

(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2008-509673

(P2008-509673A)

(43) 公表日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
C 1 2 N 9/90 (2006.01)	C 1 2 N 9/90	4 B O 5 0
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
C O 7 K 14/005 (2006.01)	C O 7 K 14/005	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-525837 (P2007-525837)
 (86) (22) 出願日 平成17年8月12日 (2005.8.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年4月2日 (2007.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/028781
 (87) 国際公開番号 W02006/028655
 (87) 国際公開日 平成18年3月16日 (2006.3.16)
 (31) 優先権主張番号 60/601, 413
 (32) 優先日 平成16年8月13日 (2004.8.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505440192
 ミレニアム ファーマシューティカルズ,
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 3 9, ケンブリッジ, シドニー ス
 トリート 7 5
 (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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト前立腺癌の同定、評価、予防および治療のための遺伝子、組成物、キットおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、前癌状態を含む前立腺癌に関連する、新規に開発された核酸分子およびタンパク質に関する。ヒト前立腺癌を検出、特徴付け、予防および処置するための組成物、キットおよび方法が提供される。本発明は、表 1 に列挙されるガンマーカー（本明細書において以降では「マーカー」または「本発明のマーカー」）に関する。本発明は、このマーカーによってコードされるかまたはこのマーカーに相当する核酸およびタンパク質を提供する（本明細書において以降では、それぞれ、「マーカー核酸」および「マーカータンパク質」）。さらに、このようなマーカータンパク質および/またはこのマーカータンパク質のフラグメントと特異的に結合する抗体、抗体誘導体および抗体フラグメントが提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価する方法であって、該方法は：

a) 患者サンプルにおけるマーカーの発現レベルを決定する工程であって、該マーカーは表 1 に列挙されるマーカーからなる群より選択される、工程と；

b) コントロールサンプルからサンプル中の該マーカーの発現のレベルを決定する工程と；

c) 該マーカーの発現のレベルを、該患者サンプルと該コントロールサンプル由来のサンプルとにおいて比較する工程と；

d) 該患者サンプルと、該コントロールサンプル由来のサンプルとの間における該マーカーの発現のレベルの有意な相違が、該患者が前立腺癌に罹患している指標である場合、該患者が前立腺癌に罹患していることを決定し、これによって患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価する工程と；

を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、コントロールサンプル由来の発現のレベルが：

a) ガンでない患者由来の前立腺細胞から決定されたレベル；

b) 良性の前立腺肥大を有するかまたは前立腺腫瘍を有さない被験体由来の前立腺細胞から決定されたレベル；

c) 良性前立腺肥大を有するかまたは前立腺腫瘍を有さない被験体の集団からの発現の平均レベルを用いて予め決定されたレベル；

から選択される方法によって決定される、方法。

【請求項 3】

前記マーカーが選択されたタンパク質に相当する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記マーカーが、転写されたポリヌクレオチドまたはその一部を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法であって、前記サンプルが：

a) 前記患者から得られた細胞；ならびに

b) 血液、リンパ液、尿、前立腺液および精液からなる群より選択される液体；
から選択されるサンプルを含む、方法。

【請求項 6】

前記マーカータンパク質の存在が、該タンパク質と特異的に結合する試薬を用いて検出される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試薬が、抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントからなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプル中の前記マーカーの発現のレベルが、核酸マーカーに対応する、転写されたポリヌクレオチドまたはその一部の該サンプル中での存在を検出することによって、評価される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

転写されたポリヌクレオチドを検出する工程が、該転写されたポリヌクレオチドを増幅する工程を包含する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記サンプル中の前記マーカーの発現レベルが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で核酸マーカーまたはその一部とアニーリングする、転写されたポリヌクレオチドのサンプル中での存在を検出することによって評価される、請求項 8 に記載の方法。

。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記サンプル中の前記マーカーの発現のレベルが、少なくとも約 2 つまたは少なくとも約 5 つの要因によって、前立腺癌に罹患していない患者におけるマーカーの発現の正常なレベルとは異なる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価する方法であって：

a) 表 1 に列挙されるマーカーから独立して選択される少なくとも 2 つのマーカーのサンプル中における発現のレベルを決定する工程と；

b) コントロールサンプル中の各々のマーカーの発現のレベルを決定する工程と；

c) 該マーカーの発現のレベルを、該患者サンプルと該コントロールサンプル由来のサンプルとにおいて比較する工程と；

d) 該マーカーの発現の対応するコントロールレベルに対して、少なくとも 2 つのマーカーの発現のレベルにおける有意な相違が、該患者が前立腺癌に罹患している指標である場合、該患者が前立腺癌に罹患していることを決定する工程と；

を包含し、これによって患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価する、方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の方法であって、コントロールサンプル由来の発現のレベルが：

a) ガンでない患者由来の前立腺細胞から決定されたレベル；

b) 良性の前立腺肥大を有するかまたは前立腺腫瘍を有さない被験体由来の前立腺細胞から決定されたレベル；

c) 良性前立腺肥大を有するかまたは前立腺腫瘍を有さない被験体の集団からの発現のレベルの平均を用いて予め決定されたレベル；

から選択される方法によって決定される、方法。

【請求項 1 4】

前記少なくとも 3 つのマーカーの発現が決定される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記少なくとも 5 つのマーカーの発現が決定される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

患者における前立腺癌の進行をモニタリングするための方法であって、

a) 第 1 の時点由来の患者サンプルにおけるマーカーの発現のレベルを決定する工程であって、該マーカーが、表 1 に列挙されるマーカーからなる群より選択される、工程と；

b) 該患者由来のサンプル中におけるマーカーの発現のレベルを引き続く時点で決定する工程と；

c) 工程 a) および b) において検出された発現のレベルを比較して、これによって該患者における前立腺癌の進行をモニタリングする工程とを包含し、

該マーカーの発現における変化が、前立腺癌の進行または退行のいずれかの指標である、方法。

【請求項 1 7】

前記マーカーが分泌されたタンパク質に相当する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記マーカーが転写されたポリヌクレオチドまたはその部分を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記サンプルが、

a) 前記患者から得られた細胞；および

b) 血液、リンパ液、尿、前立腺液および精液からなる群より選択される液体；
から選択されるサンプルを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記患者が、第 1 の時点と引き続く時点との間で腫瘍を除去するための手術を受けている、請求項 1 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

患者における前立腺癌を阻害するための候補試験化合物を同定する方法であって：

a) 患者から得られ、試験化合物に曝された第 1 のサンプル中のマーカーの発現を決定する工程であって、該マーカーが、表 1 に列挙されるマーカーからなる群より選択される、工程と；

b) 該患者から得られた第 2 のサンプルにおける該マーカーの発現を決定する工程であって、該サンプルが該試験化合物に曝されない、工程と；

c) マーカーの発現を、該試験化合物に曝されたサンプルと該試験化合物に曝されていないサンプルとにおいて比較する工程と；

d) 該試験化合物に曝されたサンプルにおける該マーカーの発現の、該第 2 のサンプルに比べて有意に低いレベルが、該試験化合物が患者における前立腺癌を阻害するために有効であることの指標である場合、該試験化合物が該患者における前立腺癌を阻害するための候補化合物であることを決定する工程と；

を包含する、方法。

10

【請求項 2 2】

前記第 1 および第 2 のサンプルが、前記患者から得られた単一のサンプルの一部であるか、または該第 1 および第 2 のサンプルが該患者から得られたプールされたサンプルの一部である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

ある患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価するためのキットであって、該キットは、表 1 に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーの発現を評価するための試薬を含み；

20

該キットは：

a) 少なくとも 1 つの核酸プローブであって、表 1 に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーに対応する転写されたポリヌクレオチドと、特異的に結合するプローブ（単数または複数）；および

b) 少なくとも 1 つの抗体であって、表 1 に列挙されるマーカーからなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーに対応するタンパク質と、特異的に結合する抗体（単数または複数）；

から選択される試薬を含む、キット。

30

【請求項 2 4】

配列番号 3、配列番号 5、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7、配列番号 2 1、配列番号 2 5、配列番号 2 7、配列番号 2 9 および配列番号 4 3 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 2 5】

配列番号 4、配列番号 6、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 2、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0 および配列番号 4 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 に記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 2 6】

40

請求項 2 5 に記載のポリペプチドに選択的に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

（関連の出願）

本出願は、2 0 0 4 年 8 月 1 3 日出願の米国仮出願第 6 0 / 6 0 1 , 4 1 3 号であって、その内容は、この引用文献によってその全体が本明細書において援用される出願の恩典を請求する。

【0 0 0 2】

（発明の分野）

50

本発明の分野は、前立腺癌であって、これには、前立腺癌の診断、特徴付け、管理および治療が含まれる。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

米国においてはますます多くのガンが報告されており、そして実際に、世界中で、主要な懸念である。現在、特定のタイプのガンに利用可能な処置は少々しかなく、そしてこれらでは、成功の絶対的な保証は得られない。最も有効であるためには、これらの処置には、悪性腫瘍の早期の検出が必要であるだけでなく、悪性腫瘍の重篤度の信頼できる評価も必要である。

10

【0004】

前立腺の癌 (PCA) は、米国の男性で最も頻繁に診断されるガンであり、男性のガンの死亡の2番目に主要な原因である (非特許文献1)。男性でのガンに対するこの器官の急性の罹患率は理解されていない。スキーン腺は、女性の組織であって、男性の前立腺と同一源であるが、有意な新生物悪性転換が観察される部位ではない。

【0005】

前立腺癌によって示される普通とは異なる問題は、ほとんどの前立腺腫瘍が生命にかかわる状態を示さないということである。解剖調査からの予測によって、1100万例ほどの多くのアメリカ人男性が前立腺癌を有するということが示される (非特許文献2)。これらの状態は、正常には緩徐であり長期的な進行の経過を示す前立腺癌の臨床的観察と一致している。このような疾患の進行の結果として、患者の寿命の間に臨床的に問題がある症例へ進行する前立腺腫瘍は比較的少ない。利用可能な方法での検出の際、ガンが十分に分化した、病巣および器官に限局されて出現する場合、処置では通常、高齢の患者の寿命を延長できない。

20

【0006】

不幸にも、通常は高頻度に進行性である前立腺癌は、利用可能な方法での臨床検出の時点で既に転移している。転移性前立腺癌を有する個体の生存率はかなり低い。これらの両極端の間では、患者はその寿命の間には前立腺腫瘍が転移するが、まだそうっていない。これらの患者については、前立腺の外科的除去は、治療的であってかつ平均余命を延長する。従って、新規に診断された患者がどの群に該当するかという正確な決定は、最適の処置および患者の生存を決定するのに重要である。

30

【0007】

現在、無症候性の疾患を検出するために医師に利用可能な少なくとも1つの早期かつ非侵襲性の試験が存在する。前立腺特異的抗原 (PSA) の存在は、標準的な抗体ベースの検出キットを用いて血液サンプルから比較的容易に測定され得る。患者の血清においてこの抗原が異常に高レベルであれば、高い確率の前立腺疾患、可能性としては癌腫、良性前立腺肥大 (BPH) または前立腺炎いずれかを示す。ほとんどの場合に、PSA上昇は、癌腫ではなくBPHまたは前立腺炎に起因する。

【0008】

臨床的および病理学的状態ならびに組織学的類別システム (例えば、グリーソン (Gleason) のシステム) を用いて、腫瘍分化の程度または腺のパターンのタイプに基づいて患者の群についての予後が示されている (非特許文献3; 非特許文献4) が、これらのシステムは、ガンの進行速度を十分には予測しない。「核の丸み」の原発性病変の組織学的切片のコンピューターシステムの画像分析の使用は、個々の患者の管理の補助として示唆されている (非特許文献4) が、この方法は、この疾患の進行を研究するのには用途が限られている。

40

【0009】

フローサイトメトリーおよびFISHを用いるDNA含量/倍数性の分析は、前立腺癌の病原力を予測するのに有用性を有することが実証されている (非特許文献5; 非特許文献6; 非特許文献7; 非特許文献8; 非特許文献9) が、これらの方法は、高価であって

50

、時間がかかり、後者の方法では、分析のために動原体特異的なプローブの構築が必要である。特定の核マトリクスタンパク質であって、その発現が前立腺癌に関連しているということが報告されているタンパク質も存在する。しかし、これらのタンパク質マーカーは、BPHと前立腺癌との間で明らかに識別されない（非特許文献10）。不幸にも、良性と悪性の前立腺腫瘍の間を識別できないマーカーは価値がほとんどない。

【0010】

従って、前立腺癌の診断、病期分類、予後予測、モニタリングおよび処置のための方法および試薬を提供することは利点がある。

【非特許文献1】Karpら、Cancer Res. 1996, 56: 5547-5556

【非特許文献2】Dhom、J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1983, 106: 210-218

【非特許文献3】Carter and Coffey, In: J. P. Karr and H. Yamanak (eds.), Prostate Cancer: The Second Tokyo Symposium, pp. 19-27, New York: Elsevier, 1989.

【非特許文献4】Diamondら、J. Urol. 1982, 128: 729-734

【非特許文献5】Pearsonら、J. Urol. 1993, 150: 120-125

【非特許文献6】Macoskaら、Cancer Res. 1994, 54: 3824-3830

【非特許文献7】Visakorpiら、Am. J. Pathol. 1994, 145: 1-7

【非特許文献8】Takahashiら、Cancer Res. 1994, 54: 3574-3579

【非特許文献9】Alcarazら、Cancer Res. 1994, 55: 3998-4002

【非特許文献10】Partinら、Cancer Res. 1993, 53: 744-746

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

（発明の説明）

本発明は、表1に列挙されるガンマーカー（本明細書において以降では「マーカー」または「本発明のマーカー」）に関する。本発明は、このマーカーによってコードされるかまたはこのマーカーに相当する核酸およびタンパク質を提供する（本明細書において以降では、それぞれ、「マーカー核酸」および「マーカータンパク質」）。さらに、このようなマーカータンパク質および/またはこのマーカータンパク質のフラグメントと特異的に結合する抗体、抗体誘導体および抗体フラグメントが提供される。

【0012】

本発明はまた、前立腺癌を診断、病期分類、予後予測、モニタリングおよび処置するための種々の方法、試薬およびキットに関する。1実施形態では、本発明は、ある患者が前立腺癌を有するか、または前立腺癌を発症することについて正常よりも高いリスクを有するかを評価する診断方法を提供し、この方法は、患者サンプルにおける本発明の少なくとも1つのマーカーの発現のレベルと、コントロール、例えば前立腺癌を有さない患者由来のサンプルにおけるマーカー（単数または複数）の発現の正常なレベルと比較する工程を包含する。患者サンプルにおけるマーカー（単数または複数）の有意に高いレベルの発現は、前立腺癌を有するかまたは前立腺癌を発症するリスクがある患者の指標であり得る。

【0013】

別の実施形態では、本発明は、患者が前立腺癌を有するか、または前立腺癌を発症する可能性が高いかを評価するための診断方法を提供し、この方法は、患者サンプルにおける

10

20

30

40

50

本発明の少なくとも１つのマーカーの発現のレベルと、良性前立腺肥大を有するかまたは前立腺腫瘍を有さないコントロール被験体由来のサンプルにおけるマーカーの発現のレベルとを比較する工程を包含する。マーカーの発現の上昇は、前立腺の癌の指標であり得る。

【 0 0 1 4 】

従って、本発明の方法は、前立腺癌を発症するリスクが上昇している患者（例えば、前立腺癌の家族歴を有する患者、変異発癌遺伝子を有すると同定された患者）を同定することにおいて有用であり得る。この方法はまた、ある患者が前立腺癌を有するか、前立腺癌を発症する可能性が高いかを評価するために有用な診断法である。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法は、前立腺癌の特定の段階を予測するのに、そしてその癌が転移している（例えば、リンパ節に対する転移）か否かを評価するのに有用であり得る。さらには、本発明の方法はまた、前立腺癌を有する患者、または前立腺癌を根絶するための治療を受けている患者についての臨床的転帰を予測するのに有用である。さらに、本発明の方法はまた、前立腺癌患者の処置の有効性（例えば、化学療法の有効性）を評価するのに有用である。さらに、本発明の方法はまた、物質の前立腺に関する発癌性を評価するのに有用である。

【 0 0 1 6 】

本発明によれば、本発明の方法の陽性の予測値が少なくとも約 10 %、好ましくは約 25 %、さらに好ましくは約 50 %、そして最も好ましくは約 90 % であるようにマーカーは選択される。また、このマーカーが、正常な非前立腺癌患者に比較して、前立腺癌患者（例えば、T 1 期の前立腺癌患者、T 2 期の前立腺癌患者、T 3 期の前立腺癌患者、T 4 期の前立腺癌患者、N 期の前立腺癌患者、M 期の前立腺癌患者、ならびに前立腺に関連する任意の他のタイプの癌、悪性腫瘍および悪性変換を含む）の少なくとも約 15 % において少なくとも 5 倍まで過剰発現される方法の実施形態が好ましい。

【 0 0 1 7 】

本発明はさらに、ある患者が前立腺癌に罹患しているか否か、前立腺癌が転移しているかまたは転移する可能性が高いかを評価する診断方法を提供し、この方法は、患者由来のサンプル中における表 1 に列挙される少なくとも 1 つのマーカーの発現のレベルと、転移していない前立腺腫瘍を有するかまたは前立腺腫瘍を有さないコントロール被験体由来のサンプル中におけるマーカー（単数または複数）の発現のレベルとを比較する工程を包含する。コントロール被験体由来のサンプルにおけるレベルと比較して、患者サンプルにおける発現の有意に高いレベルは、この前立腺癌が転移しているかまたは転移する可能性が高いかという指標である。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、前立腺癌患者の臨床的転帰を予測するための方法を提供し、この方法は、患者由来のサンプル中における表 1 に列挙される少なくとも 1 つのマーカーの発現のレベルと、良好な臨床転帰を有するコントロール被験体（例えば、無病生存レベルが 5 年を超える、以前に前立腺癌であった患者）のサンプル中におけるマーカー（単数または複数）の発現のレベルとを比較する工程を包含する。コントロール被験体由来のサンプルにおける発現レベルに比較して患者サンプルにおける有意に高レベルの発現は、その患者の転帰が劣る（例えば、無病生存が 3 年未満）ことの指標である。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、患者における前立腺癌を阻害するための治療の有効性を評価するための方法を提供する。このような方法は、患者に対して治療の少なくとも一部を提供する前にこの患者から得られた第 1 のサンプルにおける本発明の少なくとも 1 つのマーカーの発現と、この治療の一部の提供後にこの患者から得られた第 2 のサンプルにおけるマーカー（単数または複数）の発現とを比較する工程を包含する。第 1 のサンプルにおけるマーカー（単数または複数）の発現のレベルに対する第 2 のサンプルにおけるこのマーカー（単数または複数）の発現のレベルが有意に低いことは、この治療がこの患者における前立腺癌

10

20

30

40

50

を阻害するために有効であることの指標である。

【 0 0 2 0 】

これらの方法における「治療」とは、前立腺癌を処置するための任意の治療であってもよく、これには、限定はしないが、化学療法、放射線療法、腫瘍組織の外科的除去、遺伝子治療および生物学的治療、例えば、抗体およびケモカインの投与が挙げられることが理解される。従って、本発明の方法は、例えば、腫瘍負荷の軽減を評価するために、治療の前、間および後に患者を評価するために用いられ得る。

【 0 0 2 1 】

好ましい実施形態では、この方法は、化学薬品または生物学的因子を用いる治療に関する。これらの方法は、患者から得られて、この化学薬品または生物学的因子の存在下で維持された第1のサンプルにおける本発明の少なくとも1つのマーカーの発現と、この患者から得られて、この因子の非存在下で維持された第2のサンプルにおけるこのマーカーの発現とを比較する工程を包含する。第2のサンプルにおけるこのマーカー（単数または複数）の発現が、第1のサンプルにおける発現に対して有意に低いレベルであることは、この因子がこの患者において前立腺癌を阻害するために有効であることの指標である。特定の実施形態では、この第1および第2のサンプルは、この患者から得られた単一のサンプルの一部であっても、またはこの患者から得られたプールされたサンプルの一部であってもよい。

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、患者における前立腺癌の進行を評価するためのモニタリング方法を提供し、この方法は：

本発明の少なくとも1つのマーカーの発現を、第1の時点で患者由来のサンプル中で検出する工程と；

発現工程の検出を引き続く時点で適切な時間内に繰り返す工程と；

この第1および第2の検出工程において検出された発現のレベルを比較して、これによってこの患者における前立腺癌の進行をモニタリングする工程と；を包含する。第1の時点でのサンプル中のマーカーの発現レベルから、引き続く時点でのサンプル中のマーカーの発現のレベルが有意に高いことは、その前立腺癌がその患者で進行していることの指標であるが、有意に低いレベルの発現は、前立腺癌が退行していることの指標である。

【 0 0 2 3 】

本発明はさらに、患者において前立腺癌を阻害するための候補組成物を選択するための試験方法を提供する。この方法は、以下の工程：

この患者からガン細胞を含むサンプルを得る工程と；

少なくとも1つの試験組成物の存在下でこの患者由来のガン細胞を含む少なくとも1つのサンプルを別々に維持する工程と；

各々のアリコート中で本発明の少なくとも1つのマーカーの発現を比較する工程と；

この組成物が、その試験組成物を含むアリコート中で本発明の少なくとも1つのマーカーの発現のレベルを、他の試験組成物の存在下におけるこのマーカーの発現のレベルに対して有意に低下させる場合、前立腺癌の阻害のための候補組成物としてこの試験組成物を選択する工程と；を包含する。

【 0 0 2 4 】

本発明はさらに、ある化合物の前立腺癌の発癌能力を評価する試験方法を提供する。この方法は以下の工程：化合物の有無において前立腺細胞の別のアリコートを維持する工程と；各々のアリコートにおいて本発明のマーカーの発現を比較する工程とを包含する。この化合物の存在下で維持したアリコート中でのマーカーの発現が、この化合物の非存在下において維持したアリコートのマーカーの発現に比べて有意に高いことは、この化合物が前立腺癌の発癌能力を保有することの指標である。

【 0 0 2 5 】

さらに、本発明はさらに、患者における前立腺癌を阻害する方法を提供する。この方法は、以下の工程：

患者から癌細胞を含むサンプルを得る工程と；

試験組成物の存在下で患者由来のガン細胞を含む少なくとも１つのサンプルを別々に維持する工程と；

各々のアリコート中で本発明のマーカーの発現を比較する工程と；

この組成物が、他の組成物の存在下におけるこのマーカーの発現のレベルに対して、この組成物を含むアリコート中で本発明のマーカーの発現のレベルを有意に低下させる場合、前立腺癌のインヒビターとしてこの組成物を同定する工程と；

前立腺癌のインヒビターとして同定されるこの組成物の少なくとも１つをこの患者に投与する工程と；を包含する。

【 0 0 2 6 】

本発明によれば、あるサンプル中における本発明のマーカーの発現のレベルは、例えば、サンプル中における以下の存在を検出することによって、評価され得る：

対応するマーカータンパク質（例えば、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、および配列番号 44 の配列のいずれか 1 つを有するタンパク質）またはそのタンパク質のフラグメント（例えば、このタンパク質またはタンパク質フラグメントと特異的に結合する、抗体、抗体誘導体、抗体フラグメントまたは単鎖抗体のような試薬を用いることによる）；

対応するマーカー核酸（例えば、配列番号（例えば、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、および配列番号 43）またはその相補体の配列の 1 つを有するヌクレオチド転写物）、またはその核酸のフラグメント（例えば、配列番号（例えば、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、および配列番号 43）のいずれかの配列の全体またはあるセグメントを有する 1 つ以上の核酸に対して固定されている基質と、このサンプルから得られた転写ポリペプチドとを接触させることによる）、またはその相補体、あるいは

対応するマーカータンパク質によって直接（すなわち、触媒されて）または間接的に生成される代謝物。

【 0 0 2 7 】

本発明によれば、任意の上述の方法は、本発明の提供されたマーカーと、当該分野で公知のさらなる前立腺癌マーカーとの組み合わせを含む、複数（例えば、2、3、5または10以上）の前立腺癌マーカーを用いるかまたは検出して行ってもよい。このような方法では、そのうち少なくとも１つが本発明のマーカーである、複数のマーカーの各々のサンプルにおける発現のレベルを、前立腺癌に罹患していないコントロールのヒトから得た同じタイプのサンプルにおける複数のマーカーの各々の正常な発現レベルと比較する。本発明の 1 つ以上のマーカー、またはそのいくつかの組み合わせが、サンプルにおける発現の、そのマーカーの対応する正常なまたはコントロールのレベルに対して、有意に変化した（すなわち、単一のマーカーを用いて、記載された方法において特定した場合、増大または減少した）レベルであること、その患者が前立腺癌に罹患していることの指標である。上述の方法の全てについて、マーカー（単数または複数）は好ましくは、この方法の陽性の予測値が少なくとも約 10 % であるように選択される。

