctact
ttgaattgtatacattttgaaagtacccaataaatgagaagcttctatccttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

mrnctpirgllmalavmfgtamafapipritwehrevhlvqfhepdiynysalllledkdtlyigareavfavna
lnisekqhevywkvksedkkakcaekgskqteclnyirvlqplsatslyvcgtnafqpacdhlntsfkflgkne
dgkgrcpfdpahsytsvmvdgelysgtsynflgsepiisrnseshplrteyaipwlnepsfvfadvirkspsdpsd
geddrvyffftevsveyefvfrvliipriarvckgdqgglrtlqkkwtsflkarlicsrpdsoglfnvlrdrvflr
spglkvvpvfyalfpqlnnvglsavcaynlstaeefvshgkymqsttveqshtkwvryngpvpkprpgacidsea
raanytsslnlpdktlqfvkdhplmddsvtpidnrprlikkdvnytqiivdrdtqaldgtvydvfmfstdrgalhk
aislehavhiieetqlfqdfepvqtlillsskkgnrfvyagsnsgvvqaplafcgkhgtcedcvlardpycawssp
tatcvalhqtespsrgligemsgdasvcpdkskgsyrqhffkhggtaelkcsqksnlarvfwkfqndvlkaespk
yqlmqrknllifnlsegdsqvyqclseervknktvfqvvakhvlevkvvpkpvpvaptlsvvqtegsriatkvlva

【表 18】

stqgsspptpavqatssgaitlppkpaptgtscepkiivintvpqlhsektmylkssdnrlmslflffvflcl
ffyncykgyllprqclksfrsalligkkpkksdfcdreqslketlvepgsfsqqngehpkpaldtgyeteqdtitsk
vptdredsqriddlsardkpfdvkcelkfadsdadgd

配列番号 3; 受託番号 BC054500 (配列番号 3 = ヌクレオチド配列):

gctgtaacactcacogtgaaggtctgcagcttcaactcccgagccagcgagaccacgaacccaccagaaggaagaa
actctgaacacatctgaacatcagaagggacagactccagacgcgccaccactctgctaaccagatagtgga
agaaacatgtgctgaaatgtttgacgacactgatgggttgactctgctaactggaatggcttattgtgcaagaa
agtacacctgggtcggttctgggtgctcatctctagcaccagcaaagatttctgaagacgtctttctgaaatgac
tggaagtttcaagaggcataagatacagcatttcttctgaggccctgaagaagtatcaagtgggctttgacatt
gcgggtggtgagagcgacccctcctcacctggagaactgggaatgtggattctcagggaccgcgtgttcacgag
ctccaggctgtgctgctggccctgggtcctggggcgctgagccgcatctgcaatagcacacttgcccggccactg
ctgccgtgagcctttgctgctgaagccctggggcgctcctctacctgatgaggatgtgcaccccatagggggc
tgctcatggcccttgacgtgatgtttgggacagcgatggcatttgacccataccccggatcacctgggagcaca
gagaggtgcacctgggtgcagtttcatgagccagacatctacaactactcagccttgctgctgagcgaggacaagg
acaccttgatcataggtgcccgggaggcggtcttctgctgtgaacgcactcaacatctccgagaagcagcatgagg
tgtattggaaggtctcagaagacaaaaagcaaatgtgcagaaaaggggaaatcaaacagacagagtgcctca
actacatccgggtgctgcagccactcagcgccacttccctttacgtgtgtgggaccaacgcattccagccggcct
gtgaccacctgaacttaacatcctttaagtttctggggaaaaatgaagatggcaaggaagatgtccctttgacc
cagcacacagctacacatccgtcatgggtgatggagaactttattcggggacgtcgtataattttttgggaagtg
aaccatcatctcccgaaattcttccacagtcctctgaggacagaatatgcaatcccttggtgaacgagccta
gtttcgtgtttgctgacgtgatccgaaaaagcccagacagccccgacggcgaggatgacaggggtctacttctct
tcacggaggtgtctgtggagtatgagtttgtgttcaggggtgctgatcccacggatagcaagagtgtgcaaggggg
accagggcggtgaggaccttgacagaagaaatggacctccttctgaaagcccgactcatctgctcccggccag
acagcggcttggtcttcaatgtgctgcgggatgtcttctgctcaggtccccgggcctgaaggtgcctgtgtct
atgcactcttccccacagctgaacaacgtggggctgtcggcagtgctgcgcctacaacctgtccacagccgagg
aggctcttctcccacgggaagtacatgcagagcaccacagtgaggcagtcacacaccaagtgggtgcgtataatg
gcccgggtacccaagccgcggcctggagcgtgcatcgacagcgaggcacgggcccgaactacaccagctccttga
atttgccagacaagacgtgcagttcgttaagaccacctttgatggatgactcggttaacccaatagacaaca
ggcccagggttaatcaagaaagatgtgaactacaccagatcgtgggtggaccggaccagggcctggatgggactg
tctatgatgtcatgtttgtcagcacagaccgggagctctgcacaaagccatcagcctcgagcacgctgttcaca
tcatcgaggagaccagctcttccaggactttgagccagtcacagacctgctgctgtcttcaaagaaggggaaca
ggtttgtctatgctggctctaactcgggcgtgggtccaggccccgctggccttctgtgggaagcacggcacctgcg
aggactgtgtgctggcggggacccctactgcgcctggagcccgcacagcgacctgctgggtctctgcaccaga
ccgagagccccagcaggggtttgattcaggagatgagcggcgatgcttctgtgtgcccggataaaaagtaaaggaa
gttacggcagcattttttcaagcacgggtggcacagcggaactgaaatgctcccaaaaatccaacctggccccggg
tcttttggaagttccagaatgacgtgttgaggccgagagcccaagtacgggtcttatgggcagaaaaaacttgc
tcatcttcaacttgtcagaaggagacagtgggggtgtaccagtgcctgtcagaggagaggggttaagaacaaaacgg
tcttccaagtgggtcgccaagcacgtcctggaagtgaaggtggttccaaagcccgtagtggccccccaccttgtcag
ttgttcagacagaaggtagtaggattgccaccaaagtgttggtggcatccaccaaggggtcttctcccccaaccc
cagccgtgcaggccacctcctccggggccatcaccttctcccaagcctgcgcccaccggcacatcctgcgaac

