

(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2008-535853

(P2008-535853A)

(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	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 183 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-505600 (P2008-505600)	(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/US2006/013153		ド
(87) 国際公開番号	W02006/110581		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	60/669,861		. 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】 癌関連遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、癌関連遺伝子の分野におけるものである。詳細には、本発明は、特定の遺伝子の発現またはそれらの遺伝子によってコードされるタンパク質の存在の有無に基づいて癌または癌を発症する可能性を検出するための方法に関する。本発明は、これらの癌関連遺伝子を上方調節または下方調節させるための方法および分子も提供する。いくつかの実施形態において、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、膵癌、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】

患者における癌を処置するための方法であって、該方法は、WNT 3、NOTCH 1、WNT 1、WNT 3 A、IL 2 RA、FLT 3、PRLR、TNFRSF 6、PTPRK、TNFSF 1 1、FGFR 3、SELL、DPT、CD 2 8、PDCD 1 LG 2、L F NG、ANXA 2、CDH 2 3、IFNAR 2、RAMP 1、MET、FGFR 1、PLAU、SLC 4 A 8、TPCN 1、LTBR、IL 4 R、ITGA 9、FGFR 2、FCMD、COL 1 5 A 1、SLAMF 6、CD 7 4、TSPAN-2、THSD 2、CD 2、LNPEP、IGSF 8、ATP 1 A 2、ITGA 4、B 2 M、PAG、NOTCH 2、UTS 2、TNFRSF 1 4、TGFB 3、FGF 8、FGF 3、XYLT 1、FGF 4、LOC 3 9 0 2 4 3、THY 1、SLC 9 A 9、PRG 1、PRLR、CPM、FBN 2、LTB、KCNH 5、SLC 1 2 A 7、FGF 1 0、IL 7 R、MATN 2、COL 1 9 A 1、SLC 1 A 2、SLC 2 8 A 2、SLPI、IL 1 2 A、IL 6 R、TNFSF 8、TNFRSF 8、CD 3 8 および PDGFR A からなる群から選択される遺伝子の発現産物のレベルを調節する工程を含み、該癌は、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される、方法。

10

【請求項 2】

前記方法が、前記遺伝子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前記患者に投与する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

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

【請求項 4】

前記癌が、腫瘍成長の阻害または腫瘍体積の減少によって処置される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記癌が、癌細胞の侵襲性を低減することによって処置される、請求項 1 ～ 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、タンパク質または mRNA である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

第 1 の時点における前記発現産物のレベルを第 2 の時点における同じ発現産物のレベルと比較し、該第 1 の時点と比較して該第 2 の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 1 ～ 1 4 4 からなる群から選択される配列を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体が、中和抗体である、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体が、少なくとも 1×10^8 K a のアフィニティーで前記遺伝子によってコードされる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 に記載の方法。

【請求項 12】

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、一本鎖抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体または Fab フラグメントである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

50

コントロールと比較して、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の過剰発現を特徴とする、患者における癌を処置する方法であって、該方法は、該患者における該遺伝子の発現を調節する工程を含む、方法。

10

【請求項14】

前記方法が、遺伝子発現を阻害する抗体、核酸またはポリペプチドを前記患者に投与する工程を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の患者サンプルにおける差次的発現の証拠を検出する工程を含む、癌を診断するための方法であって、ここで、差次的発現の証拠は、癌の診断となり、該癌は、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される、方法。

20

30

【請求項16】

差次的発現の証拠が、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される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、請求項15に記載の方法。

40

【請求項17】

前記発現産物が、タンパク質またはmRNAである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

50

前記タンパク質の発現のレベルが、前記遺伝子によってコードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体を使用して測定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体が、画像化剤に連結されている、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記患者サンプルにおける前記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 16 に記載の方法。

【請求項 21】

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型の既知の正常組織である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 22】

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較して増加している、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の発現産物の証拠を検出する工程を含む、患者サンプルにおける癌性細胞を検出するための方法であって、該サンプルにおける該遺伝子の発現の証拠は、該サンプル中の細胞が、癌性であることを示す、方法。

【請求項 24】

前記細胞が、乳房細胞、結腸細胞、腎臓細胞、肝臓細胞、肺細胞、リンパ細胞、卵巣細胞、膵臓細胞、前立腺細胞、子宮細胞、頸部細胞、膀胱細胞、胃細胞または皮膚細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記発現産物の証拠が、画像化剤に連結された抗体を使用して検出される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

患者における癌の進行を評価するための方法であって、第1の時点における生物学的サンプル中の、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の発現産物のレベルを第2の時点における同じ発現産物のレベルと比較する工程を含み、ここで、該第1の時点と比較して、該第2の時

10

20

30

40

50

点における該発現産物のレベルの変化は、該癌の進行を示唆し、そして、該癌は、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される、方法。

【請求項 27】

メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される癌を診断する方法であって、該方法は：

(a) 第1の個体の第1の組織型を含む第1のサンプルにおける、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子のmRNAレベルを測定する工程；および

(b) (a)におけるmRNAレベルを：

(1) 該第1の個体の正常組織型を含む第2のサンプルにおけるmRNAレベル、または
(2) 罹患していない個体由来の正常組織型を含む第3のサンプルにおけるmRNAレベル

と比較する工程

を含み；ここで、(a)におけるmRNAレベルと該第2のサンプルまたは該第3のサンプルにおけるmRNAレベルとの間の少なくとも2倍の差は、該第1の個体が、癌を有するか、または癌に罹患しやすくなっていることを示す、方法。

【請求項 28】

前記(a)におけるmRNAのレベルと前記第2のサンプルまたは前記第3のサンプルにおけるmRNAのレベルとの間の少なくとも3倍の差が、前記第1の個体が癌を有するか、または癌に罹患しやすくなっていることを示す、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

抗癌活性についてスクリーニングする方法であって、該方法は：

(a) WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子を発現する細胞を候補抗癌剤と接触させる工程；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の遺伝子発現レベルにおける少なくとも2倍の差を検出する工程

を含み、ここで、

10

20

30

40

50

該候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞の遺伝子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、抗癌活性を有することを示唆し、また、該癌は、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される、方法。

【請求項30】

前記候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞の遺伝子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、抗癌活性を有することを示す、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記候補抗癌剤が、抗体、低分子量有機化合物、低分子量無機化合物またはポリヌクレオチドである、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

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31に記載の方法。

【請求項33】

WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の発現産物に結合する抗体での処置に感受性であると患者を同定するための方法であって、該方法は、該患者由来の生物学的サンプル中の該遺伝子の発現産物のレベルを測定する工程を含む、方法。

【請求項34】

哺乳動物における癌の診断または検出のためのキットであって、該キットは、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の腫瘍細胞抗原と特異的に結合する前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体もしくはそのフラグメント、または免疫複合体もしくはそのフラグメント；該抗体と該腫瘍細胞抗原との結合反応を検出するための1以上の試薬；および必要に応じて、該キットを使用するための指示書を備え、ここで、該癌は、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される、キット。

【請求項35】

癌を診断するためのキットであって、該キットは、WNT3、NOTCH1、WNT1

、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブ；該遺伝子を増幅するためのプライマー；および必要に応じて、該キットを使用するための指示書を備え、ここで、該癌は、メラノーマ、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌からなる群から選択される、キット。

10

【請求項36】

WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、PRLR、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の発現産物に特異的な1以上の抗体またはオリゴヌクレオチドを含む組成物。

20

【請求項37】

従来の、癌に対する薬物をさらに含む、請求項36に記載の組成物。

30

【請求項38】

薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含む、請求項36に記載の組成物。

【請求項39】

前記1以上のオリゴヌクレオチドが、配列番号1～144からなる群から選択される、請求項36に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(関連出願への相互参照)

40

本出願は、2005年4月7日に出願された、米国連続番号60/669,861（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おけるものである。詳細には、本発明は、特定の遺伝子の差次的発現またはそれらの遺伝子産物の存在に基づいて癌または癌を発症する可能性を検出するための方法に関する。本発明は、これらの癌関連遺伝子を調節することによって癌を検出し、診断し、そして処置するための方法および分子も提供する。

【背景技術】**【0003】**

50

(発明の背景)

癌遺伝子は、癌を引き起こし得る遺伝子である。発癌は、癌遺伝子を含むウイルスによる細胞の感染、宿主ゲノム内の癌原遺伝子（癌遺伝子になる可能性を有する正常遺伝子）の活性化および癌原遺伝子および腫瘍抑制遺伝子の変異を含む多岐にわたるメカニズムによって生じ得る。発癌は、基本的に体細胞進化（すなわち、増殖制御の進行性の喪失を伴う改変体の変異および自然淘汰）によって引き起こされる。これらの体細胞突然変異に対する標的として働く遺伝子は、突然変異の表現型が、優性または劣性であるかに応じて、それぞれ癌原遺伝子または腫瘍抑制遺伝子のいずれかとして分類される。

【0004】

ヒトの癌ならびに動物の癌に関与することが知られている多くのウイルスが存在する。ここで、特に興味深いのは、癌遺伝子自体を含まないウイルスである；これらは、遅性トランスフォーミング（slow-transforming）レトロウイルスである。このようなウイルスは、宿主ゲノムへ組み込み、そして種々の方法で近隣の癌原遺伝子に影響を与えることにより、腫瘍を誘導する。プロウイルス挿入変異は、レトロウイルスの生活環の正常な結果である。感染細胞において、レトロウイルスゲノムのDNAコピー（プロウイルスと呼ばれる）は、宿主ゲノムに組み込まれる。新たに組み込まれたプロウイルスは、2つのメカニズムのうちの一方によって、組み込み部位において、またはその付近にて同一分子上で（in cis）遺伝子発現に影響を及ぼし得る。I型挿入変異は、プロウイルスの末端反復配列（LTR）内の調節配列（エンハンサーおよび／またはプロモーター）の結果として近位遺伝子の転写を上方調節する。遺伝子のイントロンまたはエキソン内に位置するII型挿入変異は、プロウイルスの末端反復配列（LTR）内の調節配列（エンハンサーおよび／またはプロモーター）の結果として前記遺伝子の転写を上方調節し得る。さらに、オープンリーディングフレーム内に直接組み込まれることまたは両端がコード配列に隣接しているイントロン内に組み込まれることのいずれかに起因して、II型挿入変異は、コード領域の短縮化を引き起こし得る。これにより、短縮化された転写物／タンパク質産物または不安定な転写物／タンパク質産物がもたらされ得る。挿入部位における配列またはその近隣の配列の解析により、多くの新たな癌原遺伝子が同定される。

【0005】

リンパ腫および白血病に関して、AKVマウス白血病ウイルス（MLV）またはSL3-3MLVなどのレトロウイルスは、感染しやすい新生仔マウスに接種されるとき、または生殖細胞系列内に保有されるとき、腫瘍の強力な誘発因子である。挿入部位を解析することによって、多くの配列がリンパ腫および白血病の誘発に関連すると同定されている；非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5；および非特許文献6を参照のこと；これらのすべてが本明細書中で参考として明白に援用される。癌、特に乳癌、前立腺癌および上皮起源の癌に関して、哺乳動物のレトロウイルスであるマウス乳癌ウイルス（MMTV）は、感染しやすい新生仔マウスに接種されるとき、または生殖細胞系列内に保有されるとき、腫瘍の強力な誘発因子である。非特許文献Mammmary Tumours in the Mouse, J. HilgersおよびM. Sluyser編；Elsevier/North-Holland Biomedical Press；New York, N. Y.。

【0006】

特定の生細胞における遺伝子発現のパターンは、その現在の状態に特徴的である。細胞の状態またはタイプにおけるほぼすべての差異は、1以上の遺伝子のRNAレベルにおける差異に反映される。特徴付けられていない遺伝子の発現パターンを比較することにより、それらの機能の手がかりが提供され得る。数百または数千の遺伝子の発現のハイスループット解析は、（a）複雑な遺伝的疾患の同定、（b）組織と疾患状態との間の経時的な差次的遺伝子発現の解析、ならびに（c）薬物発見および毒性学研究に役立ち得る。特定の遺伝子の発現レベルの増加または減少は、癌の生物学と相関する。例えば、癌遺伝子は、腫瘍形成の正の制御因子であり、一方、腫瘍抑制遺伝子は、腫瘍形成の負の制御因子で

ある (Marshall, Cell, 64:313-326 (1991); Weinberg, Science, 254:1138-1146 (1991))。

【0007】

免疫療法または治療的な目的で抗体を使用することは、近年、癌を処置するために使用されてきている。受動免疫療法は、癌の処置における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を参照のこと。これらの抗体の固有の治療的な生物学的活性は、腫瘍細胞の成長または生存の直接阻害および身体の免疫系の天然の細胞殺傷活性を補充する能力を含む。これらの薬剤は、単独または放射線照射もしくは化学療法剤と組み合わせて投与される。それぞれ、リンパ腫および乳癌の処置について認可されているRituxan (登録商標) およびHerceptin (登録商標) は、このような治療剤の2つの例である。あるいは、抗体は、抗体結合体を作製するために使用され、ここで、その抗体は、毒性薬剤に連結されており、そして腫瘍に特異的に結合することによってその薬剤を腫瘍に向かわせる。Mylotarg (登録商標) は、白血病の処置のために使用される、認可された抗体結合体の例である。しかしながら、これらの抗体は、その原因ではなく腫瘍自体を標的化している。

10

【0008】

抗癌治療のためのさらなるアプローチは、癌を引き起こし得る癌原遺伝子を標的化することである。癌を引き起こすと同定された遺伝子をモニターして、癌の発症を検出することができ、そしてその遺伝子を、癌を処置するために標的化することができる。

20

【非特許文献1】Sorensen et al, J. Virology (2000) 74:2161

【非特許文献2】Hansen et al, Genome Res. (2000) 10(2):237-43

【非特許文献3】Sorensen et al, J. Virology (1996) 70:4063

【非特許文献4】Sorensen et al, J. Virology (1993) 67:7118

【非特許文献5】Joosten et al, Virology (2000) 268:308

30

【非特許文献6】Li et al, Nature Genetics 23:348 (1999)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

いくつかの態様において、本発明は、患者において癌を処置するための方法を提供し、この方法は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子の発現産物のレベルを調節する工程を含む。いくつ

40

50

かの実施形態において、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、膵癌、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。

【0010】

いくつかの態様において、本発明は、コントロールと比較したときの遺伝子の過剰発現によって特徴付けられる、患者における癌を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態において、その方法は、患者における遺伝子発現を調節する工程を含む。

【0011】

いくつかの態様において、本発明は、癌を診断するための方法を提供し、この方法は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子の患者サンプルにおける差次的発現の証拠を検出する工程を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子の差次的発現の証拠は、癌の診断となる。

【0012】

いくつかの態様において、本発明は、患者サンプルにおける癌性細胞を検出するための方法を提供し、この方法は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子の発現産物の証拠を検出する工程を含む。いくつかの実施形態において、サンプルにおける遺伝子の発現の証拠は、サンプル中の細胞が癌性であることを示す。

【0013】

いくつかの態様において、本発明は、患者における癌の進行を評価するための方法を提供し、その方法は、第1の時点における生物学的サンプル中の、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8

、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子の発現産物のレベルを第2の時点における同じ発現産物のレベルと比較する工程を含む。いくつかの実施形態において、第1の時点と比較して第2の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。

【0014】

いくつかの態様において、本発明は、癌を診断する方法を提供し、この方法は：

(a) 第1の個体の第1の組織型を含む第1のサンプル中の、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子のmRNAレベルを測定する工程；ならびに

(b) (a)におけるmRNAレベルを：

(1) 前記第1の個体の正常組織型を含む第2のサンプル中のmRNAのレベル、または
(2) 罹患していない個体由来の正常組織型を含む第3のサンプル中のmRNAのレベルと比較する工程
を含む。いくつかの実施形態において、(a)におけるmRNAレベルと第2のサンプルまたは第3のサンプル中のmRNAレベルとの間の少なくとも2倍の差は、第1の個体が、癌を有するか、または癌に罹患しやすくなっていることを示す。

【0015】

いくつかの態様において、本発明は、抗癌活性についてのスクリーニングを提供し、そのスクリーニングは：

(a) WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子を発現する細胞を候補抗癌剤と接触させる工程；ならびに
(b) 候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞の遺伝子発現レベルにおける少なくとも2倍の差を検出する工程

を含む。いくつかの実施形態において、候補抗癌剤の存在下と不在下の細胞の遺伝子の発現レベルの間の少なくとも2倍の差は、候補抗癌剤が、抗癌活性を有することを示す。

【0016】

いくつかの態様において、本発明は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、

TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFBFR3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子の発現産物に結合する抗体での処置に感受性であると患者を同定するための方法を提供し、この方法は、その患者由来の生物学的サンプル中の遺伝子の発現産物のレベルを測定する工程を含む。

10

【0017】

いくつかの態様において、本発明は、哺乳動物における癌の診断または検出のためのキットを提供する。いくつかの実施形態において、このキットは、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体もしくはそのフラグメントまたは免疫複合体もしくはそのフラグメントを備える。いくつかの実施形態において、その抗体またはフラグメントは、癌関連腫瘍細胞抗原に特異的に結合する；前記抗体と前記腫瘍細胞抗原との間の結合反応を検出するための1以上の試薬。いくつかの実施形態において、このキットは、キットを使用するための指示書を備える。

【0018】

いくつかの態様において、本発明は、癌を診断するためのキットを提供し、このキットは、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFBFR3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブならびにその遺伝子を増幅するためのプライマーを備える。いくつかの実施形態において、これらのキットは、キットを使用するための指示書を備える。

20

30

【0019】

いくつかの態様において、本発明は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFBFR3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される癌関連遺伝子の発現産物に特異的な1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。

40

【0020】

本発明のこれらの態様および他の態様は、以下の発明の詳細な説明で明らかにされるだ

50

ろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

(詳細な説明)

癌原遺伝子は、「プロウイルスタギング」として知られるプロセスを使用してヒトにおいて同定されており、挿入変異メカニズムによって作用する遅性トランスフォーミングレトロウイルスが、マウスモデルを使用して癌原遺伝子を単離するために使用される。いくつかのモデルにおいて、非感染動物の癌比率が低く、感染動物の癌比率は高い。関連するレトロウイルスの多くが形質導入された宿主癌原遺伝子または病原性トランス作用性ウイルス遺伝子を保持しないため、癌発生率は、宿主癌原遺伝子へのプロウイルスの組み込み効果の直接的な結果であるにちがいないことが公知である。プロウイルスの組み込みはランダムであるため、極少数の組み込み体しか、選択的増殖の利点を提供する宿主癌原遺伝子を「活性化」しない。これらの稀な事象によって、腫瘍におけるクローン化学量論にて新規プロウイルスが生じる。化学物質、放射線照射または自然発生的エラーによって引き起こされる変異とは対照的に、癌原遺伝子挿入変異は、既知配列（プロウイルス）の便利なサイズの遺伝マーカーが変異部位に存在するという理由から、その変異の位置を容易に決定することができる。クローニング的に組み込まれたプロウイルスに隣接する宿主配列は、種々のストラテジを使用してクローニングされ得る。一旦、これらの配列が手に入ると、続いてタグ化癌原遺伝子を同定することができる。2以上の独立した腫瘍中の同じ遺伝子座にプロウイルスが存在するという事は、癌原遺伝子がプロウイルスの組み込み部位またはその付近に存在するという明白な証拠である（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、ランダムな組み込みに対してゲノムが大きすぎて、観察可能なクラスタリングを生じないからである。検出されるどのクラスタリングも生物学的選択（すなわち腫瘍表現型）についての明白な証拠である。さらに、プロウイルスの組み込み体のパターン（配向性を含む）は、各クラスターにおいての標的遺伝子の位置決めを比較的簡単にする確固たる位置情報を提供する。挿入変異メカニズムによって癌を引き起こすと知られている3種類の哺乳動物のレトロウイルスは、FeLV（ネコにおける白血病／リンパ腫）、MLV（マウスおよびラットにおける白血病／リンパ腫）およびMMTV（マウスにおける乳癌）である。一旦、癌原遺伝子がマウスモデルにおいて同定されると、ヒトオルソログは、癌原遺伝子としてアノテートされ得、そしてさらなる研究が行われる。

【0022】

従って、発癌性レトロウイルス（その配列が宿主生物体のゲノムに挿入して癌が生じる）を使用することにより、癌に関連する宿主遺伝子が同定できる。そしてこれらの配列は、多くの様々な方法において使用され得る。その方法としては、診断、予後判定、調節因子（modulator）（アゴニストとアンタゴニストの両方を含む）のスクリーニング、抗体作製（免疫療法および画像化のため）などが挙げられる。しかしながら、当業者によって理解されるように、本発明において同定された癌遺伝子などのような1つの型の癌において同定される癌遺伝子は、同様に他の型の癌に関連する確率が高い。

【0023】

従って、本発明は、生物学的サンプルにおける癌性細胞を検出するための方法を提供する。この方法は、1以上の（すなわち1、2、3、4、5またはそれ以上の）癌関連遺伝子の配列または発現レベルを決定する工程を含む。

【0024】

本明細書中で使用されるとき、用語「癌関連遺伝子」とは、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LF

NG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM3、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAから選択される遺伝子のことをいう。

【0025】

10

これらの遺伝子は、本明細書中に記載の方法を使用して癌原遺伝子として同定され、確認された。

【0026】

いくつかの実施形態において、この方法は、癌関連遺伝子の1以上の（すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の）発現産物の発現のレベルを測定する工程を含み、ここで、コントロールレベルと異なる発現のレベルが疾患を示唆する。

【0027】

いくつかの実施形態において、発現産物は、タンパク質であるが、代わりにmRNA発現産物を検出してもよい。タンパク質を使用する場合、そのタンパク質は、好ましくはそのタンパク質に特異的に結合する抗体によって好ましくは検出される。用語「特異的に結合する」とは、抗体が、他の関連ポリペプチドに対してよりも、標的ポリペプチドに対してのほうが実質的に高いアフィニティを有することを意味する。本明細書中で使用されるとき、用語「抗体」とは、インタクトな分子ならびにそのフラグメント（例えば、Fab、Fab'）2およびFv）のことをいい、それらは、対象とする抗原決定基に結合することができる。「実質的に高いアフィニティ」とは、他の関連ポリペプチドに対するアフィニティと比較して、本発明の標的ポリペプチドに対するアフィニティにおいてかなり大きい増加が存在することを意味する。いくつかの実施形態において、アフィニティは、標的ポリペプチドに対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍またはそれ以上である。

20

【0028】

30

いくつかの実施形態において、抗体は、 10^{-4} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-9} M以下の解離定数という高アフィニティ；またはnM以下のアフィニティ（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。

【0029】

mRNA発現産物を使用する場合、いくつかの実施形態において、mRNA発現産物は、mRNAとプローブとがハイブリッド複合体を形成し得る条件下で組織サンプルとプローブとを接触させ；そして複合体の形成を検出することによって検出される。いくつかの実施形態において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を使用する。

【0030】

40

癌関連遺伝子をコードする核酸発現産物とプローブとがハイブリッド複合体を形成し得る条件下で生物学的サンプルとプローブとを接触させ；そしてプローブと生物学的サンプル由来の核酸との複合体の形成を検出することによって、癌関連遺伝子自体は検出される。いくつかの実施形態において、複合体が形成されないことは、癌関連遺伝子の配列における変異を示唆する。

【0031】

方法は、形成される複合体と、コントロール組織を使用するときに形成される量とを比較する工程を含み、ここで、コントロールとサンプルとが形成する複合体の量の差は、癌の存在を示唆する。いくつかの実施形態において、正常組織と比較した、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。いくつかの実施形態において、

50

形成される複合体の量が2倍増加しているか、または2倍減少していることは、疾患を示唆する。いくつかの実施形態において、形成される複合体の量が3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍または100倍も増加または減少することは、疾患を示唆する。

【0032】

いくつかの実施形態において、本発明の方法において使用される生物学的サンプルは、組織サンプルである。どの組織サンプルを使用してもよい。しかしながら、いくつかの実施形態において、その組織は、乳房組織、結腸組織、腎臓組織、肝臓組織、肺組織、リンパ系組織、卵巣組織、膵臓組織、前立腺組織、子宮組織、頸部組織または皮膚組織から選択される。

【0033】

本発明はまた、患者における癌の進行を評価するための方法を提供する。その方法は、第1の時点における生物学的サンプルにおける上記の癌関連遺伝子の1以上の（すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の）発現産物の発現を第2の時点における同じ発現産物の発現と比較する工程を含み、ここで、第1の時点に対して第2の時点における発現の増加もしくは減少または発現の増加もしくは減少の速度は、癌の進行を示す。

【0034】

本発明はまた、癌を診断するために有用なキットを提供する。そのキットは、癌関連遺伝子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との結合反応を検出するのに有用な試薬を備える。いくつかの実施形態において、その抗体は、癌関連遺伝子のポリペプチド産物に特異的に結合する。

【0035】

さらに、本発明は、癌を診断するためのキットを提供する。そのキットは、ストリンジェントな条件下で癌関連遺伝子にハイブリダイズする核酸プローブ；癌関連遺伝子を増幅するために有用なプライマー；および必要に応じて、疾患の診断を容易にするためにプローブおよびプライマーを使用するための指示書を備える。

【0036】

本発明は、癌を処置する際に使用するための上で列挙した癌関連遺伝子の1以上の（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の）発現産物の発現を調節する際の用途に適した抗体、核酸またはタンパク質をさらに提供する。

【0037】

従って、本発明は、患者における癌を処置するための方法を提供する。その方法は、上で列挙した癌関連遺伝子のいずれか1つの1以上の（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の）発現産物のレベルを調節する工程を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、前記発現産物のレベルを調節する、治療有効量の抗体、核酸またはポリペプチドを患者に投与する工程を含む。

【0038】

従って、本発明はまた、癌の処置、検出または診断のための薬物を製造する際の、1以上の（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の）癌関連遺伝子の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の使用を提供する。いくつかの実施形態において、発現のレベルは、遺伝子、mRNAまたはコードされるタンパク質に対する作用によって調節される。いくつかの実施形態において、発現は、上方調節または下方調節される。例えば、調節の変化は、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍または100倍以上でもあり得る。

【0039】

癌関連タンパク質が癌性細胞上または癌性細胞内で発現されるとき、本発明に記載の用途に適した抗体は、癌関連タンパク質に特異的であり得る。例えば、癌性細胞上で発現されるような癌関連タンパク質におけるグリコシル化パターンは、これらの同じタンパク質が非癌性細胞上で発現されるとき、これらの同じタンパク質におけるグリコシル化パターンと異なり得る。いくつかの実施形態において、本発明に記載の抗体は、癌性細胞にのみ

10

20

30

40

50

発現される癌関連タンパク質に特異的である。これは、治療的な抗体として特に価値がある。抗標的抗体はまた、標的のスプライスバリエント、欠失、付加および／または置換の変異体に結合し得る。

【0040】

本発明に記載の治療的な使用に適した抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘発する。ADCCとは、Fcレセプターを発現する非特異的な細胞傷害性細胞が、標的細胞において結合抗体を認識し、続いて、標的細胞を溶解させる細胞媒介性の反応のことをいう（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）。本発明に記載の治療的な使用に適した抗体は、抗体依存性細胞媒介性食作用（ADCP）を誘発しうる。ADCPは、Fcレセプターを発現する非特異的な細胞傷害性細胞が標的細胞において結合抗体を認識し、続いて食作用を引き起こす細胞媒介性の反応である。これらのプロセスは、表面上にIgG抗体のFc部分に対するレセプターを有するナチュラルキラー（NK）細胞によって媒介される。IgGが、癌細胞を含む「異質な」膜に結合した細胞上のエピトープに対して作製されるとき、抗体のFab部分は、癌性細胞と反応する。そしてNK細胞は、抗体のFc部分に結合する。

【0041】

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害性（cytotoxicity）（ADCC）および／または補体依存性細胞傷害性（CDC）を増大させるようにエフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することが望ましい実施形態において、1以上のアミノ酸置換が、抗体のFc領域に導入され得る。あるいは、またはさらに、システイン残基をFc領域に導入し得ることによって、この領域における鎖間ジスルフィド結合を形成することができる（概説として：Weiner and Carter (2005) Nature Biotechnology 23(5):556-557）。このようにして作製されるホモダイマーの抗体は、改善された内部移行能力ならびに／または高い補体媒介性細胞殺傷および抗体依存性細胞傷害（ADCC）を有し得る。Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) および Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照のこと。高い制癌性活性を有するホモダイマーの抗体はまた、Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993) に記載されているようなヘテロ二機能性のクロスリンカーを使用して調製され得る。あるいは、二重のFc領域を有する抗体が、設計され得ることによって、高い補体溶解およびADCC能力を有し得る。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989) を参照のこと。抗体は、Fc領域内の改変グリコシル化を伴って作製され得る。例えば、糖鎖中のフコース含有量の低下によって、抗体の内因性のADCC活性が改善され得る（例えば、WO0061739に記載されているBioWa's PotillegentTM ADCC Enhancing Technologyを参照のこと）。あるいは、抗体は、二分されたフコシル化されていないオリゴ糖鎖を加える細胞株において産生され得る（米国特許第6,602,684号を参照のこと）。これらの技術の両方により、高いADCC効率をもたらすエフェクター細胞上のFcガンマIIレセプターに対するアフィニティーが高い抗体が作製される。Fc領域はまた、本発明の抗体の血清半減期を変化させるように操作され得る。Abdegは、FcRnサルベージレセプターに対して高いアフィニティーを有する操作されたIgGであるため、従来のIgGよりも短い半減期を有する（Vaccaro et al., (2005) Nature Biotechnology 23(10):1283-1288を参照のこと）。血清半減期を延ばすために、FcRnとのアフィニティーを減少させると考えられている特定の変異をFc領域に導入することができる（Hinton et al., (2004) J Biol Chem 297(8):6213-6216を参照の

10

20

30

40

50

こと)。本発明の抗体はまた、血清アルブミン結合ドメインを含む抗体 (d A b) (例えば、W O O 5 0 3 5 5 7 2 を参照のこと) などのように他のメカニズムを使用して、血清半減期を変更するように改変され得る。操作された F c ドメイン (例えば、X m A B^{T M}、W O O 5 0 7 7 9 8 1 を参照のこと) はまた、本発明の抗体に組み込まれ得ることにより、A D C C 活性の改善、血清半減期の変更または高い抗体タンパク質安定性がもたらされる。

【0042】

いくつかの実施形態において、本発明に記載の治療的な用途のための抗体は、A D C C を誘発するのに有効であり、標的に結合することおよび A D C C 活性を有することによって癌性細胞の生存を調節する。抗体は、A D C C 活性を高めるように操作され得る (例えば、U S 2 0 0 5 0 0 5 4 8 3 2 A 1、X e n c o r I n c. および本明細書中で引用される文書を参照のこと)。

10

【0043】

いくつかの実施形態において、このような方法において使用される核酸タイプは、アンチセンス構築物、リボザイム、または例えば s i R N A を含む R N A i である。

【0044】

癌は、腫瘍増殖の阻害または腫瘍容積の減少、あるいは癌細胞の侵襲性の低減によって処置され得る。いくつかの実施形態において、上記の処置方法は、手術、ホルモン除去療法、放射線治療または化学療法の 1 つ以上と併せて使用される。例えば、患者が、すでに化学療法を受けている場合、上で列挙したような発現産物のレベルを調節する本発明の化合物も、投与され得る。化学療法剤、ホルモン療法剤および／または放射線治療薬および本発明に記載の化合物は、同時か、別個か、または連続的に投与され得る。

20

【0045】

いくつかの実施形態において、上記の方法の 1 つに従って検出または処置される癌は、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、リンパ系癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、子宮癌、頸部癌または皮膚癌から選択される。

【0046】

本発明は、癌を診断するための方法を提供し、この方法は、W N T 3、N O T C H 1、W N T 1、W N T 3 A、I L 2 R A、F L T 3、P R L R、T N F R S F 6、P T P R K、T N F S F 1 1、F G F R 3、S E L L、D P T、C D 2 8、P D C D 1 L G 2、L F N G、A N X A 2、C D H 2 3、I F N A R 2、R A M P 1、M E T、F G F R 1、P L A U、S L C 4 A 8、T P C N 1、L T B R、I L 4 R、I T G A 9、F G F R 2、F C M D、C O L 1 5 A 1、S L A M F 6、C D 7 4、T S P A N-2、T H S D 2、C D 2、L N P E P、I G S F 8、A T P 1 A 2、I T G A 4、B 2 M、P A G、N O T C H 2、U T S 2、T N F R S F 1 4、T G F B R 3、F G F 8、F G F 3、X Y L T 1、F G F 4、L O C 3 9 0 2 4 3、T H Y 1、S L C 9 A 9、P R G 1、C P M、F B N 2、L T B、K C N H 5、S L C 1 2 A 7、F G F 1 0、I L 7 R、M A T N 2、C O L 1 9 A 1、S L C 1 A 2、S L C 2 8 A 2、S L P I、I L 1 2 A、I L 6 R、T N F S F 8、T N F R S F 8、C D 3 8 および P D G F R A からなる群から選択される遺伝子の患者サンプルにおける差次的発現の証拠を検出する工程を含む。この遺伝子の差次的発現の証拠は、癌の診断となる。いくつかの実施形態において、癌は、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、膵癌、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。いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、発現産物は、タンパク質または m R N A である。いくつかの実施形態において、タンパク質の発現レベルは、そのタンパク質に特異的に結合する抗体を使用して測定される。いくつかの実施形態において、抗体は、画像化剤に連結されている。いくつかの実施形態において、患者サンプルにおける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。いくつかの実施形態において、コントロールは、患者サンプルと同じ組織型の既知の正常組織である。いくつかの実施形態において、サンプルにおける発現産物

30

40

50

のレベルは、コントロールに対して高い。

【0047】

本発明はまた、患者サンプルにおける癌性細胞を検出するための方法を提供し、この方法は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の発現産物の証拠を検出する工程を含む。サンプルにおける遺伝子の発現の証拠は、サンプル中の細胞が癌性であることを示す。いくつかの実施形態において、細胞は、乳房細胞、結腸細胞、腎臓細胞、肝臓細胞、肺細胞、リンパ細胞、卵巣細胞、膵臓細胞、前立腺細胞、子宮細胞、頸部細胞、膀胱細胞、胃細胞または皮膚細胞である。いくつかの実施形態において、発現産物の証拠は、画像化剤に連結された抗体を使用して検出される。

【0048】

本発明は、患者における癌の進行を評価するための方法を提供し、この方法は、第1の時点における生物学的サンプル中のWNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の発現産物のレベルを、第2の時点における同じ発現産物のレベルと比較する工程を含む。第1の時点に対する第2の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。いくつかの実施形態において、癌は、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、膵癌、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。

【0049】

本発明はまた、癌を診断する方法を提供し、この方法は、(a)第1の個体の第1の組織型を含む第1のサンプル中の、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC2

8 A 2、S L P I、I L 1 2 A、I L 6 R、T N F S F 8、T N F R S F 8、C D 3 8 および P D G F R A からなる群から選択される遺伝子の m R N A レベルを測定する工程；および（b）（a）における m R N A レベルをコントロールと比較する工程を含む。（a）における m R N A レベルと第 2 のサンプルまたは第 3 のサンプルにおける m R N A レベルとの間に少なくとも 2 倍の差が検出された場合、第 1 の個体が、癌を有するか、または癌に罹患しやすくなっていることを示す。いくつかの実施形態において、コントロールサンプルは、第 1 の個体の正常組織型を含む。いくつかの実施形態において、コントロールサンプルは、罹患していない個体由来の正常組織型を含む。いくつかの実施形態において、第 1 のサンプルにおける m R N A レベルとコントロールとの間の少なくとも 3 倍の差は、第 1 の個体が癌を有するか、または癌に罹患しやすくなっていることを示す。

10

【0050】

本発明は、抗癌活性についてスクリーニングする方法を提供し、この方法は、（a）W N T 3、N O T C H 1、W N T 1、W N T 3 A、I L 2 R A、F L T 3、P R L R、T N F R S F 6、P T P R K、T N F S F 1 1、F G F R 3、S E L L、D P T、C D 2 8、P D C D 1 L G 2、L F N G、A N X A 2、C D H 2 3、I F N A R 2、R A M P 1、M E T、F G F R 1、P L A U、S L C 4 A 8、T P C N 1、L T B R、I L 4 R、I T G A 9、F G F R 2、F C M D、C O L 1 5 A 1、S L A M F 6、C D 7 4、T S P A N 2、T H S D 2、C D 2、L N P E P、I G S F 8、A T P 1 A 2、I T G A 4、B 2 M、P A G、N O T C H 2、U T S 2、T N F R S F 1 4、T G F B R 3、F G F 8、F G F 3、X Y L T 1、F G F 4、L O C 3 9 0 2 4 3、T H Y 1、S L C 9 A 9、P R G 1、C P M、F B N 2、L T B、K C N H 5、S L C 1 2 A 7、F G F 1 0、I L 7 R、M A T N 2、C O L 1 9 A 1、S L C 1 A 2、S L C 2 8 A 2、S L P I、I L 1 2 A、I L 6 R、T N F S F 8、T N F R S F 8、C D 3 8 および P D G F R A からなる群から選択される遺伝子を発現する細胞を候補抗癌剤と接触させる工程；および（b）候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞の遺伝子発現レベルにおける少なくとも 2 倍の差を検出する工程を含む。候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞の遺伝子発現レベルにおける少なくとも 2 倍の差は、候補抗癌剤が抗癌活性を有することを示す。いくつかの実施形態において、候補抗癌剤の存在下と不在下との間での細胞の遺伝子発現レベルにおける少なくとも 3 倍の差は、候補抗癌剤が抗癌活性を有することを示す。いくつかの実施形態において、候補抗癌剤は、抗体、低分子有機化合物、低分子無機化合物またはポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、候補抗癌剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、候補抗癌剤は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号 1～144 からなる群から選択される配列を有するオリゴヌクレオチドである。

20

30

【0051】

本発明はまた、哺乳動物における癌の診断または検出のためのキットを提供する。いくつかの実施形態において、そのキットは、抗体もしくはそのフラグメントまたは免疫結合体またはそのフラグメントを備える。いくつかの実施形態において、抗体またはフラグメントは、腫瘍細胞抗原を特異的に結合することができ、ここで、前記腫瘍細胞抗原は、W N T 3、N O T C H 1、W N T 1、W N T 3 A、I L 2 R A、F L T 3、P R L R、T N F R S F 6、P T P R K、T N F S F 1 1、F G F R 3、S E L L、D P T、C D 2 8、P D C D 1 L G 2、L F N G、A N X A 2、C D H 2 3、T F N A R 2、R A M P 1、M E T、F G F R 1、P L A U、S L C 4 A 8、T P C N 1、L T B R、I L 4 R、I T G A 9、F G F R 2、F C M D、C O L 1 5 A 1、S L A M F 6、C D 7 4、T S P A N 2、T H S D 2、C D 2、L N P E P、I G S F 8、A T P 1 A 2、I T G A 4、B 2 M、P A G、N O T C H 2、U T S 2、T N F R S F 1 4、T G F B R 3、F G F 8、F G F 3、X Y L T 1、F G F 4、L O C 3 9 0 2 4 3、T H Y 1、S L C 9 A 9、P R G 1、C P M、F B N 2、L T B、K C N H 5、S L C 1 2 A 7、F G F 1 0、I L 7 R、M A T N 2、C O L 1 9 A 1、S L C 1 A 2、S L C 2 8 A 2、S L P I、I L 1 2 A、I

40

50

L6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAの群から選択される。そのキットは、さらに、抗体と腫瘍細胞抗原との間の結合反応を検出するための1以上の試薬を備える。いくつかの実施形態において、そのキットは、キットを使用するための指示書を備える。

【0052】

本発明はまた、癌を診断するためのキットを提供する。いくつかの実施形態において、そのキット (k i s) は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB R3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブを備える。そのキットはまた、癌関連遺伝子を増幅するためのプライマーを備える。いくつかの実施形態において、そのキットは、キットを使用するための指示書を備える。

【0053】

本発明は、患者における癌を処置するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、その方法は、WNT3、NOTCH1、WNT1、WNT3A、IL2RA、FLT3、PRLR、TNFRSF6、PTPRK、TNFSF11、FGFR3、SELL、DPT、CD28、PDCD1LG2、LFNG、ANXA2、CDH23、IFNAR2、RAMP1、MET、FGFR1、PLAU、SLC4A8、TPCN1、LTBR、IL4R、ITGA9、FGFR2、FCMD、COL15A1、SLAMF6、CD74、TSPAN-2、THSD2、CD2、LNPEP、IGSF8、ATP1A2、ITGA4、B2M、PAG、NOTCH2、UTS2、TNFRSF14、TGFB R3、FGF8、FGF3、XYLT1、FGF4、LOC390243、THY1、SLC9A9、PRG1、CPM、FBN2、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、MATN2、COL19A1、SLC1A2、SLC28A2、SLPI、IL12A、IL6R、TNFSF8、TNFRSF8、CD38およびPDGFRAからなる群から選択される遺伝子の発現産物のレベルを調節する工程を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、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患者に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、発現産物のレベルは、少なくとも2倍の変化だけ上方調節または下方調節される。いくつかの実施形態において、癌は、腫瘍増殖の阻害、腫瘍容積の減少によって処置される。いくつかの実施形態において、癌は、癌細胞の侵襲性を低減することによって処置される。いくつかの実施形態において、発現産物は、タンパク質またはmRNAである。いくつかの実施形態において、第1の時点における発現産物の発現レベルは、第2の時点における同じ発現産物の発現レベルと比較される。ここで、第1の時点に対しての第2の時点における発現の増加または減少は、癌の進行を示す。

【0054】

本発明はまた、患者における癌を処置するための方法を提供し、この方法は、癌関連遺伝子活性を調節する工程を含む。いくつかの実施形態において、癌関連遺伝子活性は、細胞増殖、細胞成長、細胞運動性、転移、細胞遊走、細胞生存または腫瘍原性 (t u m o r i g n e i c i t y) である。いくつかの実施形態において、その方法は、癌関連遺伝子活性を阻害する抗体、核酸またはポリペプチドを患者に投与する工程を含む。いくつかの

実施形態において、抗体は、中和抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、癌関連ポリペプチドと少なくとも 1×10^8 K a というアフィニティーで結合する。いくつかの実施形態において、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 1 以上を阻害する。いくつかの実施形態において、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、一本鎖抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体または F a b フラグメントである。

【0055】

本発明はまた、コントロールと比較して癌関連遺伝子の過剰発現によって特徴付けられる、患者における癌を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態において、その方法は、患者における癌関連遺伝子活性を調節する工程を含む。いくつかの実施形態において、癌関連遺伝子活性は、細胞増殖、細胞成長、細胞運動性、転移、細胞遊走、細胞生存、遺伝子発現および腫瘍原性からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、癌は、子宮頸癌、腎臓癌、卵巣癌、膀胱癌、皮膚癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、その方法は、癌関連遺伝子活性を阻害する抗体、核酸またはポリペプチドを患者に投与する工程を含む。

10

【0056】

本発明はまた、WNT 3、NOTCH 1、WNT 1、WNT 3 A、IL 2 R A、FLT 3、PRL R、TNFRSF 6、PTPRK、TNFSF 1 1、FGFR 3、SELL、DPT、CD 2 8、PDCD 1 LG 2、LFNG、ANXA 2、CDH 2 3、IFNAR 2、RAMP 1、MET、FGFR 1、PLAU、SLC 4 A 8、TPCN 1、LTBR、IL 4 R、ITGA 9、FGFR 2、FCMD、COL 1 5 A 1、SLAMF 6、CD 7 4、TSPAN-2、THSD 2、CD 2、LNPEP、IGSF 8、ATP 1 A 2、ITGA 4、B 2 M、PAG、NOTCH 2、UTS 2、TNFRSF 1 4、TGFB 3、FGF 8、FGF 3、XYLT 1、FGF 4、LOC 3 9 0 2 4 3、THY 1、SLC 9 A 9、PRG 1、CPM、FBN 2、LTB、KCNH 5、SLC 1 2 A 7、FGF 1 0、IL 7 R、MATN 2、COL 1 9 A 1、SLC 1 A 2、SLC 2 8 A 2、SLPI、IL 1 2 A、IL 6 R、TNFSF 8、TNFRSF 8、CD 3 8 および PDGFR A からなる群から選択される遺伝子の発現産物に結合する抗体での処置に感受性であると患者を同定するための方法を提供し、この方法は、その患者由来の生物学的サンプル中のその遺伝子の発現産物のレベルを測定する工程を含む。

20

30

【0057】

本発明はまた、癌を処置、診断または検出するための組成物を提供する。いくつかの実施形態において、その組成物は、WNT 3、NOTCH 1、WNT 1、WNT 3 A、IL 2 R A、FLT 3、PRL R、TNFRSF 6、PTPRK、TNFSF 1 1 3 FGF R 3、SELL、DPT、CD 2 8、PDCD 1 LG 2、LFNG、ANXA 2、CDH 2 3、IFNAR 2、RAMP 1、MET、FGFR 1、PLAU、SLC 4 A 8、TPCN 1、LTBR、IL 4 R、ITGA 9、FGFR 2、FCMD、COL 1 5 A 1、SLAMF 6、CD 7 4、TSPAN-2、THSD 2、CD 2、LNPEP、IGSF 8、ATP 1 A 2、ITGA 4、B 2 M、PAG、NOTCH 2、UTS 2、TNFRSF 1 4、TGFB 3、FGF 8、FGF 3、XYLT 1、FGF 4、LOC 3 9 0 2 4 3、THY 1、SLC 9 A 9、PRG 1、CPM、FBN 2、LTB、KCNH 5、SLC 1 2 A 7、FGF 1 0、IL 7 R、MATN 2、COL 1 9 A 1、SLC 1 A 2、SLC 2 8 A 2、SLPI、IL 1 2 A、IL 6 R、TNFSF 8、TNFRSF 8、CD 3 8 および PDGFR A からなる群から選択される遺伝子の発現産物に特異的な抗体またはオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、その組成物は、さらに、従来の癌に対する薬物を含む。いくつかの実施形態において、その組成物は、滅菌注射剤である。

40

【0058】

本発明はさらに、癌性細胞の成長を調節する候補薬剤を同定するためのアッセイを提供

50

し、そのアッセイは、a) 候補薬剤の存在下で、上記の本発明の実施形態のいずれかにおいて列挙した癌関連遺伝子の1以上の（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検出する工程；およびb) その発現レベルを候補薬剤の不在下での発現レベルと比較する工程を含み、ここで、発現の差は、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。

【0059】

本発明はまた、癌関連遺伝子の発現レベルを改変する薬剤を同定するための方法を提供し、その方法は：a) 上記の本発明の実施形態のいずれかにおいて列挙した癌関連遺伝子を発現する細胞を候補薬剤と接触させる工程、およびb) その細胞に対する候補薬剤の効果を測定する工程を含み、ここで、発現レベルの変化は、その候補薬剤が発現を調節することができることを示す。

10

【0060】

いくつかの実施形態において、候補薬剤は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体または有機小分子である。

【0061】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける乳癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、乳癌に関連する、PRLR、FGFR3、SELL、CD28、CDH23、FGFR1、PLAU、LTBR、ITGA9、TSPAN-2、CD2、IGSF8、ITGA4、PAG、THY1、FBN2、LTBおよびCOL19A1の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

20

【0062】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける結腸癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、結腸癌に関連する、NOTCH1、IL2RA、SELL、CD28、PDCD1LG2、LFNG、MET、PLAU、SLC4A8、LTBR、FGFR2、LNPEP、FGF8およびTHY1の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

【0063】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける腎臓癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、腎臓癌に関連する、IL2RA、FLT3、PDCD1LG2、LFNG、CDH23、FCMD、UTS2、XYLT1、SLC9A9およびPRG1の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

30

【0064】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける肝臓癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、肝臓癌に関連する、WNT3A、FGFR1、COL15A1、IGSF8、TNFRSF14、THY1、SLC9A9、SLC12A7、FGF10およびTNFRSF8の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

【0065】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける肺癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、肺癌に関連する、PRLR、PTPRK、PLAU、ITGA9、COL15A1、TSPAN-2、LNPEP、THY1、IL7R、SLC1A2およびPDGFRAの1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

40

【0066】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるリンパ系癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、リンパ系癌に関連する、WNT3、IL2RA、TNFRSF6、TPCN1、IL4R、SLAMF6、CD74、CD2、LNPEP、PAG、FGF8、XYLT1、LTB、IL12A、TNFRSF8およびCD38の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

【0067】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける卵巣癌を検出するための方法を提供し、この

50

方法は、本発明の他の遺伝子のうち、卵巣癌に関連する、WNT1、FGFR3、CDH23、IFNAR2、TPCN1、LTBR、SLAMF6、CD74、THSD2、IGSF8、UTS2、THY1、LTB、KCNH5、SLC12A7、FGF10、IL7R、SLC1A2、SLPI、IL12A、IL6R、CD38およびPDGFRAの1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

【0068】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける膵癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、膵癌に関連する、PLAU、FCMD、IGSF8、THY1、FBN2、KCNH5、FGF10およびSLC1A2の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

10

【0069】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける前立腺癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、前立腺癌に関連する、WNT3、WNT1、IL2RA、PRLR、TNFRSF6、SELL、CD28、PDCD1LG2、CDH23、FGFR1、IGSF8、TNFRSF14、TGFB3、MATN2およびTNFRSF8の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

【0070】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける子宮癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、子宮癌に関連する、NOTCH1、IL2RA、TNFRSF6、CD28、FGFR1、TPCN1、ITGA9、COL15A1、CD74、TSPAN-2、PAG、TGFB3、THY1、SLC12A7、MATN2、COL19A1およびSLC28A2の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