【 0 0 2 8 】

さらなる態様では、本発明は、マーカータンパク質（例えば、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号

10

20

30

40

50

30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42および配列番号44の配列のいずれかの配列を有するタンパク質)またはそのタンパク質のフラグメントと特異的に結合する、抗体、抗体誘導体または抗体フラグメントを提供する。本発明はまた、このような抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントを製するための方法を提供する。このような方法は、マーカータンパク質(例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42および配列番号44の配列のいずれかの配列を有するタンパク質)の全体、または10以上のアミノ酸のセグメントを含む、タンパク質またはペプチドを用いて哺乳動物を免疫する工程を包含してもよく、このタンパク質またはペプチドは、細胞から得られても、または化学合成によって得られてもよい。本発明の方法はまた、モノクローナル抗体および単鎖抗体を生成する工程を包含し、この工程はさらに、この免疫された哺乳動物から脾細胞を単離する工程と、この単離された脾細胞と固定された細胞とを融合して、ハイブリドーマを形成する工程と、マーカータンパク質またはそのタンパク質のフラグメントと特異的に結合する抗体を生成するハイブリドーマについて個々のハイブリドーマをスクリーニングする工程とを包含する。

10

【0029】

別の態様では、本発明は、種々の診断キットおよび試験キットに関する。1実施形態では、本発明は、ある患者が前立腺腫瘍に罹患しているか否かを評価するためのキットを提供する。別の態様では、このキットは、ある患者が前立腺腫瘍を発症するリスクにあるか否かを評価するために用いられ得る。このキットは、本発明の少なくとも1つのマーカーの発現を評価するための試薬を含む。さらに別の実施形態は、ある患者が侵襲性の前立腺腫瘍に罹患しているか否かを評価するために用いられ得るキットを提供する。このキットは、本発明の少なくとも1つのマーカーの発現を評価するための試薬を含む。別の実施形態では、本発明は、ある患者において前立腺癌を阻害するための化合物または生物学的因子の適切性を評価するためのキットを提供する。このようなキットは、本発明の少なくとも1つのマーカーの発現を評価するための試薬を含み、そしてまたこのような因子の1つ以上を含んでもよい。さらなる実施形態では、本発明は、前立腺癌細胞の存在を評価するかまたは前立腺癌を処置するためのキットを提供する。このようなキットは、マーカータンパク質またはそのタンパク質のフラグメントと特異的に結合する、抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントを含んでもよい。このようなキットはまた、複数の抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントであって、複数のこのような抗体因子がマーカータンパク質またはそのタンパク質のフラグメントと特異的に結合するものを含んでもよい。

20

30

【0030】

さらなる実施形態では、本発明は、前立腺癌細胞の存在を評価するためのキットを提供し、このキットは、少なくとも1つのマーカー核酸またはこの核酸のフラグメントと特異的に結合する少なくとも1つの核酸プローブを含む。このキットはさらに、複数のプローブを含み、各々のプローブがマーカー核酸またはその核酸のフラグメントと特異的に結合する。

40

【0031】

さらなる態様では、本発明は、前立腺癌に罹患しているかまたは前立腺癌を発症するリスクのある患者を処置するための方法に関する。このような方法は、本発明の少なくとも1つのマーカーの発現を減少させる工程、および/またはその生物学的機能を妨害する工程を包含し得る。1実施形態では、この方法は、マーカー核酸またはそのセグメントに対して相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを患者に提供する工程を包含する。例えば、アンチセンスポリヌクレオチドは、マーカー核酸またはそのフラグメントのアンチセンスポリヌクレオチドを発現するベクターの送達を通じて患者に提供されてもよい。別の実施形態では、この方法は、マーカータンパク質またはそのタンパク質のフラグメントに特異的に結合する抗体、抗体誘導体または抗体フラグメントを、患

50

者に対して提供する工程を包含する。好ましい実施形態では、この抗体、抗体誘導体または抗体フラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42 および配列番号 44 の配列を有するタンパク質またはそのタンパク質のフラグメントと特異的に結合する。

【0032】

本発明の方法およびキットはまた、公知の前立腺癌マーカーを含む公知のガンマーカーを含んでもよいことが理解される。この方法およびキットは、前立腺癌以外のガンを同定するために用いられ得ることもさらに理解される。

10

【0033】

別の態様では、本発明は、マーカータンパク質またはマーカーポリペプチド、例えばこのマーカータンパク質の生物学的に活性な部分をコードする核酸分子を特徴とする。好ましい実施形態では、この単離された核酸分子は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42 および配列番号 44 のアミノ酸配列を有するマーカーポリペプチドをコードする。他の実施形態では、本発明は、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、および配列番号 43 から選択されるいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を有する単離されたマーカー核酸分子を提供する。さらなる他の実施形態では、本発明は、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、および配列番号 43 に示されるヌクレオチド配列に対して実質的に同一である核酸分子（例えば、天然に存在する対立遺伝子改変体）を提供する。他の実施形態では、本発明は、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、および配列番号 43 のヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、全長マーカータンパク質またはその活性フラグメントをコードする核酸分子に対して、本明細書に記載されるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸分子を提供する。

20

30

【0034】

関連の態様では、本発明はさらに、本明細書に記載のマーカー核酸分子を含む核酸構築物を提供する。特定の実施形態では、本発明の核酸分子は、天然または異種の調節（制御）配列に対して作動可能に連結される。また、本発明のマーカー核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞、例えば、ポリペプチドを生成するために適切なベクターおよび宿主細胞も含まれる。

40

【0035】

別の関連の態様では、本発明は、マーカーコード核酸の検出のためのプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして適切な核酸フラグメントを提供する。

【0036】

さらに別の関連の態様では、マーカーコード核酸分子に対してアンチセンスである単離された核酸分子が提供される。

【0037】

他の実施形態では、本発明は、マーカーポリペプチド、例えば、配列番号 2、配列番号

50

4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42および配列番号44に示されるアミノ酸配列；配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42および配列番号44に示されるアミノ酸配列に対して実質的に同一であるアミノ酸配列；または配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、および配列番号43のヌクレオチド配列を含む核酸分子であってこの核酸が全長マーカータンパク質またはその活性なフラグメントをコードする核酸分子に対して、本明細書に記載されたストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列；を有するマーカポリペプチドを提供する。

10

【0038】

関連の態様では、本発明はさらに、本明細書に記載のポリペプチド分子を含むタンパク質またはペプチド構築物を提供する。特定の実施形態では、本発明のマーカポリペプチドまたはフラグメントは、天然または異種のマーカでないポリペプチド配列に対して作動可能に連結されて、融合タンパク質配列を形成する。

20

【0039】

さらに別の態様では、本発明は、マーカポリペプチドと反応するか、またはさらに好ましくは、特異的にもしくは選択的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントを特徴とする。

【0040】

本発明は、前立腺細胞のガン状態に関連する新規に開発されたガンマーカに関する。これらのマーカのいずれかまたはこれらのマーカの組み合わせが正常なレベルの発現よりも高いことは、患者における前立腺癌の存在と相関していることが発見されている。本発明は、正常な（すなわち、非癌性）前立腺細胞におけるそれらの発現に対して比較して、前立腺癌細胞において過剰発現される、新規に同定されたマーカの一部に基づく。前立腺細胞におけるこれらのマーカの1つ以上の増大された発現は、本明細書において組織のガン状態と相関している。表1は、正常な（すなわち非ガン性）前立腺細胞に比較して前立腺癌細胞において過剰発現される、本発明のマーカの全てを列挙する。

30

【0041】

サンプル中における前立腺癌細胞の存在を、サンプル中における異形成のような前悪性状態を含む前立腺癌の非存在を、前立腺癌の段階を、患者における前立腺癌の予防、診断、特徴付けおよび治療に関する前立腺癌の他の特徴とともに検出するための方法が提供される。前立腺癌を処置するための因子を同定する方法、ならびに前立腺癌を処置する方法も提供される。

40

【0042】

表1は本発明の前立腺マーカを列挙する。マーカは、名称（「マーカ」で命名され、その遺伝子の名称は、妥当な場合、（「遺伝子名」、マーカによってコードされるかまたはマーカに相当するヌクレオチド転写物のcDNA配列の配列表識別子（「配列番号（ヌクレオチド）」）、ヌクレオチド転写物によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列の配列表識別子（「配列番号（アミノ酸）」）、およびcDNA配列内のタンパク質コード配列の位置（「CDS」）によって一般に公知である。

【0043】

【表 1】

表 1 前立腺癌マーカー

マーカー	遺伝子名	配列番号 (ヌクレオチド)	配列番号 (アミノ酸)	CDS
M245A	ABCC4: ATP結合カセット、サブファミリー C (CFTR/MRP), メンバー 4	1	2	116..4093
M683A	AMACR: α メチルアシル-CoA ラセマーゼ, 改変体 1	3	4	90..1238
M684A	AMACR: α メチルアシル-CoA ラセマーゼ, 改変体 2	5	6	90..1274
M686	AMACR: α メチルアシル-CoA ラセマーゼ, 改変体 3	7	8	66..932
M260A	ERG: v-ets 赤芽球症ウイルス E26 癌遺伝子様 (トリ), 改変体 1	9	10	247..1635
M742	ERG: v-ets 赤芽球症ウイルス E26 癌遺伝子様 (トリ), 改変体 2	11	12	247..1626
M743	ERG: v-ets 赤芽球症ウイルス E26 癌遺伝子様 (トリ), 改変体 3	13	14	326..1408
M744	ERG: v-ets 赤芽球症ウイルス E26 癌遺伝子様 (トリ), 改変体 4	15	16	326..1417
M745	ERG: v-ets 赤芽球症ウイルス E26 癌遺伝子様 (トリ), 改変体 5	17	18	104..1471
M261	FABP5: 脂肪酸結合タンパク質 5 (乾癬関連)	19	20	49..456
M746	FLJ23153: 腫瘍壊死因子- α 誘導性脂肪関連タンパク質	21	22	103..1482
M271A	GOLPH2: ゴルジリンタンパク質 2	23	24	199...1404
M279A	HSRG1: HSV-1 刺激関連遺伝子 1	25	26	331..1974
M747	LIM: LIM タンパク質 (ラットプロテインキナーゼ C 結合エニグマと類似), 改変体 2	29	30	394..828
M164A	NET-6: 4 回膜貫通スーパーファミリーメンバー テトラスパン NET-6	31	32	207...821
M301A	NPY: ニューロペプチド Y	33	34	87...380
M308A	PLA2G2A: ホスホリパーゼ A2, グループ IIA (血小板、滑液)	35	36	273..707
M318A	SMS: スペルミンシンターゼ スペルミジンアミノプロビルトランスフェラーゼ	37	38	102..1202
M320	SPON2: スポンジン 2, 細胞外基質タンパク質	39	40	276..1271
M389	TACSTD1: 腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子 1	41	42	179..1123
M322A	TARP: T細胞レセプター γ 鎖選択的 リーディングフレームタンパク質	43	44	98..274

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

(定義)

本明細書において用いる場合、以下の用語の各々は、このセクションにおいてその用語に関連する意味を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

「 1 つの (a) および (a n) 」という文言を本明細書において用いて、この文言の文法上の目的語の 1 つまたは 2 つ以上 (すなわち、少なくとも 1 つ) を指す。例えば、「 1 つのエレメント」とは、 1 つのエレメントまたは 2 つ以上のエレメントを意味する。

【 0 0 4 6 】

「マーカー」とは遺伝子であって、正常なまたは健常な組織または細胞におけるその発現から変更された、ある組織または細胞におけるその発現のレベルが、ガンのような疾患状態に関連している遺伝子である。「マーカー核酸」とは、本発明のマーカーによってコードされるか、またはそのマーカーに対応する核酸 (例えば、mRNA、cDNA) である。このようなマーカー核酸は、任意の配列番号 (ヌクレオチド) の全体もしくは一部の配列またはこのような配列の相補体を含む DNA (例えば、cDNA) を包含する。このマーカー核酸はまた、任意の配列番号 (ヌクレオチド) の全体もしくは一部の配列またはこのような配列の相補体を含む RNA であって、全てのチミジン残基がウリジン残基で置換される RNA を包含する。「マーカータンパク質」とは、本発明のマーカーによってコードされるかまたは本発明のマーカーに相当するタンパク質である。マーカータンパク質は、任意の配列番号 (アミノ酸) の全体または部分的な配列を含む。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、交換可能に用いられる。

【 0 0 4 7 】

「プローブ」という用語は、特に意図される標的分子、例えば、あるマーカーによってコードされるかまたはそのマーカーに対応するヌクレオチド転写物またはタンパク質に対して選択的に結合し得る任意の分子をいう。プローブは、当業者によって合成されてもよいし、または適切な生物学的調製物に由来してもよい。標的分子の検出の目的のためには、プローブは、本明細書に記載のように、標識されるように特に設計され得る。プローブとして利用可能な分子の例としては、限定はしないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体および有機分子が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

「前立腺関連」体液とは、患者の体液にある場合、前立腺細胞に接触するかもしれない前立腺細胞を通過するか、またはその中に前立腺細胞から脱落した細胞もしくはタンパク質が通過し得る体液である。例示的な前立腺関連体液としては、血液 (例えば、全血、血清、血小板が除去されている血液)、リンパ液、尿、前立腺液および精液が挙げられる。多くの前立腺関連体液 (すなわち、通常は尿を除く) は、特に前立腺細胞が癌性である場合、そして詳細には、前立腺癌が転移されている場合、その中に前立腺細胞を有し得る。

【 0 0 4 9 】

「サンプル (単数または複数)」または「患者サンプル (単数または複数)」とは、患者から得られた細胞または前立腺関連体液を含む。この細胞は、例えば、前立腺組織生検もしくは組織学的切片、または骨髓生検によって、収集された前立腺組織サンプルから単離されるか、同定されるかまたはそこで見出され得る。あるいは、患者サンプルはインビボである。さらに別の代替的なサンプルとしては、前立腺細胞または前立腺に由来する細胞である、インビトロの細胞または細胞株が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

マーカーの発現の「正常な」レベルとは、前立腺癌に罹患していないヒト被験体または患者の前立腺細胞におけるマーカーの発現のレベルである。

【 0 0 5 1 】

マーカーの「過剰発現」または「有意に高レベルの発現」とは、発現を評価するために使用されるアッセイの標準誤差よりも大きい、そして好ましくは、コントロールサンプル (例えば、疾患、すなわち、前立腺癌に関連するマーカーを有さない健常な被験体由来のサンプル) におけるマーカーの発現レベル、そして好ましくはいくつかのコントロールサンプルにおけるマーカーの平均発現レベル、よりも好ましくは少なくとも 2 倍、そしてより好ましくは 3、4、5 または 10 倍大きい、試験サンプル中の発現レベルをいう。

【 0 0 5 2 】

マーカの「有意に低いレベルの発現」とは、コントロールサンプル（例えば、疾患、すなわち前立腺癌に関連するマーカを有さない健常な被験体由来のサンプル）におけるマーカの発現レベル、そして好ましくはいくつかのコントロールサンプルにおけるマーカの平均発現レベル、よりも少なくとも2倍、そしてさらに好ましくは3、4、5または10倍大きい、試験サンプル中の発現レベルをいう。

【0053】

本明細書において用いる場合、「プロモーター／調節（制御）配列」という用語は、このプロモーター／調節（制御）配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を意味する。ある場合には、この配列は、コアプロモーター配列であってもよく、そして他の場合には、この配列はまた、この遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の調節エレメントを含んでもよい。このプロモーター／調節（制御）配列は、例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現する配列であってもよい。

10

【0054】

「構成的」プロモーターとは、ヌクレオチド配列であって、ある遺伝子産物をコードするか特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結された場合、細胞のほとんどまたは全ての生理学的な状態の下で、生きているヒト細胞中でその遺伝子産物を生成させるヌクレオチド配列である。

【0055】

「誘導性」プロモーターとは、ヌクレオチド配列であって、ある遺伝子産物をコードするか、または特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結された場合、そのプロモーターに対応する誘導因子が細胞中に存在する場合にのみ実質的に、生きているヒト細胞中でその遺伝子産物を生成させるヌクレオチド配列である。

20

【0056】

「組織特異的」プロモーターとは、ヌクレオチド配列であって、ある遺伝子産物をコードするか特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結された場合、細胞がそのプロモーターに対応する組織タイプの細胞である場合にのみ実質的に、生きているヒト細胞中でその遺伝子産物を生成させるヌクレオチド配列である。

【0057】

「転写されたポリヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド転写物」とは、本発明のマーカの転写、および、もしあればRNA転写物の正常な転写後プロセッシング（例えば、スプライシング）、そしてRNA転写物の逆転写によって作成された成熟mRNAの全てまたは一部と相補的であるかまたは相同であるポリヌクレオチド（例えば、mRNA、hnRNA、cDNAまたはこのようなRNAもしくはcDNAのアナログ）である。

30

【0058】

「相補性」とは、2つの核酸鎖の領域の間、または同じ核酸鎖の2つの領域の間の配列相補性の広範な概念をいう。第1の核酸領域のアデニン残基は、残基がチミジンまたはウラシルである場合、この第1の領域に対して逆平行である第2の核酸領域の残基と、特異的な水素結合（「塩基対」）を形成し得ることが公知である。同様に、第1の核酸鎖のシステイン残基は、残基がグアニンである場合、この第1の鎖に対して逆平行である第2の核酸鎖の残基と、塩基対合し得ることが公知である。核酸の第1の領域は、同じまたは異なる核酸の第2の領域に対して、2つの領域が逆平行方式で配列されるとき、この第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基が第2の領域の残基と塩基対合し得る場合に、相補的である。好ましくは、この第1の領域は、第1の部分を含み、そして第2の領域は、第2の部分を含み、それによって、この第1および第2の部分が逆平行方式で配列される場合、この第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、そして好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、第2の部分におけるヌクレオチド残基と塩基対合し得る。さらに好ましくは、この第1の部分の全てのヌクレオチド残基が、第2の部分におけるヌクレオチド残基と塩基対合し得る。

40

【0059】

本明細書において用いる場合、「相同な」とは、同じ核酸鎖の2つの領域の間、または

50

2つの異なる核酸鎖の領域の間のヌクレオチド配列類似性をいう。両方の領域におけるヌクレオチド残基部分が、同じヌクレオチド残基で占められるならば、この領域はその位置で相同である。第1の領域は、各々の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基位置が同じ残基で占められる場合、第2の領域に対して相同である。2つの領域の間の相同性は、同じヌクレオチド残基で占められる2つの領域のヌクレオチド残基位置の割合として表現される。例えば、ヌクレオチド配列5' - A T T G C C - 3'を有する領域およびヌクレオチド配列5' - T A T G G C - 3'を有する領域は50%の相同性を共有する。好ましくは、この第1の領域は、第1の部分を含み、そして第2の領域は、第2の部分を含み、これによって、各々の部分のヌクレオチド残基位置の少なくとも約50%、そして好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%または少なくとも約95%が同じヌクレオチド残基で占められる。さらに好ましくは、各々の部分の全てのヌクレオチド残基部分が、同じヌクレオチド残基で占められる。

10

【0060】

分子は、基質から分子の実質的な画分が解離されることなしに、この基質が液体（例えば、標準のクエン酸生理食塩水、pH 7.4）でリンスできるように、この基質と共有結合的にまたは非共有結合的に会合されている場合、この基質に対して「固定」または「添付」されている。

【0061】

本明細書において用いる場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に見出される生物体に存在するヌクレオチド配列を有するRNAまたはDNA分子をいう。

20

【0062】

ガンは、そのガンの少なくとも1つの症状が軽減、終結、減速または予防される場合に「阻害される」。本明細書において用いる場合、前立腺癌はまた、その癌の再発または転移が軽減、減速、遅延または予防される場合にも「阻害される」。

【0063】

キットとは、本発明のマーカーの発現を特異的に検出するために、少なくとも1つの試薬、例えば、プローブを含む任意の製品（例えば、パッケージまたは容器）である。このキットは、本発明の方法を行うためにユニットとして販売促進、流通または販売され得る。

【0064】

「本発明のタンパク質」とは、マーカータンパク質およびそれらのフラグメント；改変体マーカータンパク質およびそれらのフラグメント；マーカーまたは改変体マーカータンパク質の少なくとも15個のアミノ酸セグメントを含むペプチドおよびポリペプチド；ならびにマーカーまたは改変体マーカータンパク質、またはマーカーまたは改変体マーカータンパク質の少なくとも15個のアミノ酸セグメントを含む融合タンパク質；を包含する。

30

【0065】

本明細書において他に特定されない限り、「抗体（単数または複数）」という用語は広義には、抗体の天然に存在する形態（例えば、IgG、IgA、IgM、IgE）、ならびに、組み換え抗体、例えば、単鎖抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体および多価特異的な抗体、ならびに前述の全てのフラグメントおよび誘導体であって、少なくとも抗原結合部位を有するフラグメントおよび誘導体を包含する。抗体誘導体は、抗体に結合体化されるタンパク質または化学的部分を含んでもよい。

40

【0066】

本発明は、前立腺細胞（例えば、ヒトから得られた細胞、培養ヒト細胞、保管されて保存されるヒト細胞およびインビボ細胞）の癌状態を評価するための、そして前立腺癌に罹患している患者を処置するための組成物、キットおよび方法を提供する。

【0067】

本発明のこの組成物、キットおよび方法は、とりわけ以下の用途を有する：
ある患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価すること；

50

ヒト患者における前立腺癌の転移能を評価すること；
前立腺癌を処置すること、および／またはある患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価することのために有用な抗体、抗体フラグメントまたは抗体誘導体を作製すること；
前立腺癌細胞の存在を評価すること；
患者における前立腺癌を阻害するための１つ以上の試験化合物の有効性を評価すること；

ある患者における前立腺癌を阻害するための治療の有効性を評価すること；
患者において前立腺癌の進行をモニタリングすること；
ある患者における前立腺癌を阻害するための組成物または治療を選択すること；
前立腺癌に罹患している患者を処置すること；
ある患者における前立腺癌を阻害すること；
ある試験化合物の前立腺癌の発癌能力を評価すること；ならびに
前立腺癌を発症するリスクのある患者において前立腺癌の発現を予防すること。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

従って、本発明は、ある患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価する方法を包含し、この方法は、この患者が転移前の前立腺癌を有するか否かを評価する工程を包含する。この方法は、患者サンプルにおける本発明のマーカの発現のレベルと、コントロール、例えば、非前立腺癌サンプルにおけるマーカの発現の正常なレベルとを比較する工程を包含する。正常なレベルに比較して患者サンプルにおけるマーカの有意に高いレベルの発現は、この患者が前立腺癌に罹患していることの指標である。好ましい実施形態では、このマーカは、表１のマーカから選択される。

【 0 0 6 9 】

配列番号（ヌクレオチド）の任意の配列またはこのような配列の相補体の全体または１５個以上のヌクレオチドのセグメントを含む核酸、ならびに配列番号（アミノ酸）の任意の配列の全体または１０個以上のアミノ酸のセグメントを含むポリペプチドを含む、遺伝子送達ビヒクル、宿主細胞および組成物（全て本明細書に記載）もまた本発明によって提供される。

【 0 0 7 0 】

本明細書において記載されるとおり、患者における前立腺癌は、本発明の１つ以上のマーカの発現のレベルの増大に関連している。しかし、上記で考察されたように、発現レベルにおけるこれらの変化のいくつかは、前立腺癌の出現から生じるが、これらの変化のうちその他は、前立腺癌細胞の癌状態を誘導、維持および促進する。従って、本発明の１つ以上のマーカの発現のレベルの増大によって特徴づけられる前立腺癌は、マーカの発現および／またはこれらのマーカによってコードされるタンパク質の機能を低下および／または妨害することによって阻害され得る。