10

20

30

40

【0 4 6 4】

10

20

30

40

【表 20】

配列番号 5; 受託番号 AAH54500:

mrmctpirgllmalavmfgtamafapipritwehrevhlvqfhepdiynysalllsedkdtlyigareavfavna
 lnisekqhevywkvksedkkakcaekgskskqteclnyirvlqplsatslyvcgtnafqpadhlnltsfkflgkne
 dgkgrcpfdpahsytsvmvdgelysgtsynflgsepiisrnseshsplrteyaipwlnepsfvfadvirkspspsd
 geddrvvyffftvevsveyefvfrvlipriarvckgdqggllrtlqkkwtsfllkarlicsrpdsqglvfnvlrdvfvlr
 spglkvpfyalfftpqlnnvglsavcaynlstaeevfshgkymqsttveqshtkwvryngpvpkprpgacidsea
 raanytsslnlpdktlqfvkdhplmddsvtpidnrprlikkdvnytgivvdrtdqaldgtvydvfmfvstdrgalhk
 aislehavhiieetqlfqdfepvqtlillsskkgnrffvyagsnsgvvqaplafcgkhgtcedcvlardpycawssp
 tatcvalhqtessprgliqemsgdasvcpdkskgsyrqhfkhggtaelkcsqksnlarvfwkfqnsvlkaespk
 yglmgrknllifnlsegdsgvyqclseervknktvfqvakhvlevkvvpkpvvaptlsvvqtsgsriatkvlva
 stqgsspptpavqatssgaitlppkpaptgtscepkivintvpqlhsektmylkssdnrlmslflffvflcl
 ffyncykgyllprqclkfrrsalligkkpkpsdfcdreqslketlvepgsfsqqngehpkpaldtgyeteqdtitsk
 vptdredsqriddlsardkpfdvkcelkfadsdadgd

10

配列番号 6; 受託番号 BX648216:

ctggcgcccgaaactcgcccgccgggagcccgccggggcaggacgcgcgctgcagactctgctaaccaccagatag
 tggaaagaaaccatgtgctgaaatgtttgacgacactgatggtttgcatttcttctgaggccctgaagaagtatc
 aagtgggctttgacattgcgggtggtgagagcgacccctcctcacctggagaactgggaaatgtggattctcaggg
 accgcgctgttcacgagctccaggtgtgctgctggccctgggtcctggggcgctgagccgcactctgcaatagcac
 acttgcggcgccacctgctgcccgtgagcctttgctgctgaagccctggggtegcctctacctgatgaggatgtg
 caccctcatagggggctgctcatggcccttgacgtgatgtttgggacagcgatggcatttgcacccatacccg
 gatcacctgggagcacagagaggtgcacctgggtgcagtttcatgagccagacatctacaactactcagccttgc
 gctgagcgaggacaaggacaccttgtacataggtgcccgggaggcggtcttcgctgtgaacgcactcaacatctc
 cgagaagcagcatgaggtgtattggaaggtctcagaagacaaaaagcaaaatgtgcagaaaaggggaaatcaaa
 acagacagagtgcctcaactacatccgggtgctgcagccactcagcgccacttccctttacgtgtgtgggaccaa
 cgcattccagccggcctgtgaccacctgaacttaacatcctttaagtttctggggaaaaatgaagatggcaaagg
 aagatgtccctttgaccagcacacagctacacatccgtcatggttgatggagaactttattcggggacgtcgta
 taattttttgggaagtgaacccatcatctcccgaaattcttccacagtcctctgaggacagaatatgcaatccc
 ttggctgaacgagcctagtttctgtgtttgctgacgtgatccgaaaaagcccagacagccccgagggcgaggatga
 cagggctacttcttcttcacggaggtgtctgtggagtatgagtttgtgttcaggggtgctgatcccacggatagc
 aagagtgtgcaagggggaccagggcggtcctgaggaccttgacagaagaatggacctccttctgaaagcccgact
 catctgctcccggccagacagcggttgggtcttcaatgtgctgcgggatgtcttcgtgctcaggtccccgggct
 gaaggtgcctgtgttctatgcactcttcacccacagctgaacaacgtggggctgtcggcagtggtgcgcctacaa
 cctgtccacagccgaggaggtcttctccacgggaagtacatgcagagcaccacagtgaggacgtcccacaccaa
 gtgggtgcgctataatggcccggtacccaagccgcgccctggagcgtgcacgacagcgaggcacggggccgcaa
 ctacaccagctccttgaatgttgcagacaagacgtgcagttcgttaaagaccaccccttggatggatgactcgggt
 aaccccaatagacaacagggccaggttaatcaagaaagtgtgaactacaccagatcgtgggtggaccgggaccca
 ggccctggatgggactgtctatgatgtcatgtttgtcagcacagaccggggagctctgcacaaagccatcagcct
 cgagcacgctgttcacatcatcgaggagaccagctcttccaggactttgagccagtcacagaccctgctgctgtc
 ttcaaagaagggcaacaggtttgtctatgctggctctaactcgggcgtgggtccaggccccgctggccttctgtgg