20

【0071】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける子宮頸癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、子宮頸癌に関連する、TNFRSF6、SELL、CD28、IFNAR2、PLAU、FCMD、SLAMF6、CPM、SLC1A2、TNFRSF8およびCD38の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

【0072】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける胃癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、胃癌に関連する、LFNG、FGFR2、SLAMF6、PAG、KCNH5およびSLC1A2の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

30

【0073】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける皮膚癌を検出するための方法を提供し、この方法は、本発明の他の遺伝子のうち、皮膚癌に関連する、IL2RA、PRLR、CDH23、IFNAR2、IGSF8、TNFRSF14、KCNH5、SLC1A2およびTNFRSF8の1以上の配列または発現レベルを測定する工程を含む。

【0074】

40

(定義)

本発明は、癌に関連する遺伝子（例えば、「癌関連遺伝子」）を同定する。従って、これらの遺伝子にコードされるポリペプチドは、「癌関連ポリペプチド」または「癌関連タンパク質」とよばれる。これらの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」とよばれる。癌関連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」とよばれる。癌関連遺伝子をコードする細胞は、「癌関連遺伝子型」を有するといわれる。癌関連タンパク質を発現する細胞は、「癌関連表現型」を有するといわれる。「癌関連配列」とは、癌関連遺伝子から得られるポリペプチド配列とポリヌクレオチド配列の両方のことをいう。「癌関連核酸」は、癌関連遺伝子を含むDNAならびにその遺伝子から得られるmRNAおよびcDNAを含む。

50

【0075】

このような文脈において、「関連」とは、ヌクレオチド配列またはタンパク質配列が、正常組織と比較して癌において差次的に発現されるか、活性化されるか、不活性化されるか、または変化されることを意味する。下記で概要を述べるように、癌関連配列は、癌において上方調節（すなわち、より高いレベルで発現）されている配列ならびに下方調節（すなわち、より低いレベルで発現）されている配列を含む。癌関連配列はまた、変更された配列（すなわち、切断された配列または点変異を含む置換、欠失または挿入を伴う配列）を含み、同じ発現プロファイルまたは変更されたプロファイルのいずれかを示す。一般に、癌関連配列は、ヒト由来であるが；しかしながら、当業者が理解するように、他の生物体由来の癌関連配列も疾患および薬物進化の動物モデルにおいて有用であり得；従って、他の癌関連配列がげっ歯類（ラット、マウス、ハムスター、モルモットなど）、霊長類および家畜（ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマなどを含む）を含む哺乳動物を含む脊椎動物から同定され得る。いくつかの場合において、原核生物の癌関連配列が、有用であり得る。他の生物体由来の癌関連配列を、以下に概要を述べる技術を使用して得てもよい。

10

【0076】

癌関連配列は、組換え核酸を含む。本明細書中の用語「組換え核酸」は、一般に、ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼによる核酸の操作によって天然で通常見いだされない形態で独創的にインビトロにおいて形成された核酸を意味する。従って、組換え核酸はまた、直線状の単離された核酸であるか、または通常結合していないDNA分子を連結することによってインビトロにおいて形成されたベクターにクローニングされる。この両方が、本発明の目的で組換えと考えられる。一旦、組換え核酸が作製され、宿主細胞または宿主生物に再導入されると、インビトロ操作ではなく宿主細胞のインビボの細胞機構を使用して複製されることになることが理解される；しかしながら、このような核酸は、一旦組換えで作製されると、その後インビボで複製されるが、なおも組換え体とみなされるか、または本発明の目的で単離される。本明細書中で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」または「核酸」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いずれかの任意の長さのヌクレオチドの多量体型である。この用語は、その分子の1次構造のことだけをいう。従って、この用語は、2本鎖および1本鎖のDNAおよびRNAを含む。この用語はまた、公知の型の改変、例えば、当該分野で公知の標識、メチル化、「キャップ」、1以上の天然に存在するヌクレオチドとアナログとの置換、ヌクレオチド間の改変、例えば、無電荷結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を有する改変、付属部分（例えば、タンパク質（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L-リシンなどを含む））を有する改変、介入物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を有する改変、キレート剤（例えば、金属、放射性金属など）を有する改変、アルキル化剤を含む改変、改変結合を有する改変（例えば、アルファアノマー核酸など）ならびに非改変型のポリヌクレオチドを含む。

20

30

【0077】

本明細書中で使用されるとき、指摘された配列「から得られた」ポリヌクレオチドとは、その指摘されたヌクレオチド配列の領域に対応する、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ヌクレオチド配列から構成されるポリヌクレオチド配列のことをいう。「対応する」とは、指摘された配列と相同または相補的であることを意味する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドが由来する領域の配列は、癌関連遺伝子に特有の配列と相同または相補的である。

40

【0078】

「組換えタンパク質」は、組換え技術を使用して、すなわち、上で示したような組換え核酸の発現を介して作製されるタンパク質である。組換えタンパク質は、天然に存在するタンパク質と少なくとも1以上の特徴によって区別される。例えば、このタンパク質は、その野生型宿主に通常関連するタンパク質および化合物の一部または全部から単離または精製され得るため、実質的に純粋であり得る。例えば、単離タンパク質は、その天然の状

50

態と通常関連する少なくとも一部の材料を伴わず、所与のサンプル中の総タンパク質の少なくとも約 0.5 重量%または少なくとも約重量 5%を構成する。実質的に純粋なタンパク質は、総タンパク質の約 50～75 重量%、少なくとも約重量 80%または少なくとも約 90 重量%を含む。この定義は、異なる生物体のうちの 1 つの生物体または宿主細胞からの癌関連タンパク質の産生を含む。あるいは、このタンパク質を、高濃度レベルで作製するために、誘導性プロモーターまたは高発現プロモーターを使用することによって、このタンパク質は、通常見られる濃度よりも非常に高い濃度で作製され得る。あるいは、このタンパク質は、以下に記述するような、エピトープタグまたはアミノ酸置換、挿入および欠失を含む形態に加えて、通常天然では見られない形態であり得る。

【0079】

本明細書中で使用されるとき、用語「タグ」、「配列タグ」または「プライマータグ配列」とは、特定の核酸配列を有するオリゴヌクレオチドのことをいい、その特定の核酸配列は、そのようなタグを有するポリヌクレオチドの一群を同定するために役立つ。同じ生物学的供給源由来のポリヌクレオチドを、特定の配列タグで共有結合的にタグ化すると、その後の解析において、そのポリヌクレオチドを、その供給源に従って同定することができる。その配列タグはまた、核酸増幅反応用のプライマーとしても役立つ。

【0080】

「マイクロアレイ」は、固体支持体の表面上に形成された好ましくは別個の領域（各々は、規定面積を有する）の線状または 2 次元のアレイである。マイクロアレイ上の別個の領域の密度は、単一の固相支持体の表面上で検出される標的ポリヌクレオチドの総数によって決定され、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 $100/\text{cm}^2$ 、さらにより好ましくは少なくとも約 $500/\text{cm}^2$ およびなおより好ましくは少なくとも約 $1,000/\text{cm}^2$ である。本明細書中で使用されるとき、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ニングするために使用されるチップまたは他の表面上に配置されるオリゴヌクレオチドプライマーのアレイである。アレイにおける特定の群のプライマーの各々の位置は、既知であるため、標的ポリヌクレオチドの同定は、マイクロアレイにおける特定の位置への結合に基づいて決定することができる。

【0081】

「リンカー」は、制限酵素認識部位を含む合成オリゴデオキシリボヌクレオチドである。リンカーは、その後のベクター分子へのフラグメントのクローニングで使用するができる制限酵素認識部位を作製するために DNA フラグメントの末端に平滑末端で連結され得る。

【0082】

用語「標識」とは、アッセイサンプル中に標的ポリヌクレオチドが存在することを示す検出可能なシグナルを生成することができる組成物のことをいう。適当な標識としては、放射性同位体、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発光部分、磁性粒子、生物発光部分などが挙げられる。同様に、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的な手段または他の任意の適切な手段によって検出可能な任意の組成物である。用語「標識」は、検出可能な物理的特性を有する任意の化学基もしくは化学部分または検出可能な生成物への基質の変換を触媒する酵素などの、検出可能な物理的特性を示す化学基もしくは化学部分を生じることができる任意の化合物のことをいうために使用される。用語「標識」はまた、特定の物理的特性の発現を阻害する化合物も包含する。この標識はまた、結合対のメンバー、検出可能な物理的特性を有する他のメンバーである、化合物であり得る。

【0083】

用語「支持体」とは、従来の支持体（例えば、ビーズ、粒子、計深棒、繊維、フィルター、膜およびシランまたはケイ酸塩の支持体（ガラススライドなど））のことをいう。

【0084】

用語「増幅する」は、例えば、付加的標的分子または標的様分子もしくは標的分子に相

10

20

30

40

50

補的な分子を含み得る増幅産物を作ることの意味するために広い意味で使用され、その分子は、サンプル中に標的分子が存在するために作られる。標的が核酸である場合において、増幅産物は、DNAポリメラーゼもしくは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できる。

【0085】

本明細書中で使用されるとき、「生物学的サンプル」とは、個体から単離される組織または体液のサンプルのことをいい、それらとしては、例えば、血液、血漿、血清、髄液、リンパ液、皮膚、気道、腸管および尿生殖器の管、涙、唾液、乳、細胞（血液細胞が挙げられるがこれらに限定されない）、腫瘍、器官およびインビトロにおける細胞培養成分のサンプルが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0086】

用語「生物学的供給源」とは、本明細書中で使用されるとき、標的ポリヌクレオチドが由来する供給源のことをいう。この供給源は、上に記載したような任意の形態の「サンプル」であり得、例えば、細胞、組織または体液が挙げられるがこれらに限定されない。「様々な生物学的供給源」とは、同じ個体の様々な細胞／組織／器官または同じ種の様々な個体由来の細胞／組織／器官または異なる種由来の細胞／組織／器官のことをいうことができる。

【0087】

（癌関連遺伝子）

「WNT3」とは、受託番号NM__030753と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__110380と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID7473と呼ばれる遺伝子「ウイングレス型MMTV組込み部位ファミリー、メンバー3」のことを意味する。WNT3は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、72通りのMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取されたリンパ性腫瘍の60%および採取された前立腺腫瘍の32%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、リンパ性癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

20

【0088】

「NOTCH1」とは、受託番号NM__017617と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__060087と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID4851と呼ばれる遺伝子「Notchホモログ1、転座関連」のことを意味する。NOTCH1は、シグナル伝達レセプタータンパク質である。この遺伝子は、132通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された結腸腫瘍の62%および採取された子宮腫瘍の39%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

30

【0089】

「WNT1」とは、受託番号NM__005430と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__005421と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID7471と呼ばれる遺伝子「ウイングレス型MMTV組込み部位ファミリー、メンバー1」のことを意味する。WNT1は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、346通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巣腫瘍の57%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された前立腺腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌および前立腺癌に関

40

50

連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0090】

「WNT3A」とは、受託番号NM_033131と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_149122と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID89780と呼ばれる遺伝子「ウイングレス型MMTV組込み部位ファミリー、メンバー3A」のことを意味する。WNT3Aは、分泌タンパク質である。この遺伝子は、106通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、採取された肝臓腫瘍の47%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肝臓癌に関連しているため、これらの癌および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

【0091】

「IL2RA」とは、受託番号NM_000417と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_000408と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3559と呼ばれる遺伝子「インターロイキン2レセプター、アルファ鎖前駆体」のことを意味する。IL2RAは、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、12通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された6つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された結腸腫瘍の32%および採取されたリンパ性腫瘍の28%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、皮膚腫瘍および子宮腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌、リンパ性癌、前立腺癌、皮膚癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

20

【0092】

「FLT3」とは、受託番号NM_004119と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_004110と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2322と呼ばれる遺伝子「fms関連チロシンキナーゼ3」のことを意味する。FLT3は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、18通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、採取された腎臓腫瘍の36%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、腎臓癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

30

【0093】

「PRLR」とは、受託番号NM_000949と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_000940と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID5618と呼ばれる遺伝子「プロラクチンレセプター」のことを意味する。PRLRは、レセプタータンパク質である。この遺伝子は、16通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された4つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された皮膚腫瘍の45%、採取された肺腫瘍の34%および採取された乳房腫瘍の40%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された前立腺腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、皮膚癌、肺癌、乳癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

40

【0094】

「TNFRSF6」とは、受託番号NM_000043と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_000034と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID355と呼ばれる遺伝子「腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー、メンバー6」（「FAS」としても知られる）のことを意味する。

50

転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__152871、NM__152872、NM__152873、NM__152874、NM__152875、NM__152876、NM__152877およびそれぞれタンパク質受託番号NP__690610、NP__690611、NP__690612、NP__690613、NP__690614、NP__690615、NP__690616と呼ばれる。TNFRSF6は、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、7通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された4つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取されたリンパ性腫瘍の50%、採取された子宮腫瘍の32%および採取された前立腺腫瘍の28%および採取された子宮頸部腫瘍の27%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、リンパ性癌、子宮癌、前立腺癌および子宮頸癌に関連しているため、これらの癌および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

【0095】

「PTPRK」とは、受託番号NM__002844と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002835と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID5796と呼ばれる遺伝子「タンパク質チロシンホスファターゼ、レセプター型、K」のことを意味する。PTPRKは、チロシンホスファターゼレセプターである。この遺伝子は、7通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、採取された肺腫瘍の33%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

20

【0096】

「TNFSF11」とは、受託番号NM__003701と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__003692と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID8600と呼ばれる遺伝子「腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、メンバー11」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__033012およびタンパク質受託番号NP__143026と呼ばれる。TNFSF11は、サイトカインである。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのI型組込みを起こした。従って、この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

30

【0097】

「FGFR3」とは、受託番号NM__000142と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000133と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2261と呼ばれる遺伝子「線維芽細胞成長因子レセプター3」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__022965およびタンパク質受託番号NP__075254とよばれる。TNFSF11は、サイトカインである。この遺伝子は、軟骨形成不全および致死性小人症（thanatophoric dwarfism）と関係する。FGFR3は、チロシンキナーゼレセプターである。この遺伝子は、9通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巣腫瘍の86%および採取された乳房腫瘍の48%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌および乳癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

40

【0098】

「SELL」とは、受託番号NM__000655と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000646と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID6402と呼ばれる遺伝子「セレクトリンL（リンパ球接着分子1）」のことを意味する。SELLは、分泌タンパク質である。この遺伝子は、7通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された4つの癌

50

組織型において過剰発現していることが見出され、採取された乳房腫瘍の38%および採取された子宮頸部腫瘍の23%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された結腸腫瘍および前立腺腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌、子宮頸癌、結腸癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0099】

「DPT」とは、受託番号NM__001937と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__001928と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID1805と呼ばれる遺伝子「デルマトポンチン(dermatopontin)」のことを意味する。DPTは、細胞外マトリックスタンパク質である。この遺伝子は、3通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

【0100】

「CD28」とは、受託番号NM__006139と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__006130と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID940と呼ばれる遺伝子「CD28抗原(Tp44)」のことを意味する。CD28は、Igタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。この遺伝子は、4通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された5つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された子宮腫瘍の34%および採取された結腸腫瘍の32%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された乳房腫瘍、子宮頸部腫瘍および前立腺腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌、子宮癌、乳癌、子宮頸癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0101】

「PDCD1LG2」とは、受託番号NM__025239と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__079515と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID80380と呼ばれる遺伝子「プログラムされた細胞死1リガンド2」のことを意味する。PDCD1LG2は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、7通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された腎臓腫瘍の36%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された結腸腫瘍および前立腺腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、腎臓癌、結腸癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0102】

「LFNG」とは、受託番号NM__002304と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002295と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3955と呼ばれる遺伝子「ルナティックフリンジ(lunatic fringe)ホモログ(Drosophila)」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号XM__496845、XM__499250およびそれぞれタンパク質受託番号XP__496845、XP__499250と呼ばれる。LFNGは、分泌タンパク質である。この遺伝子は、39通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された結腸腫瘍の40%、採取された腎臓腫瘍の32%、採取された胃腫瘍の30%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌、腎臓癌および胃癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0103】

「ANXA2」とは、受託番号NM__001002857と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__001002857と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID302と呼ばれる遺伝子「アネキシンA2」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__001002858、NM__004039およびそれぞれタンパク質受託番号NP__001002858、NP__004030とよばれる。ANXA2は、シグナル伝達タンパク質である。この遺伝子は、5通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

【0104】

「CDH23」とは、受託番号NM__022124と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__071407と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID64072と呼ばれる遺伝子「カドヘリン様23」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__052836およびタンパク質受託番号NP__443068とよばれる。CDH23は、カドヘリタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。この遺伝子は、5通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された5つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された腎臓腫瘍の70%、採取された乳房腫瘍の38%および採取された皮膚腫瘍の36%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された卵巣腫瘍および前立腺腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、腎臓癌、乳癌、皮膚癌、卵巣癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0105】

「IFNAR2」とは、受託番号NM__000874と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000865と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3455と呼ばれる遺伝子「インターフェロン（アルファ、ベータおよびオメガ）レセプター2」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__207584、NM__207585およびそれぞれタンパク質受託番号NP__997467、NP__997468と呼ばれる。IFNAR2は、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、3通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された皮膚腫瘍の56%、採取された子宮頸部腫瘍の27%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された卵巣腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、皮膚癌、子宮頸癌および卵巣癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0106】

「RAMP1」とは、受託番号NM__005855と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__005846と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座10267と呼ばれる遺伝子「レセプター（カルシトニン）活性改変タンパク質1」のことを意味する。RAMP1は、レセプタータンパク質である。この遺伝子は、11通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

【0107】

「METチロシンキナーゼレセプター」としても知られる「MET」とは、受託番号NM__000245と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000236と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座4233と呼ばれる遺伝子「met原癌遺伝子（肝細胞成長因子レセプター）」のことを意味する。この遺伝子は、7通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型組込み

10

20

30

40

50

を起こした。この遺伝子は、採取された結腸腫瘍の86%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0108】

「FGFR1」とは、受託番号NM__000604と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000595と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2260と呼ばれる遺伝子「線維芽細胞成長因子レセプター1 (fms 関連チロシンキナーゼ2)」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__015850、NM__023105、NM__023106、NM__023107、NM__023108、NM__023109、NM__023110、NM__023111およびそれぞれタンパク質タンパク質受託番号NP__056934、NP__075593、NP__075594、NP__075595、NP__075596、NP__075597、NP__075598、NP__075599とよばれる。この遺伝子は、プファイファー症候群に関係する。FGFR1は、チロシンキナーゼレセプターである。この遺伝子は、9通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された4つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された子宮腫瘍の37%、採取された乳房腫瘍の30%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された肝臓腫瘍、前立腺腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、子宮癌、乳癌、肝臓癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0109】

「PLAU」とは、受託番号NM__002658と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002649と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID5328と呼ばれる遺伝子「プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼ」のことを意味する。PLAUは、レセプター結合プロテアーゼである。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのI型組込みを起こした。この遺伝子は、採取された結腸腫瘍の95%、採取された肺腫瘍の79%、採取された脾臓腫瘍の65%および採取された乳房腫瘍の52%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された子宮頸部腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌、肺癌、脾癌、乳癌および子宮頸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0110】

「SLC4A8」とは、受託番号NM__004858と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__004849と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID9498と呼ばれる遺伝子「溶質キャリアファミリー4、炭酸水素ナトリウム共輸送体、メンバー」のことを意味する。SLC4A8は、キャリアタンパク質である。この遺伝子は、5通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、採取された結腸腫瘍の50%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0111】

「TPCN1」とは、受託番号NM__017901と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__060371と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID53373と呼ばれる遺伝子「2ポア(two pore)セグメントチャネル1」のことを意味する。TPCN1は、イオンチャネルタンパク質である。この遺伝子は、3通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取さ

れた子宮腫瘍の29%、採取されたリンパ性腫瘍の23%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された卵巣腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、子宮癌、リンパ性癌および卵巣癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0112】

「LTBR」とは、受託番号NM__002342と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002333と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID4055と呼ばれる遺伝子「リンフォトキシンβレセプター（TNFRスーパーファミリー、メンバー3）」のことを意味する。LTBRは、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、5通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された乳房腫瘍の40%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された結腸腫瘍および卵巣腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌、結腸癌および卵巣癌に関連しているため、これらの癌および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

【0113】

「IL4R」とは、受託番号NM__000418と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000409と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3566と呼ばれる遺伝子「インターロイキン4レセプター」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__001008699およびタンパク質受託番号NP__001008699とよばれる。IL4Rは、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、4通りのMLVプロウイルスのI型組込みを起こした。この遺伝子は、採取されたリンパ性腫瘍の23%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、リンパ性癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

20

【0114】

「ITGA9」とは、受託番号NM__002207と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002198と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3680と呼ばれる遺伝子「インテグリン、アルファ9」のことを意味する。ITGA9は、インテグリンである。この遺伝子は、3通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された肺腫瘍の38%、採取された乳房腫瘍の30%および採取された子宮腫瘍の26%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肺癌、乳癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

30

【0115】

「FGFR2」とは、受託番号NM__000141と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000132と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2263と呼ばれる遺伝子「線維芽細胞成長因子レセプター2（細菌発現キナーゼ、ケラチノサイト成長因子レセプター）」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__022969、NM__022970、NM__022971、NM__022972、NM__022973、NM__022974、NM__022975、NM__022976、NM__023028、NM__023029、NM__023030、NM__023031およびそれぞれタンパク質受託番号NP__075258、NP__075259、NP__075260、NP__075261、NP__075262、NP__075263、NP__075264、NP__075265

40

50

、NP__075417、NP__075418、NP__075419、NP__075420 と呼ばれる。この遺伝子は、頭蓋顔面骨形成不全症1、クルゾン症候群、プファイファー症候群およびジャクソンワイス症候群に関係する。FGFR2は、チロシンキナーゼレセプターである。この遺伝子は、94通りのMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された胃腫瘍の40%、採取された結腸腫瘍の33%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌および胃癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0116】

「FCMD」とは、受託番号NM__006731と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__006722と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2218と呼ばれる遺伝子「フクヤマ型先天性筋ジストロフィ(fukutin)」のことを意味する。FCMDは、細胞外マトリックスタンパク質である。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された膵臓腫瘍の33%、採取された子宮頸部腫瘍の30%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された腎臓腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、膵癌、腎臓癌および子宮頸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0117】

「COL15A1」とは、受託番号NM__001855と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__001846と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID1306と呼ばれる遺伝子「コラーゲン、XV型、アルファ1」のことを意味する。COL15A1は、コラーゲン型タンパク質である。この遺伝子は、7通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された肝臓腫瘍の50%、採取された肺腫瘍の38%および採取された子宮腫瘍の29%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肝臓癌、肺癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0118】

「SLAMF6」とは、受託番号NM__052931と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__443163と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID114836と呼ばれる遺伝子「SLAMファミリーメンバー6」のことを意味する。SLAMF6は、Igタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。この遺伝子は、4通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された4つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巣腫瘍の50%、採取されたリンパ性腫瘍の43%および採取された胃腫瘍の30%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された子宮頸部腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌、リンパ性癌、胃癌および子宮頸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0119】

「CD74」とは、受託番号NM__004355と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__004346と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID972と呼ばれる遺伝子「CD74抗原(主要組織適合遺伝子複合体の不変ポリペプチド、クラスII抗原関連)」のことを意味する。CD74は、シャペロンタンパク質である。この遺伝子は、36通りのMLVプロウイルスのI型お

よび I I 型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された 3 つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された子宮腫瘍の 26 % および採取されたリンパ性腫瘍の 23 % において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された卵巣腫瘍においても過剰発現していることが見出された (t 検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、子宮癌、リンパ性癌および卵巣癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0120】

「TSPAN-2」とは、受託番号 NM_005725 と呼ばれる mRNA および受託番号 NP_005716 と呼ばれるポリペプチドをコードする mRNA を有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座 ID10100 と呼ばれる遺伝子「テトラスパン 2」のことを意味する。TSPAN-2 は、テトラスパニンタンパク質である。この遺伝子は、2 通りの MLV プロウイルスの I 型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された 3 つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された乳房腫瘍の 45 % および採取された肺腫瘍の 26 % において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された子宮腫瘍においても過剰発現していることが見出された (t 検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌、肺癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0121】

「RSP03」としても知られる「THSD2」とは、受託番号 NM_032784 と呼ばれる mRNA および受託番号 NP_116173 と呼ばれるポリペプチドをコードする mRNA を有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座 ID84870 と呼ばれる遺伝子「トロンボスポンジン、I 型、ドメイン含有 2」のことを意味する。THSD2 は、細胞外マトリックスタンパク質である。この遺伝子は、20 通りの MMTV プロウイルスの I 型および I I 型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された 4 つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された乳房腫瘍の 45 %、採取された卵巣腫瘍の 43 % および採取された子宮腫瘍の 26 % において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された膵臓腫瘍においても過剰発現していることが見出された (t 検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌、卵巣癌、子宮癌および膵癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0122】

「CD2」とは、受託番号 NM_001767 と呼ばれる mRNA および受託番号 NP_001758 と呼ばれるポリペプチドをコードする mRNA を有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座 ID914 と呼ばれる遺伝子「CD2 抗原 (p50)、ヒツジ赤血球レセプター」のことを意味する。CD2 は、Ig タンパク質スーパーファミリーのメンバーである。この遺伝子は、5 通りの MLV および MMTV プロウイルスの I 型および I I 型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された 2 つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された乳房腫瘍の 29 % および採取されたリンパ性腫瘍の 24 % において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌およびリンパ性癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0123】

「LNPEP」とは、受託番号 NM_005575 と呼ばれる mRNA および受託番号 NP_005566 と呼ばれるポリペプチドをコードする mRNA を有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座 ID4012 と呼ばれる遺伝子「ロイシル/シスチニルアミノペプチダーゼ」のことを意味する。LNPEP は、アミノペプチダーゼである。この遺伝子は、5 通りの MLV プロウイルスの I 型および I I 型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された 3 つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された結腸腫瘍の 44 %、採取された肺腫瘍の 42 % および採取されたリンパ性腫瘍の 40 % において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、

結腸癌、肺癌およびリンパ性癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0124】

「IGSF8」とは、受託番号NM__052868と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__443100と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID93185と呼ばれる遺伝子「免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバー8」のことを意味する。IGSF8は、Igタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。この遺伝子は、3通りのMLVプロウイルスのII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された6つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巣腫瘍の65%、採取された肝臓腫瘍の55%、採取された乳房腫瘍の52%、採取された前立腺腫瘍の41%、採取された膵臓腫瘍の30%および採取された皮膚腫瘍の30%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌、肝臓癌、乳癌、前立腺癌、膵癌および皮膚癌に関連しているため、これらの癌および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

【0125】

「ATP1A2」とは、受託番号NM__000702と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000693と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID477と呼ばれる遺伝子「ATPアーゼ、Na⁺/K⁺輸送、アルファ2(+)ポリペプチド」のことを意味する。ATP1A2は、陽イオントランスポーターATPアーゼである。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。従って、この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

20

【0126】

「ITGA4」とは、受託番号NM__000885と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000876と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3676と呼ばれる遺伝子「インテグリン、アルファ4(抗原CD49D、VLA-4レセプターのアルファ4サブユニット)」のことを意味する。ITGA4は、インテグリンである。この遺伝子は、6通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、採取された乳房腫瘍の40%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

30

【0127】

「B2M」とは、受託番号NM__004048と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__004039と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID567と呼ばれる遺伝子「ベータ-2-ミクログロブリン」のことを意味する。B2Mは、分泌タンパク質である。この遺伝子は、6通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

【0128】

「PAG1」としても知られる「PAG」とは、受託番号NM__018440と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__060910と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID55824と呼ばれる遺伝子「スフィンゴ糖脂質リッチミクロドメイン関連リタンパク質」のことを意味する。PAGは、レセプタータンパク質である。この遺伝子は、6通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された4つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された胃腫瘍の43%、採取された子宮腫瘍の40%および採取されたリンパ性腫瘍の33%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された乳房腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、胃癌、子宮癌、リンパ性癌および乳癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを

40

50

意味する。

【0129】

「NOTCH2」とは、受託番号NM__024408と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__077719と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID4853と呼ばれる遺伝子「Notchホモログ2」のことを意味する。NOTCH2は、シグナル伝達レセプターである。この遺伝子は、40通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

【0130】

「UTS2」とは、受託番号NM__006786と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__006777と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID10911と呼ばれる遺伝子「ウロテンシン2」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__021995およびタンパク質受託番号NP__068835とよばれる。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのI型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巣腫瘍の37%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された腎臓腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌および腎臓癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0131】

「TNFRSF14」とは、受託番号NM__003820と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__003811と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID8764と呼ばれる遺伝子「腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー、メンバー14(ヘルペスウイルス侵入メディエーター)」のことを意味する。TNFRSF14は、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、4通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された皮膚腫瘍の75%、採取された肝臓腫瘍の48%および採取された前立腺腫瘍の36%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、皮膚癌、肝臓癌および前立腺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0132】

「TGFB3」とは、受託番号NM__003243と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__003234と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID7049と呼ばれる遺伝子「トランスフォーミング成長因子、βレセプターIII(ベータグリカン、300kDa)」のことを意味する。TGFB3は、レセプターである。この遺伝子は、9通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された前立腺腫瘍の67%および採取された子宮腫瘍の27%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、前立腺癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0133】

「FGF8」とは、受託番号NM__006119と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__006110と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2253と呼ばれる遺伝子「線維芽細胞成長因子8(アンドロゲン誘導)」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__033163、NM__033164、NM__033165およびそれぞれタンパク質受託番号NP__149353、NP__149354、NP__149355とよば

れる。FGF8は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、62通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取されたリンパ性腫瘍の33%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された結腸腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、リンパ性癌および結腸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0134】

「FGF3」とは、受託番号NM_005247と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_005238と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2248と呼ばれる遺伝子「線維芽細胞成長因子3(マウス乳腺腫瘍ウイルス組込み部位(vint-2)癌遺伝子ホモログ)」のことを意味する。FGF3は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、824通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

10

【0135】

「XYLT1」とは、受託番号NM_022166と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_071449と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID64131と呼ばれる遺伝子「キシロシルトランスフェラーゼI」のことを意味する。XYLT1は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、4通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取されたリンパ性腫瘍の40%および採取された腎臓腫瘍の31%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、リンパ性癌および腎臓癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

20

【0136】

「FGF4」とは、受託番号NM_002007と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_001998と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2249と呼ばれる遺伝子「線維芽細胞成長因子4(ヘパリン分泌性トランスフォーミングタンパク質1、カボジ肉腫癌遺伝子)」のことを意味する。FGF4は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、49通りのMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

30

【0137】

「LOC390243」とは、受託番号XM_372428と呼ばれるmRNAおよび受託番号XP_372428と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID390243と呼ばれる遺伝子「LOC390243、葉酸レセプター3類似」のことを意味する。LOC390243は、レセプターである。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

40

【0138】

「THY1」とは、受託番号NM_006288と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_006279と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID7070と呼ばれる遺伝子「Thy-1細胞表面抗原」のことを意味する。THY1は、Igタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。この遺伝子は、4通りのMLVプロウイルスのI型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された7つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された結腸腫瘍の59%、採取された肝臓腫瘍の45%、採取された乳房腫瘍の50%、採取された肺腫瘍の34%、採取された卵巣腫瘍の26%および採取された子宮腫瘍の54%において過剰

50

発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された膵臓腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t 検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、結腸癌、肝臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、子宮癌および膵癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0139】

「SLC9A9」とは、受託番号NM__173653と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__775924と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座ID285195と呼ばれる遺伝子「溶質キャリアファミリー9（ナトリウム／水素交換体）、アイソフォーム9」のことを意味する。SLC9A9は、キャリアタンパク質である。この遺伝子は、4通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された腎臓腫瘍の38%および採取された肝臓腫瘍の33%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、腎臓癌および肝臓癌に関連しているため、これらの癌および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

【0140】

「PRG1」とは、受託番号NM__002727と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002718と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座ID5552と呼ばれる遺伝子「プロテオグリカン1、分泌性顆粒」のことを意味する。PRG1は、プロテオグリカンである。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子はまた、採取された肺腫瘍においても過剰発現していることが見出された（t 検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肺癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

20

【0141】

「CPM」とは、受託番号NM__001005502と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__001005502と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座ID1368と呼ばれる遺伝子「カルボキシペプチダーゼM」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__001874、NM__198320およびそれぞれタンパク質受託番号NP__001865、NP__938079とよばれる。CPMは、カルボキシペプチダーゼである。この遺伝子は、4通りのMLVおよびMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、採取された子宮頸部腫瘍において過剰発現していることが見出された（t 検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、子宮頸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

30

【0142】

「FBN2」とは、受託番号NM__001999と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__001990と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座ID2201と呼ばれる遺伝子「フィブリリン2」のことを意味する。この遺伝子は、先天性拘縮性クモ指症に関係する。FBN2は、細胞外マトリックスタンパク質である。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された乳房腫瘍の48%および採取された膵臓腫瘍の29%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌および膵癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

40

【0143】

「LTB」とは、受託番号NM__002341と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002332と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI 公的データベース内の遺伝子座ID4050と呼ばれる遺伝子「リンフォトキシンベータ（TN

50

Fスーパーファミリー、メンバー3)」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__009588およびタンパク質受託番号NP__033666とよばれる。LTBは、サイトカインである。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巢腫瘍の50%、採取された乳房腫瘍の29%および採取されたリンパ性腫瘍の27%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巢癌、乳癌およびリンパ性癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0144】

「KCNH5」とは、受託番号NM__139318と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__647479と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID27133と呼ばれる遺伝子「電位型カリウムチャンネル、サブファミリーH(eag関連)、メンバー5)」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、mRNA受託番号NM__172375、NM__172376およびそれぞれタンパク質受託番号NP__758963、NP__758964とよばれる。KCNH5は、カリウムイオンチャンネルタンパク質である。この遺伝子は、2通りのMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された4つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された膵臓腫瘍の60%、採取された胃腫瘍の46%、採取された卵巢腫瘍の44%および採取された皮膚腫瘍の36%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、膵癌、胃癌、卵巢癌および皮膚癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0145】

「SLC12A7」とは、受託番号NM__006598と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__006589と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID10723と呼ばれる遺伝子「溶質キャリアファミリー12(カリウム/クロライドトランスポーター)、メンバー7)」のことを意味する。SLC12A7は、キャリアタンパク質である。この遺伝子は、4通りのMLVおよびMMYVプロウイルスのII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された子宮腫瘍の50%および採取された肝臓腫瘍の48%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された卵巢腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、子宮癌、肝臓癌および卵巢癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0146】

「FGF10」とは、受託番号NM__004465と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__004456と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID2255と呼ばれる遺伝子「線維芽細胞成長因子10)」のことを意味する。FGF10は、分泌タンパク質である。この遺伝子は、42通りのMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された肝臓腫瘍の47%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された卵巢腫瘍および膵臓腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肝臓癌、卵巢癌および膵癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0147】

「IL7R」とは、受託番号NM__002185と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__002176と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3575と呼ばれる遺伝子「インターロイキン7レセプタ

10

20

30

40

50

ー」のことを意味する。I L 7 Rは、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、7通りのM L VプロウイルスのI型およびI I型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された肺腫瘍および採取された卵巣腫瘍において過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肺癌および卵巣癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0148】

「M A T N 2」とは、受託番号N M _ 0 0 2 3 8 0と呼ばれるm R N Aおよび受託番号N P _ 0 0 2 3 7 1と呼ばれるポリペプチドをコードするm R N Aを有する、N C B I 公的データベース内の遺伝子座I D 4 1 4 7と呼ばれる遺伝子「マトリリン (m a t r i l i n) 2」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれm R N A 受託番号N M _ 0 3 0 5 8 3およびタンパク質受託番号N P _ 0 8 5 0 7 2とよばれる。M A T N 2は、細胞外マトリックスタンパク質である。この遺伝子は、2通りのM L VまたはM M T VプロウイルスのいずれかのI I型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された前立腺腫瘍の32%および採取された子宮腫瘍の24%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、前立腺癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0149】

「C O L 1 9 A 1」とは、受託番号N M _ 0 0 1 8 5 8と呼ばれるm R N Aおよび受託番号N P _ 0 0 1 8 4 9と呼ばれるポリペプチドをコードするm R N Aを有する、N C B I 公的データベース内の遺伝子座I D 1 3 1 0と呼ばれる遺伝子「コラーゲン、X I X型、アルファ1」のことを意味する。C O L 1 9 A 1は、細胞外マトリックスタンパク質である。この遺伝子は、3通りのM L VまたはM M T VプロウイルスのいずれかのI I型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された乳房腫瘍の27%および採取された子宮腫瘍の24%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、乳癌および子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0150】

「S L C 1 A 2」とは、受託番号N M _ 0 0 4 1 7 1と呼ばれるm R N Aおよび受託番号N P _ 0 0 4 1 6 2と呼ばれるポリペプチドをコードするm R N Aを有する、N C B I 公的データベース内の遺伝子座I D 6 5 0 6と呼ばれる遺伝子「溶質キャリアファミリー1 (グリア高アフィニティーグルタミン酸トランスポーター)、メンバー2」のことを意味する。S L C 1 A 2は、カルシウムチャネルトランスポータータンパク質である。この遺伝子は、2通りのM L VプロウイルスのI型およびI I型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された9つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巣腫瘍の61%、採取された乳房腫瘍の60%、採取された肺腫瘍の53%、採取された皮膚腫瘍の40%、採取されたリンパ性腫瘍の40%、採取された前立腺腫瘍の39%、採取された肝臓腫瘍の33%および採取された子宮腫瘍の33%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された膵臓腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌、乳癌、肺癌、皮膚癌、リンパ性癌、前立腺癌、肝臓癌、子宮癌および膵癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0151】

「S L C 2 8 A 2」とは、受託番号N M _ 0 0 4 2 1 2と呼ばれるm R N Aおよび受託番号N P _ 0 0 4 2 0 3と呼ばれるポリペプチドをコードするm R N Aを有する、N C B I 公的データベース内の遺伝子座I D 9 1 5 3と呼ばれる遺伝子「溶質キャリアファミリー28 (ナトリウム結合ヌクレオシドトランスポーター)、メンバー2」のことを意味する。S L C 2 8 A 2は、キャリアタンパク質である。この遺伝子は、2通りのM L Vプロ

ウイルスの I 型組込みを起こした。この遺伝子は、採取された子宮腫瘍の 45%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、子宮癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0152】

「SLPI」とは、受託番号NM__003064と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__003055と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID6590と呼ばれる遺伝子「分泌性白血球プロテアーゼインヒビター（抗ロイコプロテイナーゼ）」のことを意味する。SLPIは、分泌タンパク質である。この遺伝子は、5通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、採取された卵巣腫瘍の100%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌に関連しているため、これらの癌および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

【0153】

「IL12A」とは、受託番号NM__000882と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000873と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3592と呼ばれる遺伝子「インターロイキン12A（ナチュラルキラー細胞刺激因子1、細胞傷害性リンパ球成熟因子1、p35）」のことを意味する。IL12Aは、分泌タンパク質である。この遺伝子は、5通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取されたリンパ性腫瘍の47%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、リンパ性癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

20

【0154】

「IL6R」とは、受託番号NM__000565と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__000556と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID3570と呼ばれる遺伝子「インターロイキン6レセプター」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__181359およびタンパク質受託番号NP__852004とよばれる。IL6Rは、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、4通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、採取された卵巣腫瘍において過剰発現していることが見出された（t検定）。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

30

【0155】

「TNFSF8」とは、受託番号NM__001244と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__001235と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID944と呼ばれる遺伝子「腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、メンバー8」のことを意味する。TNFSF8は、サイトカインである。この遺伝子は、2通りのMLVプロウイルスのI型組込みを起こした。この遺伝子は、癌の診断および治療に有用である。

40

【0156】

「TNFRSF8」とは、受託番号NM__001243と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP__001234と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID943と呼ばれる遺伝子「腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー、メンバー8」のことを意味する。転写改変体は、当該分野で公知であり、それぞれmRNA受託番号NM__152942およびタンパク質受託番号NP__694421とよばれる。TNFRSF8は、サイトカインレセプターである。この遺伝子は、5通りのMLVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は

50

、試験された5つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された肝臓腫瘍の56%、採取された子宮頸部腫瘍の45%、採取された皮膚腫瘍の44%、採取された前立腺腫瘍の39%および採取されたリンパ性腫瘍の33%において過剰発現していることが見出された。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肝臓癌、子宮頸癌、皮膚癌、前立腺癌およびリンパ性癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0157】

「CD38」とは、受託番号NM_001775と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_001766と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID952と呼ばれる遺伝子「CD38抗原(p45)」の10
ことを意味する。CD38は、レセプターである。この遺伝子は、3通りのMLVまたはMMTVプロウイルスのいずれかのII型組込みを起こした。この遺伝子は、試験された3つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された卵巣腫瘍の35%および採取されたリンパ性腫瘍の30%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された子宮頸部腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、卵巣癌、リンパ性癌および子宮頸癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0158】

「PDGFRA」とは、受託番号NM_006206と呼ばれるmRNAおよび受託番号NP_006197と呼ばれるポリペプチドをコードするmRNAを有する、NCBI公的データベース内の遺伝子座ID5156と呼ばれる遺伝子「血小板由来成長因子レセプター、アルファポリペプチド」の20
ことを意味する。PDGFRAは、チロシンキナーゼレセプターである。この遺伝子は、11通りのMMTVプロウイルスのI型およびII型の組込みを起こした。この遺伝子は、試験された2つの癌組織型において過剰発現していることが見出され、採取された肺腫瘍の27%において過剰発現していることが見出された。この遺伝子はまた、採取された卵巣腫瘍においても過剰発現していることが見出された(t検定)。このことは、この遺伝子が、他の癌のうち、肺癌および卵巣癌に関連しているため、これらの癌および他の癌の診断および治療の標的となることを意味する。

【0159】

従って、これらの遺伝子のうちの1つの発現の有無のみで、癌を引き起こすのに十分であり得る。あるいは、これらの遺伝子のうちの1つの発現の増加または減少(遺伝子の発現が癌において増加または減少するということは、いくつかの実施形態において遺伝子および癌のタイプに依存する)が、癌を引き起こすのに十分であり得る。さらに別の場合においては、これらの遺伝子の1以上の(すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の)発現が閾値レベルに達するかまたはそれを越えると、癌が誘導され得る。閾値レベルは、発現の「正常な」コントロールレベルと比較した場合の遺伝子の発現の増加率または減少率として表され得る。

【0160】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子の差次的発現または増幅は、インビボ診断アッセイを使用して、例えば、検出されるべき分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位体)でタグ化した分子(例えば、抗体)を投与すること、および標識の局在について患者を外部からスキャンすることによって評価され得る。

【0161】

いくつかの実施形態において、遺伝子または遺伝子発現産物は、隣接する健常組織または貯蔵されていた正常組織と比べてその遺伝子または遺伝子発現産物の発現レベルの比較によって標的化のために選択される。いくつかの実施形態において、正常組織および/またはコントロールと比較して少なくとも3倍(300%)発現が増加する。いくつかの実施形態において、貯蔵された、市販の正常組織サンプルの大部分と比較して3倍の増加が見られる。スクリーニングはまた、レーザーキャプチャー顕微鏡を使用して正常な隣接組50

織から癌性組織を切り出し、その後、標準的なAffimetrixチップU133 (cat # 900370) などの標準的な市販のチップを利用した発現マイクロアレイ解析することによって行うことができる (例えば、Yang et al., (2005) Oncogene, 10-31を参照のこと)。いくつかの実施形態において、癌のタイプによって分類された患者組織サンプルの貯蔵物由来の核酸サンプルを含むカスタムチップを製作し、発現プロファイルを解析するために探索することができる (例えば、Makino et al., Dis Esophagus. 2005; 18 (1) : 37-40を参照のこと)。

【0162】

本発明はまた、上記参照癌関連遺伝子のホモログ、フラグメントおよび機能等価物の使用を可能にする。相同性は、上で参照した完全な遺伝子配列に基づき得、一般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使用して以下に概要を述べるように決定する。癌関連遺伝子のホモログは、好ましくは癌関連遺伝子に対して約75%以上 (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%またはそれ以上) の相同性を有する。このようなホモログは、スプライスバリエーション、欠失変異体、付加変異体および/または置換変異体を含み得、そして一般に機能的な類似性を有する。

【0163】

この文脈での相同性とは、配列類似性または配列同一性を意味する。相同性の目的での1つの比較は、配列決定エラーを含む配列と正しい配列とを比較することである。この相同性は、当該分野で公知の標準的な技術を使用して決定されることになる。それらの技術としては、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, PNAS USA 85: 2444 (1988) の類似性についての検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)、Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12: 387-395 (1984) に記載されている、いくつかの実施形態ではデフォルト設定を使用したベストフィット (Best Fit) 配列プログラムまたは検定が挙げられるが、これらに限定されない。

【0164】

有用なアルゴリズムの1つの例は、PILEUPである。PILEUPは、プログレッシブペアワイズアラインメントを使用して関連配列の群から複数の配列アラインメントを生成する。PILEUPはまた、そのアラインメントを生成するために使用されるクラスタリングの関係性 (clustering relationship) を示す木を表示することができる。PILEUPは、Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351-360 (1987) のプログレッシブアラインメント法の単純化を使用する; その方法は、Higgins & Sharp CABIOS 5: 151-153 (1989) に記載されている方法に類似している。有用なPILEUPパラメータとしては、デフォルトのギャップ重みづけ (gap weight) 3.00、デフォルトのギャップ長重み付け (gap length weight) 0.10および重み付けエンドギャップ (weighted end gap) が挙げられる。

【0165】

有用なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) およびKarlin et al., PNAS USA 90: 5873-5787 (1993) に記載されているBLAST (B

10

20

30

40

50

asic Local Alignment Search Tool) アルゴリズムである。特に有用なBLASTプログラムは、Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/> から入手したWU-BLAST-2プログラムである。WU-BLAST-2は、いくつかの検索パラメータを使用し、そのパラメータのほとんどは、デフォルトの値に設定されている。調節可能なパラメータは、以下の値で設定されている：オーバーラップスパン (overlap span) = 1、オーバーラップフラクション (overlap fraction) = 0.125、ワード閾値 (word threshold) (T) = 11。HSP SおよびHSP S2パラメータは、動的な値であり、特定の配列の組成および目的の配列を検索する特定のデータベースの組成に依存するプログラム自体によって確立される；しかしながら、その値は、感度を高くするように調節され得る。アミノ酸配列同一性パーセント値は、マッチする同一残基の数を、アラインメントされる領域の「より長い」配列の残基の総数で割ることによって決定される。「より長い」配列は、アラインメントされる領域内で実際の残基を最も多く有する配列のことである（アラインメントスコアを最大にするためにWU-Blast-2によって導入されたギャップは無視する）。

【0166】

アラインメントは、アラインメントされるべき配列中にギャップを導入することを含み得る。さらに、癌関連遺伝子のヌクレオチドよりも多いかまたは少ないヌクレオチドを含む配列については、相同性のパーセンテージは、ヌクレオチドの総数に対する相同なヌクレオチドの数に基づいて決定されると理解される。従って、本明細書中で同定される配列よりも短い配列の相同性は、短いほうの配列におけるヌクレオチドの数を使用して決定されることになる。

【0167】

本発明のいくつかの実施形態において、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントまたはその相補的配列に中程度から高度に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、分子生物学の当該分野で周知である。説明の目的で、他のポリヌクレオチドと本発明のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するための適当な中程度にストリンジェントな条件としては、5×SSC（「クエン酸ナトリウム食塩水」；9mM NaCl, 0.9mMクエン酸ナトリウム）、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0) 溶液中で前洗浄し；50～60℃で、5×SSC中、一晚ハイブリダイズし；その後、65℃にて、2×SSC（0.1% SDS含有）、0.5×SSC（0.1% SDS含有）および0.2×SSC（0.1% SDS含有）でそれぞれ20分間の洗浄を2回行うことが挙げられる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション溶液の塩含有量および／またはハイブリダイゼーションを行う温度を変更することなどによって容易に操作できることを当業者は理解するだろう。例えば、いくつかの実施形態において、適当な高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、ハイブリダイゼーションの温度を例えば、60～65℃または65～70℃に上げること以外は上記の条件が挙げられる。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤を追加することによって達成され得る。

【0168】

従って、本出願および配列表を通じて同定される核酸またはその相補物に高ストリンジェンシーでハイブリダイズする核酸は、癌関連配列と考えられる。高ストリンジェンシー条件は、当該分野で公知である；例えば、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989およびShort Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al. を参照のこと。この両方は、本明細書によって参考として援用される。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、様々な状況において異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズ

する。核酸のハイブリダイゼーションの詳細な指針は、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、規定されたイオン強度 pHにおける特定の配列に対する熱融解点 (T_m) より約 $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 低く選択される。 T_m は、(規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度において) 標的に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である(標的配列が過剰に存在するとき、 T_m において、プローブの50%が平衡状態を占める)。ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH 7.0~8.3において、約1.0Mナトリウムイオン未満、代表的には、約0.01~1.0Mナトリウムイオン濃度(または他の塩)である条件である。温度は、短いプローブ(例えば、10~50ヌクレオチド)については少なくとも約 30°C およびより長いプローブ(例えば、50ヌクレオチド超)については少なくとも約 60°C である。別の実施形態において、より低いストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を使用する;例えば、当該分野で公知であるような中程度または低いストリンジェンシー条件を使用してもよい;ManiatisおよびAusubel, 前出およびTijssen, 前出を参照のこと。