【 0 0 7 1 】

本発明のマーカの発現は、当該分野で一般に公知の多数の方法で阻害され得る。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、マーカ（単数または複数）の転写、翻訳またはその両方を阻害するために、前立腺癌細胞に提供され得る。あるいは、マーカタンパク質に特異的に結合し、適切なプロモーター／調節領域と作動可能に連結された、抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドが、このタンパク質の機能または活性を阻害する細胞内抗体を生成するために細胞に提供されてもよい。あるマーカの発現および／または機能はまた、マーカタンパク質に特異的に結合する抗体、抗体誘導体または抗体フラグメントを用いて前立腺癌を処置することによって阻害され得る。本明細書に記載される方法を用いて、種々の分子、特に、細胞膜を横切り得る十分に小さい分子を含む分子が、マーカタンパク質の発現を阻害するか、またはマーカタンパク質の機能を阻害する分子を同定するためにスクリーニングされ得る。このように同定された化合物が、患者の前立腺癌細胞を阻害するために患者に提供されてもよい。

【 0 0 7 2 】

本発明のマーカまたはマーカの組み合わせ、ならびに本発明のマーカと組み合わ

された任意の公知のマーカーは、本発明の組成物、キットおよび方法において用いられ得る。一般には、前立腺癌細胞におけるマーカーの発現のレベルと、正常な前立腺細胞における同じマーカーの発現のレベルとの間の相違ができるだけ大きいマーカーを用いることが好ましい。この相違は、このマーカーの発現を評価するための方法の検出限界程度まで小さくてもよいが、その相違は、評価方法の標準誤差よりも少なくとも大きく、好ましくは正常な前立腺組織における同じマーカーの発現のレベルよりも少なくとも2 -、3 -、4 -、5 -、6 -、7 -、8 -、9 -、10 -、15 -、20 -、25 -、100 -、500 -、1000 - 倍以上の相違であることが好ましい。

【0073】

特定のマーカータンパク質が、前立腺細胞（すなわち、正常および癌の細胞のうちの一方または両方）から細胞周囲の細胞外間隙に分泌されることが認識される。これらのマーカーは好ましくは、このようなマーカータンパク質が、組織生検サンプルよりもヒト患者からさらに容易に収集され得る、前立腺関連体液サンプル中で検出され得るという事実のおかげで、本発明の組成物、キットおよび方法の特定の実施形態において用いられる。さらに、マーカータンパク質の検出のための好ましいインビボ技術としては、タンパク質に対する標識抗体を被験体に導入する工程が挙げられる。例えば、被験体中での存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射性マーカーを用いて、抗体を標識してもよい。

【0074】

任意の特定のマーカータンパク質が分泌タンパク質であるか否かを決定することは当業者には簡単な問題である。この決定を行うために、マーカータンパク質は、例えば、哺乳動物細胞中で、好ましくはヒト前立腺細胞株中で発現されて、細胞外液が収集されて、その細胞外液中のタンパク質の有無が評価される（例えば、そのタンパク質と特異的に結合する標識抗体を用いて）。

【0075】

以下は、タンパク質の分泌を検出するために用いられ得る方法の例である。約 8×10^5 個の293T細胞を37℃で、増殖培地（10%ウシ胎仔血清を補充したダルベッコ改変イーグル培地 {DMEM}）を含むウェル中で、5%（v/v）CO₂ 下で、95%空気雰囲気中で、約60~70%コンフルエンスまでインキュベートする。次いでこの細胞を、1ウェルあたりに、タンパク質をコードする発現ベクターを含む2μgのDNAおよび10μlのLipofectAMINETM（GIBCO/BRL Catalog番号18342-012）を含む、標準トランスフェクション混合物を用いてトランスフェクトする。このトランスフェクション混合物を約5時間維持し、次いで新鮮増殖培地で置換し、空気雰囲気中で維持する。各々のウェルを、メチオニンもシステインも含まないDMEM（DMEM-MC；ICNカタログ番号16-424-54）を用いて穏やかに2回リンスする。約1mlのDMEM-MCおよび約50μCiのTrans-³⁵STM試薬（ICNカタログ番号51006）を各々のウェルに添加した。このウェルを上記の5%CO₂ 雰囲気下で維持して、選択された期間にわたって37℃でインキュベートする。インキュベーション後、150μlの馴化培地を取り出して、遠心分離して浮遊する細胞および細片を除去する。この上清中のタンパク質の存在は、このタンパク質が分泌されていることの指標である。

【0076】

前立腺細胞を含む患者サンプルが本発明の方法で用いられ得ることが理解される。これらの実施形態では、マーカーの発現レベルは、前立腺細胞サンプル、例えば、患者から得られた前立腺組織生検におけるマーカーの量（例えば、絶対量または濃度）を評価することによって評価され得る。細胞サンプルは当然ながら、サンプルにおけるこのマーカーの量を評価する前に、種々の周知の収集後の調製および保管技術（例えば、核酸および/またはタンパク質の抽出、固定、保管、凍結、限外濾過、濃度、エバポレーション、遠心分離など）に供され得る。同様に、前立腺組織生検はまた、収集後の調製および保管技術、例えば、固定に供されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

本発明の組成物、キットおよび方法は、マーカータンパク質を発現する細胞の表面上に提示されるマーカータンパク質の少なくとも一部の発現を検出するために用いられ得る。マーカータンパク質またはその一部が細胞表面上で露出されるか否かを決定することは当業者には簡単な問題である。例えば、免疫学的方法を用いて、このようなタンパク質を細胞全体の上で検出してもよいし、または周知のコンピューターベースの配列分析方法を用いて、少なくとも1つの細胞外ドメイン（すなわち、分泌タンパク質および少なくとも1つの細胞表面ドメインを有するタンパク質の両方を含む）の存在を予測してもよい。マーカータンパク質を発現する細胞の表面上に提示されるマーカータンパク質の少なくとも一部の発現は、細胞を溶解する必要なしに検出され得る（例えば、タンパク質の細胞表面ドメインと特異的に結合する標識抗体を用いて）。

10

【 0 0 7 8 】

本発明のマーカーの発現は、転写された核酸またはタンパク質の発現を検出するため任意の広範な種々の周知の方法によって評価され得る。このような方法の非限定的な例としては、分泌された、細胞表面の、細胞質の、または核のタンパク質の検出のための免疫学的方法、タンパク質精製方法、タンパク質の機能または活性のアッセイ、核酸ハイブリダイゼーション方法、核酸逆転写方法、および核酸増幅方法が挙げられる。

【 0 0 7 9 】

好ましい実施形態では、マーカーの発現は、マーカータンパク質の正常な翻訳後改変の全てまたは一部を受けているマーカータンパク質を含む、マーカータンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合する、抗体（例えば、放射性標識抗体、発色団標識抗体、蛍光団標識抗体、または酵素標識抗体）、抗体誘導体（例えば、基質と、またはタンパク質もしくはタンパク質リガンド対のリガンドと結合体化された抗体（例えば、ビオチン-ストربتアビジン））、または抗体フラグメント（例えば、単鎖抗体、単離された抗体の超可変ドメインなど）を用いて評価される。

20

【 0 0 8 0 】

別の好ましい実施形態では、マーカーの発現は、患者サンプルにおける細胞から mRNA / cDNA（すなわち、転写されたポリヌクレオチド）を調製することによって、そしてこの mRNA / cDNA と、マーカー核酸またはそのフラグメントの補体である参照ポリヌクレオチドとをハイブリダイズすることによって評価され得る。cDNA は、必要に応じて、参照ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの前に、任意の種々のポリメラーゼ連鎖反応方法を用いて増幅され得る；好ましくは、これは増幅されない。1つ以上のマーカーの発現は、マーカー（単数または複数）の発現のレベルを評価するために定量的な PCR を用いて同様に検出され得る。あるいは、本発明のマーカーの変異または改変体（例えば、一塩基遺伝子多型、欠失など）を検出する任意の多数の公知の方法を用いて、患者におけるマーカーの出現を検出してもよい。

30

【 0 0 8 1 】

関連の実施形態では、サンプルから得られた転写されたポリヌクレオチドの混合物を、マーカー核酸の少なくとも一部（例えば、少なくとも7、10、15、20、25、30、40、50、100、500またはそれ以上のヌクレオチド残基）と相補的または相同であるポリヌクレオチドに対して固定されている基質と接触させる。相補的であるかまたは相同であるポリヌクレオチドがこの基質上で示差的に検出可能（例えば、種々の発色団もしくは発蛍光団を用いて検出可能、または種々の選択された位置に固定された）であるならば、複数のマーカーの発現のレベルが、単一の基質（例えば、選択された位置に固定されたポリヌクレオチドの「遺伝子チップ」マイクロアレイ）を用いて同時に評価され得る。1つの核酸と別の核酸とのハイブリダイゼーションを含む、マーカー発現を評価する方法が用いられる場合、ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で行われ得ることが好ましい。

40

【 0 0 8 2 】

本発明の組成物、キットおよび方法は、本発明の1つ以上のマーカーの発現レベルにお

50

ける相違の検出に依拠するので、このマーカーの発現のレベルは、正常な前立腺細胞および癌の前立腺細胞の少なくとも1つにおける発現を評価するために用いられた方法の最小検出限界よりも有意に大きいことが好ましい。

【0083】

本発明のマーカーの1つ以上を用いる、さらなる患者サンプルの慣用的なスクリーニングによって、特定のマーカーが、特定の癌を含む種々のタイプのガン、および他の癌で過剰発現されることが認識されるということが理解される。例えば、本発明のいくつかのマーカーは、前立腺癌のほとんど(すなわち、50%以上)または実質的に全て(すなわち、80%以上)で過剰発現されることが確認される。さらに、本発明の特定のマーカーは、種々の段階の前立腺癌と関連していることが確認される。TNM病期分類アプローチは、前立腺内の原発性腫瘍のサイズおよび位置に基づいて、4つの段階の1つに(そしてこれらの範疇内のさらなる小分類に)原発性腫瘍(T)を割り当てる。T1の記号は、直腸指診では検出できない顕微鏡的な腫瘍を示す。T2NOの記号は、直腸指診で明白な腫瘍を指すが、前立腺の嚢内に含まれる(局所疾患)。病期T3疾患の全ての型で、腫瘍は前立腺嚢を通じて周囲の結合組織または精嚢に拡大している。T4の記号は、前立腺から逃げて骨盤領域で見出され得る腫瘍を指す。N期とは、原発性腫瘍が限局的なリンパ節(骨盤リンパ腫)に伝播しているか否かを指す。M期とは、腫瘍細胞が別個の部位に転移しているか否かを指す。

【0084】

さらに、より多数の患者サンプルを本発明のマーカーの発現について評価し、そしてサンプルを得た個々の患者の転帰を相関させる場合、本発明の特定のマーカーの発現の変更が悪性の癌と強力に相関していることが確認される。従って、本発明の組成物、キットおよび方法は、患者における前立腺癌の1つ以上の病期、段階、組織学的タイプおよび良性/悪性の性質を特徴付けるために有用である。

【0085】

本発明の組成物、キットおよび方法を、患者における前立腺癌の1つ以上の病期、段階、組織学的タイプおよび良性/悪性の性質を特徴付けるために用いる場合、本発明のマーカーまたはマーカーのパネルは、陽性の結果が対応する病期、段階、組織学的タイプまたは良性/悪性の性質の前立腺癌に罹患している患者の少なくとも約20%、そして好ましくは少なくとも約40%、60%または80%で、そしてさらに好ましくは、罹患している実質的に全ての患者において得られるように選択されることが好ましい。好ましくは、本発明のマーカーまたはマーカーのパネルは、約10%より多くの陽性適中率(PPV)が一般的集団について得られる(さらに好ましくは80%より大きいアッセイ特異性を伴う)ように選択される。

【0086】

本発明の複数のマーカーを本発明の組成物、キットおよび方法において用いる場合、患者サンプルにおける各々のマーカーの発現のレベルは、単一の反応混合物中において(すなわち、各々のマーカーについての異なる蛍光プローブなどの試薬を用いて)、または1つ以上のマーカーに相当する個々の反応混合物中において、同じタイプの非癌サンプルにおける複数のマーカーの各々の発現の正常なレベルと比較され得る。1実施形態では、対応する正常なレベルに対して、サンプル中の複数のマーカーの2つ以上の発現の有意に増大したレベルとは、この患者が前立腺癌に罹患していることの指標である。複数のマーカーを用いる場合、2、3、4、5、8、10、12、15、20、30もしくは50またはそれ以上の個々のマーカーを用いることが好ましく、ここではマーカーが少ないことが好ましい。

【0087】

本発明の組成物、キットおよび方法の感度を最大化する(すなわち、患者サンプルにおける非前立腺起源の細胞に起因し得る干渉によって)ためには、本明細書に用いられる本発明のマーカーは、組織分布が制限されている、例えば、正常には非前立腺組織で発現されないマーカーであることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0088】

ごく少数のマーカーが、前立腺癌と関連していることが公知である（例えば、前立腺特異的抗原（PSA、KLK3）、前立腺特異的膜抗原（PSMAFOLH1）、前立腺酸性ホスファターゼ（PAP、ACPP）、前立腺癌抗原3（PCA3、DD3）、前立腺癌腫瘍抗原（PCTA-1 L G A L S 8）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、腺性カリクレイン-1（hGK-1、KLK2）、プロスターゼ（KLK4、PRSS17、KLK-L1）、前立腺特異的Gタンパク質結合レセプター（PSGR）、および前立腺の6回膜貫通上皮抗原（STEAP, PRSS24））。1実施形態では、これらのマーカーは、マーカーのパネルにおいて本発明の1つ以上のマーカーとともに用いられ得る。特定のタイプの遺伝子、例えば、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、増殖因子様遺伝子、プロテアーゼ様遺伝子、およびプロテインキナーゼ様遺伝子がしばしば、種々のタイプの癌の発症に 10
関与していることは周知である。従って、本発明のマーカーのなかでも、公知の癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子によってコードされる公知のタンパク質と似ているタンパク質に対応するマーカー、ならびに増殖因子、プロテアーゼおよびプロテインキナーゼと似ているタンパク質に対応するマーカーの使用が好ましい。

【0089】

本発明の組成物、キットおよび方法は、前立腺癌を発症するリスクの上昇を有する患者およびそれらの医学的アドバイザーに対して特に有用であることが理解される。前立腺癌を発症するリスクが上昇していると認識された患者としては、例えば、前立腺癌の家族歴を有する患者、変異癌遺伝子（すなわち、少なくとも1つの対立遺伝子）を有すると同定された患者、および高齢の患者（すなわち、約50または60歳を超える男性）が挙げら 20
れる。

【0090】

正常な（すなわち、非ガン）ヒト前立腺組織におけるマーカーの発現のレベルは、種々の方法で評価され得る。1実施形態では、発現のこの正常なレベルは、非癌性であると思われる前立腺細胞の一部におけるマーカーの発現レベルを評価することによって、そしてこの正常なレベルの発現と癌性であると疑われる前立腺細胞の一部における発現のレベルとを比較することによって、評価される。代わって、そして詳細には、さらなる情報が本明細書に記載される方法の慣用的能力の結果として利用可能になる場合、本発明のマーカーの正常な発現の集団の平均値を用いてもよい。他の実施形態では、マーカーの発現の「正常な」レベルは、癌に罹患していない患者から得られた患者サンプル、ある患者からこの患者における前立腺癌の発現が疑われる前に得られた患者サンプル、保管された患者サンプルから得られた患者サンプルなどにおいて、このマーカーの発現を評価することによ 30
って決定され得る。

【0091】

本発明はサンプル（例えば、保管された組織サンプルまたはある患者から得られたサンプル）における前立腺癌細胞の存在を評価するための組成物、キットおよび方法を包含する。これらの組成物、キットおよび方法は、必要に応じてこの組成物、キットおよび方法が患者サンプル以外のサンプルでの使用のために適合されること以外は、実質的に、上記のものと同一である。例えば、用いられるサンプルがパラフィン処理された保管されたヒト組織サンプルである場合、本発明の組成物における化合物の比を、本発明のキットにおいて、調節すること、またはこの方法を用いてサンプル中のマーカー発現のレベルを評価することが必要であり得る。このような方法は、当該分野で周知であって、当業者の技術の範囲内である。 40

【0092】

本発明は、（例えば、患者サンプルのようなサンプルにおいて）前立腺癌細胞の存在を評価するためのキットを包含する。このキットは、各々がマーカー核酸またはタンパク質と特異的に結合し得る複数の試薬を含む。マーカータンパク質との結合のために適切な試薬としては、抗体、抗体誘導体、抗体フラグメントなどが挙げられる。マーカー核酸（例えば、ゲノムDNA、mRNA、スプライシングされたmRNA, cDNAなど）との結 50

合のために適切な試薬としては、相補的な核酸が挙げられる。例えば、核酸試薬としては、基質に結合されたオリゴヌクレオチド（標識または非標識）、基質と結合されない標識オリゴヌクレオチド、PCRプライマーの対、分子ビーコンプローブなどを挙げることができる。

【0093】

本発明のキットは、本発明の方法を行うために有用なさらなる成分を必要に応じて含んでもよい。例えば、キットは、相補的な核酸をアニーリングするために、または抗体とこれが特異的に結合するタンパク質との結合のために適切な液体（例えば、SSC緩衝液）、1つ以上のサンプル区画、本発明の方法の能力を記載する説明書、正常な前立腺細胞のサンプル、前立腺癌細胞のサンプルなどを含んでもよい。

10

【0094】

本発明はまた、患者が前立腺癌に罹患しているか否かを評価するために有用な抗体を生成する単離されたハイブリドーマを作製する方法を包含する。この方法では、マーカータンパク質の全体またはセグメントを含むタンパク質またはペプチドが合成されるか単離される（例えば、公知の方法を用いる、マーカーが発現される細胞からの精製によって、または、インビボもしくはインビトロにおけるタンパク質もしくはペプチドをコードする核酸の転写および翻訳によって）。脊椎動物、好ましくは哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはヒツジは、タンパク質またはペプチドを用いて免疫される。脊椎動物は必要に応じて（かつ好ましくは）、少なくともさらに1回タンパク質またはペプチドで免疫されて、その結果その脊椎動物がそのタンパク質またはペプチドに対する強固な免疫応答を示す。当該分野で周知の任意の種々の方法を用いて、脾細胞を免疫された脊椎動物から単離して、不死化した細胞株と融合してハイブリドーマを形成する。次いで、この方式で形成したハイブリドーマを、標準的な方法を用いてスクリーニングして、マーカータンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合する抗体を生じる1つ以上のハイブリドーマを同定する。本発明はまた、この方法によって作成されたハイブリドーマ、およびこのようなハイブリドーマを用いて作成された抗体を包含する。

20

【0095】

本発明はまた、前立腺癌細胞を阻害するための試験化合物の有効性を評価する方法を包含する。上記のように、本発明のマーカーの発現のレベルにおける相違は、前立腺細胞の癌状態と相関する。本発明の特定のマーカーの発現のレベルにおける変化は、前立腺細胞の癌状態から生じる可能性が高いことが理解されるが、本発明のマーカーの他の発現のレベルにおける変化は、その細胞の癌状態を誘導、維持および促進することが同様に認識される。従って、患者における前立腺癌を阻害する化合物は、本発明のマーカーの1つ以上の発現のレベルをそのマーカーの発現の正常なレベルに近いレベル（すなわち、非癌性前立腺細胞におけるマーカーの発現のレベル）にさせる。

30

【0096】

従って、本方法は、第1の前立腺細胞サンプルにおけるそして試験化合物の存在下で維持されたマーカーの発現と、第2の前立腺細胞サンプルにおけるそして試験化合物の非存在下で維持されたマーカーの発現とを比較する工程を包含する。試験化合物の存在下における本発明のマーカーの有意に減少された発現は、この試験化合物が前立腺癌を阻害することの指標である。前立腺細胞サンプルは、例えば、患者から得られた正常な前立腺細胞の単一のサンプルのアリコート、患者から得られた正常な前立腺細胞のプールされたサンプル、正常な前立腺細胞株の細胞、患者から得られた前立腺癌細胞の単一のサンプルのアリコート、患者から得られた前立腺癌細胞のプールされたサンプル、前立腺癌細胞株の細胞などであってもよい。1実施形態では、このサンプルは、患者から得られた前立腺癌細胞であり、そして種々の前立腺癌を阻害するために有効であることが公知の複数の化合物を試験して、患者における前立腺癌を阻害するのに最高と考えられる化合物を同定する。

40

【0097】

本方法は、患者における前立腺癌を阻害するための治療の有効性を評価するために同様に用いられ得る。この方法では、1対のサンプル（一方は治療に供し、他方は治療に供さ

50

ない)において、本発明の1つ以上のマーカーの発現のレベルを評価する。試験化合物の有効性を評価する方法と同様に、治療が本発明のマーカーの有意に低レベルの発現を誘導するならば、この治療は前立腺癌を阻害するために有効である。上記のように、選択された患者由来のサンプルをこの方法で用いる場合、別の治療をインビトロで評価して、患者において前立腺癌を阻害するために最も有効であると考えられる治療を選択してもよい。

【0098】

上記のように、ヒト前立腺細胞の癌状態を、本発明のマーカーの発現のレベルにおける変化と相関させる。本発明は、試験化合物のヒト前立腺細胞癌発癌能力を評価するための方法を包含する。この方法は、試験化合物の有無においてヒト前立腺細胞の別々のアリコートを維持する工程を包含する。各々のアリコートにおいて本発明のマーカーの発現を比較する。試験化合物の存在下で維持したアリコート中の本発明のマーカーの有意に高レベルの発現(試験化合物の非存在下で維持したアリコートに対して)は、この試験化合物がヒト前立腺細胞の発癌能を保有することの指標である。種々の試験化合物の相対的な発癌能力は、関連のマーカーの発現のレベルの増強もしくは阻害の程度を評価することによって、発現のレベルが増強もしくは阻害されるマーカーの数を比較することによって、または両者を比較することによって評価され得る。

【0099】

本発明の種々の態様は、以下の小区分にさらに詳細に記載される。

【0100】

(単離された核酸分子)

本発明の1態様は、マーカータンパク質またはその一部をコードする核酸を含む単離された核酸分子に関連する。本発明の単離された核酸はまた、マーカー核酸分子およびマーカー核酸分子のフラグメントを同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸分子、例えば、マーカー核酸分子の増幅または変異のためのPCRプライマーとしての使用に適切な核酸を包含する。本明細書において用いる場合、「核酸分子」という用語は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)およびRNA分子(例えば、mRNA)ならびにヌクレオチドアナログを用いて生成されたDNAまたはRNAのアナログを含むものとする。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0101】

「単離された」核酸分子とは、核酸分子の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離されている核酸分子である。1実施形態では、「単離された」核酸分子とは、核酸が由来する生物体のゲノムDNAにおける核酸(すなわち、核酸の5'および3'末端に位置する配列)に天然に隣接する配列(好ましくはタンパク質コード配列)がない。例えば、種々の実施形態では、単離された核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおける核酸分子に天然に隣接するヌクレオチド配列の約5kB、4kB、3kB、2kB、1kB、0.5kBまたは0.1kB未満を含んでもよい。別の実施形態では、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、他の細胞物質も、組み換え技術によって生成される場合培養培地も実質的に含まず、または化学的前駆体も、化学的に合成される場合他の化合物も実質的に含み得ない。細胞物質を実質的に含まない核酸分子は、異種核酸(本明細書において「混入核酸」ともいわれる)の約30%、20%、10%または5%未満を有する調製物を含む。

【0102】

本発明の核酸分子は、本明細書において記載される標準的な分子生物学的技術およびデータベース記録における配列情報を用いて単離され得る。このような核酸配列の全てまたは一部を用いて、本発明の核酸分子は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクロニングの技術(例えば、Sambrookら、ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NT, 1989)を用いて単離され得る。

【0103】

本発明の核酸分子は、標準的なPCR増幅技術に従って、テンプレートおよび適切なオリゴヌクレオチドプライマーとしてcDNA、mRNAまたはゲノムDNAを用いて増幅され得る。そのように増幅された核酸は、適切なベクターにクローニングされて、DNA配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、本発明の核酸分子の全てまたは一部に相当するヌクレオチドは、例えば、自動化されたDNAシンセサイザーを用いて標準的な合成技術によって調製され得る。

【0104】

別の好ましい実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、マーカー核酸のヌクレオチド配列に対して、またはマーカータンパク質をコードする核酸のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子を含む。所定のヌクレオチド配列に相補的である核酸分子とは、所定のヌクレオチド配列に対してハイブリダイズし得、それによって安定な二重鎖を形成する所定のヌクレオチド配列に対して十分に相補的である核酸分子である。