20

30

40

【0 4 6 6】

【表 2 1】

gaagcacggcacctgcgaggactgtgtgctggcgcgggacccctactgcgctggagcccggccacagcgacctg
 cgtggctctgcaccagaccgagagccccagcaggggtttgattcaggagatgagcggcgatgcttctgtgtgccc
 ggataaaagtaaaggaagttaccggcgagcattttttcaagcacgggtggcacagcggaactgaaatgctcccaaaa
 atccaacctggccccgggtcttttggagttccagaatgacgtgttgaaggccgagagccccaagtacgggtcttat
 gggcagaaaaaacttgtcatcttcaacttgtcagaaggagacagtggggtgtaccagtgcctgtcagaggagag
 ggttaagaacaaaacgggtcttccaagtggctcgccaagcacgtcctggaagtgaaggtgggttccaaagcccgtagt
 ggccccaccttgtcagttgttcagacagaaggtagtaggattgccaccaaagtgttggtggcatccaccaagg
 gtcttctcccccaaccccgacgggtgcaggccacctcctccggggccatcaccttctcccaagcctgctccac
 cggcacatcttgcgaaccaaagatcgtcatcaacacgggtccccagctccactcggagaaaaacatgtatcttaa
 gtccagcgacaacccgctccccatgtccctcttctcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctaa
 ctgctataagggatactgcccagacagtgcttgaaattccgctcggccctactaattgggaagaagaagcccaa
 gtcagatttctgtgaccgtgagcagagcctgaaggagacgttagtagagccagggagcttctcccagcagaatgg
 ggagcaccccaagccagccctggacaccggctatgagaccgagcaagacaccatcaccagcaaagtccccacgga
 tagggaggactcacagaggatcgacgaccttctgccagggacaagccctttgacgtcaagtgtgagctgaagtt
 cgctgactcagacgcagatggagactgaggccggctgtgcatccccgctgggtgcctcggctgcgacgtgtccagg
 cgtggagagttttgtgtttctcctgttcagtatccgagctcctgtgcagtgctgcgtaggttagcccgcatcgtgc
 agacaacctcagtcctcttgtctattttctcttgggttgagcctgtgacttggtttctcttcttcttcttcttctgaaa
 aatgacaagcattgcacccagtccttgtgttccgaagtcagtcggagtacttgaagaaggccacgggcggcacg
 gagttoctgagcccttctgtagtgggggaaaggtggctggacctctgttggtgagaagagcatcccttcagct
 tccccctcccgtagcagccactaaaagattatttaattccagattggaaatgacatttttagtttatcagattgggt
 aacttatcgctgttgtccagattggcacgaaccttttcttccacttaattattttttaggattttgctttgat
 tgtgtttatgtcatgggtcattttttttagttacagaagcagatgtgttaatatattagaagaagatgtatatct
 tccagattttgttatatatattggcataaaaatacggcttacgttgcttaagattctcagggataaacttccctttg
 ctaaatagcattcttctgtcttttagaaatgtagacataaacactccccggagccactcacctttttctttttc
 tttttttttttttaactttatctccttgagggaagcattgtttttggagagattttcttctgtacttcgttttac
 ttttctttttttttaactttactctctcgaagaagaggaccttccacatccacgaggtgggttttgagcaagg
 gaaggtagcctggatgagctgagtgaggccaggtggccagagctgagatgggagtgcggtacaatctggagcc
 cacagctgtcggtcagaacctcctgtgagacagatggaaccttcacaaggcgcccttgggttctctgaacatctc
 ctttctcttcttcttcaattgcataccactgcctgccagactttctatccagcctcactgagctgccacta
 ctggaagggaactgggcctcgggtggccggggccgcgagctgtgaccacagcacccctcaagcatacggcgctgttc
 ctgccactgtcctgaagatgtgaatgggtggtaacgatttcaacactgggttaatttcacactccatctccccgctt
 tgtaaatacccatcgggaagagactttttttccatgggtgaagagcaataaactctggatgtttgtgaaaaaaaa
 aaaaaaaaa