【0169】

(癌関連遺伝子発現の検出)

癌関連遺伝子は、クローニングされ得、そして、必要であれば、その構成部分を、癌関連核酸全体を形成するように組換え得る。一旦、その天然供給源から単離されると、例えば、プラスミドもしくは他のベクター内に含まれるか、または直線状の核酸セグメントとしてそこから切り取られると、組換え癌関連核酸は、他の癌関連核酸、例えば、さらなるコード領域を同定および単離するプローブとしてさらに使用することができる。組換え癌関連核酸はまた、癌関連核酸および癌関連タンパク質の改変体または癌関連核酸および癌関連タンパク質のバリエーションを作製する「前駆体」核酸として使用することもできる。癌関連遺伝子のヌクレオチド配列はまた、癌関連遺伝子に特異的なプローブを設計するために使用することもできる。

【0170】

癌関連核酸は、いくつかの方法で使用され得る。癌関連核酸にハイブリダイズ可能な核酸プローブを、作製することができ、そして、スクリーニングおよび診断法において、または遺伝子治療および/またはアンチセンス用途のために使用されるバイオチップに付着することができる。あるいは、癌関連タンパク質のコード領域を含む癌関連核酸を、スクリーニングの目的で、または患者に投与するためのいずれかのために癌関連タンパク質の発現用の発現ベクターに再度組み込むことができる。

【0171】

遺伝子発現を定量化するためのこのようなシステムの1つは、キネティックポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。キネティックPCRにより、特定の核酸配列の同時に増幅および定量が可能になる。特異性は、標的部位を囲う一本鎖核酸配列に優先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から得られる。オリゴヌクレオチドプライマーのこの対は、標的配列の鎖のそれぞれにおいて特異的な非共有結合的に結合した複合体を形成する。これらの複合体は、逆向きの二本鎖DNAのインビトロ転写を促進する。反応混合物の温度サイクリングは、プライマー結合、転写および個々の鎖への核酸の再融解の連続したサイクルである。その結果、標的dsDNA産物が指数関数的に増加する。この産物は、インターカレート色素または配列特異的プローブのいずれかの使用によってリアルタイムで定量することができる。SYBR (登録商標) Greene Iは、インターカレート色素の例であり、dsDNAに優先的に結合して、同時に蛍光シグナルが増加する。TaqMan (登録商標) 技術で使用されるような配列特異的プローブは、蛍光色素およびオリゴヌクレオチドの反対の端に共有結合しているクエンチング分子か

らなる。このプローブは、2つのプライマーの間の標的DNA配列に選択的に結合するように設計されている。DNA鎖が、PCR反応の間に合成されると、蛍光色素は、ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によりプローブから切断され、シグナルの脱クエンチング (dequenching) が起きる。プローブシグナリング法は、インターカレート色素法よりも特異的であり得るが、各々の場合において、シグナル強度は、生成される dsDNA 産物に比例する。定量方法の各タイプは、多ウェルの液相アレイにおいて使用することができ、各ウェルが目的の核酸配列に特異的なプライマーおよび／またはプローブを示す。組織または細胞株のメッセンジャーRNA調製物とともに使用するとき、プローブ／プライマー反応物のアレイは、目的の複数の遺伝子産物の発現を同時に定量することができる。Germer, S., et al., Genome Res. 10: 258-266 (2000); Heid, C. A., et al., Genome Res. 6, 986-994 (1996) を参照のこと。

10

【0172】

DNAマイクロアレイ技術の近年の進歩により、単一の固相支持体上で複数の標的癌関連核酸分子の大規模アッセイを行うことが可能になった。米国特許第5,837,832号 (Chee et al.) および関連特許出願では、ハイブリダイゼーション用のオリゴヌクレオチドプローブのアレイの固定およびサンプル中の特定の核酸配列の検出について記載されている。目的の組織から単離された目的の標的ポリヌクレオチドは、DNAチップおよび標的ポリヌクレオチドの優先度および別個のプローブの位置でのハイブリダイゼーションの程度に基づいて検出される特異的配列にハイブリダイズする。アレイの重要な用途の1つは、様々な細胞 (目的の細胞およびコントロール細胞であることが多い) における遺伝子の発現プロファイルを比較し、それぞれの細胞間の遺伝子発現の任意の差が同定される差次的遺伝子発現の解析における用途である。このような情報は、特定の細胞または組織の型において発現している遺伝子タイプの同定およびその発現プロファイルに基づいた癌の状態の診断に有用である。

20

【0173】

代表的には、目的のサンプル由来のRNAを、逆転写に供して、標識cDNAを得る。米国特許第6,410,229号 (Lockhart et al.) を参照のこと。次いで、そのcDNAを、チップまたは他の表面上に既知の順序で整列した既知配列のオリゴヌクレオチドまたはcDNAにハイブリダイズする。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、cDNAについての配列情報を提供し、標識され、ハイブリダイズされたRNAまたはcDNAの量は、目的のRNAまたはcDNAの相対的な表示の推定を提供する。Schena, et al. Science 270: 467-470 (1995) を参照のこと。例えば、ヒト癌において遺伝子発現パターンを解析するcDNAマイクロアレイの使用については、DeRisi, et al. (Nature Genetics 14: 457-460 (1996)) に記載されている。

30

【0174】

癌関連核酸に対応する核酸プローブを作製してもよい。代表的には、これらのプローブは、開示された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せた核酸プローブを、癌関連核酸、すなわち標的配列 (例えば、サンドイッチアッセイにおけるサンプルの標的配列または他のプローブ配列のいずれか) に実質的に相補的であるように設計すると、標的配列と本発明のプローブとの特異的なハイブリダイゼーションが生じる。以下に概要を述べるように、標的配列と本発明の一本鎖核酸との間のハイブリダイゼーションを妨げるいくらかの数の塩基対ミスマッチが存在し得るため、この相補性は、必ずしも完璧である必要はない。ヌクレオチドレベルでの遺伝子の全体の相同性が、約40%以上、約60%以上、または約80%以上であること; およびさらに約8~12ヌクレオチドまたはそれ以上長い、対応する近接配列が存在することが期待される。しかしながら、変異の数が多すぎるために、最低のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下であってもハイブリダイゼーションが起き得ない場合は、その配列は、標的配列と相補的でない。従って、本明細書における「実質的に相補的」とは、プローブが、標的配列に十分相補

40

50

的で、本明細書中に概要を述べるような通常の反応条件、特に高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることを意味する。配列が本発明に記載の癌関連遺伝子に特有であるか否かということは、当業者に公知の技術によって決定することができる。例えば、その配列を、データバンク、例えばGene Bank内の配列と比較することによって、非感染宿主または他の生物体において存在するか否かを判定することができる。その配列はまた、癌を誘導することが知られている配列を含む他のウイルス性物質の既知配列と比較することもできる。

【0175】

核酸プローブは、一般に一本鎖であるが、部分的に一本鎖および部分的に二本鎖であり得る。プローブの鎖の状態 (strandedness) は、標的配列の構造、組成物および特性によって支配される。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～約100塩基長、約10～約80塩基または約30～約50塩基の範囲である。いくつかの実施形態において、遺伝子全体をプローブとして使用する。いくつかの実施形態において、何百塩基までの一層長い核酸を使用することができる。プローブは、十分に特異的であるため、当業者に公知の条件下で相補的な鋳型配列にハイブリダイズする。プローブ配列とそれがハイブリダイゼーションの間にハイブリダイズするその相補的鋳型 (標的) 配列との間のミスマッチの数は、FASTA (デフォルトの設定) によって決定される場合、一般に15%、10%または5%を超えない。

【0176】

オリゴヌクレオチドプローブは、核酸 (ウラシル、シトシン、チミン、アデニンおよびグアニン) に通常見られる天然に存在する複素環式の塩基ならびに改変塩基および塩基アナログを含み得る。標的配列に対するプローブのハイブリダイゼーションに適合している任意の改変塩基または塩基アナログは、本発明の実施に有用である。プローブの糖部分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改変型、例えば、2'-O-アルキルリボースを含み得る。いくつかの実施形態において、糖部分は、2'-デオキシリボースである；しかしながら、標的配列にハイブリダイズするプローブの能力に適合した任意の糖部分を使用することができる。

【0177】

プローブのヌクレオシド単位は、当該分野で周知であるように、ホスホジエステル骨格によって連結され得る。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド間の結合は、プローブの特定のハイブリダイゼーションに適合した、当業者に公知の任意の結合を含み得る。その結合としては、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、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) が挙げられるが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に記載されている。

【0178】

プローブは、キメラ分子であり得る；すなわち、塩基または糖サブユニットの2つ以上の型を含み得、そして/またはその結合は、同じプライマー内の2つ以上の型であり得る。プローブは、当該分野で公知であるように、その標的配列へのハイブリダイゼーションを促進する部分、例えば、インターカレーターおよび/または副溝結合剤を含み得る。塩基、糖およびインターヌクレオシド骨格のバリエーションならびにプローブ上の任意の付属基の存在は、配列特異的な様式で、その標的配列と結合するプローブの能力に適合する。既知および開発された多数の構造的改変の両方が、これらの結合内で可能である。有利なことには、本発明に記載のプローブは、シグナル増幅を可能にするような構造的特徴を有し得、このような構造的特徴は、例えば、Urdea et al. (Nucleic Acids Symp. Ser., 24:197-200 (1991)) または欧州特許第EP-0225,807号に記載されているような分枝DNAプローブである。さらに、プローブを形成する様々な複素環式の塩基、糖、ヌクレオシドおよびヌクレオチドな

らびに特定の所定の配列のオリゴヌクレオチド調製物を調製するための合成方法は、十分に開発されており、当該分野で公知である。オリゴヌクレオチド合成するための方法は、米国特許第 5, 4 1 9, 9 6 6 号の教示を援用する。

【0179】

複数のプローブを、特定の標的核酸について設計することにより、標的核酸の多型および／または二次構造、データの冗長性などについて説明し得る。いくつかの実施形態において、配列 1 つにつき 2 個以上のプローブが使用される場合、単一の標的癌関連遺伝子の様々な部分と重複するプローブまたはプローブのいずれかを使用する。すなわち、2 個、3 個、4 個またはそれ以上のプローブ（好ましくは 3 個）を使用して、特定の標的に対する重複性を確立する。そのプローブは、重複し得る（すなわち、共通していくつかの配列を有する）か、または癌関連遺伝子の別個の配列に特異的であり得る。複数の標的ポリヌクレオチドが、本発明に従って検出されるとき、特定の標的ポリヌクレオチドに対応するプローブまたはプローブ群の各々が、マイクロアレイの別個の領域に位置している。

【0180】

プローブは、ウェル内またはマイクロアレイの表面上のように溶液中に存在し得るか、または固体支持体に付着され得る。使用できる固体支持体材料の例としては、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。固体支持体の有用なタイプとしては、プレート、ビーズ、磁性材料、マイクロビーズ、ハイブリダイゼーションチップ、膜、結晶、セラミックスおよび自己集合性単層が挙げられる。いくつかの実施形態は、2 次元マトリックスまたは 3 次元マトリックス（例えば、複数のプローブ結合部位を含むゲルまたはハイブリダイゼーションチップ）を含む（Pevzner et al., J. Biomol. Struct. & Dyn. 9:399-410, 1991; Maskos and Southern, Nuc. Acids Res. 20:1679-84, 1992）。ハイブリダイゼーションチップを使用して、標的核酸に続いてハイブリダイズする非常に大きなプローブアレイを構築することができる。チップのハイブリダイゼーションパターンの解析により、標的ヌクレオチド配列の同定が助けられる。パターンは、手動またはコンピュータにより解析され得るが、ハイブリダイゼーションによる位置配列決定が、コンピュータ解析および自動化につながることは明らかである。配列再構築のために開発されてきたアルゴリズムおよびソフトウェアは、本明細書中で記載されている方法に適用可能である（R. Drmanac et al., J. Biomol. Struct. & Dyn. 5:1085-1102, 1991; P. A. Pevzner, J. Biomol. Struct. & Dyn. 7:63-73, 1989）。

【0181】

当業者によって理解されるように、核酸は、多岐にわたる方法で固体支持体に接着または固定することができる。本明細書中で「固定される」とは、核酸プローブと固体支持体との間の会合または結合が、以下で概要を述べるように、結合、洗浄、解析および除去の条件下で十分に安定であることを意味する。結合は、共有結合または非共有結合であり得る。本明細書中で「非共有結合」および文法上の同義語は、正電氣的、親水性および疎水性の相互作用のいずれかの 1 以上を意味する。非共有結合に含まれるのは、ストレプトアビジンなどの分子の支持体への共有結合およびビオチン化プローブのストレプトアビジンへの非共有結合である。本明細書中で「共有結合」および文法上の同義語は、2 つの部分、すなわち固体支持体およびプローブが、 σ 結合、 π 結合および配位結合を含む少なくとも 1 つの結合によって結合していることを意味する。共有結合は、プローブと固体支持体との間で直接形成され得るか、あるいはクロスリンカーまたは固体支持体もしくはプローブのいずれかまたは両方の分子上の特定の反応基を含むことにより形成され得る。固定化はまた、共有結合および非共有結合の相互作用を組み合わせたものにも関連し得る。

【0182】

核酸プローブは、カップリング剤を組み合わせることによる共有結合または共有結合もしくは非共有結合（例えば、静電氣的相互作用、水素結合または抗体-抗原結合またはそれらの組み合わせ）によって固体支持体に接着され得る。代表的なカップリング剤として

は、ビオチン／アビジン、ビオチン／ストレプトアビジン、*Staphylococcus aureus* プロテイン A／IgG 抗体 Fc フラグメントおよびストレプトアビジン／プロテイン A キメラ (T. Sano and C. R. Cantor, *Bio/Technology* 9:1378-81 (1991)) またはこれらの物質の誘導体もしくは組み合わせが挙げられる。核酸は、光切断可能な結合、静電結合、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れらの種類の結合の組み合わせによって固体支持体に接着され得る。アレイはまた、4, 4'-ジメトキシトリチルまたはその誘導体などの選択的に放出可能な結合によって固体支持体に接着され得る。有用であると思出され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)]-メチルー安息香酸、N-スクシンイミジル-3 または 4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-メチルー安息香酸、N-スクシンイミジル-3 または 4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-ヒドロキシメチルー安息香酸、N-スクシンイミジル-3 または 4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-クロロメチルー安息香酸およびこれらの酸の塩が挙げられる。

10

【0183】

プローブは、当業者によって理解されるように、多岐にわたる方法において、バイオチップに接着され得る。本明細書中で記載するように、核酸を、最初に合成し、その後バイオチップに接着し得るか、またはバイオチップ上で直接合成し得る。

【0184】

バイオチップは、適当な固体基材を含む。本明細書中で「基材」または「固体支持体」または他の文法上の同義語は、改変されて、核酸プローブの接着または会合に適切な別個のそれぞれの部位を含み得、そして少なくとも 1 つの検出方法に適用可能な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適した任意の固体材料および構造であり得る。好ましくは、固相支持体は、プライマーが固定でき、そして逆転写酵素反応を行うことができる少なくとも 1 つの実質的に強固な表面を備える。ポリヌクレオチドマイクロアレイエレメントが安定に会合する基材は、種々の材料から作製され得る。その材料としては、プラスチック、セラミックス、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、ポリエチレンビニルアセテート、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、ケイ素ゴム、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、フマル酸ポリプロピル、コラーゲン、グリコサミノグリカンおよびポリアミノ酸が挙げられる。基材は、2 次元または 3 次元の形態 (例えば、ゲル、膜、薄膜、ガラス、プレート、円柱、ビーズ、磁性ビーズ、光ファイバー、織物繊維など) であり得る。アレイの 1 つの形態は、3 次元アレイである。3 次元アレイの 1 つのタイプは、タグ化ビーズの集合である。タグ化ビーズの各々は、それに接着した様々なプライマーを有する。タグは、シグナル手段 (例えば、呈色 (Luminex, Illumina) および電磁場 (Pharmaseq)) によって検出することができ、タグ化ビーズ上のシグナルは、(例えば、光ファイバーを使用して) 遠隔的でさえも検出することができる。固体支持体の大きさは、DNA マイクロアレイ技術にとって有用な標準的なマイクロアレイの任意の大きさであり得、その大きさは、本発明の反応を実施するために使用される特定の機械に適合するように調整され得る。一般に、基材は、光学的な検出が可能であり、感知できる蛍光を発しない。

20

30

40

【0185】

バイオチップの表面およびプローブは、後でその 2 つが結合するために化学官能基で誘導体化され得る。従って、例えば、バイオチップは、化学官能基で誘導体化される。その化学官能基としては、アミノ基、カルボキシ基、オキシ基およびチオール基が挙げられるがこれらに限定されず、アミノ基が特に好ましい。これらの官能基を使用し、プローブを、プローブ上の官能基を使用して接着することができる。例えば、アミノ基を含む核酸は、例えば、当該分野で公知であるようなリンカー；例えば、周知であるようなホモ二官能性リンカーまたはヘテロ二官能性リンカー (1994 Pierce Chemical

50

Company catalog, technical section on cross-linkersの155-200ページを参照のこと。これを本明細書中で参考として援用する)を使用してアミノ基を含む表面に接着することができる。さらに、いくつかの場合において、アルキル基などのさらなるリンカー(置換アルキル基およびヘテロアルキル基を含む)を使用してもよい。

【0186】

オリゴヌクレオチドは、当該分野で公知であるように合成され得、次いで、固体支持体の表面に接着され得る。当業者によって理解されるように、5'末端または3'末端のいずれかが、固体支持体に接着し得るか、または内部ヌクレオシドを介して接着し得る。さらなる実施形態において、固体支持体への固定は、非常に強固であり得るが、非共有結合であり得る。例えば、ビオチン化オリゴヌクレオチドを作製して、それをストレプトアビジンが共有結合的にコーティングされた表面に結合することにより、接着が行われる。

【0187】

アレイは、任意の便利な方法論(例えば、ポリヌクレオチドマイクロアレイエレメントを事前に形成し、次いで、それらを表面と安定的に会合すること)に従って作製され得る。あるいは、オリゴヌクレオチドは、当該分野で公知であるように表面上で合成され得る。多くの様々なアレイ配置およびそれらの作製方法は、当業者に公知であり、WO95/25116およびWO95/35505(フォトリソグラフィック技術)、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)、同第5,384,261号(機械的に方向付けられた流路によるインサイチュ合成);および同第5,700,637号(スポッティング、プリンティングまたは結合による合成)に開示されている;これらの開示は、本明細書中でその全体が参考として援用される。DNAをビーズに結合するための別の方法は、DNAの端に結合している特定のリガンドを使用して、ビーズに結合したリガンド結合分子を連結する。リガンド結合パートナー対の候補としては、ビオチン-アビジン/ストレプトアビジンまたはジゴキシゲニン(digoxigenin)-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))などの様々な抗体/抗原対が挙げられる。DNAと支持体との共有結合による化学結合は、ホスホアミデート結合を介してコーティングされたミクロスフェアとDNA上の5'-リン酸を連結する標準的なカップリング剤を使用することによって達成することができる。固体状態の基材へのオリゴヌクレオチドの固定化のための方法は、十分に確立されている。Pease et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(11):5022-5026 (1994)を参照のこと。固体状態の基材にオリゴヌクレオチドを接着する1つの方法は、Guo et al, Nucleic Acids Res. 22:5456-5465 (1994)に記載されている。固定化は、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結合(Guo et al., 前出)のいずれかによって、ロボットのアレイ技術と組み合わせて達成され得る。

【0188】

(発現産物)

用語「発現産物」とは、本明細書中で使用されるとき、例えば、mRNAを含む核酸と、癌関連遺伝子の転写および/または翻訳によって生成されるポリペプチド産物との両方のことをいう。

【0189】

ポリペプチドは、成熟タンパク質の形態であり得るか、またはプレタンパク質、プロタンパク質またはプレプロタンパク質の切断によって活性化され、活性な成熟ポリペプチドを生成することができるプレタンパク質、プロタンパク質またはプレプロタンパク質であ

り得る。このようなポリペプチドにおいて、プレ配列、プロ配列またはプレプロ配列は、リーダー配列または分泌配列であり得るか、または成熟ポリペプチド配列の精製のために使用される配列であり得る。このようなポリペプチドは、「癌関連ポリペプチド」とよばれる。

【0190】

用語「癌関連ポリペプチド」はまた、フラグメント、ホモログ、融合物および変異体などの改変体を含む。ギャップオープンペナルティ (gap open penalty) が12およびギャップ伸長ペナルティ (gap extension penalty) が2、BLOSUM行列が62というアフィンギャップ検索 (affine gap search) を使用してSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムによって決定されるとき、相同なポリペプチドは、上記でいわれるような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%) の配列同一性を有する。Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489において教示されている。改変体ポリペプチドは、天然にグリコシル化され得るか、または非天然にグリコシル化され得る。すなわち、そのポリペプチドは、対応する天然に存在するタンパク質に見られるグリコシル化パターンと異なるグリコシル化パターンを有する。

10

20

【0191】

変異体は、アミノ酸置換、付加または欠失を含み得る。アミノ酸置換は、保存的なアミノ酸置換、または非必須アミノ酸を排除する (グリコシル化部位、リン酸化部位またはアセチル化部位を変更するなどの) 置換、または機能に必要なでない1以上のシステイン残基の置換または欠失によってミスフォールドを最小にする置換であり得る。保存的なアミノ酸置換は、通常の電荷、疎水性/親水性および/または置換されるアミノ酸の立体的な高さ高さを保存する置換である。これらの生成物の改変体は、タンパク質の特定の領域 (例えば、機能ドメインおよび/または、ポリペプチドがタンパク質ファミリーのメンバーである場合コンセンサス配列に関連した領域) の高い生物学的活性を保持するか、またはそれを有するように設計することができる。次いで、このような改変体は、検出または処置の方法において使用され得る。改変体を生成するためのアミノ酸変更の選択は、アミノ酸の到達性 (内部 対 外部) (例えば、Go et al., Int. J. Peptide Protein Res. (1980) 15:211を参照のこと)、改変体ポリペプチドの熱安定性 (例えば、Querol et al., Prot. Eng. (1996) 9:265を参照のこと)、所望のグリコシル化部位 (例えば、Olsen and Thomsen, J. Gen. Microbiol. (1991) 137:579を参照のこと)、所望のジスルフィド架橋 (例えば、Clarke et al., Biochemistry (1993) 32:4322; およびWakarchuk et al., Protein Eng. (1994) 7:1379を参照のこと)、所望の金属結合部位 (例えば、Toma et al., Biochemistry (1991) 30:97 およびHaezerebrouck et al., Protein Eng. (1993) 6:643を参照のこと) およびプロリンループ内の所望の置換 (例えば、Masull et al., Appl. Env. Microbiol. (1994) 60:3579を参照のこと) に基づき得る。システイン欠失ムテインは、米国特許第4,959,314号に開示されているように生成することができる。

30

40

【0192】

改変体としてはまた、本明細書中に開示されるポリペプチドのフラグメント、特に生物学的に活性なフラグメントおよび/または機能ドメインに対応するフラグメントが挙げられる。目的のフラグメントは、代表的には、少なくとも約8アミノ酸 (aa) 長、10 aa長、15 aa長、20 aa長、25 aa長、30 aa長、35 aa長、40 aa長から

50

少なくとも約45aa長であり、通常、少なくとも約50aa長、少なくとも約75aa長、少なくとも約100aa長、少なくとも約125aa長、少なくとも約150aa長、少なくとも約200aa長、少なくとも約300aa長、少なくとも約400aa長であり、500aa長以上の長さであり得るが、フラグメントが、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列またはそのホモログのいずれか1つの配列を有す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と同一である一続きのアミノ酸を有する場合、通常は、約1000aa長を超えない。本明細書中で記載されるタンパク質改変体は、本発明の範囲内であるポリヌクレオチドによってコードされる。遺伝暗号を使用して、適切なコドンを選択することにより、対応する改変体を構築することができる。

【0193】

癌関連遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現のレベルが変化することは、その遺伝子およびその産物が癌において役割を果たすことを示唆し得る。いくつかの実施形態において、形成される複合体の量の2倍の増加または減少は、疾患を示唆する。いくつかの実施形態において、形成される複合体の量の3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍または100倍の増加または減少は、疾患を示唆する。

【0194】

癌関連ポリペプチドは、野生型アミノ酸配列よりも短いか、または長い場合があり、mRNAをコードするその等価物は、野生型mRNAと比較して、同様に改変され得る。従って、癌関連ポリペプチドの定義内に含まれるのは、本明細書中の野生型配列の部分またはフラグメントである。さらに、上で概要を述べたように、癌関連遺伝子を使用して、さらなるコード領域を得てもよく、当該分野で公知の技術を使用してさらなるタンパク質配列を得てもよい。

【0195】

いくつかの実施形態において、癌関連ポリペプチドは、野生型配列と比較した場合、誘導体または癌関連ポリペプチド改変体である。すなわち、下記で一層十分に概要を述べるように、癌関連ポリペプチド誘導体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失または挿入を含む。アミノ酸置換、挿入または欠失は、癌関連ポリペプチド内の任意の残基において生じ得る。

【0196】

癌関連ポリペプチドのアミノ酸配列改変体もまた含まれる。これらの改変体は、3つのクラス：置換改変体、挿入改変体または欠失改変体の1以上に分類される。これらの改変体は、改変体をコードするDNAを生成するために、通常、カセット突然変異生成またはPCR突然変異生成または当該分野で周知の他の技術を使用した、癌関連タンパク質をコードするDNAにおけるヌクレオチドの部位特異的突然変異生成によって調製され、その後、上で概要を述べたように組換え細胞培養においてそのDNAを発現する。しかしながら、約100から150残基までを有する癌関連ポリペプチドフラグメント改変体は、確立された技術を使用してインビトロ合成により調製され得る。アミノ酸配列改変体は、改変体の事前に決定された性質（癌関連ポリペプチドアミノ酸配列の天然に存在する対立遺伝子または種間バリエーションと改変体を区別する特徴）によって特徴付けられる。以下で一層十分に概要を述べるように、改変体は、代表的には、天然に存在するアナログと同じ定性的な生物学的活性を示すが、改変された特徴を有する改変体を選択することもできる。

【0197】

アミノ酸配列バリエーションを導入するための部位または領域が事前に決定していたとしても、変異自体も事前に決定している必要はない。例えば、所与の部位における変異の実施を最適化するために、ランダムな突然変異生成を標的コドンまたは標的領域において行うことがあり、発現した癌関連ポリペプチド改変体が、所望の活性の最適な組み合わせについてスクリーニングされ得る。既知配列を有するDNA内の所定の部位において置換変異を生成するための技術は、周知であり、例えば、M13プライマー突然変異生成およびLAR突然変異生成である。変異体のスクリーニングは、癌関連タンパク質活性のアッ

10

20

30

40

50

セイを使用して行われる

アミノ酸置換は、代表的には単一残基であるが、当然のことながら、複数の残基であってもよい；挿入は、通常は約 1 ～ 20 アミノ酸の規模であり得るが、かなり大きい挿入も許容され得る。欠失は、約 1 ～ 約 20 残基の範囲であるが、いくつかの場合においては、欠失は、もっと大きくてもよい。

【0198】

置換、欠失、挿入またはそれらの任意の組み合わせを使用して、最終的な誘導体に到達し得る。一般に、これらの変更は、分子の変化を最小にするために少数のアミノ酸においてのみ行われる。しかしながら、より大きな変化が特定の状況において許容され得る。癌関連ポリペプチドの特徴を少しだけ変化させたい場合、一般に、以下の表に従って置換が行われる。

10

【0199】

【表 1】

表 1

<u>元の残基</u>	<u>置換の例</u>	
Ala	Ser	
Arg	Lys	20
Asn	Gln, His	
Asp	Glu	
Cys	Ser	
Gln	Asn	
Glu	Asp	
Gly	Pro	
His	Asn, Gln	
Ile	Leu, Val	30
Leu	Ile, Val	
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	
Phe	Met, Leu, Tyr	
Ser	Thr	
Thr	Ser	
Trp	Tyr	40
Tyr	Trp, Phe	
Val	Ile, Leu	

置換が、表 1 に示す置換よりも保存的でない場合、機能または免疫学的同一性の実質的な変化が生じる。例えば、以下：変更の領域内のポリペプチド骨格の構造（例えば、アルファヘリックス構造またはベータシート構造）；標的部位における分子の電荷または疎水性；および側鎖の容積、の 1 以上に一層著しく影響を及ぼすように全長に亘って置換がなされ得る。ポリペプチドの特性に最も大きな変化をもたらすと一般に考えられる置換は、（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

50

、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルと（またはこれれによって）置換される場合；（b）システインまたはプロリンが、他の任意の残基と（またはこれれによって）置換される場合；（c）電気陽性の側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニルまたはヒスチジルが、電気陰性の残基、例えば、グルタミルまたはアスパルチルと（またはこれれによって）置換される場合；または（d）かさ高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖、例えば、グリシンを有する残基と（またはこれれによって）置換される場合である。

【0200】

改変体は、代表的には、天然に存在するアナログと同じ定性の生物学的活性を示し、天然に存在するアナログと同じ免疫応答を誘発するが、改変体はまた、特徴も改変される。

10

【0201】

癌関連ポリペプチドは、検出および処置の方法において、それ自体が発現され得、そして使用され得る。癌関連ポリペプチドは、そのような方法における使用を援助するために、さらに改変され得る。

【0202】

癌関連ポリペプチドの共有結合性の改変を、例えば、スクリーニングにおいて利用してもよい。共有結合性の改変の1つのタイプは、癌関連ポリペプチドの標的化されたアミノ酸残基と、選択された側鎖または癌関連ポリペプチドのN末端残基もしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤とを反応させることが挙げられる。二官能性物質による誘導体化は、例えば、下記で一層十分に概要を述べるように、抗癌関連抗体を精製するための方法またはスクリーニングアッセイにおいて使用するための水不溶性支持体のマトリックスまたは表面に癌関連ポリペプチドを架橋するために有用である。通常使用される架橋剤としては、例えば、1，1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル類、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル類、ホモ二官能性イミドエステル類（3，3'-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオン酸エステル）などのジスクシンイミジルエステル類を含む）、ビス-N-マレイミド-1，8-オクタンなどの二官能性マレイミド類およびメチルー3-〔（p-アジドフェニル）ジチオ〕プロピオイミデートなどの薬剤が挙げられる。

20

【0203】

他の改変としては、グルタミル残基およびアスパラギン残基の、それぞれ対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基へのアミド分解、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリル残基、トレオニル残基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

【0204】

本発明の範囲内に含まれる癌関連ポリペプチドの共有結合性の改変の別のタイプは、ポリペプチドのネイティブのグリコシル化パターンを変更することを含む。「ネイティブのグリコシル化パターンを変更する」とは、本明細書中の目的のために、ネイティブの配列癌関連ポリペプチドに見られる1以上の炭水化物部分を欠失することおよび／またはネイティブの配列癌関連ポリペプチドに存在しない1以上のグリコシル化部位を付加することを意味すると解釈される。

40

【0205】

癌関連ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、そのアミノ酸配列を変更することによって達成され得る。例えば、ネイティブの配列癌関連ポリペプチドへの（O-結合グリコシル化部位について）1以上のセリンまたはトレオニン残基の付加またはそれらによる置換によって、変更がなされ得る。癌関連アミノ酸配列は、必要に応じて、DNAレベルでの変化を通じて変更してもよく、特に、癌関連ポリペプチドをコードするDNAを事

50

前に選択された塩基において変異させることによって変更してもよい。その結果、所望のアミノ酸に翻訳するコドンが生成される。

【0206】

癌関連ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増やす別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学結合または酵素的結合である。このような方法は、当該分野、例えば、1987年9月11日に公開されたWO87/05330およびApplin and Wriston, LA Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0207】

癌関連ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に達成され得るか、またはグリコシル化の標的として働くアミノ酸残基をコードするコドンの変異による置換によって達成され得る。化学的な脱グリコシル化技術は、当該分野で公知であり、例えば、Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)およびEdge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981)に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用することによって達成され得る。

【0208】

癌関連の共有結合性の改変の別のタイプは、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,179,337号に説明されている様式で、種々の非タンパク質性ポリマーの1つ、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に癌関連ポリペプチドを連結することを含む。

【0209】

癌関連ポリペプチドはまた、別の異種性のポリペプチドまたはアミノ酸配列と融合した癌関連ポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で改変され得る。いくつかの実施形態において、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するエピトープを提供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ル末端に位置するが、内部融合もまた、いくつかの場合において許容され得る。このようなエピトープタグ化型の癌関連ポリペプチドの存在は、そのタグポリペプチドに対する抗体を使用して検出することができる。また、エピトープタグの提供により、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マトリックスを使用して癌関連ポリペプチドをアフィニティ精製によって容易に精製することが可能である。別の実施形態において、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の領域との融合を含み得る。キメラ分子の2価の形態について、そのような融合は、IgG分子のFc領域に対してであり得る。

【0210】

様々なタグポリペプチドおよびそのそれぞれの抗体は、当該分野で周知である。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-his）タグまたはポリ-ヒスチジン-グリシン（ポリ-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., 8:2159-2165 (1988)）；c-mycタグおよびそれに対する8F9抗体、3C7抗体、6E10抗体、G4抗体、B7抗体および9E10抗体（Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)）；およびHerpes Simplexウイルス糖タンパク質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。他のタグポリペプチドとしては、Flag-ペプチド（Hopp et al., BioTechnology, 6:1

10

20

30

40

50

204-1210 (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 タンパク質ペプチドタグ (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。

【0211】

あるいは、癌関連タンパク質ファミリーの他の癌関連タンパク質および他の生物体由来の癌関連タンパク質が、以下で概要を述べるように、クローニングおよび発現され得る。従って、プローブまたは変性ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) プライマー配列を使用して、ヒトまたは他の生物体由来の他の関係する癌関連タンパク質を見つけ得る。当業者に理解されるように、特に有用なプローブおよび／または P C R プライマー配列は、癌関連核酸配列の特有の領域を含む。一般に当該分野で公知であるように、P C R プライマーは、約 15 ～ 約 35 ヌクレオチド長または約 20 ～ 約 30 ヌクレオチド長であり得、必要であれば、イノシンを含み得る。P C R 反応の条件は、当該分野で周知である。

【0212】

さらに、本明細書中で概要を述べるように、例えば、追加配列の解明、エピトープまたは精製タグの付加、他の融合配列の付加などによって癌関連遺伝子によってコードされる癌関連タンパク質よりも長い癌関連タンパク質が、作製され得る。

【0213】

癌関連タンパク質はまた、癌関連核酸によってコードされるタンパク質と同定され得る。従って、癌関連タンパク質は、本明細書中で概要を述べるように、上で列挙した癌関連遺伝子またはそれらの相補体にハイブリダイズする核酸によってコードされる。

【0214】

(癌関連ポリペプチドの発現)

上で述べたように、癌関連タンパク質をコードする癌関連遺伝子由来の核酸を使用して、スクリーニングアッセイに使用され得る癌関連タンパク質を発現する種々の発現ベクターを作製することができる。発現ベクターは、自己複製の染色体外ベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターのいずれかであり得る。一般に、これらの発現ベクターは、癌関連タンパク質をコードする核酸に作動可能に連結された転写性調節核酸および翻訳調節核酸を含む。用語「調節配列」とは、特定の宿主生物体において作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な D N A 配列のことをいう。原核生物に適した調節配列としては、例えば、プロモーター、必要に応じてオペレーター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、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

【0215】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係性の位置に置かれるとき、「作動可能に連結されている」。例えば、プレ配列または分泌リーダーの D N A が、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、それらの D N A は、ポリペプチドに対する D N A に作動可能に連結されている；プロモーターまたはエンハンサーが、配列の転写に影響する場合、それらは、コード配列に作動可能に連結されている；またはリボソーム結合部位が、翻訳を容易にするように配置される場合、そのリボソーム結合部位は、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結されている」とは、連結している D N A 配列が、隣接しており、また、分泌リーダーの場合は、隣接していて、かつ読み相 (r e a d i n g p h a s e) 内に存在することを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接していなくてもよい。連結は、便利な制限酵素認識部位においてライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合は、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来の実施に従って使用する。転写性調節核酸および翻訳調節核酸は、一般に癌関連タンパク質を発現させるために使用される宿主細胞に適している；例えば、B a c i l l u s 由来の転写性調節核酸配列および翻訳調節核酸配列は、好

ましくは癌関連タンパク質を *Bacillus* において発現させるために使用される。適切な発現ベクターおよび適当な調節配列の多くのタイプは、種々の宿主細胞について当該分野で公知である。

【0216】

一般に、転写調節配列および翻訳調節配列としては、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および転写終結配列、翻訳開始配列および翻訳終結配列およびエンハンサー配列またはアクチベーター配列が挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、調節配列としては、プロモーターおよび転写開始配列および転写終結配列が挙げられる。

【0217】

プロモーター配列は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターのいずれかをコードする。プロモーターは、天然に存在するプロモーターまたはハイブリッドプロモーターのいずれかであり得る。2個以上のプロモーターのエレメントを組み合わせたハイブリッドプロモーターはまた、当該分野で公知であり、本発明で有用である。

【0218】

さらに、発現ベクターは、追加のエレメントを含み得る。例えば、発現ベクターは、2つの複製システムを有し得るため、2種の生物体、例えば、発現のための哺乳動物細胞または昆虫細胞ならびにクローニングおよび増幅のための原核生物宿主において維持され得る。さらに、発現ベクターを組み込むために、発現ベクターは、宿主細胞ゲノムに相同な少なくとも1つの配列、好ましくは発現構築物に隣接する2つの相同配列を含む。組込みベクターは、ベクター内に含むのに適切な相同配列を選択することによって宿主細胞において特定の遺伝子座を対象とし得る。組込みベクター用の構築物は、当該分野で周知である。

【0219】

いくつかの実施形態において、発現ベクターは、選択可能なマーカー遺伝子を含むことによって、形質転換された宿主細胞の選択が可能になる。抗生物質耐性遺伝子を含む選択遺伝子は、当該分野で周知であり、使用する宿主細胞に応じて変化する。

【0220】

癌関連タンパク質は、癌関連タンパク質の発現を誘導するか、またはそれを引き起こすのに適切な条件下で、癌関連タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによって産生され得る。癌関連タンパク質の発現に適切な条件は、発現ベクターおよび宿主細胞の選択によって変化し、慣習的な実験を通じて当業者によって容易に確かめられる。例えば、発現ベクター内の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の最適化を必要とする一方で、誘導性プロモーターの使用は、誘導のための適切な増殖条件を必要とする。さらに、いくつかの実施形態において、回収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イルス系は、溶解性ウイルスであるため、回収時期の選択は、生成物の収量にとって重大である。

【0221】

適切な宿主細胞としては、酵母、細菌、古細菌、菌類ならびに昆虫細胞、植物細胞および哺乳動物細胞を含む動物細胞が挙げられる。特に興味深いのは、*Drosophila melanogaster* 細胞、*Saccharomyces cerevisiae* および他の酵母、*E. coli*、*Bacillus subtilis*、Sf9細胞、C129細胞、293細胞、*Neurospora*、BHK細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、THP1細胞株（マクロファージ細胞株）ならびにヒト細胞およびヒト細胞株である。

【0222】

いくつかの実施形態において癌関連タンパク質は、哺乳動物細胞において発現する。哺乳動物の発現系はまた、当該分野で公知であり、レトロウイルス系を含む。好ましい発現ベクター系は、WO97/27212 (PCT/US97/01019) およびWO97

10

20

30

40

50

／27213 (PCT/US97/01048) (この両方が本明細書によって参考として明示的に援用される) に一般に記載されているようなレトロウイルスベクター系である。ウイルス遺伝子は、高度に発現することが多く、広範な宿主を有するため、哺乳動物プロモーターとして特に使用されるのは、哺乳動物のウイルス遺伝子由来のプロモーターである。例としては、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーターおよびCMVプロモーターが挙げられる。代表的には、哺乳動物細胞によって認識される転写終結配列およびポリアデニル化配列は、翻訳終止コドンの3'に位置する調節領域であり、そのため、プロモーターエレメントとともにコード配列に隣接する。転写ターミネーターおよびポリアデニル化シグナルの例としては、SV40由来のものが挙げられる。

10

【0223】

外来性核酸を哺乳動物宿主ならびに他の宿主に導入する方法は、当該分野で周知であり、使用される宿主細胞によって変化する。技術としては、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ウイルス感染、リボソーム内へのポリヌクレオチドの被包および核へのDNAの直接的なマイクロインジェクションが挙げられる。

【0224】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質は、細菌系において発現される。細菌の発現系は、当該分野で周知である。バクテリオファージ由来のプロモーターを使用してもよく、また、そのプロモーターは、当該分野で公知である。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プロモーター配列およびlacプロモーター配列のハイブリッドである。さらに、細菌のプロモーターとしては、細菌のRNAポリメラーゼと結合して転写を開始する能力を有する非細菌起源の天然に存在するプロモーターが挙げられ得る。機能性プロモーター配列に加えて、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、細菌において癌関連タンパク質の分泌を提供するシグナルペプチド配列を含み得る。タンパク質は、増殖培地に分泌されるか（グラム陽性細菌）または細胞の内膜と外膜との間に位置する細胞周辺腔に分泌される（グラム陰性菌）。細菌発現ベクターはまた、選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよく、それによって形質転換された細菌株の選択が可能になる。適当な選択遺伝子としては、薬物（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サイクリン）に耐性な細菌をもたらす遺伝子が挙げられる。選択可能なマーカーはまた、生合成遺伝子（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おける遺伝子）を含む。これらの構成要素は、発現ベクターに構築される。細菌用の発現ベクターは、当該分野で周知であり、それらとしては、とりわけ、*Bacillus subtilis*、*E. coli*、*Streptococcus cremoris* および *Streptococcus lividans* 用のベクターが挙げられる。細菌発現ベクターは、当該分野で周知の技術（例えば、塩化カルシウム処理、エレクトロポレーションおよび他の技術）を使用して細菌の宿主細胞に形質転換される。

20

30

【0225】

癌関連タンパク質は、昆虫細胞において生成され得る。昆虫細胞の形質転換用の発現ベクターおよび特にバキュロウイルスベースの発現ベクターは、当該分野で周知である。

40

【0226】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質は、酵母細胞において生成され得る。酵母発現系は、当該分野で周知であり、それらとしては、*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。

50

【0227】

癌関連タンパク質はまた、当該分野で周知の技術を使用して、融合タンパク質として作製され得る。従って、例えば、モノクローナル抗体の作製について。所望のエピトープが小さい場合、癌関連タンパク質は、免疫原を形成するキャリアタンパク質に融合され得る。あるいは、癌関連タンパク質は、発現を増加させるためまたは他の理由で融合タンパク質として作製され得る。例えば、癌関連タンパク質が、癌関連ペプチドであるとき、そのペプチドをコードする核酸は、発現の目的で他の核酸に連結され得る。

【0228】

(癌)

いくつかの実施形態において、本発明の方法によって検出、診断または処置される癌は、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、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、胃癌または皮膚癌から選択される。

【0229】

(抗体)

いくつかの実施形態において、本発明は、癌関連遺伝子によって発現される癌関連ポリペプチドに特異的に結合する抗体を使用する。用語「特異的に結合する」とは、抗体が、他の関連ポリペプチドに対するアフィニティーよりも標的癌関連ポリペプチドに対するアフィニティーのほうが実質的に高いことを意味する。本明細書中で使用されるとき、用語「抗体」とは、対象の抗原決定基に結合することができるインタクトな分子ならびにそれらのフラグメント（例えば、Fab、Fab'）2およびFv）のことをいう。「実質的に高いアフィニティー」とは、本発明の標的癌関連ポリペプチドに対するアフィニティーが、他の関連ポリペプチドに対するアフィニティーと比較して、無視できないほど増加していることを意味する。いくつかの実施形態において、アフィニティーは、標的癌関連ポリペプチドに対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍またはそれ以上である。

【0230】

いくつかの実施形態において、抗体は、 10^{-4} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-9} M以下の解離定数という高アフィニティー；またはnM以下のアフィニティー（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。

【0231】

癌関連ポリペプチドを使用して、例えば、免疫療法用の抗体を作製するとき、いくつかの実施形態において、癌関連ポリペプチドは、全長タンパク質と少なくとも1つのエピトープまたは決定基を共有するはずである。本明細書中で「エピトープ」または「決定基」とは、MHCと関連して、抗体またはT細胞レセプターを作製し、そして／またはそれらに結合するタンパク質の部分を意味する。従って、いくつかの例において、小型の癌関連ポリペプチドに対して作製される抗体は、全長タンパク質に結合することができる。いくつかの実施形態において、エピトープは、固有のものである；すなわち、固有のエピトープに対して作製される抗体は、交差反応性をほとんどかまたは全く示さない。

【0232】

癌関連遺伝子によってコードされるポリペプチド配列は、ポリペプチドの特定の好ましい領域を決定するために解析され得る。抗原性の高い領域は、抗原認識が免疫応答開始のプロセスにおいて生じ得る環境において、ポリペプチドの表面に曝露される可能性のあるポリペプチドの領域を表す値を選択することによってDNASTAR解析によるデータから決定される。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は、DNASTARコンピュータアルゴリズム（DNASTAR, Inc., Madison, Wis.; dnastar.comのワールドワイドウェブサイトを参照のこと）のデフォルトのパラメータを使用して解析され得る。

【0233】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、癌関連ポリペプチドのオルソログ、ホ

10

20

30

40

50

モログ、パラログもしくは改変体またはそれらの組み合わせおよびサブ組み合わせに結合する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、癌関連ポリペプチドのオルソログに結合する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、癌関連ポリペプチドのホモログに結合する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、癌関連ポリペプチドのパラログに結合する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、癌関連ポリペプチドの改変体に結合する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、癌関連ポリペプチドのオルソログ、ホモログ、パラログもしくは改変体またはそれらの組み合わせおよびサブ組み合わせに結合しない。

【0234】

DNA STAR コンピュータアルゴリズムを使用して慣習的に入手され得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、ターン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、ベータ領域およびターン領域 (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 アルファ両親媒性領域およびベータ両親媒性領域; Karplus-Schulz 柔軟領域; Emini 表面形成領域 (J. Virol., 55 (3): 836-839 (1985)); および高抗原性指標の Jameson-Wolf 領域 (CABIOS, 4 (1): 181-186 (1988)) が挙げられるが、これらに限定されない。Kyte-Doolittle 親水性領域および疎水性領域、Emini 表面形成領域および高抗原性指標の Jameson-Wolf 領域 (すなわち、Jameson-Wolf プログラムのデフォルトのパラメータを使用して同定されるとき、1.5 以上の抗原性指標を有する 4 個以上の連続アミノ酸を含む) を使用して、高い抗原性を示す可能性のあるポリペプチド領域を慣習的に決定することができる。タンパク質に対する抗体を調製するための 1 つのアプローチは、そのタンパク質の全部または一部のアミノ酸配列を選択および調製すること、その配列を化学的に合成することおよび適切な動物、代表的には、ウサギ、ハムスターまたはマウスに注入することである。オリゴペプチドは、成熟タンパク質において露出する可能性がある親水性領域に存在するオリゴペプチドに基づいて癌関連タンパク質に対する抗体の作製の候補として選択され得る。さらなるオリゴペプチドが、例えば、抗原性指標、Welling, G. W. et al., FEBS Lett. 188: 215-218 (1985) (本明細書中で参考として援用する) を使用して決定され得る。

【0235】

用語「抗体」は、本明細書中で使用されるとき、当該分野で公知であるように、抗体全体の改変または組換え DNA 技術を使用した新規合成のいずれかによって作製される、Fab、Fab2、一本鎖抗体 (例えば、Fv)、キメラ抗体などを含む抗体フラグメントを含む。

【0236】

本発明はまた、SMIP または標的タンパク質に特異的な結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である抗体を提供する。これらの構築物は、抗体エフェクター機能を発揮するため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一本鎖ポリペプチドである。例えば、WO03/041600、米国特許公開第 2003013393 号および米国特許公開第 20030118592 号を参照のこと。

【0237】

ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、哺乳動物において、例えば、免疫剤および所望であればアジュバントの 1 回以上の注入によって惹起され得る。代表的には、免疫剤および/またはアジュバントは、哺乳動物の皮下または腹腔内に複数回注入される。免疫剤は、図面の核酸もしくはそれらのフラグメントまたはそれらの融合タンパク質によってコードされるタンパク質を含み得る。免疫される哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に免疫剤を結合体化す

ることが有用であり得る。このような免疫原性のタンパク質の例としては、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ダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント（モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート（dicorynomycolate））が挙げられる。免疫プロトコールは、過度の実験をせずに当業者によって選択され得る。

【0238】

いくつかの実施形態において、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) に記載されている方法などのハイブリドーマ法を使用して調製され得る。ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスターまたは他の適切な宿主動物は、代表的には、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するか、または抗体を産生することができるリンパ球を誘発する免疫剤で免疫される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。免疫剤は、代表的には、癌関連ポリペプチドもしくはそのフラグメントまたはその融合タンパク質を含む。一般に、ヒト起源の細胞が所望である場合、末梢血リンパ球（「PBL」）を使用するか、または非ヒト哺乳動物起源が所望である場合、脾臓細胞もしくはリンパ節細胞を使用するかのいずれかである。そして、リンパ球を、ポリエチレングリコールなどの適当な融合剤を使用して不死化細胞株と融合することにより、ハイブリドーマ細胞（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103）を形成する。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源のミエローマ細胞である。通常、ラットまたはマウスのミエローマ細胞株を使用する。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合していない不死化細胞の増殖または生存を阻害する1以上の物質を含む適当な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素（HGPRTまたはHPR T）を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（「HAT培地」）を含む（これらの物質は、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる）。