10

【0105】

さらに、本発明の核酸分子は、核酸配列の一部しか含み得ず、この全長核酸配列は、マーカー核酸を含むかまたはマーカータンパク質をコードする。このような核酸は、例えば、プローブまたはプライマーとして用いられ得る。プローブ/プライマーは代表的には、1つ以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして用いられる。このオリゴヌクレオチドは代表的には、ストリンジェントな条件下で、本発明の核酸の少なくとも約7、好ましくは約15、さらに好ましくは約25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、350または400以上の連続したヌクレオチドに対してハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

20

【0106】

本発明の核酸分子の配列に基づくプローブを用いて、本発明の1つ以上のマーカーに相当する転写物またはゲノム配列を検出してもよい。このプローブは、それに結合された標識基、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素補助因子を含む。このようなプローブは、被験体由来の細胞のサンプル中でタンパク質をコードする核酸分子のレベルを測定すること、例えば、mRNAレベルを検出すること、またはタンパク質をコードする遺伝子に変異されているかまたは欠失されているかを決定することなどによって、このタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として用いられ得る。

30

【0107】

本発明はさらに、マーカータンパク質（例えば、配列番号（アミノ酸）の配列を有するタンパク質）をコードする核酸のヌクレオチド配列とは、遺伝子コードの縮重に起因して、異なる核酸分子を包含し、従ってこの同じタンパク質をコードする。

【0108】

アミノ酸配列における変化をもたらすDNA配列多形性が、ある集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることは当業者によって理解される。このような遺伝子多形性は、天然の対立遺伝子改変体に起因して集団内の個体間で存在し得る。対立遺伝子は、所定の遺伝子座で代替的に出現する遺伝子の群の1つである。さらに、RNA発現レベルに影響するDNA多形性はまた、その遺伝子の全体的な発現レベルに影響し得る（例えば、調節または分解に影響することによって）ことが理解される。

40

【0109】

本明細書において用いる場合、「対立遺伝子改変体」という句は、所定の遺伝子座で、またはヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドに対して生じるヌクレオチド配列をいう。

【0110】

本明細書において用いる場合、「遺伝子」および「組み換え遺伝子」という用語は、本発明のマーカーに相当するポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含

50

む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子改変体は代表的に、所定の遺伝子のヌクレオチド配列において1～5%の分散を生じ得る。別の対立遺伝子は、多数の種々の個体において目的の遺伝子を配列決定することによって同定され得る。これは、種々の個体において同じ遺伝子座を同定するためにハイブリダイゼーションプローブを用いることによって容易に行われ得る。天然の対立遺伝子改変体の結果であり、そして機能的な活性を変更させない、任意のかつ全てのこのようなヌクレオチド改変体および得られたアミノ酸多形性もしくは改変体は、本発明の範囲内であるものとする。

【0111】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500、またはそれ以上の長さのヌクレオチドであり、かつマーカー核酸に対して、またはマーカータンパク質をコードする核酸に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。本明細書において用いる場合、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、お互いに対して少なくとも60%（65%、70%、好ましくは75%）同一であるヌクレオチド配列が代表的にはお互いに対してハイブリダイズしたままである、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を記載するものとする。このようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、そしてCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)のsections 6.3.1-6.3.6に見出され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中で約45でのハイブリダイゼーション、その後の0.2×SSC、0.1%SDS中で50～65で1回以上の洗浄である。

【0112】

集団中に存在し得る本発明の核酸分子の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列変化が、変異であって、それによってコードされたタンパク質の生物学的活性を変化させることなく、このコードされたタンパク質のアミノ酸配列における変化をもたらす変異によって導入され得ることをさらに理解する。例えば、当業者は、「非必須」アミノ酸残基でアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換基を作成し得る。「非必須」アミノ酸残基とは、生物学的活性を変化させることなく野生型配列から変化され得る残基であるが、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要である。例えば、種々の種の相同体の間で保存されないかまたは半分だけ保存されたアミノ酸残基は、活性には非必須であり、従って変化のための標的であると考えられる。あるいは、種々の種（例えば、マウスおよびヒト）の相同体の間で保存されているアミノ酸残基は、活性に必須であり、したがって変化の標的ではないと考えられる。

【0113】

従って、本発明の別の態様は、活性にとって必須でないアミノ酸残基の変化を含む改変体マーカータンパク質をコードする核酸分子に関する。このような改変マーカータンパク質は、天然に存在するマーカータンパク質とはアミノ酸配列が異なるが生物学的活性は保持している。1実施形態では、このような改変体マーカータンパク質は、マーカータンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも約40%同一、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0114】

改変体マーカータンパク質をコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸残基置換、付加または欠失がコードされたタンパク質に導入されるように、1つ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失をマーカー核酸のヌクレオチド配列に導入することによって作成されてもよい。変異体は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介性突然変異誘

発のような標準的な技術によって導入され得る。好ましくは、保存的なアミノ酸置換は、1つ以上の推定非必須アミノ酸で行なわれる。「保存的なアミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で規定されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。あるいは、変異体は、飽和突然変異誘発などによって、コード配列の全てまたは一部にそって無作為に導入されてもよく、そして得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するための生物学的活性についてスクリーニングされてもよい。突然変異誘発後、コードされたタンパク質は、無作為に発現されてもよく、そしてタンパク質の活性が決定され得る。

10

20

30

40

50

【0115】

本発明は、アンチセンス核酸分子、すなわち、本発明のセンス核酸に対して相補的、例えば、二本鎖マーカーcDNA分子のコード鎖に対して相補的、またはマーカーのmRNA配列に対して相補的である分子を包含する。従って、本発明のアンチセンス核酸は、本発明のセンス核酸に水素結合（すなわち、アニーリング）し得る。アンチセンス核酸は、コード鎖全体に対して、またはその一部のみ、例えば、タンパク質コード領域（またはオープンリーディングフレーム）の全てもしくは一部に対して相補的であり得る。アンチセンス核酸分子はまた、マーカータンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域の全てまたは一部に対してアンチセンスであり得る。この非コード領域（「5'および3'非翻訳領域」）はコード領域に隣接しておりアミノ酸に翻訳されない5'および3'配列である。

【0116】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50以上のヌクレオチド長であってもよい。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いる化学合成および酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチドを用いて、または分子の生物学的安定性を増大するようもしくはアンチセンスとセンスの核酸との間で形成された二重鎖の物理的安定性を増大するように設計された種々の改変ヌクレオチドを用いて化学的に合成され得、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る。アンチセンス核酸を生成するために用いられ得る改変ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ワイプトキソシン、プソイドウラシル（pseudouracil）、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp

3) w、および 2, 6 - ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクロニングされている発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る（すなわち、挿入された核酸から転写された RNA は、以下の節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である）。

【0117】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には、被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果、それらはマーカータンパク質をコードする細胞の mRNA および / またはゲノム DNA とハイブリダイズするか、またはそれに対して結合して、それにより、例えば、転写および / または翻訳を阻害することによって、マーカーの発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によるものであってもよく、または例えば、DNA 二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主要な溝における特異的な相互作用によるものであってもよい。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例としては、組織部位への直接注射、またはアンチセンス核酸分子の前立腺関連体液への注入が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的するように改変され、次いで全身に投与されてもよい。例えば、全身投与のためには、アンチセンス分子は、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に対してこのアンチセンス核酸分子を結合することによって、それらのアンチセンス分子が、選択された細胞表面で発現されるレセプターまたは抗原と特異的に結合するように改変されてもよい。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書に記載のベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子が強力な pol II または pol III プロモーターの制御下におかれるベクター構築物が好ましい。

10

20

【0118】

本発明のアンチセンス核酸分子は、アノマー核酸分子であってもよい。アノマー核酸分子は、相補的 RNA との特異的な二本鎖ハイブリッドを形成するが、ここでは通常のユニットとは対照的に、この鎖はお互いに並行になっている (Gaultier ら、1987, Nucleic Acids Res. 15: 6625 - 6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2' - o - メチルリボヌクレオチド (Inoue ら、1987, Nucleic Acids Res. 15: 6131 - 6148) またはキメラ RNA - DNA アナログ (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215: 327 - 330) を含んでもよい。

30

【0119】

本発明はまた、リボザイムを含む。リボザイムは、相補的領域を有する mRNA のような単鎖核酸を切断できる、リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性 RNA 分子である。従って、リボザイム (例えば、Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334: 585 - 591 に記載されるようなハンマーヘッドのリボザイム) は、触媒性に mRNA 転写物を切断して、それによってこの mRNA にコードされるタンパク質の翻訳を阻害するために用いられ得る。マーカータンパク質をコードする核酸分子に特異性を有するリボザイムは、このマーカーに対応する cDNA のヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、切断されるべきヌクレオチド配列に対して相補的である Tetrahymena L - 19 IVS RNA の誘導体が構築され得る (Cech ら、米国特許第 4, 987, 071 号; および Cech et al., 米国特許第 5, 116, 742 号を参照のこと)。あるいは、本発明のポリペプチドをコードする mRNA は、RNA 分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性 RNA を選択するために用いられ得る (例えば、Bartel and Szostak, 1993, Science 261: 1411 - 1418 を参照のこと)。

40

【0120】

本発明はまた、三重らせん構造を形成する核酸分子を包含する。例えば、本発明のマーカーの発現は、標的細胞における遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成するマーカ

50

ー核酸またはタンパク質をコードする遺伝子の制御領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）に対して相補的なヌクレオチド配列を標的することによって阻害され得る。一般的には、Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6 (6) 569-84; Helene (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; および Maher (1992) Bioassays 14 (12): 807-15 を参照のこと。

【0121】

種々の実施形態では、本発明の核酸分子は、例えば、この分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは溶解度を改善するように、塩基部、糖部分またはリン酸骨格で改変されてもよい。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変されてもよい (Hyrupら、1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4 (1): 5-23 を参照のこと)。本明細書において用いる場合、「ペプチド核酸」または「PNAs」という用語は、核酸模倣物、例えば、DNA 模倣物であって、デオキシリボースリン酸骨格がシュードペプチド骨格によって置換されており、4つの天然の核酸塩基のみが保持されている模倣物をいう。PNAの天然の骨格は、低イオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的なハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup et al. (1996), supra; Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675 に記載されるような標準的な固相ペプチド合成プロトコルを用いて行なわれ得る。

10

20

【0122】

PNAは、治療および診断の適用において用いられ得る。例えば、PNAは、例えば、転写もしくは翻訳の停止を誘導すること、または複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的改変のためのアンチセンスまたはアンチジーン因子として用いられ得る。PNAはまた、例えば、PNA指向性PCRクランプによる遺伝子の一塩基対変異の分析において用いられ得る；他の酵素、例えばS1ヌクレアーゼと組み合わせて用いる場合人工的制限酵素として (Hyrup (1996), supra; またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして (Hyrup, 1996, supra; Perry-O'Keefeら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675) 用いられ得る。

30

【0123】

別の実施形態では、PNAは、例えば、それらの安定性または細胞取り込みを増強するために、PNAに対して脂肪親和性または他のヘルパー基を結合することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリボソームもしくは当該分野で公知の薬物送達他の技術の使用によって、改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性をあわせ得る、PNA-DNAキメラが生成されてもよい。このようなキメラによってDNA認識酵素、例えばRNase HおよびDNAポリメラーゼがDNA部分と相互作用することが可能になるが、一方PNA部分は、高い結合親和性および特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基の間の結合数および方向に関して選択された適切な長さのリンカーを用いて連結され得る (Hyrup, 1996, supra)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup (1996), supraおよびFinn et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24 (17) 3357-63 に記載されるように行なわれ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学および改変されたヌクレオシドアナログを用いて固体支持体上で合成され得る。5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイトのような化合物が、PNAとDNAの5'末端との間の連結として用いられ得る (Magら、1989, Nucleic Acids Res. 17: 5973-88)。次いで、PNAモノマーを、段階的な方式でカップリングさせて、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する (Finnら、1996, Nucleic Acids Res. 24 (17): 3357-63)。あるいは

40

50

は、キメラ分子は、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを用いて合成されてもよい (Peterserら、1975, Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124)。

【0124】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、他の付加基、例えば、ペプチド (例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的するため)、または細胞膜を横切る輸送を促進する因子 (例えば、Letsingerら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556; Lemaîtreら、1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652; PCT公開番号WO88/09810を参照のこと) または血液脳関門 (例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと) を含んでもよい。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断因子 (例えば、Krolら、1988, Bio/Techniques 6: 958-976を参照のこと) またはインターキレート剤 (例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549を参照のこと) を用いて改変されてもよい。このために、オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋因子、輸送因子、ハイブリダイゼーション誘発切断因子などに対して結合体化されてもよい。

【0125】

本発明はまた、分子ビーコン核酸を含むが、この核酸は、分子ビーコンがサンプル中の本発明の核酸の存在を定量するために有用であるように、本発明の核酸に対して相補的である少なくとも1つの領域を有する。「分子ビーコン」核酸は、相補的領域の対を含み、かつそれに会合する発蛍光団および蛍光性クエンチャーを有する核酸である。発蛍光団およびクエンチャーは、相補的領域がお互いにアニーリングする場合に発蛍光団の蛍光がクエンチャーによってクエンチされるような方向で、核酸の異なる部分と会合される。核酸の相補的な領域がお互いとアニーリングしない場合、発蛍光団の蛍光は、低い程度までクエンチされる。分子ビーコン核酸は、例えば、米国特許第5,876,930号に記載される。

【0126】

(単離されたタンパク質および抗体)

本発明の1態様は、単離されたマーカータンパク質およびその生物学的に活性な部分、ならびにマーカータンパク質またはそのフラグメントに対する抗体を惹起する免疫原としての使用に適切なポリペプチドフラグメントに関する。1実施形態では、ネイティブなマーカータンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いて適切な精製スキームによって細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、マーカータンパク質の全体またはセグメントを含むタンパク質またはペプチドが、組み換えDNA技術によって生成される。組み換え発現に代わって、このようなタンパク質またはペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学的に合成されてもよい。

【0127】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、そのタンパク質が由来する細胞もしくは組織供給源由来の細胞性物質もしくは他の混入するタンパク質を実質的に含まず、または化学的に合成された場合、化学的な前駆体もしくは他の化合物を実質的に含まない。「実質的に細胞物質を含まない」という用語は、タンパク質が、そのタンパク質が単離されるかもしくは組み換え生成される細胞の細胞成分から分離されている、タンパク質の調製物を包含する。従って、細胞性物質を実質的に含まないタンパク質としては、異種タンパク質 (本明細書においては「混入タンパク質」としても言及される) の約30%、20%、10%または5%未満 (乾燥重量として) を有するタンパク質の調製物が挙げられる。タンパク質またはその生物学的に活性な部分が組み換え生成される場合、これはまた、培養培地を実質的に含まない、すなわち、培養培地がタンパク質調製の容積の約20%、10%または5%未満であることが好ましい。タンパク質が化学合成によって生成される場合、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含

まない、すなわち、タンパク質の合成に關与する化学的前駆体または他の化学物質から分離されていることが好ましい。従って、このタンパク質のこのような調製物は、目的のポリペプチド以外の化学的前駆体または化合物の約30%、20%、10%、5%（乾燥重量として）未滿を有する。

【0128】

マーカートンパク質の生物学的に活性な部分は、全長タンパク質よりも含むアミノ酸が少なく、かつ対応する全長タンパク質の活性の少なくとも1つを示す、マーカートンパク質のアミノ酸配列と実質的に同一であるかまたはそのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。本発明のマーカートンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100またはそれ以上のアミノ酸長であるポリペプチドであってもよい。さらに、他の生物学的に活性な部分であって、マーカートンパク質の他の領域を欠く部分は、組み換え技術によって調製されて、そのマーカートンパク質の天然型の機能的活性の1つ以上について評価され得る。

10

【0129】

好ましいマーカートンパク質は任意の配列番号の配列（ヌクレオチド）を含むヌクレオチド配列によってコードされる。他の有用なタンパク質は、これらの配列のうちの1つに対して実質的に同一（例えば、少なくとも約40%、好ましくは50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%）であり、そして対応する天然に存在するマーカートンパク質の機能的活性を保持するが、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なる。

20

【0130】

2つのアミノ酸配列のまたは2つの核酸の同一性パーセントを決定するためには、配列は最適比較目的（optimal comparison purposes）について整列される（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適アラインメントのために、第1のアミノ酸の配列または核酸配列中にギャップが導入されてもよい）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されるならば、この分子はその位置で同一である。2つの配列の間の同一性パーセントは、この配列によって共有される同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数（例えば、重複する位置）× 100）。1実施形態では、この2つの配列は同じ長さである。

30

【0131】

2つの配列の間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成される。2つの配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877のように改変された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 - 2268のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410のBLASTNおよびBLASTXプログラムに組み込まれる。BLASTヌクレオチド検索を、BLASTNプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12で行なって、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、BLASTNプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3で行なって、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップアラインメントを得るためには、Gapped BLASTと呼ばれるBLASTアルゴリズムの新規なバージョンを、プログラムBLASTN、BLASTPおよびBLASTXのギャップの局所アルゴリズムを行なうことができるAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402に記載されるように利

40

50

用してもよい。あるいは、P S I - B l a s tを用いて、分子の間の距離関係を検出する繰り返し検索を行なってもよい。B L A S T、G a p p e d B L A S TおよびP S I - B l a s tプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、B L A S T XおよびB L A S T N）のデフォルトパラメータを用いてもよい。http://www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照のこと。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, (1988) C A B I O S 4:11-17のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、G C G配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるA L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれる。アミノ酸配列を比較するためにA L I G Nプログラムを利用する場合、P A M 1 2 0ウェイト残余表、12のギャップ長ペナルティー、および4のギャップペナルティーを用いてもよい。局所配列類似性およびアラインメントの領域を同定するためのさらに別の有用なアルゴリズムは、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448に記載されるようなF A S T Aアルゴリズムである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するためのF A S T Aアルゴリズムを用いる場合、P A M 1 2 0ウェイト残余表は例えば、2のk-tuple値で用いられ得る。

10

【0132】

2つの配列の間の同一性パーセントは、ギャップを可能にするか否かの、上記の技術と同様の技術を用いて決定され得る。同一性パーセントを算出するのにおいては、正確なマッチングのみをカウントする。

20

【0133】

本発明はまた、マーカートンパク質またはそのセグメントを含むキメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書において用いる場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、異種ポリペプチド（すなわち、マーカートンパク質以外のポリペプチド）に作動可能に連結されたマーカートンパク質の全てまたは一部（好ましくは生物学的に活性な部分）を含む。融合タンパク質内では、「作動可能に連結された」という用語とは、マーカートンパク質またはそのセグメントおよび異種ポリペプチドがお互いにインフレームで融合されることを示すものとする。異種ポリペプチドは、マーカートンパク質またはセグメントのアミノ末端またはカルボキシル末端に融合されてもよい。

30

【0134】

1つの有用な融合タンパク質は、G S T融合タンパク質であり、このタンパク質ではマーカートンパク質またはセグメントが、G S T配列のカルボキシル末端に融合される。このような融合タンパク質は、本発明の組み換えポリペプチドの精製を促進し得る。

【0135】

別の実施形態では、この融合タンパク質は、そのアミノ末端に異種シグナル配列を含む。例えば、マーカートンパク質のネイティブなシグナル配列が取り除かれて、別のタンパク質由来のシグナル配列で置換されてもよい。例えば、バキュロウイルスエンベロープタンパク質のgp67分泌性配列は、異種シグナル配列として用いられ得る（Ausubelら、ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1992）。真核生物異種シグナル配列の他の例としては、メリチンおよびヒト胎盤アルカリホスファターゼの分泌配列が挙げられる（Stratagene; La Jolla, California）。さらに別の例では、有用な原核生物異種シグナル配列としては、phoA分泌シグナル（Sambrookら、supra）およびプロテインA分泌シグナル（Pharmacia Biotech; Piscataway, New Jersey）が挙げられる。

40

【0136】

さらに別の実施形態では、融合タンパク質は、マーカートンパク質の全てまたは一部が免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合されている、免疫グロブリン融合タンパク質である。本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、リガンド（可溶性または膜結合性）と細胞表面のタンパク質（レセプター）との間の相互作用を阻

50

害し、それによってインビボにおけるシグナル伝達を抑制するために、薬学的組成物中に組み込まれて、被験体に投与されてもよい。免疫グロブリン融合タンパク質は、マーカータンパク質の同族のリガンドのバイオアベイラビリティに影響するように用いられてもよい。リガンド/レセプター相互作用の阻害は、増殖性および分化上の障害を処置するために、そして細胞生存を調節する（例えば、促進するかまたは阻害する）ための両方のために、治療上有用であり得る。さらに、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中でマーカータンパク質に対する抗体を生成するための免疫原として、リガンドを精製するために、そしてスクリーニングアッセイにおいては、マーカータンパク質とリガンドとの相互作用を阻害する分子を同定するために、用いられ得る。

【0137】

本発明のキメラおよび融合タンパク質は、標準的な組み換えDNA技術によって生成されてもよい。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNAシンセサイザーを含む従来の技術によって合成されてもよい。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、2つの連続した遺伝子フラグメントの間の相補的なオーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて行なわれてもよく、これがキメラ遺伝子配列を生成するために引き続いてアニーリングされ、そして再増幅され得る（例えば、Ausubelら、supraを参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードする多くの発現ベクターが市販されている。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、融合部分が本発明のポリペプチドに対してインフレームで連結されるように、このような発現ベクター中にクローニングされてもよい。

【0138】

シグナル配列を用いて、マーカータンパク質の分泌および単離を容易にしてもよい。シグナル配列は代表的には、一般的に1つ以上の切断事象において分泌の間に成熟タンパク質から切断される、疎水性アミノ酸のコアによって特徴付けられる。このようなシグナルペプチドは、成熟タンパク質が分泌経路を通過する際、その成熟タンパク質からのシグナル配列の切断を可能にするプロセシング部位を含む。従って、本発明は、マーカータンパク質、融合タンパク質またはシグナル配列を有するそのセグメントに、そしてシグナル配列がタンパク質分解性に切断されているこのようなタンパク質（すなわち、切断産物）に関する。1実施形態では、シグナル配列をコードする核酸配列は、目的のタンパク質、例えばマーカータンパク質またはそのセグメントに対して発現ベクター中で作動可能に連結され得る。このシグナル配列は、発現ベクターがその中に形質転換されている真核生物宿主などからのタンパク質の分泌に関連し、そしてこのシグナル配列は引き続きまたは同時発生的に切断される。次いで、このタンパク質は、当該分野で認識された方法によって細胞外培地から容易に精製され得る。あるいは、シグナル配列は、GSTドメインなどを有する精製を容易にする配列を用いて目的のタンパク質に対して連結され得る。

【0139】

本発明はまた、マーカータンパク質の改変体に関与する。このような改変体は、アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストのいずれかとして機能し得る変更されたアミノ酸配列を有する。改変体は、変異誘発、例えば、別個の点突然変異または切断によって生成され得る。アゴニストは、タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性が実質的に同じのままであるか、またはサブセットであってもよい。タンパク質のアンタゴニストは、例えば、目的のタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに対して競合的に結合することによって、タンパク質の天然に存在する形態の活性の1つ以上を阻害し得る。従って特定の生物学的効果は、種々の限定機能の改変体での処置によって誘発され得る。このタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置によって、このタンパク質の天然に存在する形態での処置に対して被験体において副作用が少なくなり得る。

【0140】

アゴニスト（模倣物）として、またはアンタゴニストとして機能するマーカータンパク質の改変体は、アゴニストまたはアンタゴニスト活性について本発明のタンパク質の変異

10

20

30

40

50

体、例えば、短縮変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定され得る。1実施形態では、改変体の多様なライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発によって生成され、そして多様な遺伝子ライブラリーによってコードされる。改変体の多様なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することによって生成され得、その結果可能性のあるタンパク質配列の変性セットが、個々のポリペプチドとして、あるいはより大きい融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイについて）発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列由来のマーカートンパク質の潜在的な改変体のライブラリーを生成するために用いることができる種々の方法が存在する。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当該分野で公知である（例えば、Narang, 1983, Tetrahedron 39:3; Itakuraら、1984, Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら、1984, Science 198:1056; Ikeら、1983 Nucleic Acid Res. 11:477を参照のこと）。