配列番号 7; 受託番号 U60800 (配列番号 7 = ヌクレオチド配列);

ctgagccgcatctgcaatagcacacttgcggggccacctgctgcccgtgagcctttgctgtgaagccctgggggt
 cgctctacctgatgaggatgtgcacccccattagggggctgctcatggcccttgacgtgatgtttgggacagcg
 atggcatttgcacccataccccggatcacctgggagcacagagaggtgcacctgggtgcagtttcatgagccagac
 atctacaactactcagccttgcctgctgagcgaggacaaggacaccttgatcataggtgcccgggaggcggtcttc
 gctgtgaacgcactcaacatctccgagaagcagcatgaggtgtattggaaggtctcagaagacaaaaaagcaaaa
 tgtgcagaaaaggggaaatcaaaacagacagagtgccctcaactacatccgggtgctgcagccactcagcgccact

【表 2 2】

tccctttacgtgtgtgtgggaccaacgcattccagccggcctgtgaccacctgaacttaacatccctttaagtttctg
 gggaaaaatgaagatggcaaaggaagatgtccctttgaccagcacacagctacacatccgtcatgggtgatgga
 gaactttattcggggacgtcgataattttttgggaagtgaacccatcatctccgaaattcttccacagtcct
 ctgaggacagaatatgcaatcccttggtgaaagagcctagtttctgtgtttgctgacgtgatccgaaaaagccca
 gacagccccgacggcgaggatgacaggggtctacttcttcttcacggaggtgtctgtggagtatgagtttgtgttc
 aggggtgctgatcccacggatagcaagagtggtcaagggggaccagggcgccctgaggaccttgacagaagaaatgg
 acctccttctgaaagcccgactcatctgtctcccgccagacagcggcttgggtcttcaatgtgctgcgggatgtc
 ttcgtgctcaggtccccgggctgaaggtgctgtgttctatgcactcttcacccacagctgaacaacgtgggg
 ctgtcggcagtggtgcgcctacaacctgtccacagccgaggaggtcttctccacgggaagtacatgcagagcacc
 acagtggagcagtcacacaccaagtgggtgctgtataatggcccggtacccaagccggcggcctggagcgtgcatc
 gacagcgaggcacgggcccgaactacaccagctccttgaatttgccagacaagacgctgcagttcgttaaagac
 caccctttgatggatgactcggtaaccccaatagacaacaggcccagggttaatcaagaaagatgtgaactacacc
 cagatcgtggtggaccggacccaggccctggatgggactgtctatgatgtcatgtttgtcagcacagaccgggga
 gctctgcacaaagccatcagcctcgagcacgctgttcacatcatcgaggagaccagctcttccaggactttgag
 ccagtcagaccctgctgctgtcttcaaagaagggaacagggttctgtctatgctggctctaactcgggctggtc
 caggccccgctggccttctgtgggaagcacggcacctgagaggactgtgtgctggcgcgggaccctactgcgcc
 tggagccccgcccacagcgacctgcgtggctctgcaccagacggagagccccagcaggggtttgattcaggagatg
 agcggcgatgcttctgtgtgccccgataaaagtaaaaggaagttaccggcagcattttttcaagcacgggtggcaca
 gcggaactgaaatgctcccaaaaatccaacctggccccgggtcttttgggaagttccagaatggcgtgttgaaggcc
 gagagccccagtagcgtcttatgggcagaaaaaacttgcctcatcttcaacttgtcagaaggagacagtggggtg
 taccagtgctgtcagaggagaggggttaagaacaaaacgggtcttccaagtggctcgccaagcacgctcctggaagtg
 aagggtgggttccaaagccgtagtggtccccaccttgtcagttgttcagacagaaggtagtaggattgccacaaa
 gtgttgggtggcatccacccaagggtcttctccccaacccagccgtgcaggccacctcctccggggccatcacc
 ctctcctcccaagcctgcgcccacccggcacatcctgcgaaccaaagatcgtcatcaacacgggtccccagctccac
 tcggagaaaaaccatgtatcttaagtccagcgacaacccgctcctcatgtccctcttctccttcttcttcttctc
 ttctctgcctctttttctacaactgctataagggtacacctgcccagacagtgcttgaaattccgctcggcccta
 ctaattgggaagaagaagcccaagtcagatttctgtgaccgtgagcagagcctgaaggagacgttagtagagcca
 gggagcttctccagcagaatggggagcaccccaagccagccctggacaccggctatgagaccgagcaagacacc
 atcaccagcaaagtcccacggatagggaggactcacagaggatcgacgaccttctgcccagggaacaagccctt
 gacgtcaagtgtgagctgaagttcgctgactcagacgcagatggagactgaggccggctgtgcatccccgctggt
 gcctcggctgcgacgtgtccaggcgtggagagttttgtgtttctcctgttcagtatccgagctcctgtgacgtgct
 gcgtaggttagcccgcatcgtgcagacaacctcagtcctcttgtctattttctcttgggttgagcctgtgacttg
 gtttctcttcttcttcttggaaaaatgacaagcattgcatccagctcttgtgttccgaagtgcagtcggagtagctt
 gaagaaggccacggggcgacaggagtccctgagcccttctgtagtgggggaaagggtggctggacctctgttgg
 ctgagaagagcatcccttcagcttccccctccccgtagcagccactaaaagattatattaattccagattggaaatg
 acatttttagtttatcagattggtaacttatcgccctgtgtccagattggcacgaaccttttcttccacttaatta
 ttttttaggattttgcttggattgtgtttatgtcatgggtcatttttttttagttacagaagcagttgtgttaa
 tatttagaagaagatgtatatcttccagattttgttatatatattggcataaaaatacggcttacgttgcttaagat
 tctcagggataaaacttcttttggctaaatgcattcttctgtcttttagaaatgtagacataaacactccccggag
 cccactcaccttttttctttttcttttttttttaactttattccttgagggaagcattgtttttggagagat
 tttcttctgtacttcgttttacttttctttttttttaacttttactctctcgaagaagaggaccttccacatc