【0239】

モノクローナル抗体技術は、研究、診断および治療を実施する際に使用される。モノクローナル抗体は、インビトロにおける診断ならびにインビボにおけるヒト疾患の診断および免疫療法のための、ラジオイムノアッセイ、ELISA法、免疫細胞病理学およびフローサイトメトリーに使用される。Walldmann, T. A. (1991) Science 252:1657-1662。特に、正常組織を避けて悪性病変を標的化するのに望ましいモノクローナル抗体は、癌の診断および治療に広く適用されている。例えば、Frankel, et al. の米国特許第4,753,894号；Ring et al. の同第4,938,948号；およびBjorn et al. の同第4,956,453号を参照のこと。

【0240】

これらの抗体は、二重特異性抗体であり得る。いくつかの実施形態において、結合特異性の一方は、癌関連ポリペプチドまたはそのフラグメントに対するものであり、他方は、他の任意の抗原、好ましくは、細胞表面タンパク質またはレセプターもしくはレセプターサブユニット（好ましくは腫瘍特異的なもの）に対するものである。

【0241】

いくつかの実施形態において、癌関連ポリペプチドに対する抗体は、下記に記載するように、癌関連ポリペプチドの生物学的機能を低減するか、または排除することができる。すなわち、抗癌関連ポリペプチド抗体（ポリクローナルまたは好ましくはモノクローナルのいずれか）を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）に付加することは、癌関連ポリペプチド活性を低減しうるか、または排除し得る。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも25%、少なくとも約50%または少なくとも

約 95～100%の活性を減少させる。

【0242】

いくつかの実施形態において、癌関連ポリペプチドに対する抗体は、ヒト化抗体である。「ヒト化」抗体とは、非ヒト種由来の免疫グロブリンから実質的に得られる抗原結合部位ならびにヒト免疫グロブリンの構造および／または配列に基づいた分子の残りの部分の免疫グロブリン構造を有する分子のことをいう。抗原結合部位は、可変ドメインを定常ドメインに融合させた完全なものか、または相補性決定領域(CDR)を可変ドメイン中の適切なフレームワーク領域に移植しただけのもののいずれかを含み得る。抗原結合部位は、野生型であり得るか、または1以上のアミノ酸置換によって、例えば、ヒト免疫グロブリンとより似ているように改変され得る。あるいは、ヒト化抗体は、親抗体、非ヒト抗体、ヒトに投与したときの親抗体と比較して低い免疫原性を示す抗体、の抗原結合特性を保持するか、または実質的に保持するキメラ抗体由来であり得る。句「キメラ抗体」とは、本明細書中で使用されるとき、代表的には異なる種を起源とする2つの異なる抗体由来の配列を含む抗体のことをいう(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)。代表的には、これらのキメラ抗体において、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、哺乳動物の一方の種に由来する抗体の可変領域を模倣する一方で、定常部分は、他方の種に由来する抗体における配列と相同である。最も代表的には、キメラ抗体は、ヒトとマウスの抗体フラグメント、一般にはヒト定常領域およびマウス可変領域を含む。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、所望の特異性、アフィニティーおよび能力を有する非ヒト(例えば、マウス、ラットまたはウサギ)抗体(ドナー抗体)由来のCDRと置換することによって作製する。いくつかの例において、ヒト「アクセプター」抗体のFvフレームワーク残基は、「ドナー」抗体由来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、レシピエント抗体または導入されるCDRもしくはフレームワーク配列のいずれにも見られない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応するCDR領域の全部または実質的に全部およびフレームワーク残基(FR)領域の全部または実質的に全部が、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれである、少なくとも1個および代表的には2個の可変ドメインを実質的にすべて含む。ヒト化抗体はまた、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、代表的にはヒト免疫グロブリンのFcを含む(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992))。このようなキメラ型の1つの明白な利点は、例えば、ヒト細胞調製物由来の定常領域と組み合わせ、非ヒト宿主生物体由来の容易に利用可能なハイブリドーマまたはB細胞を使用して、現在公知である起源から可変領域を便利に得ることができることである。その可変領域は、調製が容易であるという利点を有し、また、その特異性は、その起源から影響を受けない一方で、ヒトの定常領域は、その抗体が注入されたとき、非ヒト起源由来の定常領域の場合よりもヒト被験体から免疫応答を誘発する可能性が低い。しかしながら、この定義は、この特定の例に限定されない。

【0243】

ヒト化抗体は、ヒトにおける免疫原性が親マウスモノクローナル抗体よりも極めて低いため、ヒト化抗体を、アナフィラキシーの危険性が極めて低いヒトの処置に使用することができる。従って、これらの抗体は、ヒトへのインビボ投与に関与する治療的な用途(例えば、腫瘍性疾患の処置のための放射線照射増感剤としての用途または例えば抗癌治療の副作用を低減する方法における用途)において、好ましい場合がある。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源から導入された1以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、代表的には移入(import)可変ドメインから得られる移入残基と呼ばれることが多い。ヒト化は、本質的には、Winterおよび共同研究者らの方法(Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et

al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988))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と置換することによって)行われ得る。従って、このようなヒト化抗体は、キメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。ここで、実質的にインタクトでないヒト可変ドメインは、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際のところ、ヒト化抗体は、代表的には、いくつかのCDR残基およびおそらくいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体における類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0244】

非ヒト免疫グロブリン由来の抗原結合部位を含む多くの「ヒト化」抗体分子が報告されており、それらとしては、ヒト定常ドメインに融合したげっ歯類のV領域およびそれらの関連CDRを有するキメラ抗体(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; および Brown et al. (1987) Cancer Res. 47:3577-3583)、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合の前にヒト支持(supporting)FRに移植されたげっ歯類CDRを有するキメラ抗体(Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536; および Jones et al. (1986) Nature 321:522-525)および組換え的にベニア化された(veneered)げっ歯類FRによって支持されるげっ歯類CDRを有するキメラ抗体(欧州特許公開番号第519,596号、1992年12月23日公開)が挙げられる。

【0245】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]を含む当該分野で公知の様々な技術を使用しても作製することができる。ColeらおよびBoernerらの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) および Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991))。ヒト化抗体は、種々の方法、例えば:(1)ヒト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(当該分野で「ヒト化」とよばれるプロセス)、または(2)非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基を置換することによってヒト様表面で非ヒト可変ドメイン全体を「覆う(cloaking)」こと(当該分野で「ベニアリング(veneering)」と呼ばれるプロセス)によって達成され得る。本発明において、ヒト化抗体は、「ヒト化」抗体および「ベニア化」抗体の両方を含む。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスに導入することによって作成することができる。チャレンジの際に、ヒト抗体産生が観察され、このヒト抗体産生は、遺伝子の再構成、集合および抗体レパートリーを含む、全ての点で、ヒトにおいて見出されるものとよく似ている。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号ならびに以下の化学的出版物: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechno

10

20

30

40

50

logy 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, U.S. A., 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); および Kettleborough, C.A. et al., Protein Eng. 4 (7): 773-83 (1991) (これらの各々は、本明細書中で参考として援用される) に記載されている。本発明の抗体はまた、米国特許第 5, 766, 886 号 (本明細書中で参考として援用される) に記述されているようなヒト操作技術を使用して作製することもできる。

【0246】

成句「相補性決定領域」とは、ネイティブの免疫グロブリン結合部位の天然の Fv 領域の結合アフィニティーおよび特異性をともに規定するアミノ酸配列のことをいう。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) を参照のこと。成句「定常領域」とは、エフェクター機能をもたらす抗体分子の部分のことをいう。本発明において、マウス定常領域を、ヒト定常領域によって置換する。対象のヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域は、5つのアイソタイプ：アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマまたはミューのいずれかから選択され得る。抗体をヒト化する 1つの方法は、非ヒト重鎖配列および非ヒト軽鎖配列をヒト重鎖配列およびヒト軽鎖配列とアラインメントする工程、非ヒトフレームワークを選択する工程、そしてそのようなアラインメントに基づいて非ヒトフレームワークをヒトフレームワークで置換する工程、分子モデリングによりヒト化配列の立体配座を予測する工程、そして親抗体の立体配座と比較する工程を含む。このプロセスは、ヒト化配列モデルの予測立体配座が、親非ヒト抗体の非ヒト CDR の立体配座に近づくまで、CDR の構造を妨害する CDR 領域中の残基の逆変異を繰り返すことを続ける。このようなヒト化抗体は、さらに、例えば、Ashwell レセプターを介した取り込みおよびクリアランスを容易にするように誘導体化され得る。例えば、米国特許第 5, 530, 101 号および同第 5, 585, 089 号 (本明細書中で参考として援用される) を参照のこと。

【0247】

癌関連ポリペプチドに対するヒト化抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作されたトランスジェニック動物を使用して作製することができる。例えば、WO 98/24893 は、ヒト Ig 遺伝子座を有するトランスジェニック動物を開示している。ここで、この動物は、内在性の重鎖および軽鎖遺伝子座が不活性化されているため、機能的な内在性免疫グロブリンを生成しない。WO 91/10741 もまた、免疫原に対する免疫応答を高めることができるトランスジェニック非霊長類哺乳動物宿主を開示している。ここで、その抗体は、霊長類の定常領域および/または可変領域を有し、内在性免疫グロブリンをコードする遺伝子座は、置換されているか、または不活性化されている。WO 96/30498 は、哺乳動物における免疫グロブリン遺伝子座を改変する、例えば、定常領域または可変領域の全部または一部を置換して、改変抗体分子を形成する Cre/Lox システムの使用を開示している。WO 94/02602 は、不活性化された内在性 Ig 遺伝子座および機能性ヒト Ig 遺伝子座を有する非ヒト哺乳動物宿主を開示している。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方法を開示している。ここで、そのマウスは、内在性重鎖を欠き、1以上の異種の定常領域を含む外來性免疫グロブリン遺伝子座を発現する。

【0248】

上で記載したトランスジェニック動物を使用して、選択された抗原性分子に免疫応答を生じさせることができ、そして抗体産生細胞をその動物から取り出し、そしてそれを使用して、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製することができる。免疫プロトコール、アジュバントなどは、当該分野で公知であり、例えば、WO 96/33735に記載されているようなトランスジェニックマウスの免疫に使用される。モノクローナル抗体は、対応するタンパク質の生物学的活性または生理学的効果を阻害または中和する能力について検定され得る。

【0249】

いくつかの実施形態において、上で列挙したような癌関連ポリペプチドおよびそれらの改変体を使用して、上で記載したようなトランスジェニック動物を免疫してもよい。モノクローナル抗体は、当該分野で公知の方法を使用して作製され、抗体の特異性は、単離された癌関連ポリペプチドを使用して検定される。ヒトまたは霊長類の癌関連またはそのエピトープを調製するための方法としては、化学合成、組換えDNA技術または生物学的サンプルからの単離が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチドの化学合成は、例えば、固相ペプチド合成の従来のMerri field法(Merri field, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963 (参考として援用))またはRapid Automated Multiple Peptide SynthesisシステムにおけるFMOCストラテジ(E. I. du Pont de Nemours Company, Wilmington, DE) (Caprino and Han, J. Org. Chem. 37:3404, 1972 (参考として援用))によって行うことができる。

【0250】

ポリクローナル抗体は、抗原を注射し、その後、適切な間隔で追加免疫することによってウサギまたは他の動物を免疫することによって調製され得る。別の動物としては、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。それらの動物から採血し、通常、ELISAまたは癌関連タンパク質の作用を阻止する能力に基づくバイオアッセイによって、血清を精製癌関連タンパク質に対してアッセイする。鳥類の種、例えば、ニワトリ、シチメンチョウなどを使用するとき、抗体は、卵の卵黄から単離することができる。モノクローナル抗体は、MilsteinおよびKohlerの方法の後に、免疫されたマウス由来の脾細胞を、持続的に複製する腫瘍細胞(例えば、ミエローマまたはリンパ腫細胞)と融合することによって、調製することができる(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 (参考として援用))。そのようにして形成されたハイブリドーマ細胞は、次いで、限界希釈法によってクローン化され、その上清を、ELISA、RIAまたはバイオアッセイによって抗体産生についてアッセイする。

【0251】

抗体が標的タンパク質を認識して特異的に結合する特有の能力は、タンパク質の過剰発現を処置するためのアプローチを提供する。従って、いくつかの実施形態において、本発明は、癌関連タンパク質に特異的な抗体で患者を処置することによって、癌関連ポリペプチドの過剰発現に関与する疾患を予防または処置するための方法を提供する。

【0252】

特定の抗体、癌関連タンパク質に対するポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかの抗体は、上で記述したような当該分野で公知の任意の適当な方法によって作成することができる。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作製することができるか、あるいは、癌関連タンパク質もしくは免疫学的に活性なそれらのフラグメントまたは抗イディオタイプ抗体もしくはそれらのフラグメントを、動物に投与して、癌関連タンパク質を認識し、そしてそれに結合することができる抗体の産

生を誘発することができる。このような抗体は、任意のクラスの抗体由来であり得、そして任意のサブクラスの抗体由来であり得る。そのクラスとしては、I g G、I g A、I g M、I g DおよびI g Eまたは鳥類の種の場合はI g Yが挙げられるがこれらに限定されない。

【0253】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、中和抗体である。いくつかの実施形態において、その抗体は、標的化抗体である。いくつかの実施形態において、その抗体は、標的に結合すると内部に取り入れられる。いくつかの実施形態において、その抗体は、標的に結合しても内部に取り入れられないが、その代わりに表面に留まる。

【0254】

本発明の抗体は、対象の腫瘍細胞抗原に結合すると急速に内部に取り入れられる能力または結合した後に細胞表面上に留まる能力についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施形態において、例えば、免疫複合体のいくつかのタイプの構築において、内部への取り入れがトキシン部分を放出するために必要とされる場合、内部に取り入れられる抗体の能力が、望まれる場合がある。あるいは、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ている場合、その抗体にとって、細胞表面上に留まることがより望ましい場合がある。スクリーニング方法は、これらのタイプの挙動を区別するために使用され得る。例えば、腫瘍細胞抗原を有する細胞は、その細胞をヒトI g G 1（コントロール抗体）または本発明の抗体の1つと、氷上（内部への取り入れを阻止する0.1%アジ化ナトリウムを含む）または37℃（アジ化ナトリウムなし）で3時間、約1 μg/mLの濃度でインキュベートする場合に使用され得る。次いで、その細胞を冷えた染色緩衝液（P B S + 1% B S A + 0.1%アジ化ナトリウム）で洗浄し、そして30分間、氷上にてヤギ抗ヒトI g G - F I T Cで染色する。幾何的な平均蛍光強度（M F I）をF A C S C a l i b u rによって記録する。アジ化ナトリウムの存在下、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の不在下、37℃で観察された細胞との間でM F Iに差が観察されない場合、その抗体は、内部に取り入れられたのではなく、細胞表面に結合したままであることが疑われる。しかしながら、細胞をアジ化ナトリウムの不在下、37℃でインキュベートしたときに表面染色可能な抗体の減少が見られる場合、その抗体は、内部に取り入れられることができると疑われる。

【0255】

（抗体結合体）

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、結合体化されている。いくつかの実施形態において、結合体化抗体は、癌治療、癌診断または癌性細胞の画像化に有用である。

【0256】

診断的適用のために、抗体は、代表的には検出可能な部分で標識される。一般に以下のカテゴリーに分類することができる多くの標識が利用可能である：

（a）下に記述されるような放射性核種。抗体は、例えば、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N. Y., Pubs. (1991)に記載されている技術を使用して、例えば放射性同位体で標識することができ、放射能を、シンチレーション測定法を使用して計測することができる。

（b）蛍光標識、例えば、希土類キレート（ユウロピウムキレート）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、Lissamine、フィコエリトリンおよびTexas Redが利用可能である。これらの蛍光標識は、例えば、Current Protocols in Immunology, 前出に記載されている技術を使用して、抗体に結合体化することができ、蛍光を蛍光計を使用して定量することができる。

（c）様々な酵素-基質標識が利用可能であり、米国特許第4,275,149号は、これらの一部の概説を提供する。上記酵素は、一般に、様々な技術を使用して測定すること

10

20

30

40

50

ができる色素生産性基質の化学的变化を触媒する。例えば、上記酵素は、分光測定で計測することができる基質における色の变化を触媒し得る。あるいは、上記酵素は、基質の蛍光または化学発光を変化し得る。蛍光の変化を定量するための技術は、上に記載している。化学発光の基質は、電気工学的に化学反応によって励起され、次いで、計測することができる（例えば、ケミルミノメーターを使用して）光を放射し得るか、または蛍光性アクセプターにエネルギーを供与する。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ）、複素環式オキシダーゼ（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、マイクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。抗体に酵素を結合体化するための技術は、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)に記載されている。

10

【0257】

20

抗体はまた、インビボ診断アッセイに使用され得る。いくつかの実施形態において、イミュノシンチオグラフィ（immunosciography）を使用して腫瘍を限局できるように、抗体を放射性核種で標識する。便宜上、本発明の抗体は、キット、すなわち、所定量の試薬の組み合わせをまとめ、診断アッセイを行うための指示書を備えて提供され得る。抗体を酵素で標識する場合、そのキットは、基質および酵素に必要な補因子（例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアを提供する基質前駆体）を備え得る。さらに、安定剤、緩衝液（例えば、ブロッキング緩衝液または溶解緩衝液）などの他の付加物を備え得る。様々な試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬溶液の濃度を提供するために広く変化させてもよい。特に、試薬は、賦形剤を含む粉末、通常は凍結乾燥させた粉末として、提供され得、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する。

30

【0258】

いくつかの実施形態において、抗体は、1以上のメイタンシン分子（例えば、抗体1分子につき約1～約10のメイタンシン分子）に結合体化される。メイタンシンは、例えば、May-SH3に還元され得るMay-SS-Meに変換され得て、そして改変抗体（Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)）と反応して、メイタンシノイド-抗体免疫結合体が生成され得る。いくつかの実施形態において、この結合体は、非常に強力なメイタンシン誘導體DM1（N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン）（例えば、2002年12月12日公開のWO02/098883を参照のこと）（このIC50は約10～11Mである）（概説についてはPayne (2003) Cancer Cell 13:207-212を参照のこと）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)-メイタンシン）（例えば、2004年12月2日公開のWO2004/103272を参照のこと）であり得る。

40

【0259】

いくつかの実施形態において、抗体結合体は、1以上のカリケアマイシン分子に結合体化された抗腫瘍細胞抗原抗体を含み得る。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNA切断を起こすことができる。使用され得るカリケアマイシンの構造上のアナログとしては、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I₁（Hinman et al. Cance

50

r Research 53:3336-3342 (1993) および Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998) が挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,714,586号；同第5,712,374号；同第5,264,586号；および同第5,773,001号（これらの各々は、本明細書中で明白に援用される）も参照のこと。

【0260】

いくつかの実施形態において、抗体は、多くの癌で過剰に生成される酵素によって活性型で放出され得るプロドラッグに結合体化される。例えば、抗体結合体は、ドキシソルビシンのプロドラッグ型で作製され得る。ここで、活性成分は、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、多くの癌性組織で過剰に生成されることが知られている (Decy et al, (2004) FASEB Journal 18(3):565-567を参照のこと)。

10

【0261】

いくつかの実施形態において、抗体は、酵素的に活性なトキシンおよびそのフラグメントに結合体化される。いくつかの実施形態において、トキシンとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシンの非結合活性フラグメント、外毒素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、モデクシンA鎖、アルファーサルシン (sarcin)、Aleurites fordii タンパク質、ジアンシン (dianthin) タンパク質、Phytolacca americana タンパク質 (PAPI、PAPII および PAP-S)、リボヌクレアーゼ (Rnase)、デオキシリボヌクレアーゼ (Dnase)、アメリカヤマゴボウ抗ウイルス性タンパク質、ニガウリ (momordica charantia) インヒビター、クルシン (curcin)、クロチン (crotonin)、saponaria officinalis インヒビター、ゲロニン (gelonin)、マイトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、ネオマイシンおよびトリコテシン (trichothecene) が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、1993年10月28日公開のWO93/21232を参照のこと。いくつかの実施形態において、トキシンは、内在性の低い免疫原性および癌性細胞がトキシン耐性になる機会を減少させる作用メカニズム (例えば、細胞傷害性メカニズム 対 細胞分裂抑制メカニズム) を有する。

20

30

【0262】

いくつかの実施形態において、結合体は、本発明の抗体と免疫調節因子との間で作製された。例えば、いくつかの実施形態において、免疫賦活性のオリゴヌクレオチドを使用することができる。これらの分子は、抗原特異的抗体反応を誘発することができる強力な免疫原である (Datta et al, (2003) Ann N. Y. Acad. Sci 1002:105-111を参照のこと)。さらなる免疫調節性化合物としては、「S1因子」などの幹細胞成長因子、腫瘍壊死因子 (TNF) などのリンフォトキシン、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 (G-CSF)) または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 α 、 β または γ)、エリトロポイエチンおよびトロンプオエチンが挙げられ得る。

40

【0263】

いくつかの実施形態において、放射性結合体化抗体が提供される。いくつかの実施形態において、このような抗体は、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-

50

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ならびにこれらの組み合わせおよびサブ組み合わせを使用して作製することができる。いくつかの実施形態において、ホウ素原子、ガドリニウム原子またはウラン原子を抗体に結合体化する。いくつかの実施形態において、ホウ素原子は、B-10であり、ガドリニウム原子は、Gd-157であり、ウラン原子は、U-235である。

【0264】

いくつかの実施形態において、放射性核種結合体は、20~10,000keVのエネルギーを有する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有するオージェ放射体、20~5000keVのエネルギーを有するP放射体または2000~10,000keVのエネルギーを有するアルファ放射体もしくは「a」放射体であり得る。

【0265】

いくつかの実施形態において、ガンマーベータ線放出同位体または陽電子放出同位体である放射性核種を含む診断的放射性結合体が、提供される。いくつかの実施形態において、放射性核種は、20~10,000keVのエネルギーを有する。いくつかの実施形態において、放射性核種は、¹⁸F、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵²Fe、⁵⁵Co、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb、⁸³Sr、⁸⁶Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁷⁵Se、⁹⁷Ru、^{99m}Tc、^{114m}In、¹²³I、¹²⁵I、¹³Liおよび¹⁹⁷Hgの群から選択される。

【0266】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、光活性薬剤または造影剤である診断薬剤に結合体化される。光活性化合物は、色素原(chromagen)または色素などの化合物を含み得る。造影剤は、例えば、常磁性イオンであり得る。ここで、そのイオンは、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)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イットルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、エルビウム(III)の群から選択される金属を含む。造影剤はまた、X線技術またはコンピュータ断層撮影において使用される放射線非透過化合物(例えば、ヨウ素化合物、イリジウム化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物およびタリウム化合物)であり得る。放射線非透過化合物は、バリウム、ジアトリゾアート、エチオダイズオイル(ethiodized oil)、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、ヨードミド、ヨージパミド、ヨードキサム酸、イオグルアミド(iogulamide)、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスルアミドメグルミン(iosulamide meglumine)、イオセメト酸(iosemetic acid)、イオタズル(iotasul)、イオテトル酸、イオタラム酸(iothalamic acid)、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオキシトリゾ酸、イボダート、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第一タリウムの群から選択され得る。いくつかの実施形態において、診断免疫複合体は、本発明の抗体に結合体化されているガス流入(gas filled)リボソームなどの超音波増幅剤(ultrasound-enhancing agent)を含み得る。診断免疫複合体は、種々の手順に使用され得る。それらの手順としては、腫瘍または癌の診断および検出の、手術中の方法、内視鏡的方法または血管内の方法が挙げられるがこれらに限定されない。

【0267】

いくつかの実施形態において、抗体結合体は、種々の二機能タンパク質カップリング剤

(例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えば、アジピイミド酸ジメチルH C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド(g l u t a r e l d e h y d e))、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、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)、ジイソシアナート類(例えば、トリエン2, 6-ジイソシアナート)、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))を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、V i t e t t a e t a l . S c i e n c e 238:1098(1987)に記載されているように調製され得る。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(M X - D T P A)は、抗体への放射性ヌクレオチドの結合体化のための例示的なキレート剤である。W O 94/11026を参照のこと。リンカーは、細胞における細胞傷害性薬物の放出を促進する「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、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(C h a r i e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 52:127-131(1992))が使用され得る。薬剤は、炭水化物部分を介して本発明の抗体に付加的に連結され得る

いくつかの実施形態において、本発明の抗体および細胞傷害性薬剤を含む融合タンパク質は、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製され得る。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤と結合体化された抗腫瘍抗原抗体を含むそのような免疫複合体が、患者に投与される。いくつかの実施形態において、上記免疫複合体および/またはそれが結合している腫瘍細胞抗原タンパク質は、細胞によって内部に取り込まれ、その結果、上記免疫複合体が結合する癌細胞を殺傷する際の免疫複合体の治療有効性が増加する。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、癌細胞内の核酸を標的化するか、またはその核酸を干渉する。そのような細胞傷害性剤の例としては、メイタンシノイド、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。

【0268】

いくつかの実施形態において、抗体は、腫瘍を事前に標的化する際に利用するための「レセプター」(例えば、ストレプトアビジン)に結合体化される。ここで、抗体-レセプター結合体が、患者に投与され、その後、除去剤(c l e a r i n g a g e n t)を使用して結合していない結合体を循環から除去し、次いで、細胞傷害性薬剤(例えば、放射性ヌクレオチド)に結合体化された「リガンド」(例えば、アビジン)を投与する。

【0269】

いくつかの実施形態において、抗体は、標的細胞リソソーム(l y s o z o m e)の内部に放出される細胞傷害性分子に結合体化される。例えば、薬物モノメチルオーリスタチンE(m o n o m e t h y l a u r i s t a t i n E; M M A E)を、タンパク質分解性リソソーム酵素カテプシンBによって切断されるバリナーシトルリン結合を介して結合体化することができ、その後、抗体結合体が内部に取り込まれる(例えば、2003年4月3日公開のW O 03/026577を参照のこと)。いくつかの実施形態において、M M A Eは、切断可能部分としてのヒドラゾン官能性を含む酸不安定性リンカーを使用して抗体に結合され得る(例えば、2002年11月11日公開のW O 02/088172を参照のこと)。

【0270】

(抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療(A D E P T))

いくつかの実施形態において、本発明の抗体はまた、プロドラッグ(例えば、ペプチジル化学療法剤、W O 81/01145を参照のこと)を活性な抗癌薬物に変換するプロドラッグ活性化酵素に抗体を結合体化することによってA D E P Tに使用され得る。例えば、W O 88/07378および米国特許第4, 975, 278号を参照のこと。

【0271】

いくつかの実施形態において、A D E P Tに有用な免疫複合体の酵素成分は、プロドラッグをより活性な細胞傷害性型に変換するために、そのような方法においてプロドラッグ上で作用することができる任意の酵素を含む。

【0272】

A D E P Tにおいて有用な酵素としては、リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアルカリホスファターゼ；硫酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアリールスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬物5-フルオロウラシルに変換するために有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なプロテアーゼ（例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、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プロドラッグを変換するために有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用な炭水化物切断酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ）； β -ラクタムで誘導体化される薬物を遊離薬物に変換するために有用な β -ラクタマーゼ；およびそれぞれフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基でアミン窒素において誘導体化される薬物を遊離薬物に変換するため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、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、「アブザイム」として当該分野で公知の酵素活性を有する抗体を使用して、本発明のプロドラッグを遊離型の活性薬物に変換することができる（例えば、Massey, Nature 328: 457-458 (1987) を参照のこと）。抗体-アブザイム結合体は、腫瘍細胞集団にアブザイムを送達するために、本明細書中で記載されているように調製され得る

いくつかの実施形態において、A D E P T 酵素を、上で記述したヘテロ二官能性架橋試薬を使用するなどの当該分野で周知の技術によって抗体に共有結合することができる。いくつかの実施形態において、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結されている本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該分野で周知の組換えDNA技術を使用して構築され得る（例えば、Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984) を参照のこと）。

【0273】

いくつかの実施形態において、細胞傷害性様式ではなく細胞分裂抑制様式で作用する抗体の同定は、処置される標的細胞培養物のバイアビリティを測定して無処置コントロール培養物と比較することによって達成され得る。バイアビリティは、当該分野で公知の方法（例えば、Cell Titer-Blue（登録商標）細胞バイアビリティアッセイまたはCell Titer-Glo（登録商標）発光細胞バイアビリティアッセイ（Promega、それぞれカタログ番号G8080およびG5750））を使用して検出することができる。いくつかの実施形態において、上記の手段によって測定するとき、いかなる細胞死の証拠もないコントロール培養物と比較して、処置によって細胞数が減少する場合、抗体は、強力な細胞分裂抑制性であると考えられる。

【0274】

いくつかの実施形態において、インビトロスクリーニングアッセイは、当該分野で公知のアッセイを使用してA D C Cを促進する抗体を同定するために行われ得る。1つの例示的なアッセイは、インビトロA D C C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、腫瘍細胞株を組織培養プレート中で生育し、滅菌10mM EDTAのPBS溶液を使用して回収する。剥離細胞を細胞培養培地で2回洗浄する。細胞（ 5×10^6 ）を、200 μ Ciのクロム51（New England Nuclear/DuPont）で1時間、37°Cにて時々混合させながら標識する。標識細胞を細胞培養培地で3回洗浄し、その後、 1×10^5 細胞/mLの濃度に再懸濁する。細胞を、オプソニン化なしで使用するか、またはPBMCアッセイでは100 ng/mLおよび1.25 ng/mLの試験抗体、またはNKアッセイでは20 ng/mLおよび1 ng/mLの試験抗体とともにインキュベートすることによって、アッセイの前にオプソニン化する。末梢血単核球

を、正常な健常ドナーからヘパリンを用いて血液を回収することによって調製し、そして等量のリン酸緩衝食塩水（PBS）で希釈する。次いで、その血液をLYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM（登録商標）（LSM：Organon Teknika）を用いて層状にし、そして製造者の指示書に従って遠心する。単核細胞をLSM-血漿界面から回収し、PBSで3回洗浄する。エフェクター細胞を細胞培養培地に最終濃度 1×10^7 細胞/mLとなるよう懸濁する。LSMで精製した後、ナチュラルキラー（NK）細胞を、製造者の指示書に従って、NK細胞単離キットおよび磁性カラム（Miltenyi Biotec）を使用してネガティブセレクションによってPBM Cから単離する。単離されたNK細胞を回収し、洗浄し、そして細胞培養培地に 2×10^6 細胞/mLの濃度に再懸濁する。NK細胞であることをフリーサイトメトリー解析によって確かめる。細胞培養培地が入ったマイクロタイタープレート（最終容量 $100 \mu\text{L}$ ）の列に沿ってエフェクター（PBM CまたはNKのいずれか）細胞を2倍ずつ連続的に希釈することによってエフェクターと標的の比を変更する。エフェクター細胞の濃度は、PBM Cについては $1.0 \times 10^7 / \text{mL} \sim 2.0 \times 10^4 / \text{mL}$ およびNKについては $2.0 \times 10^6 / \text{mL} \sim 3.9 \times 10^3 / \text{mL}$ の範囲である。エフェクター細胞の調整後、 1×10^5 細胞/mLで $100 \mu\text{L}$ のクロム51標識標的細胞（オプソニン化有りまたは無し）をプレートの各ウェルに加える。このことから、最初のエフェクター：標的比が、PBM Cについては100：1およびNK細胞については20：1となる。すべてのアッセイを2つ組で行い、各プレートは、自発的な溶解（エフェクター細胞なし）と全溶解（1%ドデシル硫酸ナトリウム、1N水酸化ナトリウムを加えた標的細胞 $100 \mu\text{L}$ ）の両方をコントロールとして含む。プレートを 37°C で18時間インキュベートし、その後、細胞培養上清を上清回収システム（Skatron Instrument, Inc.）を使用して回収し、Minaxi auto-gamma 5000シリーズガンマカウンター（Packard）で1分間計測した。次いで、式： $\% \text{細胞傷害性} = (\text{サンプルcpm} - \text{自発的溶解}) / (\text{全溶解} - \text{自発的溶解}) \times 100$ を使用して、結果をパーセント細胞傷害性として表す。

【0275】

CDCを促進する抗体を同定するために、当業者は、当該分野で公知のアッセイを行ってもよい。1つの例示的アッセイは、インビトロCDCアッセイである。インビトロにおいて、CDC活性は、腫瘍細胞抗原を発現する細胞を、試験抗体の不在下または様々な濃度の試験抗体の存在下で、ヒト（または別の起源の）補体含有血清とインキュベートすることによって測定することができる。次いで、細胞傷害性を、生細胞をALAMAR BLUE（登録商標）を使用して定量することによって測定する（Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202 163-171 (1997)）。コントロールアッセイは、抗体無しおよび抗体有りで行うが、熱失活血清および／または対象の腫瘍細胞抗原を発現しない細胞を使用して行う。あるいは、赤血球を腫瘍抗原または腫瘍抗原から得られたペプチドで被覆することができ、その後、赤血球細胞溶解を観察することによってCDCをアッセイしてもよい（例えば、Karjalainen and Mantyjarvi, Acta Pathol Microbiol Scand [C]. 1981 Oct; 89 (5): 315-9を参照のこと）。

【0276】

細胞死を誘導する抗体を選択するために、例えば、PI、トリパンブルーまたは7AADの取り込みで示されるような膜完全性の喪失をコントロールと比較してアッセイしてもよい。1つの例示的アッセイは、腫瘍抗原を発現する細胞を使用したPI取り込みアッセイである。このアッセイによれば、腫瘍細胞抗原を発現する細胞を、10%熱失活FBS（Hyclone）および2mM L-グルタミンが補充されたダルベッコ変法イーグル培地（D-MEM）：Ham's F-12（50：50）中で培養する（従って、アッセイは、補体および免疫エフェクター細胞の不在下で行われる）。腫瘍細胞を、 $100 \times 20 \text{ mm}$ ディッシュに $3 \times 10^6 / \text{ディッシュ}$ の密度で播き、一晚接着させる。次いで、

その培地を除去し、新鮮培地のみまたは $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の適切なモノクローナル抗体を含む培地に交換する。細胞を3日間インキュベートする。各処置の後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって剥離する。次いで、細胞を 4°C 1200rpm で5分間遠心し、ペレットを3mLの氷冷Ca²⁺結合緩衝液（ 10mM Hepes, pH7.4、 140mM NaCl、 2.5mM CaCl₂）に再懸濁し、そして細胞凝集塊を除去するために35mm濾過器キャップの（strainer-capped） 12×75 チューブ（ $1\text{mL}/\text{チューブ}$ 、1処置群につき3本のチューブ）に一定量を採る。そして、チューブにPI（ $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加える。サンプルをFACSCANTMフローサイトメーター、FACSCONVERTTM、CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson）を使用して解析し得る。PI取り込みによって測定されるとき、実質的に有意水準の細胞死を誘導するそれらの抗体は、細胞死誘導抗体として選択され得る。

10

【0277】

抗体はまた、PET画像化剤として¹⁸F-アネキシンを使用してアポトーシス活性についてインビボでスクリーニングされ得る。この手順において、アネキシンVを、¹⁸Fで放射性標識し、研究中の抗体を投薬した後の試験動物に投与する。ホスファチジルセリンが細胞膜の内側から外側細胞表面に外返しになるというアポトーシスのプロセスの最も初期の事象がおき、ホスファチジルセリンにアネキシンが到達できるようになる。次いで、その動物をPET画像化に供する（Yagle et al, J Nucl Med. 2005 Apr; 46 (4): 658-66を参照のこと）。また、その動物を屠殺して、個々の器官または腫瘍を取り出し、標準的なプロトコールに従ってアポトーシスマーカーで解析することができる。

20

【0278】

いくつかの実施形態において、癌は、遺伝子発現産物の過剰発現を特徴とし得るが、本出願は、さらに、腫瘍抗原を過剰発現する癌であると考えられていない癌を処置するための方法を提供する。癌において腫瘍抗原発現を測定するために、様々な診断/予後診断アッセイが利用可能である。いくつかの実施形態において、遺伝子発現産物の過剰発現をIHCによって解析することができる。腫瘍バイオプシー由来のパラフィン包埋組織切片は、IHCアッセイに供され得、そして次のような腫瘍抗原タンパク質染色強度基準に一致させる：

30

スコア0：染色が観察されないか、または膜染色が10%未満の腫瘍細胞において観察される。

スコア1+：10%超の腫瘍細胞において、かすかに/かろうじて知覚可能な膜染色が検出される。それらの細胞は、膜の部分だけが染色されている。

スコア2+：弱～中程度の完全な膜染色が、10%超の腫瘍細胞において観察される。

スコア3+：中～強度の完全な膜染色が、10%超の腫瘍細胞において観察される。

【0279】

腫瘍抗原過剰発現評価について0または1+スコアを有する腫瘍は、腫瘍抗原を過剰発現していないと特徴付けられ得る一方で、2+または3+スコアを有する腫瘍は、腫瘍抗原を過剰発現すると特徴付けられる。

40

【0280】

あるいは、またはさらに、FISHアッセイ（INFORMTM（Ventana, Ariz. から販売）またはPATHVISIONTM（Vysis, Ill.））を、ホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍組織において行うことにより、腫瘍における腫瘍抗原の過剰発現の程度を（もしあれば）測定してもよい。

【0281】

さらに、例えば、循環半減期を長くするために、抗体をポリマーに共有結合の結合体化によって化学的に改変することができる。各抗体分子は、1以上の（すなわち、1、2、3、4、5またはそれ以上の）ポリマー分子に結合され得る。ポリマー分子は、好ましくはリンカー分子によって抗体に結合される。上記ポリマーは、一般に、合成ポリマーまた

50

は天然に存在するポリマーであり得、例えば、必要に応じて置換されている直鎖または分枝鎖のポリアルケンポリマー、ポリアルケニレンポリマーまたはポリオキシアルキレンポリマーまたは分枝状または非分枝状の多糖、例えば、ホモ多糖またはヘテロ多糖であり得る。いくつかの実施形態において、上記ポリマーは、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： $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ (式中、R は、水素または保護基 (例えば、アルキル基またはアルカノール基) であり得る) を有する。いくつかの実施形態において、上記保護基は、1～8 個の炭素を有する。いくつかの実施形態において、上記保護基は、メチルである。記号 n は、1～1,000 または 2～500 の正の整数である。いくつかの実施形態において、上記 PEG は、1000～40,000、2000～20,000 または 3,000～12,000 の平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、PEG は、少なくとも 1 つのヒドロキシ基を有する。いくつかの実施形態において、上記ヒドロキシは、末端ヒドロキシ基である。いくつかの実施形態において、上記末端ヒドロキシ基は、インヒビター上の遊離アミノ基と反応するために活性化される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、本発明の共有結合の結合体化 PEG/抗体を作製するために変更してもよいことが理解される。ポリマー、およびポリマーをペプチドに結合する方法は、米国特許第 4,766,106 号；同第 4,179,337 号；同第 4,495,285 号；および同第 4,609,546 号 (各々は、その全体が本明細書によって参考として援用される) に示されている。

【0282】

(標識および検出)

いくつかの実施形態において、本発明の癌関連核酸、タンパク質および抗体は、標識される。上で記述した結合体の例の多くは、非抗体に関するものであることに注意されたい。このような例および関連の範囲内で、それらは本明細書中に組み込まれる。

【0283】

本明細書中で「標識する」とは、化合物が、その化合物を検出することができるように結合する少なくとも 1 つのエLEMENT、同位体または化合物を有することを意味する。一般に、標識は、3 つのクラス：a) 放射性同位体または重同位体であり得る、同位体標識；b) 抗体または抗原であり得る、免疫標識；および c) 色素または蛍光色素に分類される。上記標識は、癌関連核酸、タンパク質および抗体に任意の位置で組み込まれ得る。例えば、上記標識は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に生成することができるはずである。上記検出可能な部分は、放射性同位体 (例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S または ^{125}I)、蛍光性化合物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、ローダミンまたはルシフェリン) または酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ) であり得る。上記標識に抗体を結合体化するための当該分野で公知の任意の方法を使用してもよい。その方法としては、Hunter et al., Nature, 144:945 (1962)；David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974)；Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981)；および Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982) に記載されている方法が挙げられる。

【0284】

目的の発現産物の検出は、当業者に公知の任意の検出方法を使用して達成することができる。「発現を検出する」または「～のレベルを検出する」とは、生物学的サンプル中の生物学的マーカータンパク質または遺伝子の量または存在を測定することを意味すると解釈される。従って、「発現を検出する」は、生物学的マーカーが、発現していない場合、検出可能なレベルで発現していない場合、低レベルで発現している場合、正常レベルで発現している場合、または過剰発現している場合を包含する。いくつかの実施形態において、抗腫瘍細胞抗原治療薬の効果を測定するために、腫瘍細胞抗原を発現している腫瘍性細胞を含む試験生物学的サンプルを、十分な時間に亘って、抗腫瘍細胞抗原治療薬と接触さ

せることにより、その治療薬が細胞応答を発揮することができ、そしてその試験生物学的サンプルにおける目的の1以上の生物学的マーカーの発現レベルを、抗腫瘍細胞抗原治療薬の不在下のコントロール生物学的サンプルにおける発現レベルと比較する。いくつかの実施形態において、腫瘍性細胞のコントロール生物学的サンプルを、中性の物質またはネガティブコントロールと接触させる。例えば、いくつかの実施形態において、腫瘍細胞抗原に結合しない非特異的な免疫グロブリン、例えばIgG1が、ネガティブコントロールとして働く。検出は、経時的な発現産物の変化をモニタリングすることができるよう十分に時間をかけて行うことができる。検出を、様々な濃度の抗腫瘍細胞抗原治療薬に曝露して行うことにより、所与の任意の目的の生物学的マーカーについての「用量反応」曲線を作成することもできる。

10

【0285】

(癌表現型の検出)

一旦、発現し、必要であれば、精製したら、癌関連タンパク質および核酸は、多くの用途において有用となる。いくつかの実施形態において、遺伝子の発現レベルは、癌表現型における様々な細胞の状態について決定する；すなわち、正常組織および癌組織における遺伝子の発現レベル（およびいくつかの場合において、以下で概要を述べるように、予後予測に関するリンパ腫の重症度を変化させるための遺伝子の発現レベル）を評価することにより、発現プロファイルが提供される。特定の細胞状態または発生の時点の発現プロファイルは、本質的にその状態の「フィンガープリント」である；2つの状態が、同様に発現する任意の特定の遺伝子を有し得るが、多くの遺伝子を評価することにより、その細胞の状態に特有の遺伝子発現プロファイルを同時に生成することが可能である。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、どの遺伝子がこれらの状態の各々において重要であるか（遺伝子のアップレギュレーションとダウンレギュレーションの両方を含む）についての情報が手に入る。そして、診断が行われ得るか、または確かめられ得る：特定の患者由来の組織は、正常組織または癌組織の遺伝子発現プロファイルを有する。

20

【0286】

「差次的発現」または本明細書中で使用される同義語とは、細胞内および細胞間の遺伝子の一時的発現パターンおよび／または細胞性発現パターンにおける定性的差異ならびに定量的差異の両方のことをいう。従って、差次的に発現される遺伝子は、定性的に発現を変化させ得る。その変化としては、例えば、正常組織対癌組織における活性化または不活性化が挙げられる。すなわち、遺伝子は、別の状態と比べて特定の状態においてその遺伝子のスイッチがオンまたはオフになり得る。当業者に理解されるように、2以上の状態の任意の比較がなされ得る。このような定性的に制御された遺伝子は、標準的な技術によって1つのこのような状態または細胞型においては検出可能であるが、両方においては検出可能でない、1つの状態または細胞型における発現パターンを示す。あるいは、この決定は、発現が増加しているか、または減少しているかという点で定量的であり；すなわち、遺伝子の発現は、上方調節された結果、転写物の量が増加しているか、または下方調節された結果、転写物の量が減少している。発現が異なる程度は、以下で概要を述べるような標準的な特徴づけ技術、例えば、Affymetrix GeneChip（登録商標）発現アレイ（Lockhart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996)）（本明細書によって明白に参考として援用される）の使用などを介して定量するのに十分大きいことだけが必要である。他の技術としては、定量的逆転写酵素PCR、ノーザン解析およびRNase保護が挙げられるが、これらに限定されない。上で概要を述べたように、発現の変化（すなわちアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）は、少なくとも約2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍または100倍またはそれ以上である。

30

40

【0287】

当業者に理解されるように、これは、遺伝子転写物レベルまたはタンパク質レベルのいずれかで評価することによってなされ得る；すなわち、遺伝子発現の量を、遺伝子転写物

50

のDNA等価物またはRNA等価物に対する核酸プローブを使用してモニターすることができ、また、遺伝子発現レベルの定量または最終的な遺伝子産物自体（タンパク質）を、例えば、癌関連タンパク質に対する抗体の使用、および標準的なイムノアッセイ（ELISAなど）または、質量分析アッセイ、2Dゲル電気泳動アッセイなどを含む他の技術を通じてモニターすることができる。従って、癌関連遺伝子に対応するタンパク質、すなわち、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同定されるタンパク質を、その癌に特異的な診断的試験において評価することができる

いくつかの実施形態において、遺伝子発現のモニタリングが行われ、多くの遺伝子が同時にモニターされる。しかしながら、複数のタンパク質発現のモニターが、発現プロファイルを調製するために同様に行うことができる。あるいは、これらのアッセイは、個別に実施され得る。

10

【0288】

いくつかの実施形態において、癌関連核酸プローブは、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、本明細書中で概要を述べるようにバイオチップに接着され得る。アッセイは、当該分野で公知であるように行われる。当業者に理解されるように、任意の数の様々な癌関連配列がプローブとして使用され得、いくつかの場合においては単一配列アッセイが使用され、他の実施形態においては本明細書中で記載される複数の配列が使用される。なお、固相アッセイについて記載されるが、任意の数の溶液ベースのアッセイが同様に行われ得る。

【0289】

20

いくつかの実施形態において、固相ベースアッセイと溶液ベースアッセイの両方を使用して、正常組織と比較するとき、癌において上方調節されているか、または下方調節されている癌関連配列が検出され得る。癌関連配列は、変化しているが、同じ発現プロファイルまたは変化した発現プロファイルを示す場合、そのタンパク質は、本明細書中で概要を述べるように検出される。

【0290】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質をコードする核酸が検出される。癌関連タンパク質をコードするDNAまたはRNAが、検出され得るが、特に興味深いのは、癌関連タンパク質をコードするmRNAを検出する方法である。サンプル中のmRNAの存在は、その癌関連遺伝子が転写されて、mRNAを形成していることを示唆し、そのタンパク質が発現していることを示す。そのmRNAを検出するプローブは、そのmRNAに相補的であり、そのmRNAとの塩基対であ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得る。そのプローブとしては、オリゴヌクレオチド、cDNAまたはRNAが挙げられるが、これらに限定されない。プローブはまた、本明細書中で定義されるような検出可能な標識を含むべきである。1つの方法において、そのmRNAは、実験される核酸をナイロン膜などの固体支持体上に固定し、そしてプローブとサンプルとをハイブリダイズした後に検出される。非特異的に結合しているプローブを除去するために洗浄した後、標識を検出する。別の方法においては、mRNAの検出をインサイチュで行う。この方法においては、透過処理された細胞または組織サンプルを、プローブと標的mRNAとをハイブリダイズさせるのに十分な時間に亘って検出可能に標識された核酸プローブと接触させる。非特異的に結合しているプローブを除去するために洗浄した後、標識を検出する。例えば、癌関連タンパク質をコードするmRNAに相補的な、ジゴキシゲニン標識されたりボプローブ（RNAプローブ）は、そのジゴキシゲニンを抗ジゴキシゲニン二次抗体と結合することによって検出され、そしてニトロブルーテトラゾリウムおよび5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェートで発色される。

30

40

【0291】

本明細書中に記載されるようなタンパク質の3つのクラス（分泌タンパク質、膜貫通タンパク質または細胞内タンパク質）のいずれかが、診断アッセイに使用され得る。癌関連タンパク質、抗体、核酸、改変タンパク質および癌関連配列を含む細胞が、診断アッセイに使用される。これは、個別の遺伝子レベルまたは対応するポリペプチドレベルで行われ

50

得るか、またはアッセイのセットとして行われ得る。

【0292】

本明細書中で記載および定義されるように、癌関連タンパク質は、癌のマーカーとしての用途がある。その癌としては、白血病、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、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が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられる。推定上の癌組織または癌患者におけるこれらのタンパク質の検出により、癌のタイプの判定または診断が可能になる。当業者に公知の多くの方法が、癌を検出する際に使用される。

【0293】

抗体を使用して、癌関連タンパク質を検出し得る。1つの方法は、ゲル（代表的には、変性タンパク質ゲルおよび還元タンパク質ゲルであるが、等電点電気泳動ゲルなどを含む他の任意のタイプのゲルでもよい）における電気泳動によってサンプルまたは患者からタンパク質を分離する。タンパク質を分離した後、癌関連タンパク質は、その癌関連タンパク質に対して産生された抗体を用いて免疫ブロッティングにより検出される。免疫ブロッティングの方法は、当業者に周知である。このような方法において使用される抗体は、上で記載したように標識され得る。