10

20

30

40

50

【0141】

さらに、マーカートンパク質のセグメントのライブラリーを用いて、改変体マーカートンパク質またはそのセグメントのスクリーニングおよび引き続く選択のためのポリペプチドの多様な集団を生成することができる。例えば、コード配列フラグメントのライブラリーは、1分子あたり約1回だけのニックが生じる条件下でヌクレアーゼを用いて、目的のコード配列の二本鎖PCRフラグメントを処置すること、二本鎖DNAを変性すること、異なるニック産物由来のセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するDNAを復元すること、S1ヌクレアーゼでの処置によって再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去すること、そして得られたフラグメントライブラリーを発現ベクターに連結することによって生成され得る。この方法によれば、目的のタンパク質の種々のサイズのアミノ末端フラグメントおよび内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが誘導され得る。

【0142】

点変異または短縮（切断）によって作製されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、および選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするためには、いくつかの技術が当該分野で公知である。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、ハイスループット分析になり易い、最も広範に用いられる技術は代表的には、複製可能な発現ベクターへ遺伝子ライブラリーをクローニングする工程、得られたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換する工程、およびその遺伝子産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離が所望の活性の検出によって容易になる条件下で、このコンビナトリアル遺伝子を発現する工程を包含する。ライブラリーにおける機能的変異の頻度を増強する技術である、再帰的アンサンブル変異誘発（recursive ensemble mutagenesis）（REM）をスクリーニングアッセイと組み合わせ用いて、本発明のタンパク質の改変体を同定することができる（Arkin and Yourvan, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgraveら、1993, Protein Engineering 6(3):327-331）。

【0143】

本発明の別の態様は、本発明のタンパク質に対する抗体に関係する。好ましい実施形態では、この抗体は、マーカートンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する。本明細書において互換可能に用いる場合、「抗体（単数）」および「抗体（複数）」という用語は、免疫グロブリン分子、ならびに免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分を含むそのフラグメントおよび誘導体をいう（すなわち、このような部分は、マーカートンパク質、例えばマーカートンパク質のエピトープのような抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む）。本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体とは、このタンパク質に結合するが、通常このタンパク質を含むサンプル、例えば生物学的サンプル中の他の分子には

実質的に結合しない抗体である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、限定はしないが単鎖抗体 (s c A b)、F (a b) および F (a b')₂ フラグメントが挙げられる。

【0144】

本発明の単離されたタンパク質またはそのフラグメントは、抗体を生成するための免疫原として用いられ得る。全長タンパク質が用いられてもよく、あるいは本発明は免疫原としての使用のための抗原性ペプチドフラグメントを提供する。本発明のタンパク質の抗原性ペプチドは、本発明のタンパク質のうちの1つのアミノ酸配列の少なくとも8つ（好ましくは10、15、20または30以上）のアミノ酸残基を含み、そしてこのタンパク質の少なくとも1つのエピトープを包含し、その結果このペプチドに対して惹起された抗体は、このタンパク質と特異的な免疫複合体を形成する。抗原性ペプチドによって包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面上に位置する領域、例えば親水性領域である。疎水性配列分析、親水性配列分析、または同様の分析を用いて親水性領域を同定することができる。好ましい実施形態では、単離されたマーカータンパク質またはそのフラグメントは、免疫原として用いられる。

10

【0145】

免疫原は代表的には、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物もしくは脊椎動物のような適切な（すなわち、イムノコンピテント）被験体を免疫することによって抗体を調製するために用いられる。適切な免疫原性調製物は、例えば、組み換え発現されるかまたは化学的に合成されたタンパク質またはペプチドを含んでもよい。この調製物はさらに、アジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバント、または同様の免疫刺激因子をさらに含んでもよい。好ましい免疫原組成物とは、例えば、本発明のタンパク質の組み換え発現のために非ヒト宿主細胞を用いて作製された免疫原組成物のような他のヒトタンパク質を含まない組成物である。このような方式では、得られた抗体組成物は、本発明のタンパク質以外のヒトタンパク質の結合が少なくなっているかまたは結合しない。

20

【0146】

本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。本明細書において用いる場合、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位のうち1種のみを含む抗体分子の集団をいう。好ましいポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体組成物とは、本発明のタンパク質に対する抗体を選択しているものである。特に好ましいポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製物とは、マーカータンパク質またはそのフラグメントに対する抗体のみを含むものである。

30

【0147】

ポリクローナル抗体は、免疫原として本発明のタンパク質を用いて適切な被験体を免疫することによって調製され得る。免疫された被験体における抗体力価は、免疫されたポリペプチドを用いる酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) を用いるような標準的な技術によって経時的にモニターされ得る。免疫後適切な時点で、例えば、特定の抗体力価が最高であるとき、抗体産生細胞を、被験体から得て、標準的な技術、例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495 - 497 にもともと記載されるハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozborら、1983, Immunol. Today 4: 72を参照のこと)、EBV - ハイブリドーマ技術 (Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc, 1985のpp77~96を参照のこと) またはトリオーマ技術によってモノクローナル抗体 (mAb) を調製するために用いてもよい。ハイブリドーマ産生のための技術は周知である（一般には、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., ed., John Wiley & Sons, New York, 1994を参照のこと）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的な

40

50

E L I S A アッセイを用いて、目的のポリペプチドに結合する抗体についてハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出され得る。

【0148】

ハイブリドーマを分泌するモノクローナル抗体を調製する代わりに、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体を、目的のポリペプチドを有する組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることによって同定および単離してもよい。ファージディスプレイライブラリーを生成してスクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; および Stratagene SurZAP Phage Display Kit, Catalog No. 240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーを生成しスクリーニングするのにおける使用に特に受け入れられる方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5,223,409号; PCT公開番号WO92/18619; PCT公開番号WO91/17271; PCT公開番号WO92/20791号; PCT公開番号WO92/15679; PCT公開番号WO93/01288; PCT公開番号WO92/01047; PCT公開番号WO92/09690; PCT公開番号WO90/02809; et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J:725-734に見出され得る。

10

20

【0149】

本発明はまた、本発明のタンパク質に特異的に結合する組み換え抗体を提供する。好ましい実施形態では、この組み換え抗体は、マーカータンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する。組み換え抗体としては、限定はしないが、ヒトおよび非ヒト部分の両方を含む、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体、単鎖抗体および多価特異的抗体が挙げられる。キメラ抗体とは、異なる部分が種々の動物種に由来する分子、例えば、マウス mAb に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。（例えば、その全体が参考として本明細書に援用される、Cabillyら、米国特許第4,816,567号; および Bossら、米国特許第4,816,397号を参照のこと）。単鎖抗体は、抗原結合部位を有し、単独のポリペプチドからなる。それらは、当該分野で公知の技術によって、例えば、Ladnerら、米国特許第4,946,778号（その全体が参考として本明細書に援用される）; Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Whitlow et al. (1991) Methods in Enzymology 2:1-9; Whitlow et al. (1991) Methods in Enzymology 2:97-105; および Huston et al. (1991) Methods in Enzymology Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications 203:46-88に記載の方法を用いて生成され得る。多価特異的抗体とは、種々の抗原に特異的に結合する少なくとも2つの抗原結合部位を有する抗体分子である。このような分子は、当該分野で公知の技術によって、例えば、Segal、米国特許第4,676,980号（その開示は全体が参考として本明細書に援用される）; Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Whitlow et al. (1994) Protein Eng. 7:1017-1026 および米国特許第6,121,424号に記載の方法を用いて生成され得る。

30

40

【0150】

ヒト化抗体とは、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域（CDR）およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である（例えば、その全体が参考として援用される、Queen、米国特許第5,585,089号を

50

参照のこと)。ヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組み換えDNA技術によって、例えばPCT公開番号WO 87/02671；欧州特許出願第184,187号；欧州特許出願第171,496号；欧州特許出願第173,494号；PCT公開番号WO 86/01533；米国特許第4,816,567号；欧州特許出願第125,023号；Better et al. (1988) Science 240:1041-1043；Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005；Wood et al. (1985) Nature 314:446-449；およびShaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrisson (1985) Science 229:1202-1207；Oiet al. (1986) Bio/Techniques 4:214；米国特許第5,225,539号；Jones et al. (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534；およびBeidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記載の方法を用いて、生成され得る。

10

【0151】

さらに詳細には、ヒト化抗体は、例えば、内因性の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子を発現できないが、ヒト重鎖および軽鎖の遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを用いて生成され得る。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えば、本発明のマーカに相当するポリペプチドの全てまたは一部を用いて正常な様式で免疫される。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスによって保持されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再配列して、引き続きクラス切り替えおよび体細胞変異を受ける。従ってこのような技術を用いて、治療上有用なIgG、IgAおよびIgE抗体を生成することが可能である。ヒト抗体を生成するためのこの技術の概説については、Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生成するためのこの技術の、そしてこのような抗体を生成するためのプロトコルの詳細な考察については、例えば、米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；および米国特許第5,545,806号を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)のような会社は、上記の技術と同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに関与し得る。

20

30

【0152】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド選択」と呼ばれる技術を用いて生成され得る。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を用いて、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドする(Jesper et al., 1994, Bio/technology 12:899-903)。

40

【0153】

本発明の抗体は、産生(例えば、被験体の血液または血清からの)または合成後に単離されて、そして周知の技術によってさらに精製され得る。例えば、IgG抗体は、プロテインAクロマトグラフィーを用いて精製され得る。本発明のタンパク質に特異的な抗体は、例えば、アフィニティークロマトグラフィーによって選択、または(例えば、部分的に精製され)または精製され得る。例えば、本発明の組み換え発現された、そして精製された(または部分的に精製された)タンパク質は、本明細書に記載のように生成され、そして例えば、クロマトグラフィーカラムのような固体支持体に対して共有結合されるかまたは非共有結合される。次いで、このカラムを用いて、多数の異なるエピトープに対する抗

50

体を含むサンプルから本発明のタンパク質に特異的な抗体をアフィニティー精製して、これによって実質的に精製された抗体組成物、すなわち、混入した抗体を実質的に含まない抗体組成物を生成してもよい。実質的に精製された抗体組成物とは、この文脈では、この抗体サンプルが、本発明の所望のタンパク質のエピトープ以外のエピトープに対する抗体の混入が多くとも30%（乾燥重量による）を含み、そして好ましくはこのサンプルの多くとも20%、さらに好ましくは多くとも10%、そして最も好ましくは多くとも5%（乾燥重量による）が混入している抗体である。精製された抗体組成物とは、この組成物における抗体の少なくとも99%が本発明の所望のタンパク質に対するものであるということの意味する。

【0154】

好ましい実施形態では、本発明の実質的に精製された抗体は、本発明のタンパク質のシグナルペプチド、分泌された配列、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインまたは細胞膜に特異的に結合し得る。特に好ましい実施形態では、本発明の実質的に精製された抗体は、本発明のタンパク質のアミノ酸配列の選択された配列または細胞外ドメインに特異的に結合する。さらに好ましい実施形態では、本発明の実質的に精製された抗体は、マーカータンパク質のアミノ酸配列の分泌された配列または細胞外ドメインに特異的に結合する。

【0155】

本発明のタンパク質に対する抗体は、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降のような標準的な技術によってタンパク質を単離するために用いられ得る。さらに、このような抗体は、マーカータンパク質またはそのフラグメント（例えば、細胞溶解液または細胞上清において）を検出して、マーカーの発現のレベルおよびパターンを評価するために用いられ得る。抗体はまた、例えば、所定の処置レジメンの有効性を評価するために、臨床試験手順の一部として、組織または体液中（例えば、前立腺関連の体液中）のタンパク質レベルをモニターするために診断的に用いられ得る。検出は、検出可能な物質に結合された本発明の抗体を含む、抗体誘導体の使用によって容易にできる。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、蛍光体、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生体発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ、そして適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0156】

本発明の抗体はまた、ガンを処置するのににおいて治療剤として有用であり得る。好ましい実施形態では、本発明の完全ヒト抗体は、ヒトガン患者、特に前立腺癌を有する患者の治療的な処置のために用いられる。別の好ましい実施形態では、マーカータンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する抗体は、治療上の処置に用いられる。さらに、このような治療抗体は、細胞毒、治療剤または放射性金属イオンのような治療部分に結合された抗体を含む抗体誘導体または免疫毒素であってもよい。細胞毒素または細胞毒性剤としては、細胞に有害である任意の因子が挙げられる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン（dihydroxyanthracin dione）、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらのアナ

10

20

30

40

50

ログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては限定はしないが、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - フルオロウラシルデカルバジン、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（thioepa）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにcis - ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（anthramycin）（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられる。

10

【0157】

本発明の結合体化した抗体は、所定の生物学的応答を改変するために用いられ得、薬物部分については、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質としては、例えば、毒素、例えば、リボソーム阻害タンパク質（その開示が全体として本明細書に援用される、Betterら、米国特許第6,146,631号を参照のこと）、アブリン、リシンA、シュドモナス外毒素、またはジフテリア毒素；タンパク質、例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター；または生物学的応答改変剤、例えばリンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の増殖因子を挙げることができる。

20

【0158】

抗体に対してこのような治療部分を結合体化するための技術は、周知であり、例えば、Arnonら、“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら、(eds.), pp243 - 56 (Alan R, Liss, Inc. 1985); Hellstromら、“Antibodies For Drug Delivery” in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorope, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review” in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Application, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985), および Thorpeら、“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev. 62: 119 - 58 (1982)を参照のこと。

30

40

【0159】

従って、1態様では、本発明は、その全てが本発明のタンパク質、そして好ましくはマーカータンパク質に特異的に結合する、実質的に精製された抗体、抗体フラグメントおよ

50

び誘導体を提供する。種々の実施形態では、本発明の実質的に精製された抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体は、ヒト抗体であっても、非ヒト抗体であっても、キメラ抗体であっても、および/またはヒト化抗体であってもよい。別の態様では、本発明は、その全てが本発明のタンパク質、そして好ましくはマーカータンパク質に特異的に結合する、非ヒト抗体、抗体フラグメントおよび誘導体を提供する。このような非ヒト抗体は、ヤギ、マウス、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、ウサギまたはラットの抗体であってもよい。あるいは、本発明の非ヒト抗体は、キメラおよび/またはヒト化抗体であってもよい。さらに、本発明の非ヒト抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。さらなる態様では、本発明は、その全てが本発明のタンパク質、そして好ましくはマーカータンパク質に特異的に結合する、モノクローナル抗体、抗体フラグメントおよび誘導体を提供する。モノクローナル抗体は、ヒト抗体であっても、ヒト化抗体であっても、キメラ抗体であっても、および/または非ヒト抗体であってもよい。

10

【0160】

本発明はまた、検出可能物質に結合体化された本発明の抗体および使用説明書を備えるキットを提供する。本発明のなお別の態様は、本発明の抗体を含む薬学的組成物である。1実施形態では、この薬学的組成物は、本発明の抗体、治療部分および薬学的に受容可能なキャリアを含む。

【0161】

(組み換え発現ベクターおよび宿主細胞)

本発明の別の態様は、マーカータンパク質(またはそのようなタンパク質の一部)をコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書において用いる場合、「ベクター」という用語は、それに結合されている別の核酸を運搬する能力のある核酸分子を指す。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントが結合し得る環状の二重鎖DNAループを指す。ベクターの別のタイプはウイルスベクターであり、ここではさらなるDNAセグメントをウイルスゲノムの中に結合し得る。特定のベクターは、それらを導入した宿主細胞中で自律増幅することができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌のベクターおよび哺乳動物のエピゾームベクター)。他のベクター(例えば、哺乳動物の非エピゾームベクター)は、宿主細胞中への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれて、それによって宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、特定のベクターいわゆる発現ベクターは、それらが作動可能に連結した遺伝子の発現を指示する能力がある。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターはしばしば、プラスミドの形態である(ベクター)。しかし、本発明は、同等の機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製能を欠いたレトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような他の形態の発現ベクターを含むものとする。

20

30

【0162】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中における核酸の発現に適した形態で本発明の核酸を含む。これは組換え発現ベクターが、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択され、発現すべき核酸配列に対して作動可能に連結されている、1つ以上の調節(制御)配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内において、「作動可能に連結された」とは、目的のヌクレオチド配列がこのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で(例えばインビトロ転写/翻訳システムでまたはベクターを宿主細胞に導入する場合には宿主細胞中で)調節(制御)配列(単数または複数)に結合されていることを意味するものとする。「調節(制御)配列」という用語は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むものとする。このような制御配列は、例えば、GoeddelのMethods in Enzymology: Gene Expression Technology: vol. 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。調節(制御)配列としては、多くのタイプの宿主細胞中でヌクレオチド配列の構成的発現を指示する配列および特定の宿主細胞中でのみヌクレオチド配列の発現を指示する配列(例えば、組織特異的調節(制御)配列)が挙げられる。発現ベクターのデザインが、形質転換される

40

50

べき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどのような要因に依存し得ることを当業者は理解する。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入して、それにより本明細書に説明されるように、核酸によってコードされる融合タンパク質またはペプチドを含む、タンパク質またはペプチドを産生し得る。

【0163】

本発明の組換え発現ベクターを、原核生物（例えば、*E. coli*）または真核生物の細胞（例えば、昆虫細胞 {バキュロウイルス発現ベクターを用いる}、酵母細胞または哺乳動物細胞）中に、マーカータンパク質またはそのセグメントの発現のために設計し得る。適切な宿主細胞は、Goeddel, supraにさらに考察されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節（制御）配列およびT7ポリメラーゼを用いてインビトロで転写して、翻訳してもよい。

10

【0164】

真核細胞中におけるタンパク質の発現はほとんどの場合、*E. coli*中で、融合タンパク質または非融合タンパク質のどちらかの発現を指示する構成的または誘導性プロモーターを含有するベクターを用いて行われる。融合ベクターは、その中にコードしたタンパク質に多数のアミノ酸を、通常には組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。そのような融合ベクターは代表的には3つの目的に役立つ：1)組換えタンパク質の発現を増大するため；2)組換えタンパク質の溶解度を増大するため；および3)アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製を助けるため。しばしば、融合発現ベクターにおいては、タンパク質分解性の切断部位を融合部分および組換えタンパク質の接合部に導入して、融合部分から組換えタンパク質の分離に引き続いて融合タンパク質の精製を可能にする。そのような酵素、およびそれらと同種の認識配列としては、第Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを標的の組換えタンパク質に融合させる、pGEX（Pharmacia Biotech Inc；Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）が挙げられる。

20

【0165】

適切な誘導性非融合*E. coli*発現ベクターの例としては、pTrc（Amannら、(1988) Gene 69:301-315）およびpET11d（Studierら、p. 60-89, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1991）が挙げられる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存する。pET11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現されたウイルスRNAポリメラーゼ（T7 gn1）によって媒介される、T7 gn10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、宿主株BL21（DE3）またはHMS174（DE3）によって、T7 gn1遺伝子を保持する常在性プロファージから、lacUV5プロモーターの転写制御下で供給される。

30

40

【0166】

*E. coli*における組み換えタンパク質発現を最大にする1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現することである（Gottesman, p119-128, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990を参照のこと。別の戦略とは、各々のアミノ酸についての個々のコドンが*E. coli*で優先的に使用されるように、発現ベクターに挿入する核酸の核酸配列を変

50

更することである (Wadaら、1992, *Nucleic Acids Res.* 20: 2111 - 2118)。本発明の核酸配列のそのような変更は、標準的なDNA合成技法によって行なうことができる。

【0167】

別の実施形態では、この発現ベクターは酵母の発現ベクターである。酵母である *S. cerevisiae* 中の発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (Baldariら、1987, *EMBO J.* 6: 229 - 234)、pMFa (Kurjan and Herskowitz, 1982, *Cell* 30: 933 - 943)、pJRY88 (Schultzら、1987, *Gene* 54: 113 - 123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)、および pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA) が挙げられる。

10

【0168】

あるいは、この発現ベクターはバキュロウイルス発現ベクターである。培養された昆虫細胞 (例えば、Sf9細胞) 中でのタンパク質発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ (Smithら、1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156 - 2165) および pVLシリーズ (Lucklow and Summers, 1989, *Virology* 170: 31 - 39) が挙げられる。

【0169】

別の実施形態では、本発明の核酸を、哺乳動物の発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現する。哺乳動物の発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed, 1987, *Nature* 329: 840) および pMT2PC (Kaufmanら、1987, *EMBO J.* 6: 187 - 195) が挙げられる。哺乳動物細胞中で用いる場合、発現ベクターの制御機能はしばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、通常用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40に由来する。原核生物のおよび真核生物の細胞の両方にとって適切な他の発現系については、Sambrook, et al. *supra* の第16章および17章を参照のこと。

20

【0170】

別の実施形態では、組換え哺乳動物表現ベクターは、特定の細胞タイプ中で優先的に核酸の発現を指示する能力がある (例えば、組織特異的調節エレメントは核酸を発現するために用いられる)。組織特異的調節エレメントは当該分野において公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; Pinkertら、1987, *Genes Dev.* 1: 268 - 277)、リンパ系特異的プロモーター (Calame and Eaton, 1988, *Adv. Immunol.* 43: 235 - 275)、詳細には、T細胞レセプター (Winoto and Baltimore, 1989, *EMBO J.* 8: 729 - 733) および免疫グロブリン (Banerjiら、1983, *Cell* 33: 729 - 740; Queen and Baltimore, 1983, *Cell* 33: 741 - 748) のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター; Byrne and Ruddle, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473 - 5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlundら、1985, *Science* 230: 912 - 916)、ならびに乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4, 873, 316号および欧州出願公開第264, 166号) が挙げられる。例えば、マウスの *hox* プロモーター (Kessel and Gruss, 1990, *Science* 249: 374 - 379) および - フェトプロテインプロモーター (Camper and Tilghman, 1989, *Genes Dev.* 3: 537 - 546) の発生上調節されるプロモーターも包含される。

30

40

【0171】

本発明はさらに、発現ベクターの中にアンチセンスの配向でクローニングされた本発明

50

のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、本発明のポリペプチドをコードするmRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現（DNA分子の転写による）を可能にするような様式で、調節（制御）配列に対して作動可能に連結される。種々の細胞タイプ中のアンチセンスRNA分子の連続的発現を指示する、アンチセンスの配向にクローニングされた核酸に作動可能に連結された調節（制御）配列が選択され得、例えば、ウイルスのプロモーターおよび/もしくはエンハンサー、またはアンチセンスRNAの構成的な、組織特異的もしくは細胞タイプ特異的な発現を指示する調節（制御）配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、ベクターを導入した細胞タイプによって活性が決定され得る高効率調節領域の制御下でアンチセンス核酸を生産する、組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態であってもよい。アンチセンス遺伝子を用いた遺伝子発現の調節の考察については、Weintrauら、1986, Trends in Genetics, Vol. 1 (1)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0172】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書において互換的に使用される。そのような用語は、特定の対象の細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をも指すことが理解される。突然変異または環境の影響のいずれかに起因して後の世代に特定の改変が生じるかもしれないため、そのような子孫は、実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書において使用する用語の範囲内になお包含される。

【0173】

宿主細胞は任意の原核細胞（例えば、E. coli）または真核細胞（例えば、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞）であってもよい。

【0174】

ベクターDNAを、従来の形質転換または形質移入技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞の中に導入してもよい。本明細書において用いる場合、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む、外来の核酸を宿主細胞に導入するために当該分野で認める種々の技術を指すものとする。宿主細胞を形質転換するか、またはトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrookら、(supra)および他の実験室マニュアルに見出すことができる。

【0175】

哺乳動物細胞の安定的なトランスフェクションのためには、使用される発現ベクターおよびトランスフェクションの技術に依存して、細胞のごく小さい画分が外来性DNAをそのゲノムの中に組み込み得ることが公知である。これらの組み込み体を同定し選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する抵抗性）をコードする遺伝子が一般的に、目的の遺伝子と一緒に宿主細胞に導入される。好ましい選択マーカーとしては、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートのような薬物に対する抵抗性を付与するマーカーが挙げられる。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定することができる（例えば、選択マーカーを組み込んでいる細胞は生き残るが、一方他の細胞は死滅する）。

【0176】

培地中で、原核生物細胞または真核生物細胞のような本発明の宿主細胞を用いて、マーカータンパク質またはそのセグメントを生産してもよい。従って、本発明は、本発明の宿主細胞を用いるマーカータンパク質またはそのセグメントの産生の方法をさらに提供する。1実施形態では、その方法は、本発明の宿主細胞（その中にマーカータンパク質またはそのセグメントをコードする組換え発現ベクターを導入されている）を、そのマーカータンパク質を生産するのに適切な培地中で培養する工程を包含する。別の実施形態では、そ