10

20

30

40

【表 2 3】

cacgaggtgggttttgagcaaggggaaggtagcctggatgagctgagtgaggagccaggctggcccagagctgagatg
 ggagtgcggtacaatctggagcccacagctgtcggtcagaacctcctgtgagacagatggaaccttcacaagggc
 gcctttgggtctctgaacatctcctttctctctgttcaattgcttaccactgctgcccagactttctatc
 cagcctcactgagctgcccactactggaaggggaactgggcctcggtggccggggccgagctgtgaccacagca
 cctcaagcatagcgcgctgttcctgccactgtcctgaagatgtgaatgggtggtagcatttcaacactgggttaa
 tttcacactccatctccccgctttgtaaatacccatcggaagagactttttttccatggtgaagagcaataaac
 tctggatgtttgtgcgctgtgtggacagtcttatcttcagcatgataggatttgaccattttggtgtaaacat
 ttgtgttttataagatttaccttgtttttatttttctactttgaattgtatacatttggaagtagccaaataaa
 tgagaagcttctatccttaaaaaaaaaaaaaa

10

配列番号 8; 受託番号 U60800 (配列番号 8 = アミノ酸配列);

mrmctpirgllmalavmfgtamafapipritwehrevhlvqfhepdiynysalllsedkdtlyigareavfavna
 lnisekqhevykwvsedkkakcaekgskskqteclnyirvlqplsatslyvcgtnafqpacdhlnltsfkflgkne
 dgkgrcpfdpahsytsvmvdgelysgtsynflgsepiisrnseshplrtayaipwlnepsfvfadvirkspsdpd
 geddrvyyfftevsveyefvfrvlipriarvckgdqggllrtlqkkwtsflkarlicsrpdsglvfnvlrdvfvlr
 spglkvpfyalfpqlnnvqlsavcaynlstaeefshgkymqsttveqshkvwryngpvkpkrpgacidsea
 raanytsslnlpdktlqfvkdhplmddsvtpidnrprlikkdvnytgivvdrtdqaldgtvydvfmvstdrghlk
 aislehavhiieetqlfqdfepvqtlillsskkgnrfvyagsnsgvvqaplafcgkhgtcedcvlardpycawspp
 tatevalhqtessprgliqemsgdasvcpsksgsyqrhffkhggtaelkcsqksnlarvfwkfngvklkaespk
 yglmgrknllifnlsegdsgvyqclseervknktvfqvvakhvlevkvvpkpvpvaptlsvvqtsgsriatkvla
 stqgsspptpavqatssgaitlppkpaptgtscepkiivintvpqlhsektmylkssdnrlmslflffvflcl
 ffyncykgylprqclkfrrsalligkkkpkdsfcdreqslketlvepgsfsqqngehpkpaldtgyeteqdtitsk
 vptdredsqriddlsardkpfdvkcelkfadsdadgd

20

配列番号 9; 受託番号 AAC50810;

30

mrmctpirgllmalavmfgtamafapipritwehrevhlvqfhepdiynysalllsedkdtlyigareavfavna
 lnisekqhevykwvsedkkakcaekgskskqteclnyirvlqplsatslyvcgtnafqpacdhlnltsfkflgkne
 dgkgrcpfdpahsytsvmvdgelysgtsynflgsepiisrnseshplrtayaipwlnepsfvfadvirkspsdpd
 geddrvyyfftevsveyefvfrvlipriarvckgdqggllrtlqkkwtsflkarlicsrpdsglvfnvlrdvfvlr
 spglkvpfyalfpqlnnvqlsavcaynlstaeefshgkymqsttveqshkvwryngpvkpkrpgacidsea
 raanytsslnlpdktlqfvkdhplmddsvtpidnrprlikkdvnytgivvdrtdqaldgtvydvfmvstdrghlk
 aislehavhiieetqlfqdfepvqtlillsskkgnrfvyagsnsgvvqaplafcgkhgtcedcvlardpycawspp
 tatevalhqtessprgliqemsgdasvcpsksgsyqrhffkhggtaelkcsqksnlarvfwkfngvklkaespk
 yglmgrknllifnlsegdsgvyqclseervknktvfqvvakhvlevkvvpkpvpvaptlsvvqtsgsriatkvla
 stqgsspptpavqatssgaitlppkpaptgtscepkiivintvpqlhsektmylkssdnrlmslflffvflcl
 ffyncykgylprqclkfrrsalligkkkpkdsfcdreqslketlvepgsfsqqngehpkpaldtgyeteqdtitsk
 vptdredsqriddlsardkpfdvkcelkfadsdadgd