【0294】

いくつかの方法において、癌関連タンパク質に対する抗体は、インサイチュ画像化技術において使用される。この方法において、細胞を、癌関連タンパク質に対する1つの抗体から多くの抗体までと接触させる。非特異的に結合した抗体を除去するために洗浄した後、抗体の存在または抗体を検出する。いくつかの実施形態において、上記抗体は、検出可能な標識を含む2次抗体とインキュベートすることによって検出される。別の方法において、癌関連タンパク質に対する1次抗体が、検出可能な標識を含む。別の方法において、複数の1次抗体の1つずつが、異なる標識かつ検出可能な標識を含む。この方法は、複数の癌関連タンパク質について同時にスクリーニングする際に特に使用される。当業者によって理解されるように、多くの他の組織学的な画像化技術が、本発明において有用である。

【0295】

標識は、様々な波長の放射を検出および識別することができる蛍光計において検出され得る。さらに、蛍光励起細胞分取器（FACS）をこの方法で使用することができる。

【0296】

抗体は、血液サンプルから癌を診断する際に使用され得る。前述したように、特定の癌関連タンパク質は、分泌される分子／循環分子である。従って、血液サンプルは、分泌型の癌関連タンパク質の存在について探索または試験されるサンプルとして有用である。抗体を使用して、当業者によって理解されるように、ELISA、免疫ブロット法（ウェスタンブロッティング）、免疫沈降、BIACORE技術などを含む前述したイムノアッセイ技術のいずれかによって癌関連タンパク質を検出することができる。

【0297】

組織アレイに対する標識された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行ってもよい。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を作製する。そして、当該分野で公知であるようなインサイチュハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0298】

個体および基準との間の発現フィンガープリントを比較するとき、当業者は、診断ならびに予後診断を行うことができることが理解される。診断を示唆する遺伝子は、予後を示唆する遺伝子と異なってもよいことが、さらに理解される。

【0299】

上で述べたように、癌関連タンパク質、抗体、核酸、改変タンパク質および癌関連配列を含む細胞は、予後診断アッセイに使用され得る。上記のように、癌の重症度に相関する遺伝子発現プロファイルは、長期的な予後に関して生成され得る。また、これは、タンパ

10

20

30

40

50

ク質レベルまたは遺伝子レベルのいずれかで行われ得る。上記のように、癌関連プローブは、組織または患者における癌関連配列の検出および定量のためにバイオチップに接着され得る。これらのアッセイは、診断について概要を述べるように進む。

【0300】

(スクリーニングアッセイ)

本明細書中で記載するような癌関連遺伝子配列のいずれかは、薬物スクリーニングアッセイにおいて使用され得る。癌関連タンパク質、抗体、核酸、改変タンパク質および癌関連遺伝子配列を含む細胞は、薬物スクリーニングアッセイにおいて使用されるか、または「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ついて薬物候補の効果を評価することによって使用される。1つの方法において、発現プロファイルは、好ましくは、候補薬剤の処置後の発現プロファイル遺伝子についてモニタリングすることができるハイスループットスクリーニング技術と組み合わせて使用される。Z l o k a r n i k, et al., Science 279, 84-8 (1998), Heid, et al., Genome Res., 6: 986-994 (1996)。

【0301】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質、抗体、核酸、改変タンパク質、およびネイティブまたは改変癌関連タンパク質を含む細胞は、スクリーニングアッセイに使用される。すなわち、本発明は、癌表現型を調節する組成物についてスクリーニングするための新規方法を提供する。上記のように、この方法は、遺伝子発現の調節因子またはタンパク質活性化の調節因子についてスクリーニングすることによって行われ得る。同様に、この方法は、個別の遺伝子レベルまたはタンパク質レベルについて行われ得るか、または「遺伝子発現プロファイル」について薬物候補の効果を評価することによって行われ得る。いくつかの実施形態において、発現プロファイルは、好ましくは、時折、候補薬剤での処置後の発現プロファイル遺伝子についてモニタリングすることができるハイスループットスクリーニング技術と組み合わせて使用される。Z l o k a r n i k, 前出を参照のこと。

【0302】

遺伝子発現に対する薬剤の効果を評価する種々のアッセイが行われ得る。いくつかの実施形態において、アッセイは、個別の遺伝子レベルまたはタンパク質レベルについて行われ得る。すなわち、遺伝子の制御を調節する候補生物活性薬剤が、スクリーニングされ得る。従って、「調節」は、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、正常組織対腫瘍組織における遺伝子発現の本来の変化に依存し、その変化は、少なくとも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有する。従って、ある遺伝子が、正常組織と比較して腫瘍において4倍の増加を示す場合、約4倍の減少が所望され得る；正常組織と比較して腫瘍における10倍の減少している場合は、候補薬剤の発現において10倍増加することが所望される、など。あるいは、癌関連配列は変化されるが、同じ発現プロファイルまたは変化した発現プロファイルを示す場合、そのタンパク質は、本明細書中で概要を述べるように検出される。

【0303】

当業者によって理解されるように、これは、遺伝子レベルまたはタンパク質レベルのいずれかにおける評価によって行われ得る；すなわち、遺伝子発現量は、核酸プローブおよび遺伝子発現レベルの定量化を使用してモニターされ得るか、あるいは、例えば、癌関連タンパク質に対する抗体の使用および標準的なイムノアッセイを通じて、遺伝子産物自体のレベルをモニターすることができる。あるいは、上記タンパク質を用いた結合アッセイおよび生物活性アッセイは、以下で概要を述べるように、行われ得る。

【0304】

いくつかの実施形態において、複数のタンパク質発現モニタリングが同様に行われ得るが、多くの遺伝子が同時にモニターされ、すなわち、発現プロファイルが調製される。

【0305】

いくつかの実施形態において、癌関連核酸プローブは、特定の細胞における癌関連配列の検出および定量化のために、本明細書中で概要を述べるようにバイオチップに接着される。それらのアッセイは、以下でさらに説明される。

【0306】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補は、解析前に細胞に加えられる。さらに、特定のタイプの癌を調節するか、癌関連タンパク質を調節するか、癌関連タンパク質に結合するか、または癌関連タンパク質と抗体との結合を干渉する生物活性薬剤候補を同定するためにスクリーニングが提供される。

【0307】

用語「生物活性薬剤候補」または「薬物候補」または文法上の同義語は、本明細書中で使用されるとき、癌関連タンパク質に結合し、そして／もしくは癌関連タンパク質の生物活性を調節する癌表現型、または癌関連配列（核酸配列とタンパク質配列の両方を含む）の発現のいずれかを、直接的または間接的に変化させることができる生物活性薬剤について試験されるべき任意の分子、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、低分子量有機分子または低分子量無機分子、多糖、ポリヌクレオチドなどのことを説明する。いくつかの実施形態において、候補薬剤は、癌関連表現型を、例えば、正常組織フィンガープリントまで抑制する。同様に、候補薬剤は、好ましくは、重篤な癌関連表現型を抑制する。一般に複数のアッセイ混合物を様々な薬剤濃度で並行して行うことにより、様々な濃度に対する差次的応答を得る。代表的には、これらの濃度の1つは、ネガティブコントロール（すなわち、ゼロ濃度または検出レベル未満）としての役割を果たす。

【0308】

いくつかの実施形態において、候補薬剤は、癌関連タンパク質の作用を中和する。「中和する」とは、タンパク質の活性を、細胞に対して実質的に作用を有しないようにすることによって、癌の重症度を減じるか、または癌の発症を予防するために、阻害するか、または打ち消すことを意味する。

【0309】

候補薬剤は、多くの化学分類を包含するが、代表的には化学分類は、有機分子または無機分子であり、好ましくは100ダルトン超かつ約2,500ダルトン未満の分子量を有する有機低分子化合物である。いくつかの実施形態において、低分子は、2000Da未満、1500Da未満、1000Da未満または500Da未満である。候補薬剤は、タンパク質との、特に水素結合による構造的な相互作用に必要な官能基を含み、その官能基としては、代表的には、少なくともアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基、好ましくは少なくとも2種の機能的化学基が挙げられる。候補薬剤は、上記官能基の1以上と置換されている、環式炭素または複素環式構造および／または芳香族もしくは多環芳香族の構造を含むことが多い。候補薬剤はまた、生体分子内で見出され、その生体分子としては、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造アナログまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0310】

候補薬剤は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む多岐にわたる起源から得られる。例えば、多くの手段が、多岐にわたる有機化合物および生体分子のランダムな合成および指向的な合成（ランダム化されたオリゴヌクレオチドの発現を含む）に利用可能である。いくつかの実施形態において、細菌、真菌、植物および動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが利用可能であるか、それらが容易に作製される。さらに、天然のライブラリーおよび化合物、または合成で作製されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的および生化学的な手段を介して容易に改変される。既知の薬理学的物質を、指向的な化学修飾またはランダムな化学修飾（例えば、アシル化、アルキル化、エステル化またはアミド化（amidification））に供することによって、構造アナログが生成され得る。

【0311】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補は、タンパク質である。本明細書中で

、「タンパク質」は、少なくとも2つの共有結合したアミノ酸を意味し、「タンパク質」は、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドおよびペプチドを含む。上記タンパク質は、天然に存在するアミノ酸とペプチド結合とから構成され得るか、または合成ペプチド模倣物構造から構成され得る。従って、「アミノ酸」または「ペプチド残基」とは、本明細書中で使用されるとき、天然に存在する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、本発明の目的でアミノ酸とみなされる。「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）配置または（S）配置のいずれかであり得る。いくつかの実施形態において、アミノ酸は、（S）配置またはL-配置である。天然に存在しない側鎖が使用される場合、例えば、インビボ分解を防ぐかまたは遅延させるために非アミノ酸置換基を使用してもよい。

10

【0312】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補は、天然に存在するタンパク質または天然に存在するタンパク質のフラグメントである。従って、例えば、タンパク質を含む細胞抽出物またはタンパク質性の細胞抽出物のランダムな消化物もしくは指向的な消化物が使用され得る。このようにして、原核生物および真核生物のタンパク質のライブラリーが、本発明の方法においてスクリーニングするために作製され得る。いくつかの実施形態において、上記ライブラリーは、細菌、真菌、ウイルスおよび哺乳動物のタンパク質である。いくつかの実施形態において、上記ライブラリーは、ヒトタンパク質ライブラリーである。

20

【0313】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補は、約5～約30アミノ酸、約5～約20アミノ酸または約7～約15アミノ酸のペプチドである。上記ペプチドは、上で概要を述べたように、天然に存在するタンパク質の消化物、すなわち、ランダムなペプチドまたは「偏った」ランダムなペプチドであり得る。「ランダム化された」または本明細書中の文法上の同義語は、核酸およびペプチドの各々が、それぞれ本質的にランダムなヌクレオチドおよびアミノ酸からなることを意味する。一般にこれらのランダムなペプチド（または以下に記載される核酸）は、化学的に合成されるため、それらは、任意のヌクレオチドまたはアミノ酸を任意の位置に組み込み得る。合成プロセスは、ランダム化されたタンパク質または核酸を生成するように設計され、その配列の長さに亘って可能な組み合わせのすべてまたはそのほとんどを形成することができ、その結果、ランダム化された生物活性タンパク質性物質候補のライブラリーを形成することができる。

30

【0314】

いくつかの実施形態において、ライブラリーは、任意の位置において配列優先性または一定配列を有さずに完全にランダム化されている。いくつかの実施形態において、ライブラリーは、偏っている。すなわち、配列内のいくつかの位置は、一定のまま保持されているか、または限られた数の可能性から選択される。例えば、いくつかの実施形態において、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基は、規定された分類（例えば、疎水性アミノ酸、親水性残基、立体的に偏った（小さいか、または大きいかのいずれかの）残基、核酸結合ドメインの形成について、架橋のためのシステインの形成について、SH-3ドメインのためのプロリン、リン酸化部位のためのセリン、トレオニン、チロシンもしくはヒスチジンなどまたはプリンなど）内でランダム化される。

40

【0315】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補は、核酸である。タンパク質について一般に説明されるのと同様に、核酸生物活性薬剤候補は、天然に存在する核酸、ランダムな核酸または「偏った」ランダムな核酸であり得る。別の実施形態において、生物活性薬剤候補は、文献において利用可能な多岐にわたる有機化学部分である。

【0316】

1以上の癌関連遺伝子の発現プロファイルの変化を試験するためのアッセイにおいて、候補薬剤が加えられ、そしてその細胞がある期間にわたってインキュベートされた後、解

50

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、公知の技術（例えば、上で記載したようなRNAから標識されたcDNAに変換する技術）を使用して調製され、適当なマイクロアレイに加えられる。例えば、ヌクレオシドに共有結合された標識とともにインビトロ逆転写が行われる。いくつかの実施形態において、核酸は、本明細書中に定義されるような標識（特に、ビオチン-FITCまたはPE、Cy3およびCy5）で標識される。

【0317】

当業者によって理解されるように、これらのアッセイは、直接的なハイブリダイゼーションアッセイであり得るか、または「サンドイッチアッセイ」を含み得る。

それらのアッセイは、複数のプローブの使用を含み、米国特許第5,681,702号、同第5,597,909号、同第5,545,730号、同第5,594,117号、同第5,591,584号、同第5,571,670号、同第5,580,731号、同第5,571,670号、同第5,591,584号、同第5,624,802、5,635,352号、同第5,594,118号、同第5,359,100号、同第5,124,246号および同第5,681,697号（これらのすべてが本明細書によって参考として援用さえる）に概要が述べられている。いくつかの実施形態において、標的核酸は、上で概要を述べたように調製され、次いで、ハイブリダイゼーション複合体の形成が可能な条件下で、複数の核酸プローブを含むバイオチップに加えられる。

【0318】

上で概要を述べたように、高度、中程度および低度ToStrinジェントな条件を含む種々のハイブリダイゼーション条件が、本発明において使用され得る。アッセイは、一般に、標的の存在下でのみ標識プローブハイブリダイゼーション複合体を形成することができるストリンジェンシー条件下で行われる。ストリンジェンシーは、熱力学的変数である工程パラメータ（温度、ホルムアミド濃度、塩濃度、カオトロピックな塩濃度、pH、有機溶媒濃度などが挙げられるがこれらに限定されない）を変化させることによって調節され得る。これらのパラメータを使用して、米国特許第5,681,697号において一般に概要が述べられているように、非特異的結合を調節し得る。従って、いくつかの実施形態において、ある一定の工程は、高いストリンジェンシー条件で行うことにより、非特異的結合を減少させる。

【0319】

当業者によって理解されるように、本明細書中で概要を述べた反応は、種々の方法において達成され得る。反応の成分は、同時に加えられ得るか、または任意の順序で連続的に加えられ得る。以下で概要が述べられる実施形態を示唆する。さらに、反応は、アッセイにおける種々の他の試薬を含み得る。これらとしては、塩、緩衝液、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、界面活性剤などのような試薬が挙げられる。これらは、最適なハイブリダイゼーションおよび検出を容易にするためおよび／または非特異的な相互作用またはバックグラウンドの相互作用を減少させるために使用され得る。アッセイの効率を改善する別の試薬（例えば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤など）が、サンプルの調製方法および標的の純度に応じて使用され得る。また、固相または溶液ベースの（すなわち、キネティックPCR）アッセイのいずれかが使用され得る。

【0320】

一旦、アッセイが行われると、そのデータは、個々の遺伝子の発現レベル、および個々の遺伝子の発現レベルの状態間の変化を決定するために解析され、遺伝子発現プロファイルが形成される。

【0321】

いくつかの実施形態において、診断用途および予後診断用途について、任意の1つの状態において重要な、差次的に発現された遺伝子または変異遺伝子を同定したとき、スクリーニングは、癌関連遺伝子の発現の変化について試験するために個々に行われ得る。すなわち、単一遺伝子の発現の制御の調節についてのスクリーニングがなされ得る。従って、例えば、標的遺伝子の存在の有無が2つの状態の間で特有である場合、標的遺伝子発現の

調節因子についてスクリーニングがなされる。

【0322】

さらに、スクリーニングは、候補薬剤に応答して誘導される新規遺伝子について行われ得る。癌関連発現パターンを抑制して正常な発現パターンに導く能力、または正常組織由来の遺伝子の発現を模倣するように単一の癌関連遺伝子発現プロファイルを調節する能力に基づいて候補薬剤を同定した後、上で記載したようなスクリーニングを行って、その薬剤に応答して特異的に調節される遺伝子を同定することができる。正常組織と薬剤処置した癌関連組織との間の発現プロファイルを比較することにより、正常組織または癌関連組織において発現されていないが、薬剤処置した組織において発現している遺伝子が明らかになる。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質についての本明細書中で記載された方法のいずれかによって同定され得、そして使用され得る。いくつかの実施形態において、これらの配列およびそれらがコードするタンパク質は、薬剤処置細胞を標識するか、同定する際に使用される。さらに、抗体は、薬剤に誘導されるタンパク質に対して産生され得、そして新規治療薬を処置された癌関連組織サンプルに標的化するために使用され得る。

10

【0323】

従って、いくつかの実施形態において、候補薬剤は、関連する癌関連発現プロファイルを有する癌関連細胞の集団に投与される。本明細書中で「投与」または「接触させる」とは、候補薬剤を、取り込みおよび細胞内の作用によってか、または細胞表面での作用によって、その薬剤が細胞で作用するような様式で細胞に加えることである。いくつかの実施形態において、タンパク質性候補薬剤（すなわち、ペプチド）をコードする核酸は、レトロウイルス構築物などのウイルス構築物に組み込まれ、そしてペプチド薬剤の発現が達成されるように細胞に加えられる得る；PCT US 97/01019（本明細書によって参考として明白に援用される）を参照のこと。

20

【0324】

一旦、候補薬剤が細胞に投与されると、その細胞は、所望であれば洗浄してもよいし、いくらかの時間に亘って好ましくは生理学的条件下でインキュベートしてもよい。次いで、その細胞を回収し、本明細書中で概要を述べるように新しい遺伝子発現プロファイルが生成される。

【0325】

このようにして、例えば、癌関連組織は、癌関連表現型を低減させるか、または抑制する薬剤についてスクリーニングされ得る。発現プロファイルの少なくとも1つの遺伝子が増加していた場合、その薬剤が、癌関連活性に対して効果を有することが示唆される。癌関連表現型についてのサイン（signature）を定義することによって、その表現型を増加させる新規薬物についてのスクリーニングを工夫することができる。このアプローチにおいては、薬物標的は、既知である必要もないし、元の発現スクリーニングプラットフォームに示されている必要もないし、標的タンパク質についての転写物のレベルを増加させる必要もない。

30

【0326】

いくつかの実施形態において、上で概要を述べたように、スクリーニングは、個々の遺伝子および遺伝子産物（タンパク質）について行われ得る。つまり、差次的に発現される特定の遺伝子を特定の状態において重要であると同定していると、遺伝子の発現または遺伝子産物自体の調節因子のスクリーニングを行うことができる。癌関連タンパク質は、フラグメントでもよいし、あるいは上で列挙した癌関連遺伝子によってコードされるフラグメントに対する全長タンパク質でもよい。いくつかの実施形態において、それらの配列は、上でさらに記載したような配列改変体である。

40

【0327】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質は、約14～24アミノ酸長のフラグメントである。いくつかの実施形態において、フラグメントは、可溶性フラグメントである。いくつかの実施形態において、フラグメントは、膜貫通領域でない領域を含む。いく

50

つかの実施形態において、フラグメントは、溶解性を高めるためにN末端のCysを有する。いくつかの実施形態において、フラグメントのC末端は、遊離酸として維持され、かつN末端は、例えば、システインへの結合を容易にするために遊離アミンである。

【0328】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質は、本明細書中で記述されるような免疫原性の薬剤に結合体化されている。いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質は、BSAに結合体化されている。

【0329】

いくつかの実施形態において、スクリーニングは、癌関連遺伝子の発現産物の生物学的機能を変化させるために行われる。また、特定の状態における遺伝子の重要性が同定されていると、その遺伝子産物と結合し、そして／またはその遺伝子産物の生物学的活性を調節する薬剤についてのスクリーニングは、下記で一層十分に概要を述べるように行われ得る。

10

【0330】

いくつかの実施形態において、スクリーニングは、まず、癌関連タンパク質に結合することができる候補薬剤を探索するように設計され、次いで、これらの薬剤を、アッセイにおいて使用することにより、癌関連タンパク質活性および癌表現型を調節する候補薬剤の能力を評価し得る。従って、当業者によって理解されるように、行われ得る様々なアッセイ；結合アッセイおよび活性アッセイが存在する。

【0331】

20

いくつかの実施形態において、結合アッセイが行われる。一般に、精製または単離された遺伝子産物を使用する；すなわち、1以上の癌関連核酸の遺伝子産物が調製される。一般に、その調製は、当該分野で公知であるように行われる。例えば、抗体をタンパク質遺伝子産物に対して作製し、標準的なイムノアッセイを行うことにより、タンパク質の存在量を測定する。いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質を含む細胞は、それらのアッセイにおいて使用され得る。

【0332】

従って、いくつかの実施形態において、それらの方法は、癌関連タンパク質と生物活性薬剤候補とを結合させる工程および癌関連タンパク質と候補薬剤との結合を測定する工程を含む。いくつかの実施形態では、ヒトまたはマウスの癌関連タンパク質を利用するが、他の哺乳動物のタンパク質も、例えばヒト疾患の動物モデルの開発のために使用してもよい。いくつかの実施形態において、本明細書中で概要を述べるように、改変体または誘導体の癌関連タンパク質が使用され得る。

30

【0333】

本明細書中の方法のいくつかの実施形態において、癌関連タンパク質または候補薬剤は、単離サンプル受け入れ領域を有する不溶性支持体（例えば、マイクロタイタープレート、アレイなど）に拡散できないように結合している。上記不溶性支持体は、任意の組成物から作製され得、この支持体は、その任意の組成物が結合でき、可溶性材料から容易に分離され、その他の点ではスクリーニングの方法全体に適合しているものである。このような支持体の表面は、固体であってもよいし、多孔性であってもよく、また、任意の便利な形状であってもよい。適当な不溶性支持体の例としては、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、代表的には、ガラス、プラスチック（例えば、ポリスチレン）、多糖類、ナイロンまたはニトロセルロース、テフロン（登録商標）などから作製される。マイクロタイタープレートおよびアレイは、多数のアッセイを、少量の試薬およびサンプルを使用して同時に行うことができるため、特に便利である。

40

【0334】

組成物が結合する特定の様式は、本発明の試薬および方法全体に適合していて、その組成物の活性が維持され、かつ拡散できないものである限り、決定的な問題ではない。結合のいくつかの方法としては、（タンパク質が支持体に結合するときに、リガンド結合部位または活性化配列のいずれかを立体的に妨害しない）抗体の使用、「粘着性」またはイオ

50

ン性の支持体に直接結合すること、化学的架橋、表面上でのタンパク質または薬剤の合成などが挙げられる。タンパク質または薬剤を結合させた後、過剰な結合していない材料を洗浄することによって除去する。次いで、サンプル受け入れ領域を、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインまたは他の無害タンパク質または他の部分とともにインキュベートすることによってブロッキングし得る。

【0335】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質を支持体に結合し、そして生物活性薬剤候補をアッセイに加える。いくつかの実施形態において、候補薬剤を支持体に結合し、そして癌関連タンパク質を加える。新規の結合薬剤としては、特定の抗体、化学ライブラリーのスクリーニングにおいて同定される非天然結合薬剤、またはペプチドアナログが挙げられる。特に興味深いのは、ヒト細胞にとって低毒性である薬剤についてのスクリーニングアッセイである。多岐にわたるアッセイが、この目的で使用され得る。そのアッセイとしては、標識によるインビトロタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合についてのイムノアッセイ、機能的アッセイ（リン酸化アッセイなど）などが挙げられる。

10

【0336】

生物活性薬剤候補と癌関連タンパク質との結合の測定が、多くの方法において行われ得る。いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補を標識して、結合を直接測定する。例えば、これは、癌関連タンパク質の全部または一部を固体支持体に接着させ、標識された候補薬剤（例えば、蛍光標識）を加え、過剰量の試薬を洗浄し、そしてその標識が固体支持体上に存在するか否かを測定することによって行われ得る。当該分野で公知であるような様々なブロッキング工程および洗浄工程が利用され得る。

20

【0337】

いくつかの実施形態において、成分の1つだけが標識される。例えば、タンパク質（またはタンパク質性候補薬剤）を、125Iを使用してチロシンの位置で標識し得るか、またはフルオロフォアで標識し得る。あるいは、2つ以上の成分を異なる標識；例えば、タンパク質については125Iおよび候補薬剤についてはフルオロフォアを使用して標識してもよい。

【0338】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補の結合は、競合結合アッセイの使用を介して測定される。いくつかの実施形態において、競合相手は、標的分子（すなわち癌関連タンパク質）に結合することが公知である結合部分（例えば、抗体、ペプチド、結合パートナー、リガンドなど）である。ある一定の状況下では、生物活性薬剤と結合部分との間で競合的結合が起き得て、結合部分が、生物活性薬剤を置換する。

30

【0339】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補が標識される。生物活性薬剤候補もしくはその競合相手のいずれかまたはそれらの両方が存在する場合、まず、結合させるのに十分な時間に亘ってタンパク質に加えられる。インキュベーションは、最適な活性を高める任意の温度、代表的には4〜40℃で行われ得る。インキュベーションの時間は、最適な活性について選択されるが、迅速なハイスループットスクリーニングを容易にするために最適化されてもよい。代表的には、0.1〜1時間で十分である。過剰の試薬は、一般に除去されるか、または洗浄される。次いで、第2の成分を加え、そして標識された成分の存在の有無を調べることにより、結合が示唆される。

40

【0340】

いくつかの実施形態において、競合相手が初めに加えられ、その後、生物活性薬剤候補が加えられる。競合相手の置換は、候補生物活性薬剤が、癌関連タンパク質に結合すること、その結果、癌関連タンパク質に結合することができること、および癌関連タンパク質の活性を調節できる可能性を示唆する。いくつかの実施形態において、いずれかの成分が標識され得る。従って、例えば、競合相手が標識される場合、洗浄溶液中の標識の存在は、その薬剤によって置換されていることを示す。いくつかの実施形態において、生物活性

50

薬剤候補が標識される場合、支持体上の標識の存在は、置換を示唆する。

【0341】

いくつかの実施形態において、生物活性薬剤候補が初めに加えられて、インキュベーションおよび洗浄の後、競合相手が加えられる。競合相手による結合が存在しない場合、その生物活性薬剤が癌関連タンパク質と高いアフィニティーに結合していることが示唆される。従って、生物活性薬剤候補が標識される場合、競合相手の結合を欠いた支持体上の標識の存在は、候補薬剤が、癌関連タンパク質に結合することができることを示唆し得る。

【0342】

いくつかの実施形態において、それらの方法は、癌関連タンパク質の活性を調節することができる生物活性薬剤を同定するディファレンシャルスクリーニングを含む。この実施形態において、上記方法は、第1のサンプル中で癌関連タンパク質と競合相手とを結合させる工程を含む。第2のサンプルは、生物活性薬剤候補、癌関連タンパク質および競合相手を含む。競合相手の結合を、両方のサンプルについて測定し、2つのサンプル間の結合の変化または差異は、癌関連タンパク質に結合することができ、そしてその活性を調節する可能性を有する薬剤の存在を示唆する。つまり、競合相手の結合が第1のサンプルと比べて第2のサンプルにおいて異なっている場合、その薬剤は、癌関連タンパク質に結合することができる。

【0343】

いくつかの実施形態において、ネイティブの癌関連タンパク質に結合するが、改変癌関連タンパク質に結合できない薬物候補を同定するディファレンシャルスクリーニングが利用される。癌関連タンパク質の構造が、モデル化され得、そして、それを合理的な薬物設計に使用して、その部位と相互作用する薬剤を合成し得る。癌関連生物活性に影響を与える薬物候補はまた、タンパク質の活性を高めるか、または下げるかのいずれかの能力について薬物をスクリーニングすることによっても同定される。

【0344】

ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールが、上記アッセイに使用され得る。いくつかの実施形態において、すべ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少なくとも3つ組で行われる。すべてのサンプルのインキュベーションは、薬剤とタンパク質との結合に十分な時間である。インキュベーション後、すべてのサンプルを非特異的に結合している材料を無くすように洗浄し、そして結合している、一般に標識された薬剤の量が測定される。例えば、放射性標識が使用されている場合、そのサンプルを、シンチレーションカウンターで計測することにより、結合している化合物の量が決定され得る。

【0345】

他の種々の試薬が、スクリーニングアッセイに含まれ得る。これらとしては、塩、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、界面活性剤などのような試薬が挙げられ、これらは、最適なタンパク質-タンパク質結合を促進し、そして／または非特異的な相互作用もしくはバックグラウンド相互作用を減少させるために使用され得る。別の方法でアッセイの効率を改善する試薬（例えば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤など）も使用してもよい。成分の混合物は、必要な結合を提供する任意の順序で加えられ得る。

【0346】

癌関連タンパク質の活性を調節する薬剤についてのスクリーニングもまた、行われ得る。いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質の活性を調節することができる生物活性薬剤についてのスクリーニングのための方法は、上記のように生物活性薬剤候補を癌関連タンパク質のサンプルに加える工程および癌関連タンパク質の生物学的活性の変化を測定する工程を含む。「癌関連タンパク質の活性を調節する」とは、活性の増大、活性の低下または存在する活性のタイプもしくは種類の変化を含む。従って、いくつかの実施形態において、候補薬剤は、癌関連タンパク質に結合するべきであり（このことは必ずしも必要ではないが）、かつ、本明細書中で定義するようなその生物学的または生化学的な活性

10

20

30

40

50

を変化させるべきである。上記方法は、上でほぼ概要を述べたようなインビトロスクリーニング法と癌関連タンパク質の存在、分布、活性または量の変化についての細胞のインビボスクリーニングの両方を含む。

【0347】

従って、いくつかの実施形態において、上記方法は、癌関連サンプルと生物活性薬剤候補とを結合させる工程および癌関連活性に対する効果を評価する工程を含む。本明細書中で「癌関連活性」または文法上の同義語は、癌関連タンパク質の生物学的活性の1つを意味し、それらとしては、細胞分裂、細胞増殖、腫瘍成長、癌細胞生存および細胞の形質転換を含む腫瘍形成におけるそのタンパク質の役割が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、癌関連活性は、上で同定されたような癌関連遺伝子由来の核酸によってコードされるタンパク質の活性化またはそのタンパク質による活性化を含む。癌関連活性のインヒビターは、1以上の任意の癌関連活性のインヒビターである。

10

【0348】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質の活性が増大する；いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質の活性が減少する。従って、いくつかの実施形態において、生物活性薬剤は、アンタゴニストであり、いくつかの実施形態において、生物活性薬剤は、アゴニストである。

【0349】

いくつかの実施形態において、本発明は、癌関連タンパク質の活性を調節することができる生物活性薬剤についてスクリーニングするための方法を提供する。上記方法は、上で定義したように生物活性薬剤候補を、癌関連タンパク質を含む細胞に加える工程を含む。好ましい細胞タイプは、任意のほとんどの細胞を含む。それらの細胞は、癌関連タンパク質をコードする組換え核酸を含む。いくつかの実施形態において、候補薬剤ノライブラリーは、複数の細胞について試験される。

20

【0350】

いくつかの実施形態において、アッセイは、生理学的シグナル、例えば、ホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、成長因子、活動電位、化学療法薬を含む薬理学的物質、放射線照射、発癌物質または他の細胞（すなわち細胞-細胞接触）の有無またはそれらの曝露の前後において評価される。いくつかの実施形態において、測定は、様々な段階の細胞周期プロセスにおいて測定される。

30

【0351】

このようにして、生物活性薬剤は同定される。薬理学的活性を有する化合物は、癌関連タンパク質の活性を高めることができるか、または干渉することができる。

【0352】

（癌の診断および処置）

癌の細胞分裂を阻害する方法が本発明によって提供される。いくつかの実施形態において、腫瘍成長を阻害する方法が提供される。いくつかの実施形態において、細胞または癌を有する個体を処置する方法が提供される。

【0353】

上記方法は、癌インヒビターの投与を含み得る。いくつかの実施形態において、上記癌インヒビターは、アンチセンス分子、薬学的組成物、治療薬もしくは小分子またはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態において、治療薬は、抗体と結合される。いくつかの実施形態において、治療薬は、モノクローナル抗体と結合される。

40

【0354】

個体における癌細胞の検出または診断のための方法も提供される。いくつかの実施形態において、診断薬剤／検出薬剤は、本発明に記載の癌関連タンパク質に優先的に結合する小分子である。いくつかの実施形態において、診断薬剤／検出薬剤は、抗体である。

【0355】

本発明のいくつかの実施形態において、動物モデルおよびトランスジェニック動物が提

50

供され、それらは、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、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌または皮膚癌の動物モデルを作製する際に使用される。

【0356】

(a) アンチセンス分子

使用される癌インヒビターは、アンチセンス分子であり得る。アンチセンス分子は、本明細書中で使用されるとき、癌分子に対する標的mRNA（センス）配列または標的DNA（アンチセンス）配列に結合することができる一本鎖核酸配列（RNAまたはDNAのいずれか）を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドを含む。本発明によれば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドは、一般に約14～約30ヌクレオチドのフラグメントを含む。所与のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドを得る能力については、例えば、Stein and Cohen, Cancer Res. 48:2659, (1988) および van der Krol et al., BioTechniques 6:958, (1988) に記載されている。

【0357】

アンチセンス分子は、改変または未改変のRNA、DNAまたは混合ポリマーオリゴヌクレオチドであり得る。これらの分子は、マッチする配列に特異的に結合して機能し、立体的な阻害またはRNase H酵素の活性化のいずれかによってペプチド合成の阻害を生じる(Wu-Pong, Nov 1994, BioPharm, 20-33)。アンチセンス分子はまた、RNAプロセッシングまたは核から細胞質への輸送を干渉することによってタンパク質合成を変化することができる(Mukhopadhyay & Roth, 1996, Crit. Rev. in Oncogenesis 7, 151-190)。さらに、一本鎖DNAとRNAとの結合により、ヘテロ二重鎖のヌクレアーゼ媒介性分解が生じ得る(Wu-Pong, 前出)。RNase Hに対する基質として作用することが示されている骨格改変DNA化学は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボロントリフルオリデートおよび2'-arabinoおよび2'-フルオロarabino含有オリゴヌクレオチドである。

【0358】

アンチセンス分子は、WO91/04753に記載されているように、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に導入され得る。適当なリガンド結合分子としては、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカインまたは細胞表面レセプターに結合する他のリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、リガンド結合分子の結合体化は、実質的に、リガンド結合分子がその対応する分子またはレセプターに結合する能力を干渉しないか、またはセンスオリゴヌクレオチドもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその結合体化バージョンが細胞に侵入することを阻害しない。いくつかの実施形態において、センスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO90/10448に記載されているように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体が形成されることによって、標的核酸配列を含む細胞に導入され得る。アンチセンス分子またはノックアウトモデルおよびノックインモデルの使用もまた、処置の方法に加えて、上で記述したようにスクリーニングアッセイにおいて使用されることが理解される。

【0359】

(b) RNA干渉

RNA干渉とは、低分子干渉RNA (siRNA) によって媒介される動物における、配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングのプロセスのことをいう(Fire et al, Nature, 391, 806 (1998))。植物において対応するプロセスは、転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと呼ばれ、また、真菌においてはクウェリング(queiling)と呼ばれている。細胞中のdsRNAの存在は、まだ完全に特徴付けられていないメカニズムを介してRNAi応答を引き起こす。このメカ

ニズムは、リボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断を生じるタンパク質キナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレート合成酵素のdsRNA媒介性活性化に起因するインターフェロン応答とは異なるようである(Sharp, P. A., RNA interference-2001, Genes & Development 15: 485-490 (2001)に概説されている)。

【0360】

低分子干渉RNA (siRNA)は、RNA干渉(RNAi)として知られるプロセスを介して培養哺乳動物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); Caplen, N.J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-9747 (2001); Harborth, J. et al. J. Cell Sci. 114: 4557-4565 (2001)。用語「低分子干渉RNA」または「siRNA」とは、RNA干渉「RNAi」が可能な二本鎖核酸分子のことをいう(Kreutzer et al., WO00/44895; Zernicka-Goetz et al. WO01/36646; Fire, WO99/32619; Mello and Fire, WO01/29058を参照のこと)。本明細書中で使用されるとき、siRNA分子は、RNA分子に限られるが、化学修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドもさらに包含する。siRNA遺伝子標的化実験は、細胞への一過性のsiRNA導入によって行われる(リボソーム媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションなどの従来の方法によって達成される)。

【0361】

siRNAの分子は、15~30ヌクレオチドRNA、18~25ヌクレオチドRNAまたは21~23ヌクレオチドRNAであり、RNAiを正常に開始する長鎖二本鎖RNA(dsRNA)のRNaseIII処理産物に類似の、特徴的な2~3ヌクレオチドの3'-オーバーハング末端を有する。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誘導サイレンシング複合体)のまた同定されていないタンパク質と会合して、次いで標的mRNA切断を導く。標的mRNAの分解の結果として、対応するタンパク質産物の抑制を特徴とする特定の表現型を有する細胞が得られる。従来のアンチセンス分子と比較して小さいサイズのsiRNAは、哺乳動物細胞に存在するdsRNA誘導性インターフェロン系の活性化を防ぐ。このことは、体細胞において30塩基対より長いdsRNAによって通常もたらされる非特異的表現型が回避される。

【0362】

小さなRNA分子の細胞内の転写は、siRNA鋳型をRNAポリメラーゼIII(PolIII)転写単位にクローニングすることによって達成され、これは、通常、核内低分子RNA(snRNA)U6またはヒトRNaseP RNA H1をコードする。siRNAを発現するための2つのアプローチが開発されている: 第1に、siRNA二重鎖を構成するセンス鎖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こと(Lee, N. S. et al. Nat. Biotechnol. 20, 500-505 (2002); Miyagishi, M. & Taira, K. Nat. Biotechnol. 20, 497-500 (2002).); 第2に、siRNAが、細胞内プロセッシング後にsiRNAを生じるホールドバックステムループ構造として発現されること(Paul, C.P. et al. Nat. Biotechnol. 20: 505-508 (2002))。導入されたDNA鋳型からのsiRNAの内在性発現は、外来性siRNA送達のいくつかの限界、特に、表現型の一過性の喪失を克服すると考えられている。U6およびH1RNAプロモーターは、III型クラスのPolIIIプロモーターのメンバーである(Paule, M. R. & White, R.J. Nucleic Acids Res. 28, 1283-1298 (2000))。

【0363】

センスsiRNAおよびアンチセンスsiRNAの共発現は、標的遺伝子のサイレンシ

ングを媒介する一方で、センス *siRNA* またはアンチセンス *siRNA* 単独の発現は、標的遺伝子発現に大きな影響を与えない。*RNAse* 混入の危険性および化学合成 *siRNA* または *siRNA* 転写キットのコストを考慮すると、合成 *siRNA* ではなく、プラスミド DNA のトランスフェクションが、有利であるようである。*siRNA* の安定な発現は、持続性のウイルス感染の処置などの新たな遺伝子治療用途を可能にする。*siRNA* の特異性の高さを考慮すると、このアプローチはまた、残存する野生型対立遺伝子を変化させることなく、点変異を有する疾患由来の転写物（例えば、RAS または TP53 癌遺伝子転写物）の標的化も可能にする。最後に、様々なゲノムのハイスループットな配列解析によって、DNA ベースの方法はまた、特に、小型化されたアレイベースの表現型のスクリーニングと組み合わせるとき、自動化されたゲノム全体にわたる機能喪失表現型解析についての対費用効果の高い選択肢であり得る (Ziauddin, J. & Sabatini, D. M. Nature 411: 107-110 (2001))。

【0364】

細胞中の長鎖 *dsRNA* の存在は、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼ III 酵素の活性を刺激する。ダイサーは、*dsRNA* を低分子干渉 RNA (*siRNA*) として知られる *dsRNA* の短片にプロセッシングする際に関与する (Bernstein et al., 2001, Nature, 409: 363 (2001))。ダイサー活性由来の低分子干渉 RNA は、代表的には、約 21~23 ヌクレオチド長であり、約 19 塩基対の二重鎖を含む。ダイサーはまた、翻訳制御に関係している保存された構造の前駆体 RNA から 21 および 22 ヌクレオチドの一過性低分子 RNA (*small temporal RNA*; *stRNA*) の切除に関係している (Hutvagner et al., Science, 293, 834 (2001))。RNAi 応答はまた、通常、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) と呼ばれる、*siRNA* を含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とする。RISC は、*siRNA* に相同な配列を有する一本鎖 RNA の切断を媒介する。標的 RNA の切断は、*siRNA* 二重鎖のガイド配列に相補的な領域の中央で起こる (Elbashir et al., Genes Dev., 15, 188 (2001))。

【0365】

本発明は、癌関連配列に特異的にハイブリダイズすることができる配列を含む、単離された核酸分子を含む発現系を提供する。いくつかの実施形態において、上記核酸分子は、癌関連タンパク質の発現を阻害することができる。短い RNA のベクター指向型発現による細胞内の癌関連遺伝子発現の発現を阻害する方法において、この短い RNA は、それ自体で折り畳むことが可能であり、癌関連 mRNA 配列同一性を有する二本鎖 RNA を生じ得、そして、細胞内の癌関連遺伝子の転写後遺伝子サイレンシングまたは RNA 干渉 (RNAi) を引き起こし得る。いくつかの実施形態において、癌関連 mRNA 配列同一性を有する短い二本鎖 RNA を細胞内に送達することにより、癌関連遺伝子の転写後遺伝子サイレンシングまたは RNAi が引き起こされる。様々な実施形態において、核酸分子は、少なくとも 7mer、少なくとも 10mer または少なくとも 20mer である。いくつかの実施形態において、配列は、特有のものである。

【0366】

いくつかの実施形態において、*siRNA* オリゴヌクレオチドは、配列番号 1~144 からなる群から選択される配列を有する。

【0367】

(c) 薬学的組成物

本発明によって包含される薬学的組成物としては、活性薬剤として、本明細書中において開示される、治療有効量の本発明のポリペプチド、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抗体が挙げられる。「有効量」とは、臨床結果を含む、有益な結果または所望の結果に影響を与えるのに十分な量のことである。有効量じゃ、1 回以上の投与で投与され得る。本発明の目的で、アデノウイルスベクターの有効量は、疾患状態の進行を緩和するか、寛解するか、安定化するか、逆転するか、遅くするか、または遅延す

るのに十分な量のことである。

【0368】

上記組成物を使用して、癌ならびに原発性癌の転移を処置することができる。さらに、薬学的組成物は、例えば、放射線照射または従来の化学療法に対して腫瘍を感作させるために、癌の処置の従来の方法と組み合わせて使用され得る。用語「処置」、「処置する (treating)」、「処置する (treat)」などは、一般に所望の薬理学的効果および／または生理学的効果を得ることをいうために、本明細書中で使用される。上記効果は、疾患もしくはそれらの症状を完全または部分的に予防することに関して予防的であり得、そして／あるいは、疾患および／またはその疾患に起因しうる有害作用についての、部分的な安定性もしくは治癒、または完全な安定性もしくは治癒に関して治療的であり得る。「処置」は、本明細書中で使用されるとき、哺乳動物、特に、ヒトにおける疾患の任意の処置を網羅し、その「処置」としては：(a) 疾患または症状に罹患されやすくなっている可能性があるが、疾患または症状を有するとまだ診断されていない被験体においてその疾患または症状の発生を予防すること；(b) 疾患症状を阻害すること、すなわち、その発症を停止すること；または(c) 疾患症状を軽減すること、すなわち、疾患または症状の後退を引き起こすことが挙げられる。

10

【0369】

薬学的組成物が、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、その抗体は、処置部位への送達用の薬物に結合され得るか、または前立腺癌細胞などの癌細胞を含む部位の画像化を容易にするために検出可能な標識に結合され得る。薬物および検出可能な標識に抗体を結合するための方法は、検出可能な標識を使用して画像化するための方法と同様に当該分野で周知である。

20

【0370】

いくつかの実施形態において、本発明に記載の抗体および薬学的に適当なキャリア、賦形剤または希釈剤を含む薬学的組成物が提供される。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、さらに、第2の治療薬を含む。なおも別の実施形態において、上記第2の治療薬は、癌化学療法剤である。

【0371】

本発明の目的で、「患者」は、ヒトと他の動物（特に哺乳動物）の両方および生物体を含む。従って、方法は、ヒトの治療および獣医学的用途の両方に適用可能である。いくつかの実施形態において、患者は、哺乳動物であり、好ましくは、患者は、ヒトである。1つの標的 patient 集団は、癌、特に、本明細書中で述べられている特定の癌のタイプの処置を現在受けているすべての患者を含む。これらの患者集団のサブセットは、以前処置されたこのタイプの癌の再発を過去6ヶ月間に経験している患者および過去6ヶ月間に疾患が進行した患者を含む。

30

【0372】

用語「治療有効量」とは、本明細書中で使用されるとき、所望の疾患または状態を処置、寛解または予防するか、または検出可能な治療的または予防的効果を示す治療薬の量のことをいう。その効果は、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得る。治療的効果はまた、身体的な症状の低減（体温の低下など）を含む。被験体にとっての正確な有効量は、被験体の大きさおよび健康状態、状態の性質および程度ならびに投与のために選択される治療薬または治療薬の組み合わせに依存する。所与の状況のための有効量は、日常的な実験によって決定され、臨床医の判断の範囲内である。本発明の目的で、有効用量は、一般に、投与される個体において、本発明の組成物の約0.01mg/kg～約5mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kgまたは約0.05mg/kg～約10mg/kgである。

40

【0373】

薬学的組成物はまた、薬学的に許容可能なキャリアを含み得る。用語「薬学的に許容可能なキャリア」とは、治療薬（例えば、抗体またはポリペプチド、遺伝子および他の治療薬）の投与のためのキャリアのことをいう。この用語は、それ自体がその組成物を投与さ

50

れる個体によって有害である抗体の産生を誘導せず、過度の毒性を有さずに投与され得る任意の薬学的キャリアのことをいう。適当なキャリアは、大きく、ゆっくりと代謝される高分子（例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸重合体、アミノ酸共重合体および不活性なウイルス粒子）であり得る。そのようなキャリアは、当業者に周知である。治療組成物において薬学的に許容可能なキャリアとしては、液体（例えば、水、食塩水、グリセロールおよびエタノール）が挙げられ得る。補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質など）もまた、そのようなビヒクル中に存在し得る。いくつかの実施形態において、治療組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとしての注射液として調製され；注射前に液体ビヒクル中の溶液または懸濁液に適した固形もまた、調製され得る。リポソームは、薬学的に許容可能なキャリアの定義内に含まれる。薬学的に許容可能な塩もまた、薬学的組成物中に存在し得る。その塩としては、例えば、鉍酸塩（例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩）など；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）などが挙げられる。薬学的に許容可能な賦形剤の詳細な記述は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkinsで入手可能である。

10

【0374】

薬学的組成物は、様々な形態（例えば、顆粒剤、錠剤、丸剤、坐剤、カプセル、懸濁液、軟膏、ローションなど）で調製され得る。経口使用および局所的使用に適した薬学的等級の有機キャリアもしくは無機キャリアおよび／または希釈剤を使用して、治療的に活性な化合物を含む組成物を作製することができる。当該分野で公知の希釈剤としては、水性媒体、植物油および動物油ならびに脂肪が挙げられる。安定化剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変化させるための塩または適切なpH値に安定化するための緩衝液ならびに皮膚浸透増強剤は、補助剤として使用され得る。

20

【0375】

本発明の薬学的組成物は、患者への投与に適した形態で癌関連タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、酸付加塩と塩基付加塩の両方を含むと意味される、薬学的に許容可能な塩として存在するなどの水溶性の形態である。「薬学的に許容可能な酸付加塩」とは、遊離塩基の生物学的有効性を保持し、そして生物学的にか、または別で望ましくなくない塩のことをいい、それらは、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など）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、桂皮酸、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、サリチル酸など）と形成されるものである。「薬学的に許容可能な塩基付加塩」としては、無機塩基から誘導される塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、マンガン塩、アルミニウム塩など）が挙げられる。特に好ましいのは、アンモニウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩である。薬学的に許容可能な非毒性有機塩基から誘導される塩としては、第1級アミン、第2級アミンおよび第3級アミン、天然に存在する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樹脂（例えば、イソプロピルアミン、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）の塩が挙げられる。

30

40

【0376】

薬学的組成物はまた、以下：血清アルブミンなどのキャリアタンパク質；緩衝液；賦形剤（例えば、微結晶性セルロース、ラクトース、トウモロコシおよび他のデンプン；結合剤；甘味料および他の矯味矯臭剤；着色剤；ならびにポリエチレングリコール、の1以上を含み得る。添加物は、当該分野で周知であり、種々の処方物において使用される。

【0377】

所望の薬理学的活性を有する化合物は、上で記載したような生理的に許容可能なキャリ

50

アとともに宿主に投与され得る。薬学的組成物は、種々の経路で投与され得る。それらの経路としては、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、くも膜下腔内 (intrathecal)、心室内 (intraventricular)、経皮的 (transdermal) または経皮的 (transcutaneous) な適用 (例えば、WO98/20734 を参照のこと)、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所的、舌下、腔内または直腸手段が挙げられるがこれらに限定されない。導入の様式に応じて、化合物は、種々の方法において処方され得る。処方物中の治療的に活性な化合物の濃度は、約 0.1 ~ 100 重量% / 容積の範囲で変動し得る。一旦、処方されると、本発明によって企図される組成物は、(1) 被験体に直接投与され得る (例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、小分子アゴニストまたは小分子アンタゴニストなどとして) ; または (2) エキソビボで被験体由来の細胞に送達され得る (例えば、エキソビボ遺伝子治療として)。組成物の直接送達は、一般に、非経口注入 (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間質腔への注入) によって達成される。投与の他の様式としては、経口投与および肺への投与、坐剤および経皮的適用、針および遺伝子ガン (ワールドワイドウェブサイト powderject.com を参照のこと) またはハイボスプレーが挙げられる。投薬処置は、単一用量スケジュールまたは反復投与スケジュールであり得る。