の方法はさらに、培地または宿主細胞からマーカートンパク質またはそのセグメントを単離する工程をさらに包含する。

【0177】

本発明の宿主細胞を用いてまた、非ヒトトランスジェニック動物を産生してもよい。例えば、1実施形態では、本発明の宿主細胞は、その中にマーカートンパク質またはそのセグメントをコードする配列が導入されている受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、そのような宿主細胞を用いて、その中に本発明のマーカートンパク質をコードする外因性の配列がそのゲノムの中に導入されている非ヒトトランスジェニック動物、またはマーカートンパク質をコードする内因性の遺伝子（単数または複数）が変更されている相同組換え動物を創成することができる。そのような動物は、マーカートンパク質の機能および/または活性の研究に、そしてマーカートンパク質の修飾因子の同定および/または評価に有用である。本明細書において用いる場合「トランスジェニック動物」とは、動物の1つ以上の細胞が導入遺伝子を含む非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはラットまたはマウスのようなげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例としては、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両棲類などが挙げられる。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムの中に取り込まれ、そして成熟動物のゲノム内に残存して、それによってトランスジェニック動物の1つ以上の細胞タイプまたは組織中においてコードされた遺伝子産物の発現を指令する外来性のDNAである。本明細書において用いる場合、「相同組換え動物」とは、内因性の遺伝子が内因性の遺伝子と、動物の細胞、例えば、動物の胚細胞の中に動物の発生前に導入された外因性DNA分子との間で相同組換えにより変更されている非ヒト動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはマウスである。

10

20

【0178】

本発明のトランスジェニック動物は、受精した卵母細胞の雄性前核の中に、マーカートンパク質をコードする核酸を例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって導入して、卵母細胞が偽妊娠雌性仮親動物の体内で発生することを可能にすることにより、創成することができる。イントロン配列およびポリアダニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現効率を増加するために導入遺伝子中に含まれてもよい。組織特異的調節（制御）配列（単数または複数）をこの導入遺伝子に対して作動可能に結合させて、特定の細胞に対して本発明のポリペプチドの発現を指示することができる。胚の操作およびマイクロインジェクションを介した、トランスジェニック動物、特にマウスのような動物の作成方法は当該分野において従来的となっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号；および同第4,870,009号、米国特許第4,873,191号において；そしてHogan, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986において記載されている。類似の方法を他のトランスジェニック動物の生産に用いる。トランスジェニックの創始動物は、ゲノム内の導入遺伝子の存在および/またはその動物の組織もしくは細胞中におけるこの導入遺伝子をコードするmRNAの発現に基づいて、同定され得る。次いで、トランスジェニック創始動物を、この導入遺伝子を担持するさらなる動物の繁殖に用いてもよい。さらに、この導入遺伝子を担持するトランスジェニック動物は、他の導入遺伝子を担持する他のトランスジェニック動物にさらに繁殖され得る。

30

40

【0179】

相同組換え動物を創成するために、その中に欠失、付加または置換が導入されていて、それによって遺伝子を変化させる、例えば、機能的に破壊するマーカートンパク質をコードする、遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製する。好ましい実施形態では、相同組み換えの際に、内因性遺伝子が機能的に破壊されるように、このベクターをデザインする（すなわち、もはや機能的なタンパク質をコードしない；「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる）。代替的には、相同組換えの際に内因性遺伝子の変異されるかそうでなければ変更されるが、依然として機能性タンパク質をコードしているようにベクターを設計

50

してもよい（例えば、上流の調節領域を変更してそれにより内因性タンパク質の発現を変更してもよい）。相同組換えベクターでは、この遺伝子の変更された部分は、この遺伝子のさらなる核酸がその5'および3'末端に隣接しており、ベクターにより担持される外因性遺伝子と胚性幹細胞中の内因性遺伝子との間で相同組換えが起こることが可能になる。さらに別の隣接する核酸配列は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えが起きるように十分な長さである。代表的には、数千ベースの隣接するDNA（5'末端および3'末端の両方とも）がベクターに含まれる（相同組換えベクターの記載については、例えば、Thomas and Capecechi, 1987, Cell 51: 503を参照のこと）。ベクターは、胚性幹細胞株に（例えば、エレクトロポレーションにより）導入され、そしてその中に導入された遺伝子が内因性の遺伝子と相同組み換えされている細胞が選択される（例えば、Liら、1992, Cell 69: 915を参照のこと）。次いで、この選択された細胞を動物（例えば、マウス）の胚盤胞の中に注射して、凝集キメラを形成する（例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson Ed., IRL, Oxford, 1987, pp 113 - 152を参照のこと）。次いで、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性仮親動物に移植して、胚を出産させる。生殖細胞内に相同組換えしたDNAを保持している子孫を用いて、動物の全ての細胞が導入遺伝子の生殖系列を介した伝達により相同組換えされたDNAを含む動物を繁殖させることができる。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築する方法は、Bradley (1991) Current Opinion in Bio/Technology 2: 823 - 829に；そしてPCT公開番号WO90/11354号；WO91/01140号；WO92/0968号；およびWO93/04169号にさらに記載される。

10

20

30

40

50

【0180】

別の実施形態では、導入遺伝子の調節発現を可能にする、選択した系を有するトランスジェニック非ヒト動物を生産し得る。そのような系の1例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksorら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232 - 6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である（O'Gormanら、1991, Science 251: 1351 - 1355）。cre/loxPリコンビナーゼ系を用いて導入遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼおよび選択したタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要となる。そのような動物は、例えば、1つは選択したタンパク質をコードする導入遺伝子を含むし、もう一方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含む2つのトランスジェニック動物を交配させることによる、「二重」トランスジェニック動物の構築によって得ることができる。

【0181】

本明細書に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、Wilmut, et al. (1997) Nature 385: 810 - 813およびPCT公開番号WO97/07668およびWO97/07669号に記載された方法に従って生産することができる。

【0182】

（薬学的組成物）

本発明の核酸分子、ポリペプチドおよび抗体（本明細書においては「活性化合物」とも呼ばれる）は、投与に適切な薬学的組成物中に組み込まれてもよい。このような組成物は代表的には、核酸分子、タンパク質または抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書において用いる場合、「薬学的に受容可能なキャリア」という言葉は、薬学的な投与に適合する、任意のおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むものとする。薬学的に活性な物質のためのこ

のような媒体および因子の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または因子がこの活性化化合物に不適切である場合を除けば、この組成物におけるそれらの使用が意図される。補助的な活性化化合物も、組成物の中に組み込んでもよい。

【0183】

本発明は、マーカー核酸またはタンパク質の発現または活性を調節するための薬学的組成物を調製するための方法を包含する。このような方法は、薬学的に受容可能なキャリアを、マーカー核酸またはタンパク質の発現または活性を調節する因子とともに処方する工程を包含する。このような組成物はさらに、さらなる活性因子を含んでもよい。従って、本発明はさらに、薬学的に受容可能なキャリアを、マーカー核酸またはタンパク質および1つ以上のさらなる活性化化合物の発現または活性を調節する因子とともに処方することによって、薬学的組成物を調製するための方法を包含する。

10

【0184】

本発明はまた、(a)マーカーに結合するか、または(b)マーカーの活性に対して調節性(例えば、刺激性または阻害性)の効果を有するか、またはさらに詳細には、(c)マーカーとその天然の基質(例えば、ペプチド、タンパク質、ホルモン、補因子または核酸)の1つ以上との相互作用に対して修飾性の影響を有するか、または(d)マーカーの発現に対して修飾性の効果を有する、修飾因子、すなわち、候補物または試験化合物または因子(例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプトイド、低分子または他の薬物)を同定するための方法(本明細書においては、「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる)を提供する。このようなアッセイは代表的には、マーカーと1つ以上のアッセイ成分との間の反応を包含する。他の成分は、試験化合物自体であっても、または試験化合物とマーカーの天然の結合パートナーの組み合わせであってもよい。

20

【0185】

本発明の試験化合物は、天然の化合物および/または合成の化合物の合成ライブラリーを含む、任意の利用可能な供給源から得ることができる。試験化合物はまた、生物学的ライブラリー;ペプトイドライブラリー(ペプチドの機能を有するが、新規な非ペプチド骨格を有しており、酵素的分解に耐性があり、それにもかかわらず生物活性は保持している分子のライブラリー;例えば、Zuckermannら、1994, J. Med. Chem. 37: 2678-85を参照のこと);空間的にアドレス可能な平行な固相または溶液相ライブラリー;逆重畳を要する合成ライブラリー方法;「1層1化合物」ライブラリー方法;およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法を含む、当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー方法において任意の多数のアプローチによって得ることができる。生物学的ライブラリーおよびペプトイドライブラリーのアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは低分子ライブラリーに適用可能である(Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145)。

30

【0186】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば、DeWittら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6909; Erb, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 11422; Zuckermann, et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al. (1993) Science 261: 1303; Carrell, et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carrell, et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061において;そしてGallopら、1994, J. Med. Chem. 37: 1233において見出され得る。

40

【0187】

化合物のライブラリーは、溶液中に(例えば、Houghten, 1992, Biotechniques 13: 412-421)、またはビーズ上に(Lam, 1991, Nature 354: 82-84)、チップ上に(Fodor, 1993, Natur

50

e 364:555-556)、細菌および/または芽胞上に(Ladner, 米国特許第5,223,409号)、プラスミド上に(Cullら、1992.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1865-1869)またはファージ上で(Scott and Smith, 1990.Science 249:386-390; Devlin, 1990.Science 249:404-406; Cwirllaら、1990.Proc.Natl.Acad.Sci. 87:6378-6382; Felici, 1991.J.Mol.Biol. 222:301-310、Ladner, supra.)提供され得る。

【0188】

(アッセイ)

1実施形態では、本発明は、マーカーまたはその生物学的に活性な部分によってコードされるかまたはそれに対応するタンパク質の基質である、候補物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の実施形態では、本発明は、マーカーまたはその生物学的に活性な部分によってコードされるかまたはそれに対応するタンパク質に結合する、候補物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。試験化合物がタンパク質に結合する能力を決定することは、例えば、この化合物と放射性同位元素または酵素標識とをカップリングすることによって達成され得、それによってこのマーカーへのこの化合物の結合が、複合体中の標識されたマーカー化合物を検出することにより達成され得る。例えば、化合物(例えば、マーカー基質)を、 ^{125}I 、 ^3S 、 ^{14}C または ^3H で直接的にまたは間接的に標識し、そして放射性同位元素を放射線放射の直接計数またはシンチレーション計数により検出することができる。あるいは、アッセイ成分を、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼにより酵素的に標識し、そして適切な基質の生産物への変換の決定により酵素標識を検出することができる。

【0189】

別の実施形態では、本発明は、マーカーの発現、またはマーカーによってコードされるかもしくはそれに相当するタンパク質の活性、あるいはその生物学的に活性な一部を調節する候補物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。おそらく、このマーカーによってコードされるかこのマーカーに相当するタンパク質は、インビボでは、限定はしないがペプチド、タンパク質、ホルモン、補因子および核酸のような1つ以上の分子と相互作用し得る。この考察の目的については、このような細胞の分子および細胞外分子は、「結合パートナー」またはマーカー「基質」と呼ばれる。

【0190】

このようなスクリーニングを容易にするための本発明の1つの必要な実施形態は、マーカーによってコードされるかまたはマーカーに相当するタンパク質の使用により、このタンパク質の天然のインビボの結合パートナーを同定することである。これを達成するための、当業者に公知である多くの方法が存在する。1例は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ(例えば米国特許第5,283,317号、Zervosら、1993.Cell 72:223-232; Maduraら、1993.J.Biol.Chem. 268:12046-12054; Bartelら、1993.Biochemical Techniques 14:920-924; Iwabuchiら、1993.Oncogene 8:1693-1696; Brent WO94/10300を参照のこと)において「ベイトタンパク質」としてマーカータンパク質を使用して、マーカー(結合パートナー)と結合するかまたは相互作用をして、従ってこのマーカーの天然の機能に關与する可能性がある他のタンパク質を同定することである。このようなマーカー結合パートナーはまた、このマーカータンパク質によるシグナルの伝達またはマーカータンパク質媒介性シグナル伝達性経路の下流エレメントに關与する可能性が高い。あるいは、このようなマーカータンパク質結合パートナーはまた、このマーカータンパク質のインヒビターであることが見出され得る。

【0191】

このツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合および活性化ドメインからなるほとんどの転写因子のモジュールの性質に基づく。要するに、このアッセイには2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物においては、マーカートンパク質をコードする遺伝子が既知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合されている。他の構築物においては、未同定のタンパク質（「プレイ」または「サンプル」）をコードするDNA配列ライブラリー由来のDNA配列を、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合する。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用してマーカ-依存性複合体を形成することが可能である場合、転写因子のDNA結合および活性化ドメインは近位に引き寄せられる。この近接によって、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されているレポーター遺伝子（例えば、lacZ）の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現は容易に検出され得、そして機能的転写因子を含有する細胞コロニーを単離して、そしてこれを用いてマーカートンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得ることができる。

10

20

30

40

50

【0192】

さらなる実施形態では、マーカートンパク質とその基質および/または結合パートナーとの間の相互作用を調節する（例えば、ポジティブにまたはネガティブに影響する）化合物を同定する目的のために、本発明の使用を通じてアッセイが考案され得る。このような化合物としては、限定はしないが、抗体、ペプチド、ホルモン、オリゴヌクレオチド、核酸およびそのアナログのような分子を挙げることができる。このような化合物はまた、天然および/または合成の化合物の体系的なライブラリーを含む、任意の利用可能な供給源から得ることができる。この実施形態における使用に好ましいアッセイ成分は、本明細書において同定された前立腺癌マーカートンパク質、公知の結合パートナーおよび/またはこれらの基質、ならびに試験化合物である。試験化合物は、任意の供給源から供給され得る。

【0193】

マーカートンパク質とその結合パートナーとの間の相互作用を妨害する化合物を同定するために用いられるアッセイ系の基本原理は、マーカートンパク質およびその結合パートナーを含む反応混合物を、この2つの産物が相互作用して結合して、これによって複合体を形成することを可能にするのに十分な条件および時間のもとで調製する工程に關与する。因子を阻害活性について試験するために、反応混合物は、試験化合物の有無の下で調製する。試験化合物は、反応混合物に最初に含まれてもよいし、またはマーカートンパク質およびその結合パートナーの添加に続く時点で添加されてもよい。コントロール反応混合物は、試験化合物なし、またはブラシーボとともにインキュベートされる。マーカートンパク質とその結合パートナーとの間の任意の複合体の形成が次に検出される。コントロール反応物において複合体の形成があり、ただし試験化合物を含む反応混合物ではこのような形成が少ないかまたはないことは、この化合物がマーカートンパク質およびその結合パートナーの相互作用を妨害することを示す。逆に、コントロール反応においてではなく化合物の存在下でのさらなる複合体の形成によって、この化合物がマーカートンパク質およびその結合パートナーの相互作用を増強し得ることが示される。

【0194】

マーカートンパク質とその結合パートナーとの相互作用を妨害する化合物についてのアッセイは、異種または同種の方式で行なわれ得る。異種アッセイは、マーカートンパク質またはその結合パートナーのいずれかを固相の上に固定する工程と、反応の最後の時点でこの固相に固定された複合体を検出する工程とを包含する。同種アッセイでは、全体的な反応を液相中で行なう。いずれのアプローチでも、反応物の添加の順序は、試験されている化合物についての異なる情報を得るために変化され得る。例えば、マーカートンパク質と結合パートナーとの間の相互作用を妨害する（例えば、競合によって）試験化合物は、試験物質の存在下でこの反応を行なうことによって、すなわち、このマーカ-とその相互作用的な結合パートナーとの前にまたは同時にこの反応混合物に対して試験物質を添加す

ることによって、決定され得る。あるいは、事前形成された複合体を破壊する試験化合物、例えば、複合体から1つの成分を取り去る高い結合定数を有する化合物は、複合体が形成された後にこの反応混合物に試験化合物を添加することによって試験され得る。種々の形式が以前に簡単に記載されている。

【0195】

異種アッセイ系では、マーカートンパク質またはその結合パートナーのいずれかを固体表面またはマトリックスの上に固定するが、他の対応する非固定成分は、直接または間接的に標識され得る。実際には、マイクロタイタープレートがしばしば、このアプローチに利用される。固定された種は、代表的には当業者に周知である、非共有結合または共有結合のいずれかの、多数の方法によって固定され得る。非共有結合はしばしば、単に、固体表面をマーカートンパク質またはその結合パートナーの溶液でコーティングさせることおよび乾燥することによって、達成され得る。あるいは、固定されるべきアッセイ成分に特異的な固定された抗体がこの目的に用いられ得る。このような表面はしばしば、前もって調製されて貯蔵されてもよい。

10

【0196】

関連の実施形態では、1つまたは両方のアッセイ成分がマトリックスに固定されることを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/マーカ融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/結合パートナーが、グルタチオンセファローズビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオンで誘導体化したマイクロタイタープレート上に吸着されてもよく、これを次いで試験化合物と、または試験化合物および非吸着標的マーカまたはその結合パートナーのどちらかと組み合わせ、そしてこの混合物を複合体形成を促進する条件(例えば、生理的な条件)下でインキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、未結合のアッセイ成分を全て除去し、固定された複合体を、例えば上記のように、直接的にまたは間接的に評価する。あるいは、複合体をマトリックスから解離し、そしてマーカ結合または活性のレベルを標準的技術を用いて決定してもよい。

20

【0197】

マトリックス上にタンパク質を固定する他の技術をまた、本発明のスクリーニングアッセイに用いることができる。例えば、マーカートンパク質またはマーカートンパク質結合パートナーのいずれかをビオチンおよびストレプトアビジンの結合を利用して固定することができる。ビオチニル化マーカートンパク質または標的分子をビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-サクシンイミド)から当該分野で公知の技術(例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)を用いて調製して、ストレプトアビジンをコーティングした96ウェルプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定することができる。特定の実施形態では、このタンパク質固定表面は、前もって調製して保管してもよい。

30

【0198】

このアッセイを行なうために、固定されたアッセイ成分の対応するパートナーを、試験化合物の有無のもとでこのコーティングされた表面に曝す。反応終了後、未反応のアッセイ成分を除去して(例えば、洗浄によって)、形成されたあらゆる複合体を固体表面に結合したままにする。固体表面に固定された複合体の検出は、多数の方法で達成され得る。非固定成分が事前標識されている場合、この表面上に固定された標識の検出によって、複合体が形成されたことが示される。非固定成分が事前に標識されていない場合、間接的な標識を用いて、この表面上に固定された複合体を検出することができる;例えば、最初に非固定種に特異的な標識された抗体を用いて(抗体は、次に、例えば、標識された抗Ig抗体を用いて直接標識されても、間接的に標識されてもよい)。反応成分の添加の順序次第で、複合体形成を調節する(阻害するかまたは増強する)、または事前形成された複合体を破壊する試験化合物が検出され得る。

40

【0199】

50

本発明の別の実施形態では、同種のアッセイを用いてもよい。これは代表的には試験化合物の有無において液相で行なわれる上述のアッセイと類似の反応である。この形成された複合体は次に、未反応の成分から分離され、そして形成された複合体の量が決定される。異種アッセイ系について言及される場合、液相に対する反応物の添加の順序によって、試験化合物が複合体形成を調節（阻害または増強）し、そして事前形成された複合体を破壊する情報を得ることができる。

【0200】

このような相同なアッセイにおいて、反応産物は、限定はしないが：分画遠心法、クロマトグラフィー、電気泳動および免疫沈澱分離を含む任意の多数の標準的な技術によって未反応のアッセイ成分から分離され得る。分画遠心法では、分子の複合体は、複合体の種々のサイズおよび密度に基づくその複合体の分画沈殿平衡に起因して、一連の遠心分離工程を通じて複合体になっていない分子から分離され得る（例えば、Rivas, G. および Minton, A. P., Trends Biochem Sci 1993 Aug; 18(8) 284-7を参照のこと）。標準的なクロマトグラフィー技術も、複合体化していないものから複合体分子を分離するのに利用され得る。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーは、サイズに基づいて、そして適切なゲル濾過樹脂をカラムの形態で利用することによって分子を分離する、例えば、比較的大きい複合体ほど、小さい複合体化していない成分から分離され得る。同様に、複合体化していない分子に比べて、この複合体の比較的不同なる特性は、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂の使用を通じて、残りの個々の反応物質から複合体を示差的に分離するように開発され得る。このような樹脂およびクロマトグラフィー技術は、当業者に周知である（例えば、Heegaard, 1998, J Mol. Recognit. 11: 141-148; Hage and Tweed, 1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 699: 499-525を参照のこと）。未結合の種から複合体化した分子を分離するにはゲル電気泳動も使用できる（例えば、Ausubel et al (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, New York, 1999を参照のこと）。この技術では、タンパク質または核酸複合体は、例えば、サイズまたは電荷に基づいて分離される。電気泳動プロセスの間に結合相互作用を維持するため、還元剤の非存在下での非変性ゲルが代表的には好ましいが、特定の相互作用に適切な条件が当業者に周知である。免疫沈降は溶液からのタンパク質-タンパク質複合体の単離のために利用される別の共通の技術である（例えば、Ausubel et al (eds.) In: Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, New York, 1999を参照のこと）。この技術では、結合分子の1つに特異的な抗体への全てのタンパク質の結合は、遠心分離によって容易に収集され得る、ポリマービーズに対する抗体の結合体化によって溶液から沈殿される。結合アッセイ成分は、ビーズから遊離され（特定のタンパク質分解事象または複合体中のタンパク質-タンパク質相互作用を破壊しない、当該分野で周知の他の技術によって）、そして第2の免疫沈澱工程が行なわれ、この時は、対応して異なる相互作用アッセイ成分に特異的な抗体を利用する。この方式では、形成された複合体のみが、ビーズに結合されたまま残るはずである。試験化合物の有無の両方における複合体形成の変動を比較し得、これによって、化合物がマーカータンパク質とその結合パートナーとの間の相互作用を調節する能力についての情報が得られる。

【0201】

さらなるサンプル操作なしの同種または異種アッセイ系におけるマーカータンパク質とその天然の結合パートナーおよび/または試験化合物との間の相互作用の直接的な検出のための方法もまた本発明の範囲内である。例えば、蛍光エネルギー移動の技術が利用され得る（例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号; Stavrianoopolosら、米国特許第4,868,103号を参照のこと）。一般には、この技術は、第1の「ドナー」分子に対する蛍光標識（例えば、マーカータンパク質または試験化合物）の

付加を包含し、その結果その放射蛍光エネルギーは、第2の「アクセプター」分子（例えば、マーカーまたは試験化合物）上の蛍光標識によって吸着され、これが次に吸収されたエネルギーに起因して蛍光を発し得る。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は単に、トリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用し得る。「アクセプター」分子標識が、「ドナー」のものとは識別され得るように、異なる波長の光を放射する標識が選択される。標識の間のエネルギー転移の有効性は、分子を隔てる距離に関係するので、分子の間の空間的な関係が評価され得る。分子間で結合が生じる状況では、アッセイ中の「アクセプター」分子標識の蛍光放射は最大であるはずである。FET結合事象は、当該分野で周知の標準的な蛍光検出手段によって従来のように測定され得る（例えば、蛍光計を用いて）。事前形成された複合体における種の1つの関与を増強するかまたは隠す試験物質は、バックグラウンドのシグナルに対してシグナル変異を生じる。この方法では、マーカーとその結合パートナーとの間の相互作用を調節する試験物質は、制御されたアッセイで同定され得る。

10

20

30

40

50

【0202】

別の実施形態では、マーカー発現の修飾因子は、細胞が候補化合物と接触され、そしてマーカーのmRNAまたはタンパク質の細胞中での発現が決定される方法で同定される。候補化合物の存在下でのマーカーのmRNAまたはタンパク質の発現のレベルを、候補化合物の非存在下におけるマーカーのmRNAまたはタンパク質の発現のレベルと比較する。次いでこの候補化合物は、この比較に基づいてマーカー発現の修飾因子として同定され得る。例えば、マーカーのmRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりも存在下において大きい（統計学的に有意に大きい）場合、この候補化合物は、マーカーのmRNAまたはタンパク質発現の刺激因子として同定される。逆に、マーカーのmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりも存在下において小さい（統計学的に有意に小さい）場合、この候補化合物は、マーカーのmRNAまたはタンパク質発現のインヒビターとして同定される。細胞中のマーカーのmRNAまたはタンパク質発現のレベルは、マーカーのmRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書において記載された方法によって決定され得る。