40

配列番号 10; 受託番号 Q92854;

【 0 4 6 9 】

【表 2 4】

mrmctpirgllmalavmfgtamafapipritwehrevhlvqfhepdiynysalllsedkdtlyigareavfavna
 lnisekqhevywkvksedkkakcaekgskskqteclnyirvlqplsatslyvcgtnafqppacdhlntsfkflgkne
 dgkgrcpfdpahsytsvmvdgelysgtsynflgsepiisrnssshspplrteyaipwlnepsfvfadvirkspdspd
 geddrvyfffftevsveyefvfrvlpriarvckgdqggllrtlqkkwtsfllkarlicsrpdsglvfnvldrdfvlr
 spglkvvpfyalfftpqlnnvglavcaynlstaeefvshgkymqsttveqshtkwvryngvpvprpgacidsea
 raanytsslnlpdktlqfvkdhplmdsvtpidnrprlikkdvnytgivvdrtdqaldgtvydvfmfvstdrgalhk
 aislehavhiieetqlfqdfepvqtlillsskkgnrffvyagsnsgvvqaplafcgkhgtcedcvlardpycawssp
 tatcvalhqtespsrgligemsgdasvcpdkskgsyrqhfkhggtaelkcsqksnlarvfwkfngvnlkaespk
 yglmgrknllifnlsegdsgvyqclseervknktvfqvvakhvlevkvvpkpvpvaptlsvvqtsgsriatkvlva
 stqgsspptpavqatssgaitlppkpaptgtscepkivintvpqlhsektmylkssdnrlmslflffvflcl
 ffyncykgylprqclkfirsalligkkkpsdfcdreqslketlvepgsfsqqngehpkpaldtgyeteqdtitsk
 vptdredsqriddlsardkpfdvkcelkfadsdadgd

10

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個別の刊行物または特許出願が、参照により、特異的に、かつ、個別的に本明細書に含まれることが示されるかのように、参照することにより本明細書に含まれる。

【0 4 7 0】

20

本発明は、単に例示として記載されただけであり、本発明の範囲および精神の内部に留まりながら、改変を実行することが可能であることが理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0 4 7 1】

【図 1】図 1 は、Q-PCR 実験の結果を図示し、乳房、肝臓、肺、リンパ系、卵巣、すい臓、前立腺、皮膚、および子宮癌組織における S E M A 4 D 調節不良を示す。

【図 2】図 2 は、正常組織における遺伝子発現プロファイルを示す。

【図 3】図 3 は、抗 S E M A 4 D 抗体を用いる I H C によって検出される癌組織および非癌組織における S E M A 4 D の分布を示す。

【図 4】図 4 A および 4 B は、R N A i による S E M A 4 D 発現の沈黙化作用を示す。

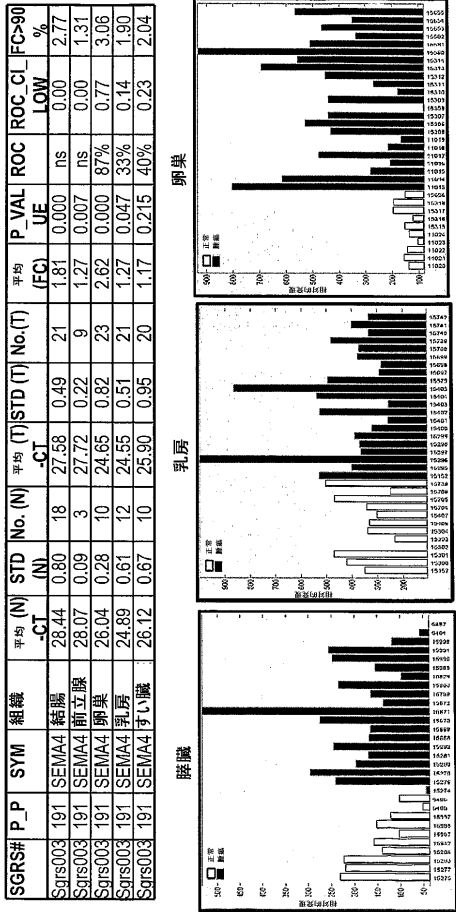
30

【図 5】図 5 は、R a t 1 細胞系統、および、E M A 4 D によって形質転換された R a t 1 細胞に関する W S T - 1 細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図 6】図 6 は、S E M A 4 D の腫瘍形成性アッセイの結果を示す。

【図 7】図 7 は、抗 S E M A 4 D モノクローナル抗体を用いるフローサイトメトリの結果を示し、S E M A 4 D の検出における B 0 9 8 モノクローナル抗体の有効性を実証する。