10

【0378】

エキソビボ送達および形質転換細胞の被験体への再移植についての方法は、当該分野で公知であり、例えば、WO93/14778 に記載されている。エキソビボ適用に有用な細胞の例としては、例えば、幹細胞、特に、造血性 (hematopoietic) 幹細胞、リンパ細胞、マクロファージ、樹状細胞または腫瘍細胞が挙げられる。一般に、エキソビボ適用とインビトロ適用の両方のための核酸の送達は、例えば、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリボソーム内への封入および DNA の核への直接マイクロインジェクションによって達成され得る。これらのすべてが当該分野で周知である。

20

【0379】

一旦、本明細書中に記載される癌関連ポリヌクレオチドに対応する遺伝子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) と相関することが見出されると、その障害は、提供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する分子 (例えば、アンチセンス、リボザイムなど) に基づいた治療薬の投与によって処置されやすくなり得る。他の実施形態において、障害は、例えば、正常細胞と比較して癌性細胞において発現が増加している遺伝子のコードされた遺伝子産物の機能のインヒビター (アンタゴニスト) または (例えば、腫瘍抑制因子として作用する遺伝子産物の活性を促進するために) 癌性細胞において発現が減少している遺伝子産物についてのアゴニストとして働く小分子薬物の投与によって処置されやすくなり得る。

30

【0380】

本発明の薬学的組成物の用量および投与手段は、治療組成物の特定の性質、状態、患者の年齢および体重、疾患の進行ならびに他の関連因子に基づいて決定される。例えば、ポリヌクレオチド治療組成物薬剤の投与としては、局所投与または全身投与が挙げられ、それらとしては、注入、経口投与、パーティクルガンまたはカテーテル投与および局所投与が挙げられる。好ましくは、治療的ポリヌクレオチド組成物は、本明細書中に開示されるポリヌクレオチドの少なくとも 12 個の連続する nt、22 個の連続する nt、25 個の連続する nt、30 個の連続する nt または 35 個の連続する nt のポリヌクレオチドに作動可能に連結されるプロモーターを含む発現構築物を含む。様々な方法を使用して、治療組成物を身体の特定位に直接投与することができる。例えば、小さい転移性病変が見つかり、そして治療組成物が、腫瘍の塊の内部に数箇所の異なる部位に数回注入される。あるいは、腫瘍に供給している動脈を同定し、腫瘍に直接、治療組成物を送達するために、その組成物をその動脈に注入する。ネクロシスの中心を有する腫瘍が吸引され、今、空になった腫瘍の中心にその組成物を直接注入する。アンチセンス組成物は、例えば、そ

40

50

の組成物の局所的適用によって腫瘍の表面に直接投与される。X線画像化は、上記の特定の送達方法を補助するために使用される。

【0381】

アンチセンスポリヌクレオチド、サブゲノムポリヌクレオチドまたは抗体を含む治療組成物の特定の組織への標的化送達もまた使用され得る。レセプター媒介性DNA送達技術は、例えば、Findeis 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に記載されている。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ールにおいて局所投与のために約100ng～約200mgの範囲のDNAとして投与される。約500ng～約50mg、約1μg～約2mg、約5μg～約500μgおよび約20μg～約100μgの濃度範囲のDNAもまた、遺伝子治療プロトコールの間に使用され得る。作用の方法（例えば、コードされる遺伝子産物のレベルを増大するためまたは阻害するため）および形質転換および発現の有効性のような、アンチセンスサブゲノムポリヌクレオチドの最終的な有効性に必要な用量に影響を与える因子が、考慮される。より広い範囲の組織に亘って、より高い発現が所望される場合、より多い量のアンチセンスサブゲノムポリヌクレオチドもしくは投与の連続的プロトコールにおける同量の再投与または例えば腫瘍部位の様々な隣接組織または近接組織への複数回投与が、正の治療的結果に影響を与えるために必要とされ得る。すべての場合において、臨床試験における日常的な実験によって、最適な治療的効果のための特定の範囲が決定される。

【0382】

本発明の治療的なポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して送達され得る。その遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス起源または非ウイルス起源であり得る（一般に、Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148を参照のこと）。このようなコード配列の発現は、内在性哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを使用して誘導され得る。コード配列の発現は、恒常的であり得るか、または制御され得る。

【0383】

所望のポリヌクレオチドの送達のためのウイルスベースのベクターおよび所望の細胞における発現は、当該分野で周知である。例示的なウイルスベースのビヒクルとしては、組換えレトロウイルス（例えば、WO90/07936; WO94/03622; WO93/25698; WO93/25234; 米国特許5,219,740号; WO93/11230; WO93/10218; 米国特許4,777,127号; 英国特許第2,200,651号; EP0345242; およびWO91/02805を参照のこと）、アルファウイルスベースのベクター（例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス（ATCC VR-67; ATCC VR-1247）、ロス川ウイルス（ATCC VR-373; ATCC VR-1246）およびベネズエラウマ脳炎ウイルス（ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532））およびアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（例えば、WO94/12649, WO93/03769; WO93/19191; WO94/28938; WO95/11984およびWO95/00655を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3

：147に記載されているような殺傷アデノウイルスに連結されたDNAの投与もまた使用され得る。

【0384】

非ウイルス性の送達ビヒクルおよび送達方法もまた使用され得る。それらとしては、殺傷アデノウイルス単独に連結されているかまたは連結されていないポリカチオン性濃縮DNA（例えば、Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147を参照のこと）；リガンド連結DNA（例えば、Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985を参照のこと）；真核細胞送達ビヒクル細胞（例えば、US 5, 814, 482；WO 95/07994；WO 96/17072；WO 95/30763；およびWO 97/42338を参照のこと）および核電荷中和または細胞膜との融合が挙げられるがこれらに限定されない。裸のDNAもまた使用され得る。例示的な裸のDNAの導入方法は、WO 90/11092およびUS 5, 580, 859に記載されている。遺伝子送達ビヒクルとして作用し得るリボソームは、US 5, 422, 120；WO 95/13796；WO 94/23697；WO 91/14445；およびEP 0524968に記載されている。さらなるアプローチは、Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411およびWoffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581に記載されている。

【0385】

使用に適したさらなる非ウイルス性送達としては、Woffendin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91(24):11581に記載されているアプローチなどの力学的送達系が挙げられる。さらに、コード配列およびその発現産物は、光重合ヒドロゲル材料の沈着または電離放射線の使用を通して送達され得る（例えば、US 5, 206, 152、WO 92/11033を参照のこと）。コード配列の送達のために使用され得る遺伝子送達のための他の従来の方法としては、例えば、ハンドヘルドの(hand-held)遺伝子導入パーティクルガン（例えば、US 5, 149, 655を参照のこと）の使用；導入された遺伝子を活性化するための電離放射線の使用（例えば、米国特許5, 206, 152号およびWO 92/11033を参照のこと）。

【0386】

いくつかの実施形態において、癌関連タンパク質および調節因子は、治療薬として投与され、そして上で概要を述べたように処方され得る。同様に、癌関連遺伝子（癌関連コード領域の全長配列、部分配列または調節配列の両方を含む）は、当該分野で公知であるように遺伝子治療適用において投与され得る。これらの癌関連遺伝子は、当業者によって理解されるように、遺伝子治療（すなわちゲノムへの組込みのため）またはアンチセンス組成物のいずれかとしてアンチセンス適用を含み得る。

【0387】

従って、いくつかの実施形態において、細胞または生物体において癌関連遺伝子活性を調節する方法が提供される。いくつかの実施形態において、その方法は、内在性癌関連タンパク質の生物学的活性を低減または排除する抗癌関連抗体を細胞に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、癌関連タンパク質をコードする組換え核酸を細胞または生物体に投与する工程を含む。当業者によって理解されるように、このことは、多くの任意の方法において達成され得る。いくつかの実施形態において、例えば、癌関連配列が、癌において下方調節されるとき、癌関連発現産物の活性は、例えば、内在性癌関連遺伝子を過剰発現することまたは遺伝子治療技術を使用して癌関連配列をコードする遺伝子を投与することによって、細胞における癌関連発現の量を増加させることによって増大される。いくつかの実施形態において、遺伝子治療技術は、例えば、PCT/US 93/03868（その全体が本明細書によって参考として援用される）に記載されているような増強された相同組換え(EHR)を使用した外来性遺伝子の組込みを含む。いくつかの実施形態において、例えば、癌関連配列が、癌において上方調節されるとき、内在性癌関連遺伝子の活性は、例えば、癌関連アンチセンス核酸の投与によって減少する。

【0388】

(d) ワクチン

いくつかの実施形態において、癌関連遺伝子は、DNA ワクチン、単一遺伝子または癌関連遺伝子の組み合わせのいずれかとして投与される。裸の DNA ワクチンは、一般に当該分野で公知である。Brower, Nature Biotechnology, 16: 1304-1305 (1998)。

【0389】

いくつかの実施形態において、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 ワクチンとして遺伝子を使用するための方法は、当業者に周知であり、その方法は、癌関連遺伝子または癌関連遺伝子の一部を、癌を有する患者において発現させるためのプロモーターの制御下に配置する工程を含む。DNA ワクチンのために使用される癌関連遺伝子は、全長癌関連タンパク質をコードし得るが、より好ましくは、癌関連タンパク質から得られるペプチドを含む癌関連タンパク質の一部をコードする。いくつかの実施形態において、患者は、癌関連遺伝子から得られる複数のヌクレオチド配列を含む DNA ワクチンで免疫される。同様に、複数の癌関連遺伝子またはそれらの一部で患者を免疫することが可能である。理論に束縛されずに、癌関連タンパク質を発現する細胞を認識し、そして破壊または排除する、DNA ワクチンによってコードされるポリペプチドの発現、細胞傷害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞および抗体が誘導される。

【0390】

いくつかの実施形態において、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。そ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性応答を増大するサイトカインを含む。さらなるアジュバントまたは別のアジュバントは、当業者に公知であり、本発明における用途を見出す。

【0391】

(e) 抗体

上記の癌関連抗体は、多くの適用における用途を見出す。例えば、癌関連抗体は、標準的なアフィニティークロマトグラフィカラムに結合され得、そして癌関連タンパク質を精製するために使用され得る。それらの抗体はまた、癌関連タンパク質に特異的に結合するため、上で概要を述べたようにブロックングポリペプチドとして、治療的に使用され得る。

【0392】

本発明は、さらに、コードされるポリペプチドに特異的な抗体を使用して、生物学的サンプル中のポリペプチドの存在を検出するための方法および／または生物学的サンプル中のポリペプチドのレベルを測定するための方法を提供する。ここで、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。上記方法は、一般に：a) サンプルと、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特異的な抗体とを接触させる工程；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工程を含む。

【0393】

適当なコントロールと比較するとき、コードされる癌関連ポリペプチドに特異的な抗体の特異的結合の検出は、コードされるポリペプチドがサンプル中に存在することを示す。適当なコントロールとしては、コードされる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高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（例えば、正常組織）、およびコードされるポリペプチドに特異的でない抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）と接触されるサンプルが挙げられる。特異的な抗体-抗原相互作用を検出する種々の方法は、当該分野で公知であり、標準的な免疫組織学的方法、免疫沈降、酵素免疫測定法およびラジオイムノアッセイが挙げられるがこれらに限定されない方法において使用され得る。一般に、特定の抗体は、直接的または間接的に検出可能に標識される。直接標識としては、放射性同位体；生成物が検出可能である酵素（例えば、ルシフェラーゼ

、 β -ガラクトシダーゼなど)；蛍光標識(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリンなど)；EDTAなどの金属キレート基を介して抗体に結合される蛍光放射金属(例えば、 ^{152}Eu または他のランタン系列)；化学発光化合物、例えば、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウム塩など；生物発光化合物、例えば、ルシフェリン、エクオリン(緑色蛍光タンパク質)などが挙げられる。抗体は、不溶性支持体(例えば、ポリスチレンプレートまたはビーズ)に接着(結合)され得る。間接的標識としては、コードされるポリペプチドに特異的な抗体(「特異的1次抗体」)に特異的な2次抗体(ここで、2次抗体は、上記のように標識される)；および特異的結合対(例えば、ビオチン-アビジンなど)のメンバーが挙げられる。生物学的サンプルは、細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定化することができるニトロセルロースなどの固体支持体またはキャリアと接触され、そしてそれに固定化され得る。次いで、その支持体は、適当な緩衝液で洗浄され得、続いて、検出可能に標識された1次特異的抗体と接触され得る。検出方法は、当該分野で公知であり、検出可能な標識によって放出されるシグナルに適するように選択される。検出は、一般に、適当なコントロールおよび適切な標準と比較して達成される。

10

【0394】

いくつかの実施形態において、その方法は、例えば、癌細胞が存在する部位を見つけるか、または同定するために、インビボにおける使用に適合させる。これらの実施形態において、検出可能に標識された部分、例えば、癌関連ポリペプチドに特異的な抗体は、個体に(例えば、注入によって)投与され、標準的な画像化技術を使用して標識細胞を位置づける。その画像化技術としては、磁気共鳴画像、コンピュータ断層撮影スキャニングなどが挙げられるがこれらに限定されない。この様式において、癌細胞は、区別して標識される。

20

【0395】

(f) 癌の検出および診断のための他の方法

理論に束縛されずに、本明細書中に開示される様々な癌関連配列は、癌において重要であるようである。従って、癌関連遺伝子の変異体または改変体に基づいた障害が決定され得る。いくつかの実施形態において、本発明は、改変体癌関連遺伝子を含む細胞を同定するための方法を提供し、この方法は、細胞における少なくとも1つの内在性癌関連遺伝子の配列の全部または一部を決定する工程を含む。当業者によって理解されるように、これは、多くの任意の配列決定技術を使用して行われ得る。いくつかの実施形態において、本発明は、個体の癌関連遺伝子型を同定するための方法を提供し、この方法は、個体の少なくとも1つの癌関連遺伝子の配列の全部または一部を決定する工程を含む。これは、一般に、個体の少なくとも1つの組織において行われ、多くの組織または同じ組織の異なるサンプルの評価を含み得る。この方法は、配列決定された癌関連遺伝子の配列を公知の癌関連遺伝子、すなわち、野生型遺伝子と比較する工程を含み得る。当業者によって理解されるように、いくつかの癌関連遺伝子の配列における変化は、疾患の存在または疾患を発症する性質のいずれかの示唆または予後評価であり得る。

30

【0396】

そして、癌関連遺伝子の全部または一部の配列は、公知の癌関連遺伝子の配列と比較することにより、任意の差が存在するか否かを判定することができる。これは、多くの任意の公知の相同性プログラム(例えば、Bestfitなど)を使用して行われ得る。いくつかの実施形態において、患者の癌関連遺伝子と公知の癌関連遺伝子との間の配列の差の存在は、本明細書中で概要を述べるように、疾患状態または疾患状態についての性質を示唆する。

40

【0397】

いくつかの実施形態において、癌関連遺伝子は、ゲノム中の癌関連遺伝子のコピー数を決定するプローブとして使用される。例えば、いくつかの癌は、染色体の欠失または挿入を示し、その結果、遺伝子のコピー数の変化が生じる。

【0398】

50

いくつかの実施形態において、癌関連遺伝子は、癌関連遺伝子の染色体位置を決定するためのプローブとして使用される。特に、転座などの染色体異常が癌関連遺伝子座において同定されるとき、染色体位置などの情報は、診断または予後診断を提供する際の用途を見出す。

【0399】

本発明は、癌細胞を検出し、被験体における癌および癌の重症度（例えば、腫瘍のグレード、腫瘍の負荷など）の診断を容易にし、被験体の予後の判定を容易にし、そして治療に対する被験体の反応性を評価する（例えば、例えば、化学療法レジメンの間またはその後の腫瘍の負荷の評価を介して治療的効果の測定を提供することによって）ために本明細書中に記載されるポリヌクレオチドを使用する方法を提供する。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き得る。本発明の検出方法は、単離細胞または組織全体または体液（例えば、血液、血漿、血清、尿など）においてインビトロまたはインビボにおいて行われ得る。

【0400】

いくつかの実施形態において、癌細胞において差次的に発現される転写物の細胞内発現を検出することによって癌細胞を検出するための方法が、提供される。種々の公知の方法のいずれかが、検出に使用され得る。それらとしては、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とのハイブリダイゼーションによる転写物の検出；特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用した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使用する細胞のインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられるがこれらに限定されない。これらの方法を使用して、癌細胞において差次的に発現される遺伝子を検出することができ、そして／または癌細胞において差次的に発現される遺伝子のmRNAレベルを測定することができる。いくつかの実施形態において、これらの方法は：a) サンプルを、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本明細書中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と接触させる工程；およびb) 存在する場合、ハイブリダイゼーションを検出する工程を含む。

【0401】

適当なコントロールと比較するときのディファレンシャルハイブリダイゼーションの検出は、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サンプル中の存在を示唆する。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」の標識ポリ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が可能な条件は、当該分野で公知であり、上でより詳細に記載してきた。検出はまた、任意の公知の方法によっても達成され得る。それらとしては、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」ブロットイングもしくはRNAブロットイングまたは適当に標識されたポリヌクレオチドを使用したこのような技術の組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。ポリヌクレオチドのための種々の標識および標識方法は、当該分野で公知であり、本発明のアッセイ方法において使用され得る。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判定され得る。

【0402】

本明細書中で提供されるポリヌクレオチドの少なくとも10nt、少なくとも12ntまたは少なくとも15の近接するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、一般に、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転写レベルの測定のためのプローブとして使用される。当業者によって容易に理解されるように、そのプロ

ープは、検出可能に標識され得、そして、例えば、試験サンプル（例えば、mRNA）から得られる固定化されたポリヌクレオチドを含むアレイと接触され得る。あるいは、そのプローブがアレイ上に固定化され得、そして試験サンプルが検出可能に標識され得る。本発明の方法のこれらの変法および他の変法は、十分に当該分野の技術の範囲内であり、本発明の範囲内である。

【0403】

ヌクレオチドプローブは、提供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使用される。ノーザンブロットにおいて、mRNAは、電気泳動的に分離され、そしてプローブと接触する。プローブは、特定のサイズのmRNA種にハイブリダイズするとき検出される。ハイブリダイゼーションの量は、例えば、特定の条件下で発現の相対量を決定するために定量され得る。プローブは、発現を検出するために細胞とのインサイチュハイブリダイゼーションに使用される。プローブはまた、ハイブリダイズする配列の診断的検出にインビボで使用され得る。プローブは、代表的には、放射性同位体で標識される。他のタイプの検出可能な標識（例えば、発色団、フルオロフォアおよび酵素）が使用され得る。ヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイの他の例は、WO 92/02526 および米国特許 5,124,246 号に記載されている。

【0404】

PCRは、少量の標的核酸を検出するための別の手段である（例えば、Mullis et al., Meth. Enzymol. (1987) 155:335; 米国特許 4,683,195 号; および米国特許 4,683,202 号を参照のこと）。標的核酸とハイブリダイズする2種類のプライマーオリゴヌクレオチドを使用して、反応をプライムする。それらのプライマーは、本明細書中に開示される癌関連ポリヌクレオチドの配列内または癌関連ポリヌクレオチドの3'および5'の配列から構成され得る。あるいは、プライマーがこれらのポリヌクレオチドに対して3'および5'である場合、それらは、それらまたは相補体にハイブリダイズする必要はない。熱安定性ポリメラーゼで標的を増幅した後、増幅された標的核酸は、当該分野で公知の方法、例えば、サザンブロットによって検出され得る。mRNAまたはcDNAもまた、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) に記載されている従来のブロッティング技術（例えば、サザンブロット、ノーザンブロットなど）（例えば、PCR増幅なしで）によって検出され得る。一般に、mRNAまたはポリメラーゼ酵素を使用してmRNAから生成されるcDNAは、精製され得、そしてゲル電気泳動を使用して分離され得、そしてニトロセルロースなどの固体支持体に転写され得る。その固体支持体を標識プローブに暴露し、任意のハイブリダイズしていないプローブを除去するために洗浄し、そして標識プローブを含む二重鎖を検出する。

【0405】

PCR増幅を使用する方法は、単一細胞由来のDNAを用いて行われ得るが、少なくとも約105細胞を使用するのが都合がよい。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、そして最新技術の概説は、Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, pp. 14.2-14.33に見られる。検出可能な標識は、増幅反応に含まれ得る。適当な検出可能な標識としては、蛍光色素（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、Texas Red、フィコエリトリン、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））、放射性標識（例えば、32P、35S、3Hなど）などが挙げられる。標識は2段階の系であり得、ポリヌクレオチドが、高アフィ

ニティー結合パートナー（例えば、アビジン、特異的抗体など）を有するビオチン、ハプテンなどと結合体化される。ここで、その結合パートナーが、検出可能な標識に結合体化されている。標識は、プライマーの一方または両方と結合体化され得る。あるいは、増幅産物に標識を取り込ませるために、増幅に使用されるヌクレオチドのプールが標識される。

【0406】

検出方法に使用される試薬は、キットの一部として提供され得る。従って、本発明は、さらに、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドおよび／もしくは生物学的サンプルにおいてそれらによってコードされるポリペプチドの存在ならびに／またはレベルを検出する（例えば、差次的に発現される目的の遺伝子によってコードされるmRNAの検出によって）ためのキットを提供する。これらのキットを使用する手順は、臨床検査室、実験室、開業医または各個人によって行われ得る。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、ポリペプチドと特異的に結合する部分を備え得る。その部分は、ポリペプチドまたはそのフラグメントと結合する抗体であり得る。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使用される本発明のキットは、こ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部分を備え得る。このキットは、必要に応じて、手順に有用なさらなる構成要素を提供され得る。それらとしては、緩衝液、現像試薬、標識、反応表面、検出手段、コントロールサンプル、標準物質および解釈用の情報が挙げられるがこれらに限定されない。

【0407】

本発明は、さらに、哺乳動物（例えば、ヒト）における新生物の状態または新生物発生前の状態を検出／診断する方法に関する。「診断」とは、本明細書中で使用されるとき、一般に、被験体の疾患または障害への感受性の判定、被験体が現在疾患または障害に罹患しているか否かの判定、疾患または障害に罹患している被験体の予後判定（例えば、転移前または転移性の癌の状態、癌の段階または治療に対する癌の反応性の同定）および治療測定（therapeutics）（例えば、治療の効果または有効性についての情報を提供するための被験体の状態のモニタリング）を含む。

【0408】

「有効量」は、臨床的な結果を含む、有益または所望の結果に影響を与えるのに十分な量である。有効量は、1回以上の投与で投与され得る。

【0409】

「細胞サンプル」は、個体由来の種々のサンプルタイプを包含し、診断アッセイまたはモニタリングアッセイにおいて使用され得る。この定義は、血液および生物学的起源の他の液体サンプル、固体組織サンプル（例えば、バイオプシー検体または組織培養物またはそれら由来の細胞およびそれらの子孫）を包含する。この定義はまた、獲得後に任意の方法において操作された（試薬による処置、可溶化または特定の成分（例えば、タンパク質またはポリヌクレオチド）の濃縮などによって）サンプルを含む。用語「細胞サンプル」は、臨床サンプルを包含し、また、培養細胞、細胞上清、細胞可溶化物、血清、血漿、生物学的液体および組織サンプルも含む。

【0410】

本明細書中で使用されるとき、用語「腫瘍性細胞」、「新形成」、「腫瘍」、「腫瘍細胞」、「癌」および「癌細胞」（これらは交換可能に使用される）とは、相対的に自律的な増殖を示し、細胞増殖制御の著しい喪失（すなわち、調節解除された細胞分裂）を特徴とする異常な成長表現型を示す細胞のことをいう。腫瘍性細胞は、悪性または良性であり得る。

【0411】

用語「個体」、「被験体」、「宿主」および「患者」は、本明細書中で交換可能に使用され、診断、処置または治療が所望される任意の哺乳動物の被験体、特にヒトのことをいう。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

マなどが挙げられ得る。これらの方法に従って検出／診断され得る状態の例としては、癌が挙げられる。適切な発現パターンを示す遺伝子に対応するポリヌクレオチドは、被験体において癌を検出するために使用され得る。癌のマーカの概説については、例えば、H a n a h a n e t a l . C e l l 100 : 57 - 70 (2000) を参照のこと。

【0412】

いくつかの実施形態において、検出方法／診断方法は：（a）哺乳動物（例えば、ヒト）から生物学的サンプルを得る工程、（b）癌関連タンパク質がサンプル中に存在することを検出する工程および（c）存在する生成物の量をコントロールサンプル中に量と比較する工程を含む。いくつかの実施形態において、高レベルの癌関連遺伝子産物がサンプル中に存在することは、その被験体が新生物を有することまたは新生物発生前の状態を有することを示す。

10

【0413】

この方法における用途に適した生物学的サンプルとしては、生物学的液体（例えば、血清、血漿、胸水、尿および脳脊髄液すなわちCSF）が挙げられ、バイオプシーから得られたサンプルを含む組織サンプル（例えば、乳腺腫瘍または前立腺組織切片）もまた、本発明の方法に使用され得る。例えば、組織バイオプシーから得られた細胞培養物または細胞抽出物もまた、使用され得る。

【0414】

いくつかの実施形態において、化合物は、結合タンパク質、例えば、抗体、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体またはそれらの抗原結合フラグメントであり得、それらは、検出可能なマーカ（例えば、フルオロフォア、発色団または同位体など）で標識され得る。必要に応じて、その化合物は、固体支持体（例えば、ビーズ、プレート、フィルター、樹脂など）に接着され得る。複合体の形成の測定は、その複合体と、第1の化合物（または複合体）に特異的に結合するさらなる化合物（例えば、抗体）とを接触させることによって影響され得る。第1の化合物と同様に、さらなる化合物が、固体支持体に接着され得、そして／または検出可能なマーカで標識され得る。

20

【0415】

本発明に従う高レベルの癌関連タンパク質の同定は、アジュバント治療から利益を享受する可能性のある被験体（患者）の同定を可能にする。例えば、第1次治療後の被験体（例えば、手術を受けた被験体）由来の生物学的サンプルは、循環癌関連タンパク質の存在についてスクリーニングされ得、正常な集団の研究によって判定された高レベルのタンパク質の存在は、残存する腫瘍組織を示唆する。同様に、手術で除去された腫瘍の切除部位由来の組織が検査され得（例えば、免疫蛍光法によって）、生成物の高レベルの存在（周辺組織と比較して）は、腫瘍の切除が不完全であることを示す。このような被験体を同定する能力は、特定の被験体の要求に合わせて治療を調整することができる。非外科的治療、例えば、化学療法または放射線照射治療を受けている被験体はまた、モニターされ得、この被験体由来のサンプルにおける高レベルの癌関連タンパク質の存在は、連続した処置が必要であることを示す。疾患の段階分け（staging）（例えば、処置レジメンを最適化する目的で）もまた、例えば、バイオプシーによって、例えば、癌関連タンパク質に特異的な抗体を使用したバイオプシーによって行われ得る。

30

40

【0416】

（g）動物モデルおよびトランスジェニック

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、膵癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌または皮膚癌の動物モデルを作製する際の用途も見出される。当業者に理解されるように、同定されている癌関連遺伝子が、癌関連組織において抑制されるか、または減少されるとき、アンチセンスRNAが癌関連遺伝子を対象としている遺伝子治療技術は、その遺伝子の発現を減少または抑制し得る。同様に作製される動物は、生物活性薬物候補をスクリーニングする際の用途として見出される癌関連動物モデルとして働く。同様に、例えば、適当な遺伝子ターゲティングベクターとの相同組換え結果としての遺伝子ノックアウト技術によって、癌関連タンパク質が存在

50

しなくなる。所望であれば、癌関連タンパク質の組織特異的発現またはノックアウトが必要となる場合がある。

【0417】

癌関連タンパク質が癌において過剰発現することも可能である。同様に、癌関連タンパク質を過剰発現するトランスジェニック動物を、作成することができる。所望の発現レベルに応じて、種々の強度のプロモーターを使用することによって導入遺伝子を発現することができる。また、導入遺伝子の発現レベルを判定するために、組み込まれる導入遺伝子のコピー数を測定および比較することができる。このような方法によって作製される動物は、癌関連動物モデルとしての用途が見出され、さらに、癌を処置する生物活性分子についてのスクリーニングに有用である。

10

【0418】

(併用療法)

いくつかの実施形態において、本発明は、癌に対してさらに改善された有効性を提供する2以上の癌関連遺伝子抗体を含む組成物を提供する。2以上の癌関連遺伝子抗体を含む組成物は、癌に罹患している人もしくは哺乳動物または癌に罹患しやすい状態の人もしくは哺乳動物に投与され得る。1以上の癌関連遺伝子抗体はまた、細胞傷害性薬剤などの別の治療薬または癌の化学療法剤とともに投与され得る。2以上の治療薬の同時投与は、それらの薬剤が治療的効果を発揮する時間が重なっている限り、薬剤が同時または同経路で投与される必要はない。異なる日または週における投与のような同時投与または連続投与が企図される。

20

【0419】

本発明の方法のいくつかの実施形態において、様々な抗体の組み合わせの投与または「混合物」の投与が企図される。このような抗体混合物が、異なるエフェクターメカニズムを利用する抗体または細胞傷害性抗体と免疫エフェクター機能性に依存する抗体とを直接組み合わせる抗体を含む限り、抗体混合物は、一定の利点を有し得る。このような抗体の併用は、相乗的な治療的効果を示し得る。

【0420】

細胞傷害性薬剤とは、細胞の機能を阻害もしくは阻止する物質および／または細胞の破壊を引き起こす物質のことをいう。この用語は、放射性同位体（例えば、I 131、I 125、Y 90およびRe 186）、化学療法剤およびトキシン（例えば、細菌、菌類、植物または動物を起源とする酵素的に活性なトキシンまたは合成トキシン）またはそれらのフラグメントを含むと解釈される。無細胞傷害性薬剤とは、細胞の機能を阻害または阻止しない物質および／または細胞の破壊を引き起こさない物質のことをいう。無細胞傷害性薬剤は、細胞傷害性となるように活性化され得る薬剤を含み得る。無細胞傷害性薬剤としては、ビーズ、リポソーム、マトリックスまたは粒子が挙げられ得る（例えば、米国特許公開2003/0028071および2003/0032995を参照のこと。これらは本明細書中で参考として援用される）。このような薬剤は、本発明に記載の抗体と結合体化され得るか、結合され得るか、連結され得るか、または会合され得る。

30

【0421】

いくつかの実施形態において、従来の癌の薬物は、本発明の組成物とともに投与される。従来の癌の薬物としては：

40

- a) 癌の化学療法剤
 - b) 追加の薬剤
 - c) プロドラッグ
- が挙げられる。

【0422】

癌の化学療法剤としては、カルボプラチンおよびシスプラチンなどのアルキル化剤；ナイトロジェンマスタードアルキル化剤；カルムスチン（BCNU）などのニトロソ尿素アルキル化剤；メトトレキサートなどの代謝拮抗物質；フォリン酸；プリンアナログ代謝拮抗物質であるメルカプトプリン；フルオロウラシル（5-FU）およびゲムシタビン（G

50

emzar（登録商標））などのピリミジンアナログ代謝拮抗物質；ホルモン性抗腫瘍薬（例えば、ゴセリン、ロイプロリドおよびタモキシフェン）；天然の抗腫瘍薬（例えば、アルデスロイキン、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（タキソール（登録商標））およびトレチノイン（ATRA）；抗生物質の天然抗腫瘍薬（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、ドキソルビシン、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）；ならびにビンカアルカロイド天然抗腫瘍薬（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン）；ヒドロキシ尿素；アセグラトン、アドリアマイシン、イホスファミド、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、塩酸プロカルバジン、カルボコン、カルボプラチン、カルモフル、クロモマイシンA3、制癌性多糖類、制癌性血小板因子、シクロホスファミド（Cytosin（登録商標））、シゾフィラン、シタラビン（シ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、アウリスタチン（auristatin）などのドラスタチンアナログ、CPT-11（イリノテカン）、ミトキサントロン（mitozantnone）、ビノレルビン、テニポシド、アミノプテリン、カルミノマイシン（carminomycin）、エスペラミシン（esperamicin）（例えば、米国特許第4,675,187号を参照のこと）、ネオカルチノスタチン、OK-432、ブレオマイシン、フルツロン、プロクスウリジン、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、ミトブロニトール、メルファラン、ラミニンペプチド、レンチナン、Coriolus versicolor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）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0423】

癌患者のための治療薬として使用され得るさらなる薬剤としては、EPO、G-CSF、ガンシクロビル；抗生物質、ロイプロリド；メペリジン；ジドブジン（AZT）；インターロイキン1～18（変異体およびアナログを含む）；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）およびアナログならびに性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）））；成長因子（例えば、トランスフォーミング成長因子-β（TGF-β）、線維芽細胞成長因子（FGF）、神経成長因子（NGF）、成長ホルモン放出因子（GHRF）、上皮成長因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子相同因子（FGFHF）、肝細胞成長因子（HGF）およびインスリン成長因子（IGF））；腫瘍壊死因子-αおよび腫瘍壊死因子-β（TNF-αおよびTNF-β）；浸潤阻害因子-2（IIF-2）；骨形成タンパク質1～7（BMP1-7）；ソマトスタチン；サイモシン-α-1；γ-グロブリン；スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）；補体因子；抗血管新生因子；抗原性材料；ならびにプロドラッグが挙げられる。

30

【0424】

プロドラッグとは、親薬物と比較して、腫瘍細胞に対して細胞傷害性が低いか、または細胞傷害性がなく、そして酵素的に活性化可能であるか、または活性型もしくはより活性な親型に変換可能である、薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体の形態のことをいう。例えば、Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) および Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)を参照のこと。プロドラッグとしては、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、b-ラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されて

40

50

いるフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは必要に応じて置換されているフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシンおよびより活性な無細胞傷害性薬物に変換され得る他の5-フルオロウリジンプロドラッグが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中における用途のためのプロドラッグ型に誘導体化され得る細胞傷害性薬物の例としては、上記の化学療法剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0425】

（細胞傷害性薬剤または診断薬剤を細胞に送達するための方法）

本発明は、癌関連遺伝子を発現する1以上の細胞に細胞傷害性薬剤または診断薬剤を送達するための方法も提供する。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞傷害性薬剤または診断薬剤に結合体化された本発明の抗体、ポリペプチドまたはヌクレオチドを細胞と接触させる工程を含む。このような結合体は、上で記述する。

10

【0426】

（アフィニティー精製）

いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、当該分野で周知の方法を使用してSephadex樹脂または濾紙などの固相に固定される。固定された抗体を、精製されるべき腫瘍細胞抗原タンパク質（またはそのフラグメント）を含むサンプルと接触させ、その後、その支持体を、固定された抗体と結合した腫瘍細胞抗原タンパク質以外のサンプル中の実質的にすべての材料を除去する適当な溶媒で洗浄する。最終的に、支持体を、腫瘍細胞抗原タンパク質を抗体から遊離するグリシン緩衝液、pH 5.0などの別の適当な溶媒で洗浄する。

20

【実施例】

【0427】

以下の実施例は、本発明の作製および使用の方法についての完全な開示および説明を当業者に提供するために記載されており、そして本発明者らの発明の関する範囲を限定することを意図せず、また、以下の実験が、実施した実験すべてであり、かつ実施した実験のみであることを表すことを意図していない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保する努力がなされたが、いくつかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。他で特に示されない限り、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、摂氏度であり、そして圧力は、大気圧またはその付近である。

30

【0428】

（実施例1：マウスにおける腫瘍誘導後の挿入部位の解析）

マウス乳癌ウイルス（MMTV）またはマウス白血病ウイルス（MLV）のいずれかを使用してマウスにおいて腫瘍を誘導した。MMTVは、乳房腺癌を引き起こし、また、MLVは、種々の異なる造血器悪性腫瘍（主にT細胞リンパ腫またはB細胞リンパ腫）を引き起こす。

【0429】

3つの感染経路：（1）新生仔への精製ウイルス調製物の注射、（2）保育中の乳汁によるウイルスの感染、および（3）生殖細胞系列を介した病原性プロウイルス（Akvr1および／またはMtv2）の遺伝的感染を使用した。罹患マウスの各々に存在する悪性腫瘍のタイプを、ホルマリン固定し、パラフィンに包埋したバイオプシーサンプルのH&E染色薄切片の組織学的解析によって判定した。各腫瘍においてクローン的に組み込まれたすべてのプロウイルスに隣接する宿主DNA配列を、2つのウイルス特異的プライマーおよび制限酵素消化された腫瘍DNAに連結された40bpの二本鎖DNAアンカーに特異的な2つのプライマーを使用したネステッドアンカーPCRによって回収した。宿主／ウイルス連結フラグメントを表す増幅されたバンドを、クローニングし、そして配列決定した。次いで、宿主配列（「タグ」とよばれる）を使用して、マウスゲノム配列をBLAST解析した。

40

【0430】

次いで、抽出されたマウスゲノムタグ配列を、www.ensembl.orgからダ

50

ウンロードしたドラフトマウスゲノムアセンブリ (NCBI m33 公開) にマッピングした。45bp 以上のタグ配列を、以下のパラメータ設定: $-t=10$ $-X=1e-10$ $-v=20$ $-b=20-R$ で、*TimeLogic* の促進 *blast* アルゴリズムである *terablast* を使用してそのゲノムにマッピングした。短いタグ配列 ($<45bp$) を、以下のパラメータ設定: $-e1000$ $-FF-W9$ $-v20$ $-b20$ の NCBI *blastall* アルゴリズムによってそのゲノムにマッピングした。次いで、合わせた *blast* 結果を、代表的には、タグ配列長の少なくとも 30% に亘って低くとも 95% 同一性が求められる各タグ配列について、ベストマッチについて選別した。特有の染色体位置を有するタグを、ジーンコールプロセス (*gene call process*) に進めた。

10

【0431】

個別のタグについて、3つのパラメータ: (1) マウス染色体配置、(2) 組み込みが生じた塩基対座標、および (3) プロウイルス配向を記録した。この情報を使用して、解析されたすべての腫瘍由来の利用可能なタグのすべてをマウスゲノムにマッピングした。プロウイルス挿入変異の癌原遺伝子標的を同定するために、組み込み体の各クラスターにおけるプロウイルス組み込みパターンを、トランスクリプトーム中の既知のすべての遺伝子の位置と比較して解析した。2つ以上の独立した腫瘍において同じ遺伝子座にプロウイルスが存在することは、癌原遺伝子が、プロウイルスの組み込み部位またはそれに非常に近い位置に存在するという明白な証拠である。これは、ランダムな組み込みにはそのゲノムが大きすぎて、観察可能なクラスター形成が成されないからである。検出されたいずれのクラスター形成も、腫瘍形成の間の生物学的選択についての明確な証拠を提供する。プロウイルス挿入変異の癌原遺伝子標的のヒトオルソログを同定するために、マウスゲノムとヒトゲノムのシンテニー領域の比較解析を行った。

20

【0432】

Ensembl マウス遺伝子モデルならびに *UCSC refseq* および既知遺伝子セットを使用して、マウストランスクリプトームを表した。上に記載したように、タグ染色体位置および隣接する遺伝子に対するプロウイルスの挿入配向性に基づいて、各タグを最も近い遺伝子に割り当てた。遺伝子に連結されたプロウイルスの挿入を、I 型挿入または II 型挿入の2つのカテゴリーに分類した。その挿入が、遺伝子座 (イントロンまたはエキソンのいずれか) 内であった場合、その挿入は、II 型挿入と呼ばれた。そうでない場合、その挿入が、これらのさらなる基準: 1) 挿入が、遺伝子座の外側であるが、その遺伝子の開始点または終点から 100 キロベース以内であった、2) 上流の挿入について、プロウイルスの配向性がその遺伝子と反対であった、および 3) 下流の挿入について、プロウイルスの配向性が、その遺伝子と同じであった、を満たせば、その挿入は、I 型挿入と呼ばれた。このプロセスにおいて発見された遺伝子または転写物に、NCBI *LocUSLink* アノテーションからの遺伝子座 ID を割り当てた。少なくとも2つのウイルス挿入断片を含む特有のマウス遺伝子座 ID が、現在の *Oncogenome TM* を構成している。

30

【0433】

Oncogenome TM におけるマウス遺伝子にヒトオルソログを割り当てるために、*MG I* のマウス対ヒトのオルソログアノテーションおよび NCBI の *homologene* アノテーションを使用した。オルソログアノテーションに矛盾または欠如が存在するときは、*UCSC* または *Ensembl* ゲノムブラウザを使用してマウスゲノムとヒトゲノムのシンテニー領域の比較解析を行った。オルソログなヒト遺伝子に、NCBI *LocUSLink* からの *LocUSId* を割り当て、そしてこれらのヒト遺伝子を、本明細書中に記載するような癌治療薬に対する標的候補としてさらに評価した。

40

【0434】

(実施例 2: 定量的 RT-PCR 解析: 比較 C_T 法)

RT-PCR 解析を、4つの主な工程: 1) 主な正常組織および腫瘍組織から RNA を精製する工程; 2) 精製した組織 RNA からリアルタイム定量的 PCR 用にファーストス

50

トランドcDNAを生成する工程；3）ABI PRISM 7900HT Sequence Detection Systemを使用した遺伝子発現についてのRT-PCRを384ウェル反応用設定する工程；4）統計的な方法によってRT-PCRデータを解析して、癌において差次的に発現（上方調節）された遺伝子を同定する工程に分けた。

【0435】

これらの工程を、以下でさらに詳細に説明する。

【0436】

A) 主な正常組織および腫瘍組織からのRNA精製

この工程は、Qiagen RNeasyミニキットCAT#74106を使用して行った。150 μ Lの溶出緩衝液を使用した場合、組織チャック（chucks）から代表的には最終濃度が約200ng/ μ Lとなる約30 μ gのRNAが得られた。

【0437】

Qiagenのプロトコルを使用してRNAを抽出した後、Molecular Probe製のRibogreen定量化試薬を使用して、製造者のプロトコルに従って、RNAの収量および濃度を測定した。

【0438】

抽出したRNAの完全性を、EtBr染色したアガロースゲル上で評価し、28Sおよび18Sバンドが等しい強度を有するか否かで判定した。さらに、サンプルバンドは、くっきりし、そして認識可能であるべきである。バンドが認識不可能であるか、またはゲル全体にスミアであった場合、サンプルを廃棄した。

【0439】

抽出したRNAの完全性を、製造者のプロトコルに従って、Agilent 2100を使用してさらに評価した。Agilent Bioanalyzer/「Lab-On-A-Chip」は、RNAサンプルの電気泳動図を生成するマイクロフルイディクスシステムである。18Sバンドと28Sバンドとの比およびベースラインの滑らかさを観察することによって、RNA分解のレベルを判定した。1未満の28S：18S比を有するサンプルは、廃棄した。

【0440】

RNAサンプルを、RT-PCRで調べて、抽出の間のゲノムDNA混入のレベルを判定した。一般に、逆転写酵素の存在下および不在下において目的の遺伝子の検証されたTaqmanプライマーおよびプローブを使用してRNAサンプルを直接調べた。384ウェル形式（1ウェルあたり5 μ Lの容量）において4つ組で1反応あたり12.5ngのRNAを使用した（2 μ LのRNA+3 μ LのRT+またはRT-のマスターミックス）。以下の温度サイクルパラメータを使用した（2ステップPCR）：

【0441】

【表2】

温度サイクルパラメータ

工程	逆転写	Amp. Gold 活性化	PCR	
	保持	保持	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

RNAサンプルには、QCで合格であるとみなされるために以下の基準を求めた。

a) 合格のためにはCtの差が7Ct以上でなければならない。少しでも低い場合は「不合格」であり、再精製しなければならない。

b) 合格するためには、平均サンプル C t が、平均（すべてのサンプル）から 2 S T D E V（すべてのサンプル）以内でなければならない。

c) サンプル群の域外値を見つけるための条件付のフォーマットを使用しなければならない。* R N A パネル上の域外値を含んではならない。

d) R T 増幅または（C t）は、34 サイクル超でなければならない。そうでない場合は、「不合格」である。

e) ヒトゲノム D N A は、23 ~ 27.6 C t でなければならない。

【0442】

サンプルがすべての Q C 工程（ゲル泳動、A g i l e n t およびゲノム D N A についての R T - P C R）を合格した場合のみ、R N A でパネルを構築した。c D N A 合成に向けて R N A を整列させた。一般に、最低でも 10 の正常型および 20 の腫瘍が、各腫瘍型について必要とされた（すなわち、組織型が扁平上皮癌および腺癌を有し得る場合、各腫瘍型の 20 のサンプルを使用しなければならない（同じ 10 の正常型を各腫瘍型について使用する））。一般に、1 パネルあたり 11 μ g の R N A が必要であった。少なくとも 2 μ g の誤差は許容されるべきである；すなわち、データベース中のサンプルは、13 μ g を有していなければならない。さもないと、c D N A アレイの間に漏れ出てしまう。サンプル番号は、A1 ウェルから開始して、96 ウェル形式の縦列の下に向かって昇順で配置した。4 つのコントロールサンプル：h F B、h r R N A、h g D N A および水（この順序で）を、パネルの最後に配置する。さらなる N T C コントロール（水）を、A2 ウェルに配置した。コントロールのすべてのロット番号を記録した。R N A サンプルを、ヌクレアーゼを含まない水に 100 n g / μ L に基準化した。11 μ g の R N A を使用し、総容積は 110 μ L であった。注意：必要な R N A の濃度は、使用した特定の c D N A 合成キットに応じて変化し得る。100 n g / μ L 未満の R N A サンプルを純粋なままロードした。基準化が完了した後、ブロックを、ヒートシーラーを使用して、175 $^{\circ}$ C で 2 秒間、容易に剥がれる箔で密封した。そのブロックを目で見て点検し、箔が完全に封着していることを確認した。次いで、手動のシーラーを箔の上に走らせた。c D N A 合成のための準備が整った状態でブロックを -80 $^{\circ}$ C 冷凍庫に保存した。

【0443】

B) リアルタイム定量的 P C R にむけて、精製された組織 R N A からのファーストストランド c D N A の生成：

以下の反応混合物を予め調製した：

【0444】

【表 3】

試薬	1 RXN 容量 (μl)	RXN
10X Taqman RT 緩衝剤	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 インヒビター	0.2	
50u/ul MultiScribe 逆転写酵素	0.25	
水	0.85	

96 ウェルブロック中に整列された R N A（11 μ g）を H y d r a を使用して娘プレートに分配して、96 ウェルプレート 1 枚あたり 1 μ g の c D N A 合成を作製した。これらの娘プレートの各々を使用して、以下の温度サイクルパラメータで R T 反応を開始した：

【0445】

【表 4】

工程	インキュベーション	RT	RT 失活
	保持	保持	保持
時間	10分	30分	5分
温度	25°C	48°C	95°C

温度サイクルが完了した時点で、プレートサイクラーから取り出し、Hydraピペットを使用して、60 μ Lの0.016M EDTA溶液をプレートのcDNAの各ウェルに加えた。各cDNAプレート（わずか10プレート）を、貯蔵のために2mLの96ウェルブロックに蓄えた。ABI PRISM 7900HT Sequence Detection Systemを使用した遺伝子発現のためのRT-PCRを、384ウェル反应用到に調整した：

（カクテルの作製）

カクテルを以下のとおり作製した：

1. このプロトコールは、1パネルにつき96サンプル分の混合物を作製するために作られたものである；これは、パネル全体で470 rxnである。
2. FRT（順方向プライマーおよび逆方向プライマーならびに標的プローブ）ミックスを-20°Cから取り出し、4°C冷蔵庫において解凍した。
3. 作製する最初の10のFRTを取り出し、冷えた金属ラックまたは氷上のラックに置いた。
4. 新しい1.5mL混合物チューブのキャップに標的番号を標識し、合成の日付（FRTチューブ上、合成の日付がないものは本日の日付を標識する）および研究者のイニシャルを側面に標識し、各FRTについて1本のチューブを作製した。

RTチューブおよびカクテルチューブを順番に、かつラックから取り出しやすいように配置した。

ピペッティング時には速度6でp200を使用した。吸引は、液体の表面で行い、チューブの内側の上部に近いところで分配した。吸引／分配工程の各々の後にチップを交換した。

すべてのカクテルチューブを開け、94 μ LのAmbion水（毎日新鮮なものが注がれている）を加え、そしてチューブを閉めた。

FRTを15回パルスボルテックスして、そして10秒間遠心した。141 μ LのFRTを1つずつ、対応する混合物チューブに加えた。

最初の10個が完了したら、FRTを直ちに-20°Cに戻した（容量が10 μ L未満の場合は廃棄した）。

実施の準備が整うまで、カクテルを4°C（1日以上待つ場合は-20°C）で保存した。

カクテルを実施する準備が整ったとき、マスターミックスを混合物に加えた（工程2.7を参照のこと）。

7. すべてのカクテルが作製されるまで、工程1.3～1.6.5を次の10の混合物について繰り返した。

【0446】

【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 #	2.5µl	1175µl
順方向プライマー 原液	0.1 µl	47 µl
逆方向プライマー 原液	0.1 µl	47 µl
プローブ原液	0.1 µl	47 µl
水	0.2 µl	94 µl
最終容量	3.0 µl	1410 µl

} 141µl

10

整列させた 96 ウェルプレートからの 2 µL の cDNA を 3 µL の Taqman マスターミックスに加えて、5 µL の QPCR 反応物を作製した。

【0447】

各遺伝子についての QPCR で使用されるプライマーおよびプローブを表 2 に示した。

【0448】

(表 2)