【0203】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される2つ以上のアッセイの組み合わせに関与する。例えば、修飾因子は、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定され得、そしてこの因子がマーカータンパク質の活性を調節する能力は、細胞の形質転換および/または腫瘍形成についての、例えば、動物全体モデルにおいてインビボでさらに確認され得る。

【0204】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規な因子に関する。従って、適切な動物モデルにおいて本明細書に記載のように同定された因子をさらに用いることは本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載のように同定された因子（例えば、マーカー修飾因子、アンチセンスマーカー核酸分子、マーカー特異的抗体、またはマーカー結合パートナー）は、このような因子を用いる処置の有効性、毒性または副作用を決定するための動物モデルにおいて用いられ得る。あるいは、本明細書に記載のように同定された因子は、このような因子の作用の機構を決定するために動物モデルにおいて用いられ得る。さらに、本発明は、本明細書に記載のような処置のための上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規な因子の使用に関する。

【0205】

低分子因子およびタンパク質またはポリペプチド因子の適切な用量は、習熟した医師、獣医師または研究者の知識の範囲内の多数の要因に依存することが理解される。これらの因子の用量（単数または複数）は、例えば、処置されている被験体またはサンプルの同一性、サイズおよび条件に依存して、さらに妥当な場合、この組成物が投与される経路、ならびにこの因子が本発明の核酸またはポリペプチドに対して有することを実施者が所望する効果に依存して変化する。低分子の例示的な用量は、被験体またはサンプルの重量の1

k g あたり 1 m g または μ g の量である (例えば、1 k g あたり約 1 μ g ~ 1 k g あたり約 5 0 0 m g、1 k g あたり約 1 0 0 μ g ~ 1 k g あたり約 5 m g、または 1 k g あたり約 1 μ g ~ 1 k g あたり約 5 0 m g)。タンパク質またはポリペプチドの例示的な用量としては、被験体またはサンプルの重量の 1 k g あたり 1 g、m g または μ g の量が挙げられる (例えば、1 k g あたり約 1 μ g ~ 1 k g あたり約 5 g、1 k g あたり約 1 0 0 μ g ~ 1 k g あたり約 5 0 0 m g、または 1 k g あたり約 1 m g ~ 1 k g あたり約 5 0 m g)。これらの因子の 1 つの適切な用量は、調節される発現または活性に関するこの因子の能力に依存することがさらに理解される。このような適切な用量は、本明細書に記載のアッセイを用いて決定され得る。これらの因子の 1 つ以上が本発明のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するために動物 (例えば、ヒト) に投与される場合、医師、獣医師または研究者は、例えば、最初に比較的低用量を処方し、その後適切な応答が得られるまでこの用量を漸増することができる。さらに、任意の特定の動物被験体についての特定の用量レベルは、使用される特定の因子の活性、被験体の年齢、体重、全身的健康状態、性別および食餌、投与の時間、投与の経路、排出経路、任意の併用薬、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む種々の要因に基づくことが理解される。

10

20

30

40

50

【0206】

本発明の薬学的組成物は、投与の意図される経路に適合するように処方される。投与の経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、口腔 (例えば、吸入)、経皮 (局所)、経粘膜および直腸の投与が挙げられる。非経口、皮内または皮下適用のために用いられる溶液または懸濁液は、以下の成分を含んでもよい：滅菌希釈液、例えば、注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または重硫酸ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン - 四酢酸；緩衝液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩および毒性の調節のための因子、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース。pH は、酸または塩基、例えば、塩酸または水酸化ナトリウムで調整され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックからなる、アンプル、ディスポーザブルシリンジまたは複数回投与用バイアルに入れられてもよい。

【0207】

注射用に適切な薬学的組成物としては、滅菌注射用水または分散の即時的調製のための滅菌水溶液 (水溶性の場合) または分散剤および滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与のためには、適切なキャリアとしては、生理食塩水、静菌性水、C r e m o p h o r E L (B A S F ; P a r s i p p a n y , N J) またはリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) が挙げられる。全ての場合に、この組成物は、滅菌でなければならず、そして容易にシリンジに適合する程度まで液体でなければならない。これは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、そして細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保護されなければならない。このキャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど) およびその適切な混合物を含む、溶媒であっても分散媒体であってもよい。適切な液体は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散の場合には必要な粒子サイズの維持によって、そしてサーファクタントの使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。多くの場合、等張性剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムをこの組成物に含むことが好ましい。注射可能組成物の長期の吸収は、吸収を遅延させる因子、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含むことによって達成され得る。

【0208】

滅菌注射用液は、活性化合物 (例えば、ポリペプチドまたは抗体) を必要な量で適切な溶媒中に、必要に応じて、上に列挙される成分の 1 つまたは組み合わせとともに組み込む

ことによって、その後に濾過滅菌によって調製され得る。一般には、分散は、基本的分散培地を含む滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むこと、次いで上に列挙された成分由来の必要な他の成分を組み込むことによって調製される。滅菌注射用水の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、減圧乾燥および凍結乾燥であり、これによって活性成分に任意のさらなる所望の成分を加えた粉末が、その以前に滅菌濾過された溶液から得られる。

【0209】

経口組成物は一般に、不活性希釈液または食用キャリアを含む。それらは、ゼラチンカプセルに包含されても、または錠剤に圧縮されてもよい。経口治療投与の目的のために、活性化化合物は、賦形剤とともに組み込まれて、錠剤、トローチまたはカプセルの形態で用いられてもよい。経口成分はまた、液体キャリア中の化合物が経口的に加えられて、漱がれて、吐き出されるかまたは飲み込まれる、口腔洗浄液としての使用のための液体キャリアを用いて調製されてもよい。

10

【0210】

薬学的に適合する結合剤、および/またはアジュバント物質が、この組成物の一部として含まれてもよい。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下のいずれかの成分、または同様の性質の化合物を含んでもよい：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン；賦形剤、例えば、デンプンまたはラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチ；潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes；流動促進剤、例えば、コロイド性二酸化ケイ素；甘味料、例えば、スクロースまたはサッカリン；あるいは芳香剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ香料。

20

【0211】

吸入による投与のためには、化合物は、適切な噴霧剤、例えば、二酸化炭素のようなガスを含む圧縮容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0212】

全身投与はまた、経粘膜または経皮的手段によっても可能である。経粘膜投与または経皮投与のためには、障壁に浸透させるのに適切な浸透剤が処方物中で用いられる。このような浸透剤は一般には、当該分野で公知であるが、例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁塩およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経皮投与は、経鼻噴霧または坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与のために、活性化化合物は、当該分野で一般に公知のような、軟膏(ointments、salves)、ゲル、またはクリーム中に処方される。

30

【0213】

化合物はまた、坐剤(例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤を含む)または直腸送達のための滞留浣腸剤の形態で調製されてもよい。

【0214】

1実施形態では、活性化化合物を、この化合物の身体からの迅速な排泄を妨げるキャリア、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤とともに調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ酢酸のような、生物分解性で生体適合性のポリマーを使用し得る。そのような製剤を調製する方法は当業者に明らかである。材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販で入手可能である。リボソームの懸濁液(リボソームであって、その中または上にモノクローナル抗体を組み込まれているリボソームを含む)をまた、薬学的に受容可能なキャリアとして用いてもよい。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載のように、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

40

【0215】

経口または非経口組成物を、投与および投与量の均一性の容易さのために投薬単位形態

50

で処方することが特に有利である。本明細書において用いられる投薬単位形態とは、処置されるべき被験体のための単位投薬量として適した物理的に別個の単位を指す；各々の単位は、必要な薬学的キャリアと組み合わせて、所望の治療効果を生じるように計算された活性化化合物の予め決定された量を含む。本発明の投薬単位形態のための仕様は、活性化化合物の固有の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個々の処置についてこのような活性化化合物からなる当該分野の固有の限界によって示され、そしてそれらに直接依存する。

【0216】

抗体については、好ましい投薬量は、体重1kgあたり0.1mg~100mg（通常は10mg/kg~20mg/kg）である。抗体が脳において作用する場合、50mg/kg~100mg/kgの投薬量が通常適切である。一般には、部分的ヒト抗体および完全ヒト抗体は、他の抗体よりもヒト身体内で長い半減期を有する。従って、少ない投薬量および少ない投与頻度がしばしば可能である。脂質化のような改変が、抗体を安定化して、取り込みおよび組織浸透（例えば、前立腺上皮への）を増強するために用いられ得る。抗体の脂質化のための方法は、Cruikshank et al. (1997) J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193によって記載される。

10

【0217】

本発明はまた、前立腺癌の予防および/または処置のためのワクチン組成物を提供する。本発明は、前立腺癌に対する免疫応答を刺激するために、表1のマーカーのタンパク質、または表1のマーカーのタンパク質の組み合わせが導入されている前立腺癌ワクチン組成物を被験体に提供する。本発明はまた、表1に同定されるマーカーまたはマーカーのフラグメントを発現する遺伝子発現構築物が、被験体に導入され、その結果表1のマーカーによってコードされるタンパク質またはタンパク質のフラグメントが被験体のトランスフェクトされた細胞によって正常より高いレベルで生成され、免疫応答を誘発する前立腺癌ワクチン組成物を提供する。

20

【0218】

1実施形態では、前立腺癌ワクチンは、前立腺癌の予防のための免疫治療因子として提供されて使用される。別の実施形態では、前立腺癌ワクチンは、前立腺癌の処置のための免疫治療因子として提供されて使用される。

30

【0219】

例えば、表1のマーカーのタンパク質からなる前立腺癌ワクチンは、種々の経路、例えば、経皮的に、皮下的にまたは筋肉内によってワクチンを投与することによって被験体における前立腺癌の予防および/または処置のために使用され得る。さらに、前立腺癌ワクチンは、ワクチンの活性および被験体の応答をブーストするために、アジュバントおよび/または免疫調整剤と一緒に投与され得る。1実施形態では、徐放性放出または間欠放出に適切な、ワクチンを含むデバイスおよび/または組成物は、身体内へのこのような物質の比較的遅い放出のために身体に組み込まれてもよく、またはそこに局所適用されてもよい。ガンを排除するのににおいてさらに有効である応答を生じるために生成された、免疫応答のタイプを変更し得る前立腺癌ワクチンが、免疫調節化合物とともに導入されてもよい。

40

【0220】

別の実施形態では、表1のマーカーの発現構築物からなる前立腺癌ワクチンは、筋肉への注射によって、またはマイクロプロジェクトル上にコーティングすることおよび高速で皮膚にプロジェクトルを発射する目的用に設計されたデバイスを用いることによって導入されてもよい。次いで、本発明の細胞は表1のマーカーのタンパク質（単数または複数）またはタンパク質のフラグメントを発現して、免疫応答を誘導する。さらに、前立腺癌ワクチンは、免疫応答を増大するか、またはガンを排除するのにさらに有効である応答を生成するために生成されたタイプの免疫応答を調節し得る、サイトカインのような免疫調節分子のための発現構築物とともに導入されてもよい。

50

【0221】

マーカー核酸分子は、ベクターに挿入されてもよく、そして遺伝子治療ベクターとして用いられてもよい。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈注射、局所投与によって（米国特許第5,328,470号）、または定位的注射によって（例えば、Chenら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057を参照のこと）被験体に送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈物中に遺伝子治療ベクターを含んでもよいし、またはこの遺伝子送達ビヒクルが包含されている徐放性マトリックスを含んでもよい。あるいは、完全な遺伝子送達ベクター、例えば、レトロウイルスベクターが、組み換え細胞からインタクトに生成され得る場合、薬学的調製物は、遺伝子送達系を生成する1つ以上の細胞を含み得る。

10

【0222】

薬学的組成物は、投与のための説明書とともに容器、バックまたはディスペンサーに含まれてもよい。

【0223】

（予測医学）

本発明は、診断アッセイ、予後予測アッセイ、薬理ゲノム学、および臨床試験のモニタリングを予後的（予測的）目的で使用し、これによって個体を予防的に処置する、予測医学の分野に関する。従って、本発明の1つの態様は、個体が前立腺癌を発症するリスクがあるか否かを決定するために、マーカータンパク質または核酸の1つ以上の発現のレベルを決定するための診断アッセイに関する。このようなアッセイは、それによってガンの発現の前に個体を予防的に処置するための予後予測または予測の目的のために用いられ得る。

20

【0224】

本発明のさらに別の態様は、薬剤（例えば、前立腺癌を阻害するために、または任意の他の障害を処置もしくは予防するために投与される、薬物または他の化合物{すなわち、このような処置が有し得る任意の前立腺癌発癌性効果を理解するため}）の臨床トライアルにおける本発明のマーカーの発現または活性に対する影響をモニタリングすることに関する。これらおよび他の薬剤については以下のセクションでさらに詳細に説明する。

【0225】

（診断アッセイ）

生物学的サンプル中におけるマーカータンパク質または核酸の有無を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプル（例えば、前立腺関連体液）を得る工程と、生物学的サンプルをこのポリペプチドまたは核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA、またはcDNA）を検出する能力のある化合物または薬剤と接触させる工程とを包含する。従って、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボにおいて、例えば、生物学的サンプル中のmRNA、タンパク質、cDNAまたはゲノムDNAを検出するために用いられ得る。例えば、mRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。マーカータンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光が挙げられる。ゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。mRNAの検出のためのインビボ技術としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、マーカータンパク質を検出するためのインビボ技術は、被験体中へこのタンパク質またはそのフラグメントに対する標識抗体を導入する工程を包含する。例えば、抗体を、被験体中のその存在および位置を標準的な造影技術で検出し得る放射活性マーカーで標識することができる。

30

40

【0226】

このような診断および予測アッセイの一般的原理は、サンプルまたはマーカーおよびプローブを含み得る反応混合物を、このマーカーおよびプローブが相互作用して結合するこ

50

とを可能にするのに適切な条件および十分な時間のもとで調製して、これによって反応混合物中で除去されるか、および/または検出され得る複合体を形成する工程を包含する。これらのアッセイは、種々の方法で行なうことができる。

【0227】

例えば、このようなアッセイを行なうための1方法は、基質とも呼ばれる固相支持体上にマーカーまたはプローブを固定する工程と、反応の終わりの時点で固相上に固定された標的マーカー/プローブ複合体を検出する工程とを包含する。このような方法の1実施形態では、マーカーの存在および/または濃度についてアッセイすべき、被験体由来のサンプルを、キャリアまたは固相支持体上に固定してもよい。別の実施形態では、逆の状態が可能であり、ここではプローブが固相に固定されてもよく、そして被験体由来のサンプルはアッセイの未固定成分として反応されてもよい。

10

【0228】

固相に対してアッセイ成分を固定するための多くの方法が確立されている。これらとしては、限定はしないが、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を通じて固定されているマーカーまたはプローブの分子が挙げられる。このようなビオチニル化アッセイ成分は、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-サクシンイミド) から当該分野内で公知の技術 (例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL) を用いて調製して、ストレプトアビジンをコーティングした96ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定することができる。特定の実施形態では、アッセイ成分が固定されている表面は、前もって調製されて保管されてもよい。

20

【0229】

このようなアッセイのための他の適切なキャリアまたは固相支持体としては、マーカーまたはプローブが属する分子のクラスに結合し得る任意の物質が挙げられる。周知の支持体またはキャリアとしては、限定はしないが、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然および改変されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩および磁鉄鉱が挙げられる。

【0230】

上記のアプローチを用いてアッセイを行なうために、固定されていない成分を固相に添加して、その上に第2の成分を固定する。反応の終了後、複合体化していない成分を、形成されたあらゆる複合体が固相に固定したままであるような条件下で、除去してもよい (例えば、洗浄によって)。固相に固定されたマーカー/プローブ複合体の検出は、本明細書に概説される多数の方法で達成され得る。

30

【0231】

好ましい実施形態では、プローブは、未固定のアッセイ成分である場合、本明細書において考察されており、当業者に周知である検出可能標識を用いて直接または間接的に、アッセイの検出および読み取りの目的のために標識され得る。

【0232】

例えば、蛍光エネルギー移動の技術 (例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照のこと) を利用することによって、いずれかの成分 (マーカーまたはプローブ) のさらなる操作または標識なしに、マーカー/プローブ複合体の形成を直接検出することも可能である。第1の「ドナー」分子上の発蛍光団標識は、適切な波長の入射光線での励起の際に、その発光された蛍光エネルギーが、第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸着され、これが次に吸収されたエネルギーに起因して蛍光を発し得るように選択される。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は単に、トリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用し得る。「アクセプター」分子標識が、「ドナー」のものとは識別され得るように、異なる波長の光を放射する標識が選択される。標識の間のエネルギー転移の有効性は、分子を隔てる距離に関係するので、分子の間の空間的な関係が評価され得る。分子間で結合が生じる状況では、アッセイ中の「アクセプター」分子標識の蛍光放射が最大であるはずである。FET結合事象は、当該分野で周知の標準的な蛍光検出手段によって

40

50

従来のように測定され得る（例えば、蛍光計を用いて）。

【0233】

別の実施形態では、プローブがマーカを認識する能力を決定することは、リアルタイム Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (例えば、Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63: 2338-2345 および Szaboら、1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705 を参照のこと) のような技術を利用することによって、アッセイ成分 (プローブまたはマーカ) のいずれかを標識することなく達成できる。本明細書において用いる場合、「BIA」または「表面プラズモン共鳴」は、いかなる反応体 (例えば BIAcore) も標識することなく、生体特異的相互作用をリアルタイムで研究するための技術である。結合表面の質量の変化 (結合事象の指標) によって、表面付近の光の屈折率の変化が生じ (表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学的現象)、その結果、生物学的分子の間のリアルタイムの反応の指標として用いられ得る検出可能シグナルが得られる。

【0234】

あるいは、別の実施形態では、類似の診断および予後予測アッセイが、液相中の溶質としてマーカおよびプローブを用いて行なわれ得る。このようなアッセイでは、複合体化されたマーカおよびプローブは、限定はしないが：分画遠心法、クロマトグラフィー、電気泳動および免疫沈澱分離を含む任意の多数の標準的な技術によって、複合体化されていない成分から分離される。分画遠心法では、マーカ/プローブ複合体は、その複合体の種々のサイズおよび密度に基づくその複合体の分画沈殿平衡に起因して、一連の遠心分離工程を通じて複合体になっていないアッセイ成分から分離され得る (例えば、Rivas, G. and Minton, A. P., 1993, Trends Biochem. Sci. 18 (8) 284-7 を参照のこと)。標準的なクロマトグラフィー技術も、複合体化していないものから複合体分子を分離するのに利用され得る。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーは、サイズに基づいて、そして適切なゲル濾過樹脂をカラムの形態で利用することによって分子を分離する、例えば、比較的大きい複合体は、比較的小さい複合体化していない成分から分離され得る。同様に、複合体化していない成分に比べて、このマーカ/プローブ複合体の相対的に異なる電荷特性が、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂の利用を通じて、複合体化されていない成分から複合体を識別するように開発され得る。このような樹脂およびクロマトグラフィー技術は、当業者に周知である (例えば、Heegaard, N. H. 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11 (1-6): 141-8; Hage, D. S. and Tweed, S. A. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1997 Oct 10; 699 (1-2): 499-525 を参照のこと)。未結合の成分から複合体化したアッセイ成分を分離するにはゲル電気泳動も使用できる (例えば、Ausubelら、ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999 を参照のこと)。この技術では、タンパク質または核酸複合体は、例えば、サイズまたは電荷に基づいて分離される。電気泳動プロセスの間に結合相互作用を維持するためには、還元剤の非存在下での非変性ゲルマトリックス物質および条件が代表的には好ましい。特定のアッセイおよびその成分に対して適切な条件は、当業者に周知である。

【0235】

特定の実施形態では、マーカの mRNA のレベルは、当該分野で公知の方法を用いて生物学的サンプル中で、インサイチュ方式およびインビトロ方式の両方で決定され得る。「生物学的サンプル」という用語は、被験体、ならびに被験体に存在する組織、細胞および液体から単離された、組織、細胞、生物学的液体およびその単離物を包含するものとする。多くの発現検出方法は、単離された RNA を用いる。インビトロの方法については、前立腺細胞からの RNA の精製のために、mRNA の単離に関して選択しない任意の RNA 単離技術を利用してもよい (例えば、Ausubelら、ed., Current P

rotocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987 - 1999を参照のこと)。さらに、当業者に周知の技術、例えば、Chomczynski (1989, 米国特許第4,843,155号)の単一工程RNA単離プロセスのような技術を用いて多数の組織サンプルが容易に処理できる。

【0236】

単離されたmRNAは、限定はしないが、サザン分析またはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析およびプローブアレイを含む、ハイブリダイゼーションまたは増幅のアッセイにおいて用いられ得る。mRNAレベルの検出のための1つの好ましい診断方法は、単離されたmRNAと、検出されている遺伝子によってコードされるmRNAにハイブリダイズし得る核酸分子(プローブ)とを接触させる工程を包含する。核酸プローブは、例えば全長cDNAまたはその一部、例えば、少なくとも7、15、30、50、100、250または500ヌクレオチド長であり、かつ本発明のマーカーをコードするmRNAもしくはゲノムDNAに対してストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドであり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書に記載されている。プローブとのmRNAのハイブリダイゼーションによって、該当のマーカーが発現されているということが示される。

10

【0237】

1方式では、mRNAは、例えば、アガロースゲル上で単離されたmRNAを泳動することおよびmRNAをこのゲルからニトロセルロースのようなメンブレンに転写することによって、固体表面に固定されて、プローブと接触させられる。別の方式では、プローブ(単数または複数)は、固体表面上に固定されて、mRNAが、例えば、Affymetrix遺伝子チップアレイ中でプローブ(単数または複数)と接触される。当業者は、本発明のマーカーによってコードされるmRNAのレベルを検出するのににおいて用いるために公知のmRNA検出方法を容易に適合し得る。

20

【0238】

サンプル中のmRNAマーカーのレベルを決定するための別の方法は、例えば、RT-PCR(Mullis, 1987, 米国特許第4,683,202号に示される実験の実施形態)、リガーゼ鎖反応(Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193)、自己保存配列複製(Guarelliら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム(Kwohら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-Beta Replicase(Lizardiら、1988, Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製(Lizardiら、米国特許第5,854,033号)または任意の他の核酸増幅方法による核酸増幅のプロセス、その後の当該分野で周知の技術を用いるこの増幅された分子の検出を包含する。これらの検出スキームは、核酸分子が極めて少数しか存在しない場合、このような核酸分子の検出のために特に有用である。本明細書において用いる場合、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域にアニーリングされ得る核酸分子の対(それぞれプラス鎖およびマイナス鎖、逆も真)であると規定され、そして間に短い領域を含む。一般に、増幅プライマーは、約10~30ヌクレオチド長であり、約50~200ヌクレオチド長の領域に隣接する。適切な条件下で適切な試薬を用いれば、このようなプライマーは、そのプライマーに隣接するヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

30

40

【0239】

インサイチュの方法のためには、mRNAは、検出の前に前立腺細胞から単離される必要はない。このような方法では、細胞または組織サンプルは、公知の組織学的方法を用いて調製/処理される。次いで、サンプルは支持体、代表的にはガラススライドに固定されて、次いでマーカーをコードするmRNAに対してハイブリダイズされ得るプローブと接触される。

50

【0240】

マーカーの絶対的発現レベルに基づく決定を行なう代わりに、マーカーの正規化した発現レベルに基づいて決定を行なってもよい。発現レベルは、マーカーの発現をマーカーではない遺伝子、例えば恒常的に発現されるハウスキーピング遺伝子の発現に対して比較することによって、このマーカーの絶対的発現レベルを補正することによって、正規化される。正規化のために適切な遺伝子としては、アクチン遺伝子、または上皮細胞特異的遺伝子のようなハウスキーピング遺伝子が挙げられる。この正規化によって、1サンプル、例えば患者サンプル中の発現レベルと、別のサンプル、例えば、非前立腺癌サンプルとの比較、または種々の供給源由来のサンプル間の比較が可能になる。

【0241】

あるいは、発現レベルは、相対的発現レベルとして提供されてもよい。マーカーの相対的発現レベルを決定するため、マーカーの発現のレベルは、該当のサンプルについての発現レベルの決定の前に、ガン細胞単離物に対して10個以上の正常のサンプル、好ましくは50個以上のサンプルについて決定する。多数のサンプルにおいてアッセイされた遺伝子の各々の平均発現レベルを決定して、これをマーカーのベースラインの発現レベルとして用いる。次いで、試験サンプルについて決定されたマーカーの発現レベル（絶対的レベルの発現）を、そのマーカーについて得られた平均発現値で割る。これによって、相対的な発現レベルが得られる。