【図 1】

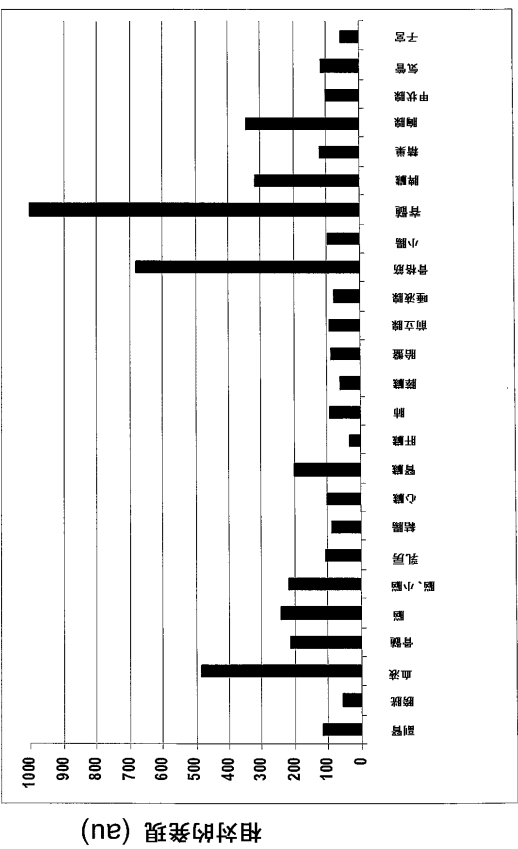


【図 3】

動物種	組織	正常番号	腫瘍番号
ヒト	膀胱	3	4
ヒト	乳房	6	8
非ヒト霊長類	脳	2	データ無し
ヒト	結腸	4	4
非ヒト霊長類	心臓	2	データ無し
ヒト	腎臓	4	4
ヒト	肝臓	1	1
ヒト	肺	4	3
ヒト	リンパ	1	5
ヒト	卵巣	1	8
ヒト	脾臓	3	7
ヒト	前立腺	3	3
ヒト	皮膚	4	4

FIG. 3

【図 2】



【図 4】

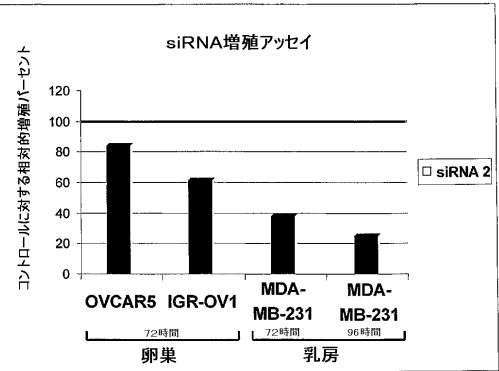
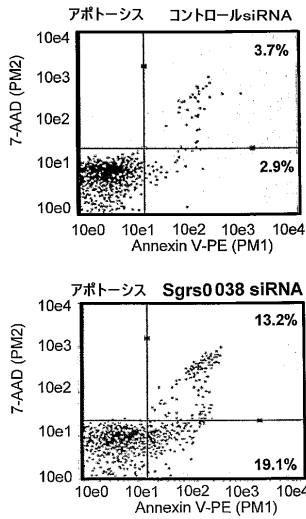


FIG. 4B



【図 5】

細胞増殖 (WST-1 アッセイ)