20

【0449】

【表 6】

遺伝子	プライマー プローブ	順方向プライマー	逆方向プライマー	プローブ配列
-----	---------------	----------	----------	--------

【0450】

【表 7】

	ID			
WNT3	885	CGCACGCGTGGTAAATGAC (配列番号 1)	GTAAGATGAGAGAGAGGGA GAGCCT (配列番号 73)	CCCAACTCGCCTGTGGACGGG (配列番号 145)
NOTCH1	91	AGTGTGCGTCCAACCCATG T (配列番号 2)	CTGTGTAGGGCAGCAGGCA (配列番号 74)	CACGTGTATTGACGACGTTGC CGG (配列番号 146)
WNT1	44	CTGTCGAGAAACGGCGTTT AT (配列番号 3)	GCGCCACCGAATGGGT (配列 番号 75)	TCGCTATCACCTCCGCCGGG (配列番号 147)
WNT3A	489	CTTCAAGGTGCCACGGA (配列番号 4)	GGTTGGGCTCGCAGAAGTT (配列番号 76)	CCTGGTCTACTACGAGGCCTC GCCC (配列番号 148)
IL2RA	107	CTCTGTGACGATGACCCGC (配列番号 5)	GGTTCCTTCCCTGTAGGCCA T (配列番号 77)	AGAGATCCACACGCCACATT CAAAGC (配列番号 149)
FLT3	160	TTTCAGTTTTTACCCCACTT TCCA (配列番号 6)	CGAGTCCGGGTGTATCTGAA C (配列番号 78)	ATCCAAATTCCAGCATGCCTG GTTCAAG (配列番号 150)
PRLR	133	TGGGCAGCAAACAGAGTTT AAGA (配列番号 7)	GGTTTGCAGCGAACCTGG (配列番号 79)	TCTCAGCCTACATCCAGGACA GAAATACCCTTG (配列番号 151)
TNFRSF6	59	CAACAACCATGCTGGGCAT (配列番号 8)	GGGCATTAACACTTTTGGAC G (配列番号 80)	TGGACCTCCTACCTCTGGTTC TTACGTCT (配列番号 152)
PTPRK	152	GGACTGGGAATCCTTGGGT TA (配列番号 9)	TTGTGACCACGGAAGTAAT GGTA (配列番号 81)	CGCGTTGCCACTCTTTTAATGT CACTATCTG (配列番号 153)
TNFSF11	881	TGGATGGCTCATGGTTAGA TCTG (配列番号 10)	TGGCATTAATAGTGAGATG AGCAAA (配列番号 82)	TGAGCTTCAAGCTTGCTCCTCT TGGC (配列番号 154)
FGFR3	800	TCCTGCTCTGGGAGATCTT CAC (配列番号 11)	GGCCCTCCTTCAGCAGCTT (配列番号 83)	CTCCTCCACAGGGATGCCGGG (配列番号 155)
SELL	221	GAAGTGGCAAAGGGCTAG AAGA (配列番号 12)	TTTCCGCTTGTTTTGTATG G (配列番号 84)	CTGCCGAGACAATTACACAGA TTAGTT (配列番号 156)
DPT	66	FTCGAGTCAGTGCTGGATC G (配列番号 13)	CAGCAGGAATATGGGCACC T (配列番号 85)	AGTGGCAGTTTACTGTTGTC GCTACAGCAA (配列番号 157)
CD28	169	GAGGGATTCCCTCAAAGCA AT (配列番号 14)	GTGAACATTAACACTGAAG TCTCATGAC (配列番号 86)	CAGGTAAACCAAGTTGCTTTC CTCACTCCC (配列番号 158)
PDCD1LG1	492	GCACTTTTCAAATGCCTTT GG (配列番号 15)	GCCAGGTGTGGCTAGTCTT GT (配列番号 87)	TGACCCAGCACTTTAATCTGA AACCTGCA (配列番号 159)
LFNG	178	TGACGCTGAGCTACGGTAT GTT (配列番号 16)	CGAGAAGGGCCCTTCAC (配列番号 88)	AAAACAAGCGGAACGCCGTC CA (配列番号 160)
ANXA2	289	GCCTTCCTGTCTAGTCTCTC CTGTA (配列番号 17)	GAGGCAAAGTGTTCACATC ATAGA (配列番号 89)	CCAACTCCTTGAATGTTTCAAT TCTTTGGC (配列番号 161)
CDH23	521	GAAAGTCAATGTCAATGAA CAAGCA (配列番号 18)	GGAACATCAGTCACTTCTGT TTATAAGC (配列番号 90)	TTCACTGGCTTCCCAAATGTGT GCC (配列番号 162)
IFNAR2	886	ATCATTTTGTGACCTCACA GATGAG (配列番号 19)	TGTTCCCGCTGAATCCTTCT AG (配列番号 91)	AGCACACACGAGGCCTATGTC ACCG (配列番号 163)
RAMP1		(配列番号 20)	(配列番号 92)	(配列番号 164)
MET	76	TGCTAAATGTGTCGCCCC T (配列番号 21)	GATATCCGGGACACCAGTT CA (配列番号 93)	AGCCGAAATGCGCCCATCCTT T (配列番号 165)
FGFR1	496	GGAGTGGGAGCCAATGAA CA (配列番号 22)	CAGACCAAACCGACAGGAG AA (配列番号 94)	AGCTCAGGAAGCTCTCACTTG CATGCC (配列番号 166)
PLAU	497	CCCGACGGTGGGCATT (配列番号 23)	CCTCAAGAGACCTCAGCTGT TACAC (配列番号 95)	TGGGAAATTATTCATTTCTCA ACCATGGGC (配列番号 167)
SLC4A8	1152	GGGCTTGGTGCTGGACAT (配列番号 24)	TGAGTGCATCTCGGTAGTCG C (配列番号 96)	AAGCGGAAGGCCCCCTGGTAC TG (配列番号 168)

【表 8】

TPCN1	524	GGCCCATGCCACAGGTT (配列番号 25)	ACCCTGGAGACCGGGAGTT (配列番号 97)	TGTGTTTTGCTTTAGGGACAG AACCCTTAGGAA (配列番号 169)
LTBR	253	GCAGGTGGGCACTGGCT (配列番号 26)	CTCAGGTTTGCTCAGGCAGT AG (配列番号 98)	TCCTGTGGAGGGCACCCTACC C (配列番号 170)
IL4R	254	CCTTCGAGCAGCACCTCCT (配列番号 27)	GCAGACGGCCAGGATGAC (配列番号 99)	AATGCAGGAAACGCTGACGCC C (配列番号 171)
ITGA9	257	TGGAGCCCCGTGGCTAC (配列番号 28)	GAGGATTCCCACCAACAAA CTG (配列番号 100)	ATGGCGATGATCCACCCACG A (配列番号 172)
FGFR2	258	CCACCCGGGATGGAGTACT (配列番号 29)	GACACCAAGTCCTTGAAGG TCATC (配列番号 101)	CCTATGACATTAACCGTGTTC CTGAGGAGCA (配列番号 173)
FCMD	423	GCTGTGGCCTTTCGGAAGA (配列番号 30)	GAATGGTACTCCCAATTTGT TTAATGT (配列番号 102)	TTCGCTGCTAGTTGCAGTAATT CCTTTGCA (配列番号 174)
COL15A1	898	CGGGTGCTTTCTTCATTTG AC (配列番号 31)	TGCTTCCACATCAGTGATGG A (配列番号 103)	TTTCCCGCTAGTTCCTTTA (配列番号 175)
SLAMF6	266	TCAATGAAACATCTCTTGC CTTCA (配列番号 32)	CTTCCCTGTTTCGGATTAG TCA (配列番号 104)	CCCCATGAAACCAAAAGTCCA GAAATCC (配列番号 176)
CD74	754	CCCCACACAGCTACAGCTT TCT (配列番号 33)	ATGAGGTACAGGTGGGAG ATG (配列番号 105)	TCAGCCCCCAGCCCTCCC (配列番号 177)
TSPAN-2	269	GCCGTCATTGCTTTTGGAC TA (配列番号 34)	GGGACTTGTCTCTGATGAT AACTC (配列番号 106)	ATGGCACCTCCGAACCGAAAC CA (配列番号 178)
THSD2	461	GTGGCTTCAAAAGAGGGA CTGA (配列番号 35)	TTTGCACTGTACACTTTCTT GTCTCA (配列番号 107)	CGGGTCCGAGAAATAATACAG CATCCTCA (配列番号 179)
CD2	511	GGACATCTATCTCATCATT GGCATAT (配列番号 36)	CTTTTGGTGATATAGAAAAC GAGCA (配列番号 108)	TGCCACAAAGACCATCAAGAG GCTGC (配列番号 180)
LNPEP	273	CGAACACAGAAGCTGTCTT TTATCA (配列番号 37)	TGACAAAATCCCATGCCAG TAAG (配列番号 109)	TGTCCAGGAAAATGTCGACCC ACTGTTC (配列番号 181)
IGSF8	536	GAGAAGGTGGCATCCAGA ACAT (配列番号 38)	GGTAGGTGCCCGCATCAC (配列番号 110)	ACCGGCTACGGCTAGAGGCTG CC (配列番号 182)
ATP1A2	537	ACATGTATGCTTCCAGGGA CAAG (配列番号 39)	ACCCAGAAAAAGCAAATCT CTTAGTATT (配列番号 111)	TGTCCAAAGGTTCTGACCATG TTCATGACC (配列番号 183)
ITGA4	552	GAGACTTCAGCACTCAAGT TTGAAA (配列番号 40)	GCAACATTCTCATCCTTGTT TAGTTC (配列番号 112)	AGCAACAGGTTTCCAGAGCC AAATCCA (配列番号 184)
B2M	883	CATTCGGGCCGAGATGTCT (配列番号 41)	AGGCCAGAAAGAGAGAGTA GCG (配列番号 113)	CGCTCCGTGGCCTTAGCTGTG C (配列番号 185)
PAG	560	TCCCAAAGGAGAACGACT ACGA (配列番号 42)	TGGGTTGCTAGAGCCTGGTA ATA (配列番号 114)	TCTCTGCCTTGTGCAAGTCA CTTATGCT (配列番号 186)
NOTCH2	888	GGAGGCTATGGCTGTGTAT GTGT (配列番号 43)	AAGGCACAATCATCAATGTT CTCA (配列番号 115)	TGCAGTCATCTCCACTCCAGC CGTT (配列番号 187)
UTS2	804	CCGGAGGAGCTAGAAAGA GCTT (配列番号 44)	GCTTTCCTGAGAATATCCCC TCTT (配列番号 116)	CCCTTCTACAGATACTGCCAG AGATGCTGG (配列番号 188)
TNFRSF14	667	CAGCAGCTCCCACTGGGTA (配列番号 45)	TGGAGCAAACAATGACGAT GA (配列番号 117)	CGAGGCTCCCTGAGAGAAACC ACCA (配列番号 189)
TGFBR3	1112	TGAAGCTGCGCATGGTCTT A (配列番号 46)	TCCTTGTGTGTGCTGGCATC (配列番号 118)	CATCAGGCTGTGCAGGAAGAA GCTATCTG (配列番号 190)
FGF8	32	GCAGAGTTCGAGTCCGAGG A (配列番号 47)	CGATCAGCTTCCCCTTCTTG (配列番号 119)	CGAGACGGGCCTCATACCTG CATG (配列番号 191)
FGF3	40	CCTTTTGTGGCGAACCCT (配列番号 48)	GGAACGCGAGTCCCTTTAAT T (配列番号 120)	CGCTTTGCGCAGCAACGGAA (配列番号 192)

【表 9】

XYLT1	922	TGCCTACATGGAGCAGAGC TT (配列番号 49)	CTGTTCCACCTGGGCGG (配列番号 121)	CAGAGCCTAAACCCCGTCTC AGCC (配列番号 193)
FGF4	900	CCAACAACCTACAACGCCTA CGA (配列番号 50)	TTCTTGCTCAGGGCGATGA (配列番号 122)	CCTACAAGTACCCCGGCAT (配列番号 194)
LOC390243	791	GGACAGTCATGCCACCTG (配列番号 51)	TCTTGTGGTGTGGCATTG A (配列番号 123)	TGCAGATGTTGAGCAGCTCGT CCC (配列番号 195)
THY1	638	GAAATGGCTTTTCCCAACC C (配列番号 52)	GTGGTGGCACTATACACAGT CACA (配列番号 124)	CCCCCGGTGGTTCCTCCTGT TC (配列番号 196)
SLC9A9	997	AAGGGTTATGTCAGAAAA GGATGAGT (配列番号 53)	GCAAAAAATTGAAGACAAG CAGC (配列番号 125)	TCAGTTTCAACATCAGGGAGC GGTGG (配列番号 197)
PRG1	647	CGCTGCAATCCAGACAGTA ATTG (配列番号 54)	GATTCACCTGGAAGTAGTTC GAACA (配列番号 126)	TGCAAACTGCCTTGAAGAAAA AGGACCA (配列番号 198)
CPM	957	GGTCAATTAAAGAAAGCCCC TCTC (配列番号 55)	TAATGGAGGACTGTGGCAT CC (配列番号 127)	CTCCAGAGCCGTTTCCCTAGC TTTTGG (配列番号 199)
FBN2	805	CAGAGGTCGATGAGGAAA ATGC (配列番号 56)	TGCCTGCTGTCTTTCTTAGA ATAGC (配列番号 128)	TCCCCAGAAGCATGCTACGAG TGCA (配列番号 200)
LTB	811	CAGAAGCTGCCAGAGGAG GA (配列番号 57)	GAGGTGGGCAGCTGGGA (配列番号 129)	CCAGAAACAGATCTCAGCCCC GGG (配列番号 201)
KCNH5	816	CGGGCACTGACGTACTGTG A (配列番号 58)	GCAAAAGCTGTATAAAAGT CCAGGA (配列番号 130)	ACATCATCAAGCGGGAAGCCT TGCT (配列番号 202)
SLC12A7	891	CCGCCTACGCCAGACAAG (配列番号 59)	GCTCCTGTACTTCTCAGCGA TCA (配列番号 131)	TCTCCCTGGTCCAGGTCTATCT GCAC (配列番号 203)
FGF10	825	TGCATCATTTAACTGGCAG CATA (配列番号 60)	CTCTCCTTGGAGCTCCTTTT CC (配列番号 132)	TTCAATGCCACATACATTGCT CTCCCA (配列番号 204)
IL7R	830	GCTTAGCCTTGGGACTACA AACAG (配列番号 61)	GGTCAATGTCAGGATTCCA GATT (配列番号 133)	ACGCTGCCCCCTCCATTTCTC TC (配列番号 205)
MATN2	831	CCACACAGAGTTCACTCTG AGAACT (配列番号 62)	GAGCCCTTCCCATGTATT CAT (配列番号 134)	CCAAAGACATGAAAAAGCC GTGGCC (配列番号 206)
COL19A1	832	GCTGCCAGCAGCAATGTTG (配列番号 63)	CCCAGGCAACCCATCCTT (配列番号 135)	TGGTGGCCCAGGTCTCCATA AGC (配列番号 207)
SLC1A2	847	CAAGTCTGAGCTGGATACC ATTGA (配列番号 64)	TCATCATAAATGGATTGAGT CTTGGT (配列番号 136)	TTCAATATCTTCATGCACTCGA TGCTGGG (配列番号 208)
SLC28A2	892	GAGATGGAGAAAGCAAGT GGAAGA (配列番号 65)	CCAGCCCCAGGTTCACTGT (配列番号 137)	CAGTCCATTGCTCTGTCCACA GTGGAGA (配列番号 209)
SLPI	849	AGGTCCTTCCACCCTGAG ACT (配列番号 66)	GCTGTGTGCCAAGCCTTTC (配列番号 138)	TGGCTCCACCACTGATATCCT CCTTTGG (配列番号 210)
IL12A	854	AAGATGTACCAGGTGGAGT TCAAGA (配列番号 67)	GCCAGCATGTTTGATCTAG AAAGAT (配列番号 139)	CCATGAATGCAAGCTTCTGA TGGATCCT (配列番号 211)
IL6R	856	GCGGCCTGAGGCACGT (配列番号 68)	TCGCCTTGCCCGAACTC (配列番号 140)	TCCTGGGCACGAAGCTGCACC (配列番号 212)
TNFSF8	863	TTCTGTTTGAGAGCCTCC AGTTAA (配列番号 69)	TCATTTCCATTAGGGCAGA GT (配列番号 141)	TGCTAGCTGCTCTGGTACTGG AGCCC (配列番号 213)
TNFRSF8	910	GGAGAACTAAGGCTGAAA CCTCG (配列番号 70)	CTAGTCCGCACCCAACGC (配列番号 142)	AGGAACAACCACTTTTGAAGT GACTTCGCG (配列番号 214)
CD38	871	TCATCATACATGACTCAGC ATACCTG (配列番号 71)	GTCTCTGGCATTGACCTTAT TGTG (配列番号 143)	AGGACCCTCCAAAATCTTCAG CTCTGCA (配列番号 215)
PDGFRA	894	CACCTACAAAAACGAGGA AGACAA (配列番号 72)	AGCGCTCAGTCTCTGCTCAT C (配列番号 144)	CAGACCACCCTCCAGTCTT CAGC (配列番号 216)

D) 統計学的方法によってRT-PCRデータを解析し、癌において差次的に発現（上方調節）された遺伝子の同定：

正常サンプルと腫瘍サンプルの両方における標的遺伝子の発現レベルを、ABI PR

10

20

30

40

50

ISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, California) を使用して定量的 RT-PCR により測定した。この方法は、開始時の標的鋳型のコピー数を開始時の参照（基準化物）ハウスキーパー遺伝子のコピー数と比較した定量化に基づく（Pre-Developed TaqMan（登録商標）Assay Reagents Gene Expression Quantification Protocol, Applied Biosystems, 2001）。各 PCR サイクルに伴う DNA 産物の蓄積は、単位複製配列効率および開始時の鋳型濃度に関連する。従って、標的と基準化物の両方の増幅効率が類似したものでなければならない。開始時の鋳型コピー数および DNA 増幅効率に依存する閾値サイクル（ C_T ）は、PCR 産物増殖が指数関数的である PCR サイクルのこと

10

【0453】

（データ基準化）

基準化に向けて、解析に利用可能なハウスキーパーのセット（5～8 個の遺伝子）に基づいた「普遍的基準化物（universal normalizer）」を開発した。簡潔には、ハウスキーパー遺伝子を、組織サンプルのパネル全体に亘って発現レベルのバリエーションに従って重み付けした。同じ組織型の n 個のサンプルについて、 k 番目のハウスキーパー遺伝子についての重み（weight; w ）を、以下の式を用いて計算した：

20

【0454】

【表10】

等式 1

$$w_k = \frac{1/S_k^2}{\sum_{k=1}^n 1/S_k^2}$$

30

式中、 S_k は、パネルにおける同じ組織型のすべてのサンプルにおける k 番目のハウスキーパー遺伝子の標準偏差を表す。 i 番目のサンプルにおけるすべてのハウスキーパー遺伝子の平均発現（ M_i ）を、重み付き最小二乗法を使用して推定し、そして M_i とすべての M_i の平均との差を、 i 番目のサンプルについての基準化因子 N_i として計算する（等式 2）。次いで、 i 番目のサンプルにおける標的遺伝子の平均 C_t 値を、基準化因子 N_i を引くことによって基準化した。上記の基準化方法の実施は、同じセットのサンプルから生成された、RT-PCR データとマイクロアレイデータとの間の相関性を比較することによって確証された：上記の基準化方法を適用した後、RT-PCR データとマイクロアレイデータとの間に高い相関性が観察された。

40

【0455】

【表11】

等式 2

$$N_i = M_i - \frac{\sum_{i=1}^n M_i}{n}$$

（有意に調節不全である遺伝子の同定）

ある遺伝子が、腫瘍サンプル対正常サンプルにおいて有意に上方調節されるか否かを判定するために、2 つの統計値、 t （等式 3）および受信者動作特性（ROC；等式 4）を計算した：

50

【 0 4 5 6 】

【 表 1 2 】

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

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

式中、

【 0 4 5 7 】

【 表 1 3 】

 $\bar{C}_t$ 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、腫瘍群および正常コントロール群の標準偏差であり、そして n_t 、 n_n は、解析に使用された腫瘍サンプルおよび正常サンプルの数である。 t の自由度 v' は、以下のとおりに計算される：

【 0 4 5 8 】

【 表 1 4 】

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

ROC の等式において、 t_0 は、正常集団における許容される偽陽性率であり、本発明者らの研究において 0.1 と設定される。従って、 $C_n(t_0)$ は、正常サンプルにおける C_n の 10 パーセンタイルであり、 $ROC(0.1)$ は、正常サンプルの 10 パーセンタイルより低い C_t を有する腫瘍サンプルのパーセンテージである。 t 統計値は、正常サンプルと比較して腫瘍サンプルにおいてより高い平均発現レベルを有する遺伝子を同定するが、ROC 統計値は、腫瘍のサブセットにおいて高い発現レベルのみを示す遺伝子を同定するためにより適している。ROC 統計値を使用する理論的解釈は、Pepe, et al (2003) Biometrics 59, 133-142 に詳細に記述されている。

帰無仮説下の t の分布は、正規分布仮定を回避する順列によって経験的に推定される。ここで、本発明者らは、正常または腫瘍の標識をサンプルにランダムに割り当て、そして t 統計値 (t^p) を 2000 回、上記のように計算する。そして、 p 値を、真のサンプルの t より小さい t^p の数値を 2000 で割って計算した。ROC のばらつきにアクセスするために、サンプルを 2000 回ブートストラップし、各回において、ブートストラップ ROC (ROC^b) を上記のように計算した。2000 個の ROC^b の 97.5% が、正常集団について本発明者らが設定した許容できる偽陽性率である 0.1 より大きい場合、真のサンプルからの ROC を、統計的に有意であるとみなした。有意性を判定するための閾値を、ROC について > 20% の発生割合に設定し、T 検定の P 値については < 0.05 に設定した。

【 0 4 5 9 】

上記の方法論を適用することにより、正常セットとサンプルセットとの間の 3 つの仮説的な分布をモデル化することが可能になった (図 2)。

10

20

30

40

50

【0460】

シナリオ I においては、2つのサンプル集団（コントロールおよび疾患）の間に本質的に完全な分離が存在した。ROCとt検定スコアの両方で、このシナリオは高い有意性を有する。シナリオ II においては、サンプルは、重複した分離を示し、疾患サンプルのサブセットだけがコントロール（正常）集団と異なる。ROC法だけが、このシナリオを有意であるとスコアする。シナリオ III においては、疾患サンプル集団は、コントロール集団と全体的に重複する。シナリオ I および II とは対照的に、t検定法だけがこのシナリオを有意であるとスコアする。要するに、両方の統計学的方法を組み合わせることにより、サンプル集団内の標的遺伝子の発現パターンを正確に特徴付けることが可能になる。これらの試験結果を表3に表す。

【0461】

【表15】

表3: 計算されたROC%発生を示す。発生率が優位でない場合、「t」値を示した。
ns=有意でないが、t値は示していない。挿入の数および挿入の型についても
使用したウイルス型と共に示した。

癌のタイプ、対応する正常組織に対応する発生率 (%)																
遺伝子	挿入型	挿入断片の数	ウイルス タイプ	乳房	結腸	腎臓	肝臓	肺	リンパ系	卵巣	膀胱	前立腺	子宮	頸部	胃	皮膚
WNT3	I/II	72	M						60%			32%				
NOTCH1	I/II	132	L/M		62%								39%			
WNT1	I/II	346	L/M							57%		t=0.02				
WNT3A	I/II	106	L/M				47%									
IL2RA	I/II	12	L/M		32%	t=0.04			28%			t=0.02	t=0.02			t=0.01
FLT3	I/II	18	L			36%										
TNFRSF6	II	7	L						50%			28%	32%	27%		
PTPRK	II	7	L					33%								
TNFSF11	I	2	L													
FGFR3	I/II	9	L/M	48%						86%						
SELL	II	7	L	38%	t=0.005							t=0.00001		23%		

【0462】

10

[illegible]

20

30

【 0 4 6 3 】

【 0 4 6 4 】

[illegible]

30

【 0 4 6 5 】

[illegible]

30

最適なMg²⁺濃度、プライマー濃度および必要な様々なサイクル温度をこれらの鋳型を用いて決定する。製造者が推奨するマスターミックスを使用する。マスターミックス成分の汚染の可能性を検出するために、鋳型を含まない反応物を常に試験した。

【0467】

サザンブロッティングおよびハイブリダイゼーションを、ランダムプライマー手順 (Feinberg, A. P., et al., 1983, Anal. Biochem. 132: 6-13) によって標識されたクローニングされた配列を使用してSouthern, E. M., (J. Mol. Biol. 98: 503-517, 1975) に記載されているとおりに行う。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を、6×SSPE、5% Denhardt's、0.5% SDS、50%ホルムアミド、100 μg/mL変性サケ精巢DNAを含む溶液で行い、42℃で18時間インキュベーションし、続いて、室温および37℃にて2×SSCおよび0.5% SDSで洗浄し、最後に、68℃にて30分、0.5% SDSを含む0.1×SSCで洗浄する (Sambrook et al., 1989, "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、250bp配列を検出するために設計されたプライマーを使用して、Wright and Manos (1990, "PCR Protocols", Innis et al., eds., Academic Press, pp. 153-158) に記載されている条件に従う。

【0468】

(実施例4：宿主細胞におけるクローニング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質産物を研究するために、癌関連DNA由来の制限酵素フラグメントを発現ベクターpMT2にクローニングし (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 16.17-16.22 (1989))、10% FCSを補充したDMEM中で生育されるCOS細胞にトランスフェクトする。リン酸カルシウム法 (Sambrook, et al (1989) pp. 16.32-16.40, 前出) を使用してトランスフェクションを行い、トランスフェクションの48時間後に、トランスフェクトされたCOS細胞とトランスフェクトしていないCOS細胞の両方から細胞可溶化物を調製する。細胞可溶化物を、抗ペプチド抗体を使用した免疫ブロット法によって解析する。

【0469】

免疫ブロット法実験において、細胞可溶化物の調製および電気泳動を、標準的な手順に従って行う。タンパク質濃度を、BioRadタンパク質アッセイ溶液を使用して測定する。ニトロセルロースへのセミドライの電気泳動的転写を行った後、その膜を5%粉乳を含む、500mM NaCl、20mM Tris, pH7.5、0.05% Tween-20 (TTBS) でブロッキングする。TTBS中で洗浄し、2次抗体 (Amersham) と共にインキュベーションした後、製造者が記載するように高感度化学発光 (enhanced chemiluminescence; ECL) プロトコル (Amersham) を行うことにより、検出を促進する。

【0470】

(実施例5：ポリペプチドに対する抗体の作製)

癌関連遺伝子に特有のポリペプチドを合成するか、または細菌の発現系もしくは他の (例えば、酵母、バキュロウイルス) 発現系から単離し、m-マレイミド安息香酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) (Pierce, Rockford, Ill.) を有するウサギ血清アルブミン (RSA) と結合体化する。これらのペプチドによる免疫プロトコルを標準的な方法に従って行う。始めに、免疫前にウサギの前飼育 (pre-bleed) を行う。最初の免疫は、フロイント完全アジュバントおよび500 μgの結合体化ペプチドまたは100 μgの精製ペプチドを含む。その後のすべての免疫は、その前の注射の4週間後に行い、同量のタンパク質とともにフロイント不完全アジュバント

を含む。免疫後、7～10日間飼育（Bleeds）を続ける。

【0471】

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を有するRSAに結合体化し、そしてCNBr活性化セファロース（Pharmacia, Uppsala, Sweden）に結合する。抗血清を10mM Tris-HCl, pH 7.5中に10倍希釈し、アフィニティマトリックスと一晚インキュベートする。洗浄後、結合した抗体を100mM グリシン, pH 2.5で樹脂から溶出する。

【0472】

（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作製）

非変性アジュバント（Ribi, R730, Corixa, Hamilton MT）を4mLのリン酸緩衝食塩水に再水和する。次いで、100μLのこの再水和アジュバントを400μLのハンクス平衡塩類溶液で希釈し、次に、これを免疫に使用する細胞ペレットと穏やかに混合する。約500μgの結合体化ペプチドまたは100μgの精製ペプチドおよびフロイント完全アジュバントを、1週間に1回、Balb/cマウスに足蹠を介して注射した。毎週の注射の6週間後に、少量の血液を各免疫動物の尾から採取して、癌関連ポリペプチドに対する抗体の力価を、FACS解析を使用して検査する。力価が、少なくとも1：2000に達したとき、そのマウスをCO₂チャンバー内で屠殺し、続いて頸椎脱臼を行う。リンパ節をハイブリドーマ調製に向けて回収する。最も力価の高いマウス由来のリンパ球を、35%ポリエチレングリコール4000を使用してマウスミエローマ系統X63-Ag8.653と融合する。融合の10日後に、ハイブリドーマ上清を、CAP特異的モノクローナル抗体の存在について蛍光励起細胞分取（FACS）によってスクリーニングする。各ハイブリドーマからの条件化培地を、PC3細胞、Colo-205細胞、LnCap細胞またはPanc-1細胞の合わせたアリコートと共に30分間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の希釈剤に再懸濁し、そして1μg/mLのFITC結合体化ヤギ抗マウスIgGのF(ab')₂フラグメントとともに4℃で30分間インキュベートする。その細胞を洗浄し、0.5mLのFACS希釈剤に再懸濁し、そしてFACSscan細胞解析装置（Becton Dickinson; San Jose, CA）を使用して解析する。FACSによって評価されるように、癌関連ポリペプチドを発現する1以上の細胞株の表面への結合に基づいて、ハイブリドーマクローンをさらなる増殖、クローニングおよび特徴づけのために選別する。抗原と結合し、mAb癌関連とよばれるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、Ag-CA.xと命名し、そしてAg-CA.x.1と命名される、その抗原におけるエピトープを選抜する。

【0473】

（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）

組換えで作製された癌関連抗原に特異的に結合する抗体について、血液サンプルを試験するために、以下の手順を使用する。組換え癌関連タンパク質を精製した後、その組換えタンパク質を5μg/mL（500ng/100μL）の濃度にPBSで希釈する。100マイクロリットルの希釈抗原溶液を、96ウェルImmulon 1プレート（Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.）の各ウェルに加え、次いで、そのプレートを室温で1時間または4℃で一晚インキュベートし、そして0.05% Tween 20のPBS溶液で3回洗浄する。抗体の非特異的結合を低下させるためのブロッキングを、PBS/Tween 20中の1%ウシ血清アルブミン溶液200μLを各ウェルに加えて行い、1時間インキュベートする。ブロッキング溶液を吸引した後、ブロッキング溶液中に1/16～1/2048の範囲で希釈した1次抗体溶液（抗凝固処理全血、血漿または血清）100μLを加え、そして室温で1時間または4℃で一晚インキュベートした。次いで、ウェルを3回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Organon Teknika, Durham, N. C.）と結合体化したヤギ抗ヒトIgG抗体（PBS/Tween 20中に1/500または1/1000希釈）100μL、オーフェニレンジアミン二塩酸塩（OPD, Sigma）溶液100μLを各ウェルに加

え、そして5～15分間インキュベートする。このOPD溶液は、5mgのOPD錠剤を50mLの1%メタノール水溶液に溶解し、使用の直前に50μLの30% H_2O_2 を加えて調製する。25μLの4M H_2SO_4 を加えることによって反応を停止する。490nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（Bio-Rad）で読む。

【0474】

（実施例8：癌細胞表面上の癌関連抗原の同定および特徴づけ）

癌細胞調製物の濃縮細胞容積が約25μLの細胞ペレットを、まず0.5mLの水に細胞を希釈し、続いて凍結解凍を3回繰り返すことにより溶解する。その溶液を14,000rpmで遠心する。細胞膜フラグメントを含む得られたペレットを、50μLのSDSサンプル緩衝液（Invitrogen, Carlsbad, CA）中に再懸濁する。このサンプルを5分間80℃で加熱し、次いで14,000rpmで2分間遠心することにより、いかなる不溶性材料も除去する。

【0475】

このサンプルを、製造者の指示に従って、Tris-グリシンSDS中の4～20%ポリアクリルアミド勾配ゲル（Invitrogen; Carlsbad, CA）を使用したウエスタンブロットによって解析する。10マイクロリットルの膜サンプルをポリアクリルアミドゲルの1レーンにアプライする。別個の10μLのサンプルを、2μLのジチオトレイトール（100mM）を加えて、2分間80℃で加熱して還元し、そして別のレーンにロードする。着色分子量マーカーSee Blue Plus 2（Invitrogen; Carlsbad, CA）を使用して、ゲル上の分子量を評価する。14.4g/lのグリシン、3g/lのトリス塩基、10%メタノールおよび0.05%SDSの転写緩衝液を使用してゲルタンパク質をニトロセルロース膜に転写する。その膜をブロッキングし、CAP特異的モノクローナル抗体（0.5μg/mLの濃度）で探索し、そしてInvitrogen Western Breeze Chromogenic Kit - Anti Mouseを使用し、製造者の指示に従って現像する。腫瘍細胞膜サンプルの還元サンプルにおいて、対応する癌関連タンパク質の予想した分子量の約10%以内の分子量に移動する顕著なバンドが観察される。

【0476】

（実施例9：ワクチンの調製）

本発明は、悪性細胞によって産生されるか、または悪性細胞に関連する抗原として働く、本発明の癌関連ポリペプチドを使用して、患者において癌関連ポリペプチドを発現する細胞に対する免疫応答を刺激する方法にも関する。本発明のこの態様は、ヒトにおける、癌細胞または癌関連ポリヌクレオチドおよび癌関連ポリペプチドを発現する細胞に対する免疫応答を刺激する方法を提供する。この方法は、（a）ヒト（human）癌関連タンパク質のアミノ酸配列または（b）ヒト内在性レトロウイルス癌関連タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドのムテインもしくはは改変体を含む免疫原性量のポリペプチドをヒトに投与する工程を含む。

【0477】

（実施例10：治療薬を試験するため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作製）

癌関連核酸を使用して、前立腺腫瘍関連遺伝子の機能もしくは調節を研究するために、遺伝的に改変された非ヒト動物を作製するか、または細胞株におけるそれらの部位特異的遺伝子改変を行うか、あるいは前立腺癌を含む疾患の動物モデルを構築する。用語「トランスジェニック」とは、外来性癌関連遺伝子の配列が改変タンパク質を生成するように変更され得る場合に宿主細胞に安定的に導入されたその遺伝子を有する遺伝的に改変された動物、またはレポーター遺伝子に作動可能に連結された外来性癌関連LTRプロモーターを有する遺伝的に改変された動物を包含すると解釈される。トランスジェニック動物は、そのゲノムにランダムに組み込まれた核酸構築物を介して作製され得る。安定な組込みのためのベクターとしては、プラスミド、レトロウイルスおよび他の動物ウイルス、YACなどが挙げられる。興味深いのは、トランスジェニック哺乳動物、例えば、ウシ、ブタ、

ヤギ、ウマなどであり、特に、げっ歯類、例えば、ラット、マウスなどである。

【0478】

改変された細胞または動物は、癌関連遺伝子の機能、調節の研究に有用である。例えば、一連の小さい欠失および／または置換を、癌関連遺伝子内で作製することにより、腫瘍形成における様々な遺伝子の役割を決定し得る。特定の目的の構築物としては、癌関連遺伝子発現を阻止するアンチセンス構築物、ドミナントネガティブ癌関連遺伝子変異の発現および癌関連遺伝子の過剰発現が挙げられるが、これらに限定されない。細胞または組織における癌関連遺伝子またはそれらの改変体の発現が、正常に発現されないか、または発生の異常な回数で発現されるとき、それらの発現が提供される。さらに、癌関連タンパク質が他の方法で正常に生成されない細胞において、癌関連由来のタンパク質の発現を提供することにより、細胞の挙動の変化が誘導され得る。

10

【0479】

ランダムな組み込み用のDNA構築物は、組換えを媒介する相同領域を含む必要はない。簡便のため、ポジティブ選択およびネガティブ選択のためのマーカーを含む。哺乳動物細胞をトランスフェクトするための様々な技術については、Keown et al., Methods in Enzymology 185:527-537 (1990)を参照のこと。

【0480】

胚性幹細胞(ES)細胞について、ES細胞株を使用するか、または胚性細胞を宿主、例えば、マウス、ラット、モルモットなどから新たに得る。このような細胞を、適切な線維芽細胞の支持細胞層上で生育するか、または白血病抑制因子(LIF)などの適切な成長因子の存在下で生育する。ES細胞を形質転換すれば、それらを使用して、トランスジェニック動物を作製し得る。形質転換後、この細胞を適切な培地中の支持細胞層上にまく。構築物を含む細胞は、選択培地を使用することによって検出され得る。コロニーが生育するのに十分な時間が経過した後、コロニーを拾い、構築物の組み込みの発生について解析する。次いで、陽性のコロニーを胚操作および胚盤胞注入に使用し得る。胚盤胞は、4～6週齢の過排卵した雌から得られる。ES細胞をトリプシン処理し、改変細胞を胚盤胞の胞胚腔に注入する。注入後、その胚盤胞を偽妊娠の雌の各子宮角に戻す。そして、雌を分娩日まで育て、得られたキメラ動物を、その構築物を有する細胞についてスクリーニングした。胚盤胞およびES細胞の異なる表現型が提供されることによって、キメラ子孫が容易に検出され得る。

20

30

【0481】

キメラ動物を改変遺伝子の存在についてスクリーニングし、改変を有する雄および雌を交配することにより、ホモ接合性の子孫を作製する。遺伝子変更により、発生のいくつかの時点で致死となる場合、組織または器官を、アロジェニックまたはコンジェニックなグラフトもしくは移植片またはインビトロ培養物として維持する。トランスジェニック動物は、実験動物、家畜動物などの任意の非ヒト哺乳動物であり得る。トランスジェニック動物は、例えば、前立腺癌に対する候補薬物の効果を測定するため、候補の治療薬または処置レジメンなどを検定するためなどの、機能的な研究、薬物スクリーニングなどに使用される。

40

【0482】

(実施例11:CA特異的抗体を使用した診断用画像化)

本発明は、最初の提示において癌患者の段階を正確に診断するためおよび癌の転移拡散を早期検出するために、癌関連ポリペプチドに対する抗体の使用を包含する。癌関連ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を使用した放射線免疫シンチグラフィは、さらなる癌特異的診断試験を提供することができる。本発明のモノクローナル抗体は、癌腫の病理組織学的な診断に使用される。

【0483】

ヌードマウスにおける癌細胞の皮下のヒト異種移植片を使用して、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., Bri

50

t. J. Urol. 75:225 (1995) によってセミノーマ細胞について記載されているように外部ガンマシントグラフィーにより異種移植された癌をうまく画像化することができるか否かを試験する。癌関連ポリペプチドに特異的な各モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ腫瘍を有するBALB/cマウスの腹水から、プロテインA-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製される。アビジン特異的モノクローナル抗体 (Skea, et al, J. Immunol. 151:3557 (1993)) などのコントロールモノクローナル抗体を含む精製された抗体は、Mather, et al, J. Nucl. Med. 31:692 (1990) および Zhang et al, Nucl. Med. Biol. 19:607 (1992) の方法を使用して、還元後に^{99m}Tcで標識される。ヒト癌細胞を有するヌードマウスの腹腔内に、200～500 μCiの^{99m}Tc標識抗体を注射する。注射の24時間後、動物から約8 cmにセットされた6 mmピンホールコリメーターを備えたSiemens ZLC 3700ガンマカメラを使用して、マウスの像を得る。画像化後、モノクローナル抗体の体内分布を決定するために、正常な器官および腫瘍を取り出し、重量を計測し、そして組織および注入液のサンプルの放射能を測定する。さらに、抗腫瘍性化合物に結合体化された癌関連抗原特異的抗体を癌特異的化学療法に使用する。

10

【0484】

(実施例12：免疫組織化学的方法)

癌患者由来の凍結組織サンプルを、最適な切断温度 (OCT) 化合物中に包埋し、そしてドライアイスとともにイソペンタン中で急凍する。凍結切片をLeica 3050 CMミクロトーム (microtome) で厚さ5 μmに切断し、vectaboundでコーティングされたスライド上に融解しながらマウントする。切片を-20℃のエタノールで固定し、室温で一晩風乾させる。固定された切片を使用するまで-80℃に保存する。免疫組織化学のために、その組織切片を回収し、ブロッキング緩衝液 (PBS、5%正常ヤギ血清、0.1% Tween 20) 中、室温にて30分間最初のインキュベーションを行い、次いで、ブロッキング緩衝液に希釈された癌関連タンパク質特異的モノクローナル抗体およびコントロールモノクローナル抗体 (1 μg/mL) と120分間インキュベートする。そして、その切片をブロッキング緩衝液で3回洗浄する。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0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.05 および0.003%過酸化水素 (Sigma cat. No. H1009) 中のペルオキシダーゼ基質ジアミノベンジジン (1 mg/mL, Sigma Catalog No. D5637) を用いて、結合したモノクローナル抗体を検出する。染色されたスライドを、ヘマトキシリンで対比染色し、Nikon顕微鏡下で調べる。

20

30

【0485】

癌関連タンパク質 (抗原) に対するモノクローナル抗体を使用して、様々な型の組織由来の様々な細胞株との反応性を試験する。様々な樹立細胞株由来の細胞を、プロテアーゼを使用せずに増殖表面から取り除き、まとめ、そしてOCT化合物中に包埋する。細胞を凍結し、薄片に切り、そして標準的なIHCプロトコールを使用して染色する。Cell ArrayTM 技術は、WO 01/43869に記載されている。外科的切除により得られた正常組織 (ヒト) を凍結し、マウントする。凍結切片をLeica 3050 CMミクロトームで厚さ5 μmに切断し、vectaboundをコーティングしたスライドに融解しながらマウントする。その切片を-20℃のエタノールで固定し、室温で一晩風乾させる。ポリMICATM 検出キットを使用して、正常組織への癌関連抗原特異的モノクローナル抗体の結合を判定する。1次モノクローナル抗体は、最終濃度1 μg/mLで使用する。

40

【0486】

(実施例13：発現データ)

表4～58は、一連の腫瘍組織におけるこの適用による多くの遺伝子の発現レベルを示す。発現アッセイの3つの形態の結果を表に示す。U133A & B (アレイタイプの欄を

50

参照のこと)との表記における結果は、Affymetrixオリゴヌクレオチドベースの発現アレイ (ワールドワイドウェブサイト: affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=hgu133-plus) を使用したことを示し、Chiron cDNAアレイとの表記における結果は、Chiron社内スポット型cDNAアレイを使用してもたらされたことを示す。残りの結果は、Affymetrix U133プラス2オリゴアレイ (ワールドワイドウェブサイト: affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=hgu133-plus) を使用してもたらされた。

【0487】

最初の2つのアレイフォーマットについて組織サンプルは、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCD) (以下の定義を参照のこと) を使用して回収された。アレイの第3の形態 (U133プラス2) についての組織サンプルは、標準的な手動の解剖手順を使用して回収した。

【0488】

差次的発現のレベルを各アレイタイプについて別個の方法によって評価した。U133 A & BおよびEVDアレイについての結果を、規定された閾値より高いか、または低い発現レベルを有したサンプルの数として表す。「2×一致」または「0.5×一致」との表記は、多くのサンプル (発現の差次的レベルを示す%サンプルの欄に示す) が、コントロール値よりも2×超の発現レベルまたはコントロール平均値の半分未満の発現レベルのいずれかを有したことを示す。従って、遺伝子の過剰発現または過小発現のいずれかを (「t」の有意レベルが0.001以下で) 示す。

【0489】

U133+2アレイについての発現レベルは、80-50または80-80パーセンタイル比 (percentile ratio) として表される。示されるすべての結果は、0.001%水準における有意性についてのt検定を合格した。80-50パーセンタイル比の結果において、コントロールサンプルの50%と比較するとき、腫瘍サンプルの20%が2倍以上のレベルの過剰発現を有する。80-80パーセンタイル比の結果において、腫瘍サンプルの20%は、コントロールサンプルの80%と比較して3倍以上の過剰発現レベルを有する。

【0490】

(標的化のための腫瘍関連抗原の選択)

(腫瘍性細胞および近隣の正常細胞のレーザーダイセクションならびに解剖された細胞由来のRNAの生成)

レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) を使用して正常組織および癌性組織を患者から回収し、そしてRNAを、当該分野で周知である技術 (例えば、Ohyama et al. (2000) Biotech'iques 29:530-6; Curran et al. (2000) Mol. Pathol. 53:64-8; Suarez-Quian et al. (1999) Biotech'iques 26:328-35; Simone et al. (1998) Trends Gerz et 14:272-6; Conia et al. (1997) J. Clin. Lab. Anal. 11:28-38; Emmeret-Buck et al. (1996) Science 274:998-1001を参照のこと) を使用してこれらの組織から調製した。実質的に同質の細胞サンプルを提供するように、LCMにより特定の細胞型の単離がもたらされるため、同様に純粋なRNAサンプルが提供された。

【0491】

(マイクロアレイ解析)

cDNAの作製: 解剖された細胞から得られた全RNAを使用して、Affymetrix 2サイクルcDNA合成キット (cat #900432) を使用してcDNAを作製した。8 μLの全RNAを、11 μL反応物中の1 μLのT7-(dT)24プライマー

10

20

30

40

50

(50 pmol/μL)とともに使用し、その反応物を12分間70℃に加熱した。次いで、混合物を5分間室温に冷却した。9 μLのマスターミックス(4 μLの5×1st ストランドcDNA緩衝液、2 μLの0.1 M DTT、1 μLの10 mM dNTPミックス、2 μLのSuperscript II(600 U/μL))を加え、その混合物を42℃で2.5時間インキュベートした(混合物の総容積は、20 μLだった)。氷上で冷却した後、2nd ストランド合成を次のとおり完了した: 20 μLの上記の混合物を、130 μLのセカンドストランドマスターミックス(91 μLの水、30 μLの5×セカンドストランド反応緩衝液、3 μLの10 mM dNTPミックス、1 μLの10 U/μL e. coli DNAリガーゼ、4 μLの10 U/μL E. coli DNAポリメラーゼI、1 μLの2 U/μL e. coli Rnase H)と混合し、2時間インキュベートし、16℃で10分間インキュベートした。氷上で冷却した後、dsDNAを反応混合物から精製した。簡潔には、QiaQuick PCT精製キットを使用し(Qiagen, cat # 28104)、5容積の緩衝液PBを1容積のcDNA混合物に加えた。次いで、製造者の指示に従ってcDNAをQIAquick スピニングカラムで精製することにより、最終容積60 μLを得た。

10

【0492】

ビオチン標識されたcRNAの生成。次いで、上で作製され、精製されたcDNAを使用して、ビオチン標識RNAを次のとおり作製した: QIAquick カラムから回収された60 μLのcDNAを、中速度加熱真空(medium heated speed vacuum)下で、22 μLの容積に減少させた。そして、これをENZO Bio Array 高収量RNA転写キット(cat # 4265520)とともに使用した。簡潔には、4 μLの10×HY反応緩衝液、4 μLの10×ビオチン標識リボヌクレオチド、4 μLのDTT、4 μLのRNase インヒビターミックスおよび2 μLのT7 RNAポリメラーゼを含むマスターミックスを22 μLの精製cDNAに加え、37℃で4~6時間インキュベートした。そして反応物をQiagen RNeasyキット(cat # 74104)を使用し、製造者の指示に従って精製した。

20

【0493】

cRNAの断片化。上の15~20 μgのcRNAを、8 μLの5×断片化緩衝液(200 mM Tris-酢酸, pH 8.1、500 mM 酢酸カリウム、150 mM 酢酸マグネシウム)および最終容積が40 μLとなるまでの水と混合した。混合物を94℃で35分間インキュベートした。代表的には、この断片化プロトコールにより、35~200塩基の範囲の大きさのRNAフラグメントの分配が得られる。断片化を、TAEアガロース電気泳動を使用して確かめた。

30

【0494】

アレイハイブリダイゼーション。次に、上の断片化されたcRNAを使用して、ハイブリダイゼーションカクテルを作製した。簡潔には、上の40 μLを1 mg/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合した。さらに、3 mgのニシン精子DNA(10 mg/mL)を150 μLの2×ハイブリダイゼーション緩衝液(100 mM MES、1 M NaCl、20 mM EDTA、0.01% Tween-20)および最終容積が300 μLとなる水とともに加えた。この溶液の200 μLを、U133アレイ(Affymetrix cat # 900370)にロードし、45℃にて45 rpmの一定速度で一晩インキュベートした。次いで、ハイブリダイゼーション緩衝液を除去し、アレイを洗浄し、そして製造者のプロトコールに従ってGeneChip Fluidics Station 450(Affymetrix, cat # 00-0079)を使用して200 μLのストリンジェントでない洗浄緩衝液(6×SSPE、0.01% Tween-20)で染色した。

40

【0495】

アレイのスキャン。次いで、上のアレイを、製造者のプロトコールに従ってGeneChip Scanner 3000(Affymetrix cat # 00-0217)を使用してスキャンした。

50

【0496】

腫瘍細胞抗原標的候補の選択。腫瘍細胞（原発腫瘍または転移のいずれか）対 近隣の健常組織または貯蔵されていた正常組織における抗原の発現レベルを比較することによって、腫瘍抗原を標的化のために選択した。選択された腫瘍抗原は、周辺の正常組織に対して発現が少なくとも3倍（300%）の増加を示した。ここで、この3倍増加は、大部分の貯蔵されていた市販の正常組織サンプル（各組織型について作製される貯蔵物である、対照基準ミックスすなわちRSM）と比較して見られるものである。下記の表は、各遺伝子についてアレイ解析からの倍増したデータを表し、この中で、数値は、正常組織と比較して2倍、3倍または5倍発現が増加したことを示した、解析された患者サンプルのパーセントを表している。