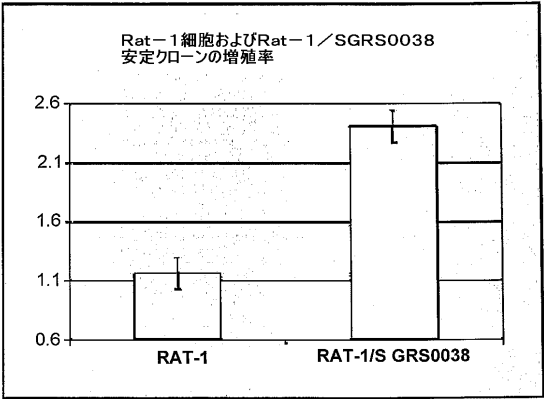


FIG. 5

【図 6】

腫瘍形成実験		
インヒボ	腫瘍発生率	移植後日数
細胞系統		
	Rat 1	0/8
	H-Ras V12	6/8
	SGRS0038	8/8

Rat-1細胞系統の発癌性アッセイ

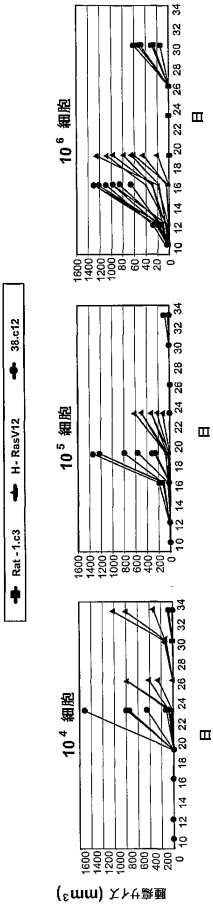


FIG. 6

【図 7】

Anti-Sgrs0038 B098 mAb

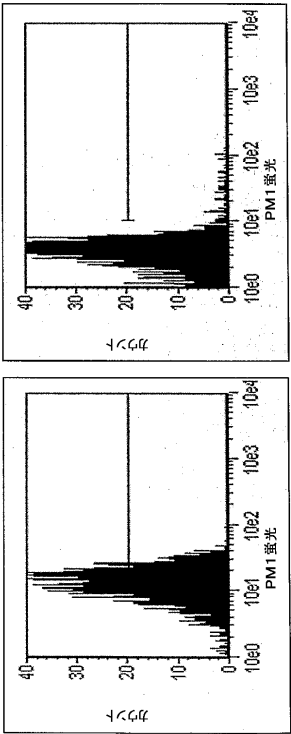


FIG. 7

【配列表】

2008535856000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成20年3月7日(2008.3.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008535856000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P35/00 G01N33/574 C12Q1/68 C12N15/11 A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/057146 A2 (SAGRES DISCOVERY [US]; MORRIS DAVID W [US] SAGRES DISCOVERY INC [US];) 17 July 2003 (2003-07-17) page 4 paragraph [0021] to page 7 [0024] pages 34 paragraph [0122] to page 35 paragraph [0124] page 37 paragraph [0131] to page 38 paragraph [0134] table 40; sequences 1178-1180 page 53 paragraph [0196] to page 55 paragraph [0207] claims 6-14 ----- -/-	1-43
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 November 2006		Date of mailing of the international search report 12/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Loubradou, Gabriel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/013174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BASILE JOHN R ET AL: "Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B" CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 15, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 5212-5224, XP002405813 ISSN: 0008-5472 abstract page 5223, left-hand column, paragraph 1	1-43
Y	GIORDANO SILVIA ET AL: "The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met" NATURE CELL BIOLOGY, vol. 4, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 720-724, XP002405814 ISSN: 1465-7392 abstract page 721, right-hand column, last paragraph - page 722, left-hand column, last paragraph	1-43
Y	CONROTTO PAOLO ET AL: "Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth" ONCOGENE, vol. 23, no. 30, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 5131-5137, XP002405815 ISSN: 0950-9232 abstract page 5136, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1	1-43
A	YAMADA T ET AL: "Identification of semaphorin E as a non-MDR drug resistance gene of human cancers" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 26, no. 94, 23 December 1997 (1997-12-23), pages 14713-14718, XP002076549 ISSN: 0027-8424 abstract page 14717, right-hand column, last paragraph ----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/013174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRANZIERO LUISA ET AL: "CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes." BLOOD, vol. 101, no. 5, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 1962-1969, XP002405816 ISSN: 0006-4971 the whole document	
P,A	DEAGLIO SILVIA ET AL: "CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival" BLOOD, vol. 105, no. 8, April 2005 (2005-04), pages 3042-3050, XP002405817 ISSN: 0006-4971 Prepublished online 21.12.2004 the whole document	
P,X	BASILE JOHN R ET AL: "Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 103, no. 24, June 2006 (2006-06), pages 9017-9022, XP002405818 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-43
P,X	W0 2005/031001 A2 (CHIRON CORP [US]; MORRIS DAVID W [US]; MALANDRO MARC S [US]) 7 April 2005 (2005-04-07) abstract; claims 1-55; sequences 73-90	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013174

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1 to 18 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/013174

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03057146	A2	17-07-2003	AU 2002367390 A1	24-07-2003
			CA 2471840 A1	17-07-2003
			EP 1509539 A2	02-03-2005
			JP 2005514923 T	26-05-2005
WO 2005031001	A2	07-04-2005	AU 2004276821 A1	07-04-2005
			CA 2539709 A1	07-04-2005
			EP 1685157 A2	02-08-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z
	C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 レイ, アルバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア, デイビス, ピー. オー. ボックス 8097

(72)発明者 ファニディ, アブダラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア, フェア オークス, ピー. オー. ボックス 8097

(72)発明者 ブーハー, ロバート エヌ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア, デイビス, ピー. オー. ボックス 8097

(72)発明者 チェ, クリスティン

アメリカ合衆国 イリノイ 60048, リバティービル, セント ウィリアム ドライブ 1321

(72)発明者 スー, シエ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94555, フレモント, パセオ パドレ パークウェイ 6500, メールストップ ビー2エフ2エスイー

(72)発明者 ユー, グオイン

アメリカ合衆国 カリフォルニア, ケンジントン, パセオ パドレ パークウェイ 6500, メールストップ ビー2エフ2エスイー

(72)発明者 モウラー, エドワード

アメリカ合衆国 カリフォルニア, ウォールナット クリーク, パセオ パドレ パークウェイ 6500, メールストップ ビー2エフ2エスイー

(72)発明者 ロー, マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア, オークランド, パセオ パドレ パークウェイ 6500, メールストップ ビー2エフ2エスイー

Fターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB25 CB02 DA14 DA36 DA78 FB03

4B024 AA01 CA04 HA12

4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34

4C084 AA02 AA13 AA17 NA14 ZB262

4C085 AA14 AA16 BB01 BB11 BB23 BB41 CC02 DD62 DD88 EE01

GG01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26