【0497】

【表20】

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	サンプル数の 標準偏差	発現の異なるレベルを 示す試料(%)	何倍または 何割増につ いての標準偏差	反復実験の数
ANXA2	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0		26.0		1.0
ANXA2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	2X 一致	68.0	6.9	22.0	1.0	3.0
ANXA2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に 対応するもの	2X 一致	27.0	6.0	30.5	3.8	4.0
ANXA2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に 対応するもの	2X 一致	26.0	6.0	30.0	3.3	4.0
ANXA2	Chiron cDNA アレイ	前立腺癌	<=0.5X 一致	89.2	30.9	54.6	12.2	5.0
ANXA2	U133A & B	結腸癌	2X 一致	27.0	0.0	30.7	4	3.0
ANXA2	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0	0.0	24.0	4.2	2.0
ANXA2	U133A & B	前立腺癌	<=0.5X 一致	22.0	0.0	89.3	2.9	3.0
ANXA2	U133A & B	前立腺	<=0.5X 一致	15.7	0.6	68.0	6.6	3.0

【0498】

10

20

30

40

【表 2 1】

遺伝子の 記号	B	癌対 照後正常組織	一致	組織試料の 平均数	サンプル数の 標準偏差	正常との差(単位:倍)	回帰係または 回帰差(正しい 標準偏差)	反復実験の数
ANXA2	U133A & B	腫瘍型および コントロールの 表示	結果のタイプ バーセントイル 比	20.0	0.0	8.0	1.0	3.0
ANXA2	U133A & B	肺がん腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 バーセントイル 比	43.0	0.0	5.0	0.0	3.0
ANXA2	U133A & B	乳房がん腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 バーセントイル 比	68.0	0.0	7.3	0.6	3.0
ANXA2	U133A & B	肺癌腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 バーセントイル 比	23.0	0.0	7.0	0.0	3.0
ANXA2	U133A & B	胃癌腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 バーセントイル 比	23.0	0.0	8.7	0.6	3.0
ANXA2	U133A & B	上気道消化管癌 腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 バーセントイル 比	39.0	0.0	6.0	0.0	3.0

【 0 4 9 9 】

10

20

30

【表 2 3】

B2M	アレイ Chiron cDNA アレイ	結腸転移	≤0.5X 一致	32.9	0.6	67.1	3.4	24.0
B2M	Chiron cDNA アレイ	結腸転移に対 応するもの	≤0.5X 一致	32.9	7.9	56.8	5.9	27.0
B2M	Chiron cDNA アレイ	結腸転移に対 応するもの	≤0.5X 一致	33.2	6.7	42.6	3.4	27.0
B2M	Chiron cDNA アレイ	前立腺癌	≤0.5X 一致	102.8	13.6	35.1	4.2	28.0
B2M	U133A & B	乳癌	2X 一致	35.5	20.5	24.0	0.0	2.0
B2M	U133A & B	結腸癌	≤0.5X 一致	27.0		52.0		1.0
B2M	U133A & B	結腸転移	≤0.5X 一致	33.0		45.0		1.0
B2M	U133A & B	前立腺癌	≤0.5X 一致	19.5	3.5	72.0	5.7	2.0

【0501】

10

20

30

【表 2 4】

B2M	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	≤0.5X 一致	16.0		25.0		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	結晶のタイプ	組織試料の 平均数	サンプル数の 標準偏差	正常との差(単位:倍)	何倍または 何分の1つに なる標準偏差	反復実験の数
B2M	U133A & B	血液、リンパ結腫 のすべて 対 本 質的に正常	80-80 パーセンタイル 比	60.0		3.0		1.0
B2M	U133A & B	血液、リンパ結腫 のすべて 対 本 質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	60.0	0.0	4.0	0.0	2.0
B2M	U133A & B	肝臓結腫のすべて 対 本質的に正 常	80-50 パーセンタイル 比	21.0		4.0		1.0
B2M	U133A & B	肺結腫のすべて 対 本質的に正 常	80-50 パーセンタイル 比	68.0		3.0		1.0
B2M	U133A & B	胃結腫のすべて 対 本質的に正 常	80-50 パーセンタイル 比	23.0		3.0		1.0
B2M	U133A & B	上気道消化管結 腫のすべて 対	80-50 パーセンタイル 比	23.0		2.0		1.0

【0502】

10

20

30

【表 2 5】

		本質的に正 常							
--	--	------------	--	--	--	--	--	--	--

表 7

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	発現の異なるレベルを 示す試料 (%)	反復実験の数
CD2	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0	26.0	1.0
CD2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	<=0.5X 一致	18.0	22.0	1.0
CD2	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的 に正常	80-80 パーセンタイル 比	60.0	正常との差 (単位: 倍) 8.0	1.0
CD2	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本 質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	60.0	9.0	1.0

表 8

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	発現の異なるレベルを 示す試料 (%)	反復実験の数
------------	--------	-----------------	--------	--------------	------------------------	--------

【 0 5 0 3 】

【表 2 6】

CD28	U133A & B	前立腺癌		<=0.5X 一致	22.0	23.0	1.0		
CD28	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常		<=0.5X 一致	16.0	25.0	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	サンプル数の 標準偏差	正常との差 (単位 ：倍)	何倍または何 %差についての 標準偏差	反復実験の数	
CD28	U133A & B	血液リンパ腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセンタイル 比	60.0	0.0	6.3	2.5	3.0	
CD28	U133A & B	血液リンパ腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	60.0	0.0	9.3	2.3	3.0	
CD28	U133A & B	肝臓癌のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	21.0		2.0		1.0	
CD28	U133A & B	肺癌のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	68.0		2.0		1.0	
CD28	U133A & B	メラノーマのすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	41.0	0.0	3.0	0.0	2.0	
CD28	U133A & B	腎臓癌のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	66.0		2.0		1.0	
CD28	U133A & B	胃癌のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル 比	23.0		2.0		1.0	

表 9

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	発現の異なるレベルを 示す試料 (%)	反復実験の数
CD38	Chiron	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0	24.0	1.0

【 0 5 0 4 】

10

20

30

【表 2 7】

	cDNA アレイ							
CD38	Chiron cDNA アレイ	前立腺癌			106.0		52.0	1.0
CD38 遺伝子の 配列	U133A & B アレイタイプ	結腸癌 腫瘍型およびコントロールの表示		結果のタイプ	25.0	組換え体の 平均数	正常との差 (単位: 倍)	1.0
CD38	U133A & B	血液リンパ腫のすべて 対 本質的に		80-80 パーセントイル比	60.0		6.0	1.0
CD38	U133A & B	血液リンパ腫のすべて 対 本質的に		80-50 パーセントイル比	60.0		11.0	1.0

【 0 5 0 5】

表 10

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	組換え体の 平均数	サンプル数の 標準偏差	発現の異なるレベルを 示す資料 (%)	割合差 または割合 差について の標準偏差	反復実験の数
CD74	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	22.0	2.2	27.8	5.7	5.0
CD74	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	<=0.5X 一致	60.2	24.4	22.3	0.8	6.0
CD74	Chiron cDNA	結腸癌	2X 一致	60.2	24.4	29.0	6.9	6.0

【表 28】

CD74	アレイ Chiron cDNA アレイ	結腸転移	<=0.5X 一致	32.4	1.3	28.6	6.2	5.0
CD74	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの	2X 一致	31.5	9.0	27.5	11.0	4.0
CD74	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの	<=0.5X 一致	32.4	8	22.6	1.3	5.0
CD74	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	<=0.5X 一致	31.0	9.3	24.0	3.9	4.0
CD74	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	2X 一致	31.8	8.3	26.8	4.9	5.0
CD74	Chiron cDNA アレイ	前立腺癌	<=0.5X 一致	98.3	16.9	26.5	2.6	6.0
CD74	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	22.0		23.0		1.0

【0506】

10

20

30

【表 2 9】

CD74	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致		33.0			27.0		1.0
CD74	U133A & B	前立腺癌	<=0.5X 一致		22.0			32.0		1.0
遺伝子の型	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	サンプル数の標準偏差	正常との差 (単位: 倍)	何倍または何分の何の標準偏差			反復実験の数
CD74	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセント	60.0		6.0				1.0
CD74	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセント	60.0		14.0				1.0

【 0 5 0 7 】

表 11

遺伝子の型	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	サンプル数の標準偏差	検出の異なるサンプルを示す試料 (%)	何倍または何分の何の標準偏差	反復実験の数
CDH23	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	19.0		32.0		1.0
CDH23	U133A & B	結腸癌	2X 一致	26.0		23.0		1.0

【表 3 0】

CDH23	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	32.5	0.7	29.5	12	2.0
CDH23	U133A & B	結腸癌	2X 一致	22.0		23.0		1.0

【 0 5 0 8 】

表 12

遺伝子の 記号	アレイ タイプ	腫瘍型およびトポロジの表示	結果のサイズ	組織試料の 平均数	発現の異なるレベルを 示す試料 (%)	反復実験の数
COL15A1	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	<=0.5X 一致	19.0	32.0	1.0
COL15A1	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	<=0.5X 一致	18.0	33.0	1.0
COL15A1	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	<=0.5X 一致	18.0	33.0	1.0
COL15A1	U133A & B	結腸癌	2X 一致	19.0	32.0	1.0

表 13

遺伝子の 記号	アレイ タイプ	腫瘍型およびトポロジの表示	結果のサイズ	組織試料の 平均数	発現の異なるレベルを 示す試料 (%)	反復実験の数
COL19A1	U133A & B	結腸転移	2X 一致	10.0	100.0	1.0

【表 3 1】

遺伝子の 記号	プライ マライ ズ	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 サンプルの 割合 (%)	何倍または 何分の1に なるかの標準 偏差	反復実験の数
CPM	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	<=0.5X 一致	76.5	0.7	46.5	17.7	2.0
CPM	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0	0.0	62.5	6.4	2.0
CPM	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの	<=0.5X 一致	36.0	0.0	43.0	9.9	2.0
CPM	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	<=0.5X 一致	36.0	0.0	39.0	11.3	2.0
CPM	Chiron cDNA アレイ	前立腺癌	<=0.5X 一致	106.0	0.0	23.0	1.4	2.0
CPM	U133A & B	乳癌	<=0.5X 一致	50.0		28.0		1.0
CPM	U133A & B	乳癌	2X 一致	11.0		100.0		1.0

表 14

【0509】

10

20

30

【表 3 2】

	B								
CPM	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	25.3	0.6	70.7	33.5	3.0	
CPM	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	28.5	9.0	73.0	25.4	4.0	
CPM	U133A & B	前立腺癌 対 陽性正常	<=0.5X 一致	15.5	3.0	63.0	19.3	4.0	

【 0 5 1 0 】

表 15

遺伝子の 記号	アレイ サイズ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のタイプ	組織サンプルの 平均数	試料数の 標準偏差	発現の異なる サンプルを示す 試料(%)	何倍または 何分の差に ついでる 差偏差	反復実験の数
DPT	U133A & B	乳癌	2X 一致	13.5	10.6	66.5	47.4	2.0

表 16

遺伝子の 記号	アレイ サイズ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のタイプ	組織サンプルの 平均数	試料数の 標準偏差	発現の異なる サンプルを示す 試料(%)	何倍または 何分の差に ついでる 差偏差	反復実験の数
FAS	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	23.5	4.9	30.0	0.0	2.0
FAS	U133A	結腸癌	2X 一致	27.0		44.0		1.0

10

20

30

【表 3 3】

	& B											
FAS	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	29.5	4.9	51.0	1.4	2.0				
遺伝子の 記号	アレイ サイズ	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 : μg)	何倍または何分の 差(%)	反復実験の数				
FAS	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-80パーセンタイル比	60.0		3.0		1.0				
FAS	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセンタイル比	60.0	0.0	4.8	1.0	4.0				
FAS	U133A & B	腎臓結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセンタイル比	66.0	0.0	3.8	1.0	4.0				

表 17

遺伝子の 記号	アレイ サイズ	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	差異の異なるレベルを 示す試料(%)	反復実験の数
FBN2	U133A & B	前立腺癌	<=0.5X 一致	19.0	42.0	1.0

表 18

遺伝子の 記号	アレイ サイズ	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	差異の異なるレベルを 示す試料(%)	反復実験の数

【 0 5 1 1 】

10

20

30

【表 3 4】

FGF8	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	25.0	52.0	1.0
FGF8	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	32.0	34.0	1.0

【0 5 1 2】

表 19

遺伝子	アレイ チップ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のアレイ	組織試料の 平均数	試料数の 標準偏差	検出の異なる アレイの平均 値(%)	何個または 何%のアレイ が100%の感 度を示す 全陽性	反復実験の数
FGFR1	Chiron cDNA アレイ	乳癌	<=0.5X 一致	23.0	0.0	48.0	12.7	2.0
FGFR1	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0		21.0		1.0
FGFR1	U133A & B	乳癌	<=0.5X 一致	49.5	0.7	39.5	12	2.0
FGFR1	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	27.0		41.0		1.0
FGFR1	U133A & B	結腸癌	2X 一致	26.0		62.0		1.0

10

20

30

【表 3 5】

FGFR1	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0		61.0	1.0
FGFR1	U133A & B	前立腺癌	2X 一致	20.0		30.0	1.0

【0 5 1 3】

表 20

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	検出の異なる アレイの平均 値(%)	割合差は どのくらい 大きいのか (%)	反復実験の数
FGFR2	Chiron cDNA アレイ	乳癌	$\leq 0.5X$ 一致	23.0	0.0	47.5	24.7	2.0
FGFR2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	$\leq 0.5X$ 一致	19.0		32.0		1.0
FGFR2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対するもの	$\leq 0.5X$ 一致	18.0		33.0		1.0
FGFR2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	$\leq 0.5X$ 一致	18.0		50.0		1.0

10

20

30

【表 3 6】

FGFR2	Chiron cDNA 7レ-I	前立腺癌	<=0.5X 一致	103.5	3.5	36.5	9.2	2.0
FGFR2	U133A & B	乳癌	<=0.5X 一致	50.0		46.0		1.0
FGFR2	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	24.7	1.5	40.3	29.4	3.0
FGFR2	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	31.5	0.7	56.5	46.0	2.0
FGFR2	U133A & B	前立腺癌	<=0.5X 一致	18.0	4.2	57.0	14.1	2.0
FGFR2	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	<=0.5X 一致	14.0	2.8	63.5	27.6	2.0

【 0 5 1 4 】

表 21

遺伝子の 記号	7レ-I タ-I	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 サンプルの 割合(%)	何倍差注 または何% 差について (Cの標準 偏差)	反復実験の数
FGFR3	Chiron cDNA 7レ-I	乳癌	2X 一致	23.0		26.0		1.0

10

20

30

【表 3 7】

FGFR3	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	$\leq 0.5X$ 一致	76.0	0.0	31.5	13.4	2.0
FGFR3	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	$\leq 0.5X$ 一致	33.0		30.0		1.0
FGFR3	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に転移するもの	$\leq 0.5X$ 一致	36.0		44.0		1.0
FGFR3	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	$\leq 0.5X$ 一致	35.0		34.0		1.0
FGFR3	U133A & B	乳癌	2X 一致	26.0		100.0		1.0
FGFR3	U133A & B	結腸癌	$\leq 0.5X$ 一致	26.0		54.0		1.0
FGFR3	U133A & B	結腸転移	$\leq 0.5X$ 一致	32.0		41.0		1.0
FGFR3	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	$\leq 0.5X$ 一致	16.0		25.0		1.0

【 0 5 1 5 】

10

20

30

【表 3 8】

表 22

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	発現の異なる アレイの割合 (%)	反復実験の数
IFNAR2	U133A & B	乳癌	2X 一致	28.0	100.0	1.0
IFNAR2	U133A & B	結腸癌	2X 一致	27.0	33.0	1.0
IFNAR2	U133A & B	結腸転移	2X 一致	31.0	32.0	1.0
IFNAR2	U133A & B	前立腺癌	2X 一致	7.0	100.0	1.0
IFNAR2	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	$\leq 0.5X$ 一致	15.0	20.0	1.0
IFNAR2	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	2X 一致	15.0	20.0	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	正常との差(単位:倍)	反復実験の数
IFNAR2	U133A & B	血液/リンパ腫腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントアイル比	60.0	2.0	1.0

表 23

【0 5 1 6】

10

20

30

【表 3 9】

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	発現の異なる ハレルを示す 試料(%)	反復実験の数
IGSF8	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0	22.0	1.0
IGSF8	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	<=0.5X 一致	76.0	21.0	1.0
IGSF8	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0	33.0	1.0
IGSF8	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	21.0	24.0	1.0

表 24

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	発現の異なる ハレルを示す 試料(%)	反復実験の数
IL12A	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	22.0	32.0	1.0

表 25

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 ハレルを示す 試料(%)	何倍差ま とは	反復実験の数
------------	------------	-----------------	--------	--------------	--------------	---------------------------	------------	--------

【 0 5 1 7 】

10

20

30

【表 4 0】

								何%差に ついての 標準偏差	
IL2RA	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0			22.0	1.0	
IL2RA	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	2X 一致	33.0			21.0	1.0	
IL2RA	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの	2X 一致	36.0			28.0	1.0	
IL2RA	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	2X 一致	35.0			20.0	1.0	
IL2RA	U133A & B アレイ タイプ	結腸癌 腫瘍型およびコホートの表示	$\leq 0.5X$ 一致	28.0			35.0	1.0	
遺伝子の 配列			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	反復実験の数	
IL2RA	U133A & B	血液/リンパ結節のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル化	60.0	0.0	4.0	0.0	2.0	

【 0 5 1 8 】

表 26

10

20

30

【表 4 1】

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)	何倍差は または何% 差について の標準 偏差	反復実験の数
IL4R	U133A & B	血液リンパ癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-80パーセンタイル比	60.0		6.0		1.0
IL4R	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		9.0		1.0

表 27

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	検出の異なる アレイの平均 値(%)	何倍差 または何 %差につ いての標 準偏差	反復実験の数
IL6R	U133A & B	乳癌	<=0.5X 一致	24.0		21.0		1.0
IL6R	U133A & B	乳癌	2X 一致	24.0		21.0		1.0
IL6R	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	21.7	7.6	77.0	20	3.0
IL6R	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	24.0	9.9	66.5	38.9	2.0

【 0 5 1 9 】

10

20

30

【表 4 2】

IL6R	U133A & B	前立腺癌	結果のタイプ	22.0		32.0	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)	何倍または何% 差に ついての標準 偏差
IL6R	U133A & B	肝臓癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	21.0		6.0	1.0
IL6R	U133A & B	肝臓癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントイル比	21.0		4.0	1.0

【 0 5 2 0 】

表 28

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)	何倍または何% 差に ついての標準 偏差	反復実験の数
ITGA4	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントイル比	60.0	0.0	7.3	0.6	3.0
ITGA4	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	60.0	0.0	9.3	1.5	3.0
ITGA4	U133A & B	腎臓癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	66.0		3.0		1.0

【表 4 3】

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	発現の異なる パルを有する 試料(%)	反復実験の数
LFNG	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	18.0	22.0	1.0
LFNG	U133A & B	乳癌	2X 一致	43.0	35.0	1.0
LFNG	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	26.0	27.0	1.0
LFNG	U133A & B	結腸癌	2X 一致	26.0	58.0	1.0
LFNG	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0	27.0	1.0
LFNG	U133A & B	前立腺癌	2X 一致	20.0	30.0	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	正常との差 (単位: 倍)	反復実験の数
LFNG	U133A & B	乳房癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントアイル比	43.0	6.0	1.0
LFNG	U133A & B	乳房癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントアイル比	43.0	4.0	1.0

表 29

【0 5 2 1】

10

20

30

【表 4 4】

LFNG	U133A & B	肺癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	68.0	4.0	1.0
LFNG	U133A & B	肺癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	13.0	4.0	1.0
LFNG	U133A & B	胃癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	23.0	5.0	1.0

表 30

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	正常との差 (単位:倍)	反復実験の数
LNPEP	U133A & B	血液/リンパ結核のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	60.0	3.0	1.0

表 31

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	検出の異なる アレルを示す 試料(%)	何倍または 何%差 にわたる 標準偏差	反復実験の数
L1TB	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0	0.0	28.0	2.0
L1TB	Chiron cDNA	結腸癌に対応するもの	2X 一致	36.0	22.0	1.0	1.0

【 0 5 2 2 】

10

20

30

【表 4 5】

	アレイ						
LTB	U133A & B	血液リンパ結核のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセンタイル比	60.0		29.0	1.0
LTB	U133A & B	血液リンパ結核のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比	60.0		36.0	1.0

【 0 5 2 3 】

表 32

遺伝子の 記号	アレイ サイズ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のサイズ	組織試料の 平均数	検出の異なる レベルを示す 試料(%)	反復実験の数
LTBR	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0	61.0	1.0
遺伝子の 記号	アレイ サイズ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のサイズ	組織試料の 平均数	正常との差 (単位: 倍)	反復実験の数
LTBR	U133A & B	膀胱癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比	20.0	2.0	1.0

表 33

遺伝子の 記号	アレイ サイズ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のサイズ	組織試料の 平均数	検出の異なる レベルを示す 試料(%)	何倍差または 何%差に よる標準偏差	反復実験の数
MATN2	Chiron cDNA アレイ	乳癌	$\leq 0.5X$ 一致	23.0	76.0	2.8	2.0

【表 4 6】

MATN2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	<=0.5X 一致	76.5	0.7	26.0	0.0	2.0
MATN2	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0		27.0		1.0
MATN2	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	<=0.5X 一致	36.0	0.0	36.0	11.3	2.0
MATN2	UT33A & B	乳癌	<=0.5X 一致	50.0		88.0		1.0
MATN2	UT33A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	28.0		50.0		1.0
MATN2	UT33A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	32.0		75.0		1.0

表 34

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	結果のサイズ	組織試料の 平均数	試料数の 標準偏差	発現の異なる サンプルを示す 試料 (%)	何倍差または 何%差にこの 1の標準偏差	反復実験の数
MET	Chiron	乳癌	<=0.5X 一致	23.0		30.0		1.0

【0 5 2 4】

10

20

30

【 0 5 2 5 】

[illegible]

30

【 0 5 2 6 】

[illegible]

30

【 0 5 2 7 】

[illegible]

30

【表 5 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	発現の異なる レールを占める 試料 (%)	反復実験の数
NOTCH1	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	2X 一致	35.0	20.0	1.0
NOTCH1	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	2X 一致	30.0	20.0	1.0
NOTCH1	U133A & B	結腸癌	2X 一致	26.0	38.0	1.0

表 35

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%差にわた りの標準偏差	反復実験の数
NOTCH2	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0		39.0		1.0
NOTCH2	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	27.0		30.0		1.0

表 36

【表 5 1】

NOTCH2	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0	0.0	24.0	4.2	2.0
NOTCH2	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0		21.0		1.0
遺伝子の 記号	アレ 1 1	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	正常の差 (単位: 船)	何倍または何 %差についての 標準偏差	反復実験の数
NOTCH2	U133A & B	乳房結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比	43.0	0.0	2.0	0.0	2.0

【 0 5 2 9 】

表 37

遺伝子の 記号	アレ 1 1	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 サンプルを示す 試料(%)	何倍または何 %差についての 標準偏差	反復実験の数
PAG1	Chiron cDNA アレ 1	結腸癌	<=0.5X 一致	41.0		29.0		1.0
PAG1	Chiron cDNA アレ 1	結腸転移	<=0.5X 一致	30.0		20.0		1.0
PAG1	U133A & B	乳癌	2X 一致	27.0		48.0		1.0
PAG1	U133A	結腸癌	<=0.5X 一致	26.0		77.0		1.0

10

20

30

【表 5 2】

	& B									
PAG1	U133A & B	結腸転移		<=0.5X 一致	33.0			64.0		1.0
PAG1	U133A & B	前立腺癌		<=0.5X 一致	22.0			45.0		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 (平均・倍)	何倍差または何 %差についての 標準偏差			反復実験の数
PAG1	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセンタイル比	60.0	0.0	3.0	0.0			2.0
PAG1	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比	60.0	0.0	4.7	0.6			3.0
PAG1	U133A & B	メラノーマのすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比	41.0	0.0	6.0	1.7			3.0
PAG1	U133A & B	メラノーマのすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセンタイル比	41.0	0.0	3.5	0.7			2.0

表 38

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	発現の異なる サンプルの 数(%)	反復実験の数
PDGFRA	U133A	乳癌	<=0.5X 一致	60.0	60.0	1.0

【 0 5 3 0 】

10

20

30

【表 5 3】

	& B							
PDGFRA	U133A & B	結腸癌			<=0.5X 一致	27.0	30.0	1.0
PDGFRA	U133A & B	結腸癌			2X 一致	27.0	30.0	1.0
PDGFRA	U133A & B	結腸転移			<=0.5X 一致	33.0	42.0	1.0
PDGFRA	U133A & B	結腸転移			2X 一致	32.0	38.0	1.0

表 39

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	% samples showing diff level of expression	何倍または 何%または 2.5Xの標準 偏差	反復実験の数
PLAU	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X - 致	21.8	2.5	38.0	2.0	4.0
PLAU	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	2X - 致	58.3	19.0	34.8	11.6	6.0
PLAU	Chiron	結腸転移	2X - 致	31.8	1.6	28.6	5.4	5.0

【表 5 4】

PLAU	cDNA アレイ		2X 一致		36.0	0.0	36.0	15	4.0
	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの							
PLAU	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	2X 一致		30.2	10.7	37.4	17.0	5.0
PLAU	Chiron cDNA アレイ	前立腺癌	2X 一致		106.0		41.0		1.0
PLAU	AffyEVD アレイ タイル	結腸癌 腫瘍型およびコントロールの表示	2X 一致		27.0		37.0		1.0
PLAU	U133A & B	乳癌腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比		43.0	0.0	2.0	0.0	2.0
PLAU	U133A & B	肺癌腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比		68.0	0.0	4.5	0.7	2.0
PLAU	U133A & B	肺癌腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセンタイル比		68.0	0.0	4.0	0.0	2.0
PLAU	U133A	肺癌腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセンタイル比		13.0	0.0	5.5	0.7	2.0

【 0 5 3 2 】

10

20

30

【表 5 5】

	& B								
PLAU	U133A & B	腫瘍腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントイル比	13.0	0.0	4.5	0.7	2.0	
PLAU	U133A & B	上気道消化管癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントイル比	23.0	0.0	4.0	0.0	2.0	
PLAU	U133A & B	上気道消化管癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	23.0	0.0	5.0	0.0	2.0	

表 40

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	発現の異なる ノベルな表示 試料 (%)	反復実験の数
PTPRK	U133A & B	乳癌	<=0.5X 一致	50.0	24.0	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	正常との差 (単位: 倍)	反復実験の数
PTPRK	U133A & B	腫瘍腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	13.0	3.0	1.0
PTPRK	U133A & B	胃腸癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	66.0	3.0	1.0
PTPRK	U133A & B	胃腸癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	23.0	3.0	1.0

【0 5 3 3】

10

20

30

【表 5 6】

PTPRK	U133A & B	上気道消化管癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	23.0	3.0	1.0
PTPRK	U133A & B	子宮癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	39.0	3.0	1.0

表 41

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	発現の異なる レアル表示 試料 (%)	反復実験の数
RAMP1	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0	21.0	1.0
RAMP1	U133A & B	前立腺癌	2X 一致	22.0	27.0	1.0
RAMP1	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	2X 一致	16.0	31.0	1.0

表 42

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	発現の異なる レアル表示 試料 (%)	反復実験の数
RSP03	Chiron cDNA アレイ	乳癌	<=0.5X 一致	23.0	22.0	1.0

【 0 5 3 4 】

【表 5 7】

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	発現の異なる 試料(%)	反復実験の数
SELL	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	2X 一致	77.0	35.0	1.0
SELL	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	2X 一致	33.0	27.0	1.0
SELL	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの	2X 一致	36.0	28.0	1.0
SELL	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	2X 一致	36.0	42.0	1.0
SELL	U133A & B アレイ	前立腺癌	2X 一致	9.0	100.0	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	正常との差 (単位:倍)	反復実験の数
SELL	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントアイル比	60.0	27.0	1.0
SELL	U133A	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントアイル比	60.0	38.0	1.0

表 43

【 0 5 3 5 】

10

20

30

【表 5 8】

	& B						
表 44							
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	発現の異なる アレイを占める 試料 (%)	反復実験の数	
SLAMF6	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントイル比	60.0	5.0	1.0	
SLAMF6	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	60.0	7.0	1.0	

表 45

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 レパルを占める 試料 (%)	何倍または 何分の差 についての 標準偏差	反復実験の数
SLC12A7	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	20.5	3.5	24.0	2.8	2.0
SLC12A7	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	2X 一致	19.0		21.0		1.0
SLC12A7	Chiron	結腸癌に対応するもの	2X 一致	18.0		22.0		1.0

【0 5 3 6】

10

20

30

【表 59】

	cDNA アレイ									
SLC12A7	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	2X 一致	18.0				28.0		1.0
SLC12A7	U133A & B	乳癌	2X 一致	50.0				22.0		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	発現の異なる パルスを示す 試料 (%)	何倍表または 何%表に ついでの標準 偏差			反復実験の数
SLC12A7	U133A & B	肝臓癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50/1-センタイル比	21.0				3.0		1.0
SLC12A7	U133A & B	腎臓癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50/1-センタイル比	66.0				3.0		1.0

表 46

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	発現の異なる パルスを示す 試料 (%)	反復実験の数
SLC1A2	U133A & B	結腸癌	$\leq 0.5X$ 一致	26.0	54.0	1.0

表 47

【0537】

10

20

30

【表 60】

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 サンプルを示す 試料 (%)	何倍または 何%異なる サンプルの 標準偏差	反復実験の数
SLC9A9	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	11.0		64.0		1.0
SLC9A9	U133A & B	前立腺癌	<=0.5X 一致	17.0		29.0		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)	何倍または 何%異なる サンプルの 標準偏差	反復実験の数
SLC9A9	U133A & B	血液/リンパ腫のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセントイル比	60.0	0.0	2.5	0.7	2.0

表 48

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 サンプルを示す 試料 (%)	何倍または 何%異なる サンプルの 標準偏差	反復実験の数
SLPI	Chiron cDNA アレイ	乳癌	<=0.5X 一致	23.0	0.0	41.5	9.2	2.0
SLPI	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0		22.0		1.0
SLPI	Chiron	結腸癌	<=0.5X	70.5	9.2	24.5	3.5	2.0

【 0 5 3 8 】

10

20

30

【表 6 1】

	cDNA アレイ		一致						
SLPI	Chiron cDNA アレイ	結腸癌	2X 一致	77.0		35.0		1.0	
SLPI	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0		42.0		1.0	
SLPI	Chiron cDNA アレイ	結腸転移	2X 一致	33.0		36.0		1.0	
SLPI	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの	2X 一致	30.0	8.5	34.5	13.4	2.0	
SLPI	Chiron cDNA アレイ	結腸癌に対応するもの	<=0.5X 一致	36.0		22.0		1.0	
SLPI	Chiron cDNA アレイ	結腸癌転移に対応するもの	<=0.5X 一致	27.3	7.5	30.7	15	3.0	
SLPI	Chiron cDNA	結腸癌転移に対応するもの	2X 一致	36.0		25.0		1.0	

【0539】

10

20

30

【表 6 2】

	array											
SLPI	Chiron cDNA アレイ	前立腺癌	<=0.5X 一致		106.0					25.0		1.0
SLPI	U133A & B	乳癌	<=0.5X 一致		50.0					54.0		1.0
SLPI	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致		21.0					43.0		1.0
SLPI	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致		33.0					45.0		1.0
遺伝子の 記号	アレイ タイル	腫瘍型およびコントロールの表示			組織試料の 平均数	試料数の 標準偏差	正常との差 (単位:倍)	何倍または 何分の差に 対応する 標準偏差				
SLPI	U133A & B	肺癌腫のすべて 対 本質的に正常	結果のタイプ	80-50 パーセントイル比	68.0		26.0				1.0	
SLPI	U133A & B	肺癌腫のすべて 対 本質的に正常		80-80パーセントイル比	68.0		14.0				1.0	
SLPI	U133A & B	卵巣癌腫のすべて 対 本質的に正常		80-50 パーセントイル比	72.0		91.0				1.0	
SLPI	U133A & B	卵巣癌腫のすべて 対 本質的に正常		80-80 パーセントイル比	72.0		49.0				1.0	

【 0 5 4 0 】

10

20

30

【表 6 3】

SLPI	U133A & B	子宮癌のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントイル比	39.0		131.0		1.0
SLPI	U133A & B	子宮内転移癌のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセントイル比	39.0		71.0		1.0

【 0 5 4 1 】

表 49

遺伝子の 記号	プライ マーズ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のサイズ	結核菌の 平均数	発現の異なる サンプルの 割合 (%)	反復実験の数
TGFBR3	Chiron cDNA プライ	乳癌	$\leq 0.5X$ 一致	23.0	57.0	1.0
TGFBR3	Chiron cDNA プライ	結腸癌に対応するもの	2X 一致	36.0	28.0	1.0
TGFBR3	U133A & B	乳癌	$\leq 0.5X$ 一致	50.0	72.0	1.0
TGFBR3	U133A & B	結腸癌	2X 一致	24.0	25.0	1.0
TGFBR3	U133A & B	前立腺癌	$\leq 0.5X$ 一致	22.0	23.0	1.0
TGFBR3	U133A	前立腺癌 対 隣接正常	$\leq 0.5X$ 一致	18.0	31.0	1.0

10

20

30

【表 6 4】

		& B									
表 50											
遺伝子の 記号	プレイ 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 (%)	何倍または 何分の差に ついての 標準偏差	反復実験の数			
THY1	U133A & B	結腸癌	2X 一致	25.0		28.0		1.0			
THY1	U133A & B	結腸転移	2X 一致	33.0		27.0		1.0			
遺伝子の 記号	プレイ 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)	何倍または 何分の差に ついての 標準偏差	反復実験の数			
THY1	U133A & B	膀胱腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセンタイル比	13.0	0.0	4.7	1.2	3.0			
THY1	U133A & B	膀胱腫瘍のすべて 対 本質的に正常	80-80 パーセンタイル比	13.0		3.0		1.0			

【 0 5 4 2 】

表 51

遺伝子の 記号	プレイ タイプ	腫瘍型およびコントロールの表示	結果のタイプ	試料数の標準偏差	正常との差 (単位:倍)	反復実験の数
------------	------------	-----------------	--------	----------	-----------------	--------

10

20

30

【表 6 5】

TNFRSF14	U133A & B	メラノーマのすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントایل比	41.0	2.0	1.0
表 52						
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	正常との差 (単位: 倍)	反復実験の数
TNFRSF11	U133A & B	血液リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントایل比	60.0	5.0	1.0
TNFRSF11	U133A & B	血液 / リンパ結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントایل比	60.0	7.0	1.0
TNFRSF11	U133A & B	肺結腫のすべて 対 本質的に正常	80-50 パーセントایل比	13.0	4.0	1.0

【 0 5 4 3 】

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	正常との差 (単位: 倍)	反復実験の数
TPCN1	U133A & B	結腸転移	<=0.5X 一致	33.0	27.0	1.0
TPCN1	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	<=0.5X 一致	16.0	25.0	1.0

表 53

【表 6 6】

表 54

遺伝子の 記号	プレイ サイト	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	発現の異なる レパルを示す 試料 (%)	反復実験の数
TSPAN2	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	26.0	27.0	1.0
TSPAN2	U133A & B	前立腺癌 対 隣接正常	2X 一致	15.0	20.0	1.0

【 0 5 4 4 】

表 55

遺伝子の 記号	プレイ サイト	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	発現の異なる レパルを示す 試料 (%)	反復実験の数
WNT1	U133A & B	前立腺癌	2X 一致	21.0	24.0	1.0

表 56

遺伝子の 記号	プレイ サイト	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	発現の異なる レパルを示す 試料 (%)	反復実験の数
WNT3	U133A & B	結腸癌	<=0.5X 一致	26.0	58.0	1.0

表 57

10

20

30

【表 6 7】

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	発現の異なる アレイを示す 試料(%)	反復実験の数
WNT3A	Chiron cDNA アレイ	乳癌	2X 一致	23.0	22.0	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	発現の異なる アレイを示す 試料(%)	正常と の差 (単位: 倍)	何倍または 何%差について の標準偏差
PRLR	U133A&B	乳癌	$\leq 0.5X$ 一致	49.0		20.0		1.0
PRLR	U133A&B	結腸癌	$\leq 0.5X$ 一致	26.5	0.7	33.5	14.8	2.0
PRLR	U133A&B	結腸転移	$\leq 0.5X$ 一致	31.0		29.0		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)	何倍または 何%差に ついての標準 偏差	反復実験の数
PRLR	U133+2	乳房癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセンタイル 比	43.0	0.0	6.3	3.0	4.0
PRLR	U133+2	乳房癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-80パーセンタイル 比	43.0	0.0	4.0	1.0	3.0
PRLR	U133+2	肝臓癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセンタイル 比	21.0	0.0	3.5	0.7	2.0
PRLR	U133+2	胃臓癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセンタイル 比	23.0		4.0		1.0
PRLR	U133+2	子宮癌腫のすべて 対 本質的に正常	80-50パーセンタイル比	39.0		4.0		1.0

表 58

(実施例 14: 機能アッセイ)

列挙した遺伝子を標的化する SiRNA を 96 ウェルプレート上で製造した。様々な細胞株におけるリバーストランスフェクション後に、3つの異なる機能アッセイ、すなわち、増殖アッセイ、細胞傷害性アッセイおよび軟寒天増殖アッセイを行った。1細胞株あたりの 1 アッセイあたり 1~3 回の反復を行った。アッセイに使用したプライマーおよびプローブを上記の表 2 に示した。

【0545】

(統計学的解析手順)

細胞傷害性作用：細胞傷害性作用の有意性を判定するために、増殖アッセイ結果 (readout) を各反復について昇順でランク付けした。軟寒天アッセイ結果を各反復について昇順でランク付けした。細胞傷害性アッセイ結果を各反復について降順でランク付けした。同じ標的についての順位をすべてのアッセイのすべての反復間で合計した。標的の標識をランダムに 100, 000 回順序を変え、各標的の順位の合計を記録した。実験上の順位の合計を、各標的のランダムに順番を変えた順位の合計の分布に対して比較することにより、「細胞傷害性」作用の p 値を得た。

【0546】

細胞傷害性作用：細胞傷害性作用の有意性を判定するために、増殖アッセイ結果を各反復について昇順でランク付けした。軟寒天アッセイ結果を各反復について昇順でランク付けした。細胞傷害性アッセイ結果を各反復について降順でランク付けした。同じ標的についての順位をすべてのアッセイのすべての反復間で合計した。標的の標識をランダムに100, 000回順序を変え、各標的の順位の合計を記録した。実験上の順位の合計を、各標的のランダムに順番を変えた順位の合計の分布に対して比較することにより、「細胞分裂抑制」作用のp値を得た。

【0547】

制御不能作用：制御不能作用の有意性を判定するために、増殖アッセイ結果を各反復について昇順でランク付けした。軟寒天アッセイ結果を各反復について昇順でランク付けした。細胞傷害性アッセイ結果を各反復について降順でランク付けした。同じ標的についての順位をすべてのアッセイのすべての反復間で合計した。標的の標識をランダムに100, 000回順序を変え、各標的の順位の合計を記録した。実験上の順位の合計を、各標的のランダムに順番を変えた順位の合計の分布に対して比較することにより、「制御不能」作用のp値を得た。

10

【0548】

無効作用：細胞傷害性作用の有意性を判定するために、増殖アッセイ結果を各反復について昇順でランク付けした。軟寒天アッセイ結果を各反復について昇順でランク付けした。細胞傷害性アッセイ結果を各反復について降順でランク付けした。同じ標的についての順位をすべてのアッセイのすべての反復間で合計した。標的の標識をランダムに100, 000回順序を変え、各標的の順位の合計を記録した。実験上の順位の合計を、各標的のランダムに順番を変えた順位の合計の分布に対して比較することにより、「無効」作用のp値を得た。

20

【0549】

有意判定：各標的について、4つの作用のうち最小のp値を決定した。最小のp値が0.05未満である場合、対応する有意な判定を割り当てた。最小のp値が0.05以上である場合、有意でない判定を割り当てた。

【0550】

結果を下記の表59に示す。

30

【0551】

(表59)

【0552】

【表 6 8】

個体	PC3	A549	HT29
ATP1A2	無効	無効	無効
B2M	細胞傷害性	無効	無効
CD38	無効	有意でない	無効
CPM	無効	有意でない	無効
DPT	細胞分裂抑制	細胞傷害性	細胞傷害性
FGF10	制御不能	細胞傷害性	有意でない
FGF4	細胞傷害性	細胞傷害性	細胞傷害性
FGF8	有意でない		有意でない
IGSF8	細胞分裂抑制		無効
IL4R	細胞傷害性	細胞分裂抑制	有意でない
IL6R	有意でない	有意でない	無効
ITGA4	制御不能	有意でない	制御不能
LFNG	有意でない	細胞傷害性	細胞分裂抑制
LTB	無効	制御不能	制御不能
NOTCH1	有意でない	制御不能	有意でない
NOTCH2	制御不能	有意でない	有意でない
PAG1	細胞分裂抑制		有意でない
PLAU	有意でない	有意でない	有意でない
PRG1	細胞傷害性		細胞分裂抑制
PTPRK	有意でない	制御不能	無効
SLC12A7	有意でない		有意でない
SLPI	制御不能		有意でない
THY1	制御不能		細胞傷害性

10

説明文：

細胞傷害性：抗増殖性作用および細胞傷害性作用についての P 値は有意である

20

細胞分裂抑制：細胞分裂抑制についての P 値は有意であるが、細胞傷害性作用についてはそうではない

制御不能：細胞傷害性は有意であるが、抗増殖性作用が弱い、またはない

有意でない (insignificant)：細胞分裂抑制作用または細胞傷害性作用についての p 値が有意でない

無効：抗増殖性または細胞傷害性作用がない。

【0553】

本明細書中で引用した出版物、特許および特許出願のすべては、個別の出版物または特許出願が参考として援用されると具体的かつ個々に示されるように、本明細書中で参考として援用される。

30

【0554】

本発明が、例としてのみ記載され、本発明の範囲および精神の範囲内に入っている限り、改変がなされ得ることが理解されるだろう。

【配列表】

2008535853000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/013153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 G01N33/574

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)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/005601 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN; CLARKE, MICHAEL, F; LIU, RU) 20 January 2005 (2005-01-20) pages 1-9,56 - page 84 page 82 - page 84 claims 9,14,18	23-25, 29-32, 34-36
X	US 2003/165500 A1 (RHEE CHAE-SEO ET AL) 4 September 2003 (2003-09-04) paragraphs [0066], [0143], [0177], [0194] - [0196], [0200] - [0210], [0275]; claims 13,15,19,21; figure 14	23-26, 29-39
P,X	WO 2006/034328 A (RHODE ISLAND HOSPITAL, A LIFESPAN-PARTNER; WANDS, JACK, R; KIM, MIRAN) 30 March 2006 (2006-03-30) the whole document	23-26, 29-39
----- -/--		

☒ 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

3 October 2006

Date of mailing of the international search report

12.01.2007

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

Bellmann, Anja

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/013153

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/105573 A (THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY; SHWE, LOUISE, C; SHWE,) 9 December 2004 (2004-12-09) page 28 - page 30; claims 13,14,17,19-21; table 1 -----	24,25, 29-33
Y	WO 03/104275 A (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC; JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF THE) 18 December 2003 (2003-12-18) page 4 - page 6; claims 11,13,15,17-21,23,34 -----	24,25, 29-33
Y	LINE A ET AL: "Serological identification and expression analysis of gastric cancer-associated genes" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 86, no. 11, 5 June 2002 (2002-06-05), pages 1824-1830, XP001153235 ISSN: 0007-0920 the whole document -----	23-26, 29-39
Y	BAST R C: "PERSPECTIVES ON THE FUTURE OF CANCER MARKERS" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, US, vol. 39, no. 11, PART 2, 1993, pages 2444-2451, XP009005035 ISSN: 0009-9147 the whole document -----	23-26, 29-39
Y	WO 03/004989 A (MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC; LILLIE, JAMES; GANNAVARAPU, MANJULA; G) 16 January 2003 (2003-01-16) see claim 1, Table 1: M174, page 6/8 page 7 - page 8; claim 1 page 78 - page 80 -----	23-26, 29-39
Y	WO 2004/111273 A (GENOMIC HEALTH, INC; AGUS, DAVID; BAKER, JOFFRE, B; NATALE, RONALD; SH) 23 December 2004 (2004-12-23) pages 7,8 pages 18,19,23 - page 25 -----	23-26, 29-39
Y	US 2003/165954 A1 (KATAGIRI TOYOMASA ET AL) 4 September 2003 (2003-09-04) paragraphs [0091], [0131], [0175], [0182], [0198], [0209] - [0221]; claims 1,14-28 -----	23-26, 29-39
A	WO 2005/001126 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY; KIM, NAM-SOO) 6 January 2005 (2005-01-06) the whole document -----	
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/013153

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/50098 A (GENAISSANCE PHARMACEUTICALS, INC; BIEGLECKI, KARYN M; DUDA, AMY; KOSHY) 27 June 2002 (2002-06-27) pages 5,7,15; claim 17 -----	
A	WO 2004/016317 A (ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM; TOUW, IVO, PAUL; DELWEL,) 26 February 2004 (2004-02-26) the whole document -----	
A	WO 01/77373 A (EPIGENOMICS AG; BERLIN, KURT; PIEPENBROCK, CHRISTIAN; OLEK, ALEXANDER) 18 October 2001 (2001-10-18) the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/013153

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005005601 A	20-01-2005	AU 2004256425 A1 CA 2528669 A1 KR 20060031809 A US 2006019256 A1	20-01-2005 20-01-2005 13-04-2006 26-01-2006
US 2003165500 A1	04-09-2003	NONE	
WO 2006034328 A	30-03-2006	NONE	
WO 2004105573 A	09-12-2004	NONE	
WO 03104275 A	18-12-2003	AU 2003241179 A1 BR 0311822 A CA 2488404 A1 CN 1675361 A EP 1513934 A2 JP 2006507802 T KR 20050053530 A MX PA04012225 A	22-12-2003 29-03-2005 18-12-2003 28-09-2005 16-03-2005 09-03-2006 08-06-2005 25-07-2005
WO 03004989 A	16-01-2003	NONE	
WO 2004111273 A	23-12-2004	AU 2004248140 A1 CA 2527321 A1 EP 1636380 A2	23-12-2004 23-12-2004 22-03-2006
US 2003165954 A1	04-09-2003	AU 2003201741 A1 WO 03057916 A2 JP 2005532036 T	24-07-2003 17-07-2003 27-10-2005
WO 2005001126 A	06-01-2005	JP 2006526998 T	30-11-2006
WO 0250098 A	27-06-2002	AU 2909902 A	01-07-2002
WO 2004016317 A	26-02-2004	NONE	
WO 0177373 A	18-10-2001	AU 7384001 A DE 10019058 A1 EP 1278892 A1	23-10-2001 20-12-2001 29-01-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013153

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.: 1-22, 27, 28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15 to 22, 27 and 28 are directed to a diagnostic method practised on 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:

see additional sheet

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.:

Invention 1: claims 23-26, 29-39 (all partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ US2006/ 013153

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: claims 23-26, 29-39 (all partially)

Methods for detecting a cancerous cell, methods for assessing the progression of cancer, methods for screening for anti-cancer activity, methods for identifying a patient susceptible for treatment, wherein said methods comprise measuring WNT3 expression, kits and compositions comprising oligonucleotides or antibodies or antibody fragments binding to WNT3.

Invention 2: claims 23-26, 29-39 (all partially)

Methods for detecting a cancerous cell, methods for assessing the progression of cancer, methods for screening for anti-cancer activity, methods for identifying a patient susceptible for treatment, wherein said methods comprise measuring NOTCH1 expression, kits and compositions comprising oligonucleotides or antibodies or antibody fragments binding to NOTCH1.

Invention 3 to 73: 23-26, 29-39 (all partially)

Methods for detecting a cancerous cell, methods for assessing the progression of cancer, methods for screening for anti-cancer activity, methods for identifying a patient susceptible for treatment, wherein said methods comprise measuring WNT1, WNT3A, IL2RA... and PDGFRA expression respectively, kits and compositions comprising oligonucleotides or antibodies or antibody fragments binding to WNT1, WNT3A, IL2RA... and PDGFRA respectively.

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 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 D	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/32	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
	C 0 7 K 16/46	

(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 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

(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 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

(72)発明者 ブーハー, ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

(72)発明者 チェ, クリスティン

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 0 4 8, リバティービル, セント ウィリアム ドライブ 1 3 2 1

(72)発明者 スー, シェ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フレモント, パセオ パドレ パークウェイ 6 5 0 0, 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 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

(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 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

(72)発明者 ロー, マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5

6 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA21 BA41 BA63 BA80 CA09 CA12 DA03 FA01
GA11 HA11 HA17
4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QQ58 QQ61 QR32 QR55 QR82 QS24
QS32
4B064 AG27 CA20 CC24 DA05 DA14
4C084 AA13 NA14 ZB262
4C085 AA13 AA14
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA30 CA40 DA01 DA50 DA76 EA22 EA29 EA51 FA74