【0242】

好ましくは、ベースライン決定において用いられるサンプルは、前立腺癌に由来するか、または前立腺組織の非前立腺癌細胞に由来する。細胞供給源の選択は、相対的発現レベルの使用に依存する。平均発現スコアとして正常な組織で見出される発現を用いて、アッセイされたマーカーが（正常な細胞に対して）前立腺特異的であるか否かを確証することが補助される。さらに、さらなるデータを蓄積すれば、平均発現値が改訂され得、蓄積されたデータに基いて相対的発現値が改善される。前立腺細胞からの発現データによって、前立腺癌状態の重篤度を分類するための手段が得られる。

【0243】

本発明の別の実施形態では、マーカータンパク質が検出される。本発明のマーカータンパク質を検出するための好ましい因子は、このようなタンパク質またはそのフラグメントに結合し得る抗体であって、好ましくは検出可能レベルの抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体であっても、さらに好ましくはモノクローナル抗体であってもよい。インタクトな抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体（例えば、FabまたはF(ab')₂）が用いられ得る。プローブまたは抗体に関して「標識された」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする（すなわち物理的に連結する）ことによってこのプローブまたは抗体を直接的に標識する工程、ならびに直接標識されている別の試薬との反応性によってプローブまたは抗体を間接的に標識する工程を包含するものとする。間接的な標識の例としては、蛍光標識した二次抗体を用いる一次抗体の検出、および蛍光標識したストレプトアビジンで検出できるように、ビオチンでのDNAプローブの末端標識が挙げられる。

【0244】

前立腺細胞由来のタンパク質は、当業者に周知である技術を用いて単離され得る。使用されるタンパク質単離方法は、例えば、HarlowおよびLane（Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York）に記載される方法などであってもよい。

【0245】

所定の抗体に結合するタンパク質をサンプルが含むか否かを決定するためには種々の形式が使用され得る。このような形式の例としては、限定はしないが、酵素免疫測定法（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ウエスタンブロット分析および酵素結合免疫

10

20

30

40

50

吸着アッセイ (E L I S A) が挙げられる。当業者は、前立腺細胞が本発明のマーカ-を発現するか否かを決定するのにける使用のために公知のタンパク質 / 抗体検出方法を容易に適合させることができる。

【 0 2 4 6 】

1 つの形式では、抗体、または抗体フラグメントもしくは誘導体をウエスタンブロットまたは免疫蛍光測定技術のような方法において用いて、発現されたタンパク質を検出することができる。このような用途においては、固体支持体上に抗体またはタンパク質のいずれかを固定することが一般に好ましい。適切な固相支持体またはキャリアとしては、抗原または抗体に結合し得る任意の支持体が挙げられる。周知の支持体またはキャリアとしては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩および磁鉄鉱が挙げられる。

10

【 0 2 4 7 】

当業者には、抗体または抗原に結合するための多くの他の適切なキャリアが公知であり、そして本発明との使用のためにこのような支持体を適合させることができる。例えば、前立腺細胞から単離されたタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で泳動されて、ニトロセルロースのような固相支持体の上に固定され得る。次いで、この支持体を適切な緩衝液で洗浄し、続いて検出可能に標識した抗体で処理してもよい。次いで固相支持体を 2 回目に緩衝液で洗浄して未結合の抗体を除いてもよい。次いで固体支持体上に結合した標識の量は、従来の手段によって検出され得る。

20

【 0 2 4 8 】

本発明はまた、生物学的サンプル中でマーカ-タンパク質または核酸の存在を検出するためのキットを包含する。このようなキットは、被験体が前立腺癌に罹患しているか、または前立腺癌を発症するリスクが増大しているかを決定するために用いられ得る。例えば、このキットは、生物学的サンプル中でマーカ-タンパク質または核酸を検出できる標識された化合物または因子、およびこのサンプル中のこのタンパク質または mRNA の量を決定するための手段を備えてもよい (例えば、タンパク質もしくはそのフラグメントに結合する抗体、またはこのタンパク質をコードする DNA もしくは mRNA に結合するオリゴヌクレオチドプローブ)。キットはまた、このキットを用いて得られる結果を解釈するための説明書を備えてもよい。

30

【 0 2 4 9 】

抗体ベースのキットについては、このキットは、例えば：(1) マーカ-タンパク質に結合する第 1 の抗体 (例えば、固体支持体に結合される) ; および、必要に応じて (2) このタンパク質または第 1 の抗体のいずれかに結合して、検出可能な標識に対して結合体化される、第 2 の異なる抗体、を含んでもよい。

【 0 2 5 0 】

オリゴヌクレオチドベースのキットについては、このキットは、例えば：(1) マーカ-タンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または (2) マーカ-核酸分子を増幅するために有用なプライマーの対、を含んでもよい。このキットはまた、例えば、緩衝化剤、防腐剤、またはタンパク質安定化剤を含んでもよい。このキットはさらに、検出可能標識 (例えば、酵素または基質) を検出するために必要な成分をさらに含んでもよい。このキットはまた、アッセイされて、試験サンプルに比較され得る、コントロールサンプルまたは一連のコントロールサンプルを含んでもよい。キットの各々の成分は、個々の容器内に包含され得、そして種々の容器の全ては、このキットを用いて行なわれるアッセイの結果を解釈するための説明書とともに、単独のパッケージ内であってもよい。

40

【 0 2 5 1 】

(薬理ゲノム学および薬力学)

本発明のマーカ-はまた、薬理ゲノム学のマーカ-としても有用である。本明細書において用いる場合、「薬理ゲノム学マーカ-」とは、その発現レベルが患者における特定の

50

臨床薬物応答または感受性と相関している客観的生物化学マーカーである（例えば、McLeodら、（1999）Eur. J. Cancer 35（12）：1650 - 1652を参照のこと）。薬理ゲノム学マーカーの発現の存在または量は、患者の予想される応答、さらに詳細には特定の薬物または薬物のクラスでの治療に対する患者の腫瘍の予想される応答に關している。患者において1つ以上の薬理ゲノムマーカーの発現の存在または量を評価することによって、その患者に最も適切であるか、またはさらに大きい程度の成功を有すると推測される薬物療法が選択され得る。例えば、患者における特定の腫瘍マーカーによってコードされるRNAまたはタンパク質の存在または量に基づいて、患者に存在する可能性が高い特定の腫瘍の処置のために適している、薬物または処置のコースが選択され得る。従って、薬理ゲノム学マーカーの使用によって、種々の薬物もレジメンも試みることなく、各々のガン患者について最も適切な処置を選択または設計することが可能になる。

10

【0252】

別の態様の薬理ゲノミクスでは、薬物に対して体が反応する方法を変更する遺伝的状态を取り扱う。これらの薬理ゲノミクス状態は、まれな欠陥として、または多形性として存在し得る。例えば、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）欠乏症は、よくみられる遺伝性酵素異常症であり、そこでは主な臨床的合併症は、酸化剤（抗マラリア剤、スルホンアミド剤、鎮痛剤、ニトロフラン類）の摂取後およびソラマメ摂食後の溶血である。

20

【0253】

例示的实施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬の作用の強度および持続期間の両方についての主な決定因子である。薬の代謝酵素の遺伝的多型性（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）ならびにチトクロームP450酵素であるCYP2D6およびCYP2C19）の発見によって、なぜある患者は標準かつ安全な用量の薬物摂取後に期待した薬の効果を得られないか、または過剰な薬物応答および重篤な毒性を示すのかについての説明が得られた。これらの多型性は、人口集団で高代謝群（EM）および低代謝群（PM）の2つの表現型で表現される。PMの存在比率は異なる集団間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型性であり、そしていくつかの変異は、全てが機能的なCYP2D6の非存在をもたらすPMにおいて同定されている。CYP2D6およびCYP2C19の低代謝群では、標準的な用量の投与を受けた際、極めて頻繁に過剰な薬の応答および副作用を経験する。代謝物が活性な治療成分である場合、CYP2D6が形成する代謝物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛作用について実証されるとおり、PMは治療応答を示さない。それと全く正反対なのが、標準の用量に反応しないいわゆる超高速代謝群である。近年では、超高速代謝群の分子的根拠は、CYP2D6遺伝子増幅に起因することが確認されている。

30

【0254】

従って、個体における本発明のマーカーの発現のレベルが決定されて、それによってその個体の治療的または予防的な処置のために適切な薬剤（単数または複数）が選択され得る。さらに、薬理遺伝学的研究を用いて、薬の代謝酵素をコードする遺伝子多型の対立遺伝子の遺伝子型決定を、個体の薬の応答性の表現型の同定に応用することができる。この知識を投薬量および薬の選択に適用する場合、本発明のマーカーの発現の調節因子を用いて被験体を処置する際に、有害作用または治療の失敗を避け、これによって治療的または予防的効率を増強することができる。

40

【0255】

本発明のマーカーは、1つ以上の障害または疾患状態のための、または疾患状態にいたる状態のための、そして詳細には前立腺癌における代用マーカーとして役立ち得る。本明細書において用いる場合、「代用マーカー」とは、疾患もしくは障害の有無に關連するか、または疾患もしくは障害の進行に（例えば、腫瘍の有無に）關連する客観的生物化学マーカーである。このようなマーカーの存在または量は、疾患とは無関係である。従って、これらのマーカーは、処置の特定の経過が疾患状態または障害を減少させるのに有効で

50

あるか否かを示すのに役立つ。代用マーカーは、疾患状態または障害の存在または程度が標準的な方法論によって評価するのが困難である場合（例えば、初期段階の腫瘍）、または潜在的に危険な臨床的終点に達する前に疾患の進行の評価が所望される場合に特に有用である（例えば、心筋梗塞または完全に進行したAIDSの望ましくない臨床転帰に十分先んじて、心血管系の疾患の評価は、代用マーカーとしてコレステロールレベルを用いて行なわれ得、そしてHIV感染の分析は、代用マーカーとしてHIV RNAレベルを用いて行なわれ得る）。当該分野における代用マーカーの使用の例としては以下が挙げられる：Koomenら、(2000) J. Mass. Spectrom. 35: 258 - 264；ならびにJames (1994) AIDS Treatment News Archive 209。

10

【0256】

本発明のマーカーはまた、薬力学的マーカーとしても有用である。本明細書において用いる場合、「薬力学的マーカー」とは、薬物効果と特異的に相関する客観的な生物化学マーカーである。薬力学的マーカーの存在または量は、薬物が投与されている疾患状態にも障害にも関係しない；従って、マーカーの存在または量は、被験体における薬物の存在または活性の指標である。例えば、薬力学的マーカーは、そのマーカーが、その薬物のレベルに関してその組織中で、発現されるかもしくは転写されるか、または発現されず転写もされないという点で、生物学的組織における薬物の濃度の指標であり得る。この方式では、薬物の分布または取り込みは、薬力学的マーカーによってモニターされ得る。同様に、薬力学的マーカーの存在または量は、薬物の代謝産物の存在または量に関連し得、その結果そのマーカーの存在または量は、インビボにおけるその薬物の相対的分解速度の指標である。薬力学的マーカーは、特に薬物が低用量で投与される場合、薬物効果の検出の感度を増大するのににおいて特に有用である。少量の薬物でさえ複数回のマーカーの転写または発現を活性化するのに十分であり得るので、増幅されたマーカーは、その薬物自体よりも容易に検出可能な量であり得る。また、このマーカーはマーカー自体の性質に起因して容易に検出され得る；例えば、本明細書に記載される方法を用いて、抗体はタンパク質マーカーの免疫ベースの検出システムにおいて使用されてもよく、またはマーカー特異的な放射性標識プローブは、mRNAマーカーを検出するために用いられてもよい。さらに、薬力学的マーカーの使用によって、潜在的な直接の観察の範囲を越えて、薬物処置に起因する機序に基づく危険性予測を得ることができる。当該分野における薬力学的マーカーの使用の例としては、Matsudaら、米国特許第6,033,862号；Hattisら、(1991) Env. Health Perspect. 90: 229 - 238；Schentag (1999) Am. J. Health - Syst. Pharm. 56 Suppl. 3: S21 - S24；およびNicolaou (1999) Am. J. Health - Syst. Pharm. 56 Suppl. 3: S16 - S20；が挙げられる。

20

30

【0257】

（臨床試験のモニタリング）

本発明のマーカーの発現のレベルに対する因子（例えば、薬物化合物）の影響をモニタリングすることは、基礎的な薬物スクリーニングに応用できるだけでなく、臨床試験にも応用できる。例えば、マーカー発現に影響する因子の有効性は、前立腺癌の処置を受けている被験体の臨床試験においてモニターし得る。好ましい実施形態では、本発明は、ある因子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬候補物）で被験体を処置することの有効性をモニタリングする方法を提供し、この方法は、(i) この因子の投与前に被験体から投与前サンプルを得る工程と；(ii) 投与前サンプル中において本発明の1つ以上の選択されたマーカーの発現レベルを検出する工程と；(iii) この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程と；(iv) この投与後サンプル中のマーカー（単数または複数）の発現のレベルを検出する工程と；(v) 投与前サンプル中のマーカー（単数または複数）の発現のレベルを投与後サンプル（単数または複数）中のマーカー（単数または複数）の発現のレベルと比較する工程と；(vi) この被験体へのこの因子の投与を適宜変更する工程とを包含

40

50

する。例えば、処置の経過の間のマーカー遺伝子（単数または複数）の発現の増大は、投薬量が無効であること、および投薬量を漸増することが望ましいことを示し得る。逆に、マーカー遺伝子（単数または複数）の発現の減少は、処置が有効であること、および投与量を変化する必要性がないことを示し得る。

【0258】

（電子装置読み取り可能媒体およびアレイ）

本発明のマーカーを含む電子装置読み取り可能な媒体も提供される。本明細書において用いる場合、「電子装置読み取り可能な媒体」とは、電子装置によって直接読んでアクセスすることが可能であるデータまたは情報を記憶、保持、または備えるための任意の適切な媒体をいう。このような媒体としては、限定はしないが：磁気記憶媒体、例えばフロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ；光学記憶媒体、例えば、コンパクトディスク；電子記憶媒体、例えば、RAM、ROM、EPROM、EEPROMなど；一般的ハードディスクおよびこれらのカテゴリーのハイブリッド、例えば、磁気／光学記憶媒体を挙げることができる。この媒体は、本発明のマーカーをその上に記録するように適合または構成される。

10

【0259】

本明細書において用いる場合、「電子装置」という用語は、データおよび情報を記憶するために構成されるかまたは適合された、任意の適切な計算または処理の装置または他のデバイスを包含するものとする。本発明で利用するのに適切な電子装置の例としては、スタンドアロンコンピュータ装置；ローカル・エリア・ネットワーク（LAN）、広域ネットワーク（WAN）インターネット、イントラネットおよびエクストラネットを含むネットワーク；電子器具、例えば、携帯情報端末（PDA）、携帯電話、ポケベルなど；ならびに局所および分散処理システム、が挙げられる。

20

【0260】

本明細書において用いる場合、「記録された」とは、電子装置読み取り可能媒体上に情報を記憶またはコード化するためのプロセスをいう。当業者は、本発明のマーカーを含む製品を生成するために公知の媒体上に情報を記録するために、任意の現在公知の方法を容易に適合させることができる。

【0261】

種々のソフトウェアプログラムおよびフォーマットを用いて、本発明のマーカー情報を電子装置読み取り可能媒体上に記憶させることができる。例えば、マーカー核酸配列は、ワードプロセシングのテキストファイルで提示されてもよいし、Word Perfect および Microsoft Word のような市販のソフトウェアにフォーマットされてもよいし、または DB2、Sybase、Oracle などのようなデータベースアプリケーションに記憶された ASCII ファイルの形式で、そして他の形式で提示されてもよい。多数のデータプロセッサ構造形式（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を使用して、その上に本発明のマーカーが記録されている媒体を得るかまたは作製することができる。

30

【0262】

本発明のマーカーを読み取り可能形態で提供することによって、種々の目的のためにこのマーカー配列情報に慣用的にアクセスすることができる。例えば、当業者は、本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を、読み取り可能な形態で使用して、標的配列または標的構造モチーフと、このデータ記憶手段に記憶された配列情報とを比較することができる。検索手段を用いて、特定の標的配列または標的モチーフにマッチする、本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。

40

【0263】

従って、本発明は、被験体が前立腺癌を有するか、前立腺癌の前段階の傾向があるかを決定するための方法を行なうための指示を保持するための媒体を提供するが、この方法は、マーカーの有無を決定する工程と、そのマーカーの有無に基づいて、この被験体が前立腺癌を有するかまたは前立腺癌に対する前段階の傾向を有するかを決定する工程と、そし

50

て／あるいは前立腺癌または前前立腺癌状態のための特定の処置を推奨する工程とを包含する。

【0264】

本発明はさらに、電子システムおよび／またはネットワークにおいて、被験体が前立腺癌を有するか、マーカーに関連する前立腺癌に対する前段階の傾向を有するかを決定するための方法であって、マーカーの有無を決定する工程と、そのマーカーの有無に基づいて、この被験体が前立腺癌を有するかまたは前立腺癌に対する前段階の傾向を有するかを決定する工程と、そして／あるいは前立腺癌または前前立腺癌状態のための特定の処置を推奨する工程とを包含する方法を提供する。本発明はさらに、被験体に関連する表現型情報を受け取る工程と、そして／または被験体に関連する表現型情報をネットワークから獲得する工程とを包含する。

10

【0265】

本発明はまた、ネットワークにおいて、被験体が前立腺癌を有するか、マーカーに関連する前立腺癌に対する前段階の傾向を有するかを決定するための方法であって、マーカーに関連する情報を受け取る工程と、被験体に関連する表現型情報を受け取る工程と、マーカーおよび／もしくは前立腺癌に対応する情報をこのネットワークから獲得する工程と、そして1つ以上の表現型情報、マーカーおよび獲得された情報に基づいて、この被験体が前立腺癌を有するかまたは前立腺癌に対する前段階の傾向を有するかを決定する工程とを包含する方法を提供する。この方法はさらに、前立腺癌または前前立腺癌状態の特定の処置を推奨する工程を包含し得る。

20

【0266】

本発明はまた、被験体が前立腺癌か、または前立腺癌に対する前段階の傾向を有するかを決定するための事業的方法であって、マーカーに関連する情報を受け取る工程と、被験体に関連する表現型情報を受け取る工程と、マーカーおよび／もしくは前立腺癌に相当する情報をこのネットワークから獲得する工程と、そして1つ以上の表現型情報、マーカーおよび獲得された情報に基づいて、この被験体が前立腺癌を有するかまたは前立腺癌に対する前段階の傾向を有するかを決定する工程とを包含する方法を提供する。この方法はさらに、前立腺癌または前前立腺癌状態の特定の処置を推奨する工程を包含し得る。

【0267】

本発明はまた、本発明のマーカーを含むアレイを包含する。このアレイは、このアレイにおいて1つ以上の遺伝子の発現をアッセイするために用いられ得る。1実施形態では、このアレイは、組織中の遺伝子発現をアッセイして、このアレイ中の遺伝子の組織特異性を確認するために用いられ得る。この方式では、最大約7600個の遺伝子が発現について同時にアッセイできる。これによって、1つ以上の組織において特異的に発現される遺伝子の集合を示すプロフィールを発達させることが可能になる。

30

【0268】

このような定量的決定に加えて、本発明は、遺伝子発現の定量を可能にする。従って、組織特異性だけでなく、組織中における遺伝子の集団の発現のレベルも確認可能である。従って遺伝子は、その組織におけるその遺伝子の組織発現自体および発現のレベルに基づいて分類され得る。これは例えば、組織間および組織内の遺伝子発現の関係を確認するのに有用である。従って、1つの組織が混乱され得、そして第2の組織において遺伝子発現の影響が決定され得る。この状況では、生物学的刺激に応答する、1つの細胞タイプの別の細胞タイプに対する効果が決定され得る。このような決定は、例えば、遺伝子発現のレベルにおいて細胞間相互作用の効果を知らるために有用である。ある因子が1つの細胞タイプを処置するために治療的に投与されるが、別の細胞タイプに対しては望ましくない効果を有する場合、本発明は、この望ましくない効果の分子的基礎を決定するアッセイを提供し、これによって中和剤を同時投与するか、そうでなければこの望ましくない効果を処置する機会が得られる。同様に、単独の細胞タイプにおいてさえ、望ましくない生物学的効果が分子レベルで決定され得る。これによって、標的遺伝子以外の発現に対する因子の効果が確認されて、相殺され得る。

40

50

【0269】

別の実施形態では、1つ以上の遺伝子の発現の時間経過をアレイ中でモニターするためにアレイが用いられ得る。これは、本明細書に考察されるような、種々の生物学的状況、例えば、前立腺癌の発達、前立腺癌の進行、および前立腺癌に関連する細胞トランスフォーメーションのような過程で生じ得る。

【0270】

このアレイは、同じ細胞または異なる細胞における他の遺伝子の発現に対する遺伝子の発現の効果を確認するためにも有用である。これによって、最終的なまたは下流の標的が調節できない場合、例えば、治療的介入のための別の分子標的の選択が得られる、

このアレイはまた、正常なまたは異常な細胞における1つ以上の遺伝子の種々の発現パターンを確認するためにも有用である。これによって、診断または治療の介入のための分子標的として役立つ遺伝子の集団が得られる。

【実施例】

【0271】

(実験)

(実施例1：前立腺癌マーカーの同定)

(材料および方法)

(RNA調製)

RNAは、前立腺腫瘍サンプル、正常前立腺サンプル、非前立腺腫瘍サンプルおよび非前立腺正常サンプル由来のサンプルから調製した。凍結組織ブロックを断片化して、RNAをサンプルから単離した。Trizol Reagent (Invitrogen, San Diego, CA)を用いてこの凍結組織から全RNAを抽出し、続いてQiagen's RNeasyキット (Qiagen, Valencia, CA)を用いて二次浄化工程を行って、RNAプローブ標識有効性を増大させた。アガロースゲルでの電気泳動後にRNAのエチジウム染色から算出して、28S/18S リボソームRNA比が少なくとも1.0であるRNAのみをこの研究に用いた。

【0272】

(cDNAマイクロアレイハイブリダイゼーション)

Research Genetics (Huntsville, AL)由来の30,732個のUniGeneクローンを含むcDNAマイクロアレイを、ナイロンフィルター上で生成した。³³P-dCTP、オリゴdT-30プライマーおよびSuperscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies)を用いた逆転写による、放射性標識したcDNAを生成するためのテンプレートとして、全部で4~6 μgの総RNAを用いた。³³P標識した第1鎖のcDNAを、cot-1 DNAおよびpoly-dA 40-60 (Pharmacia, Peapack, NJ)を用いてプレアニリングして、非特異的ハイブリダイゼーションを低下させた。7%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、250 mM Na₃PO₄ (pH 7.2)、1 mM EDTA、0.5% Casein-Hammersteinおよび0.1 mg/mlの変性サケ精子DNAを含む緩衝液中で、各々のフィルターを、約6 × 10⁶ カウントの標識プローブと65 °Cで16時間ハイブリダイズさせた。4%および1%のSDS洗浄緩衝液 (20 mM Na₃PO₄ (pH 7.2)、1 mM EDTA および4%または1% SDS)を用いてフィルターを洗浄した後、それらをFujii Phosphorimagerスクリーンに曝して、FujiiスキャナーBAS 2500を用いてスキャンした。Millennium Pharmaceuticals, Inc.で開発された自動アレイ分析プログラム、Grid Guru v1.0を用いてスポットを定量した。

【0273】

(マーカースコアリングアルゴリズムおよびデータ分析)

ハイブリダイゼーション有効性の相違について補正するために、各々のマイクロアレイフィルター由来のデジタル化データを、そのフィルター上の全てのスポットの中央強度に

よって正規化した。アレイベースのおよび遺伝子ベースの両方の階層的クラスター分析を行なって、Stanford's Gene ClusterおよびTree Viewソフトウェアを用いて可視化した。各々の遺伝子についてのマーカースコアを算出することによって示差的に発現された遺伝子をランク付けした。

【0274】

マーカースコアの計算のために、サンプルをコントロール群およびテスター群に分けた。マーカースコアについての開始点は、コントロールサンプルを上回るテスターサンプルの平均倍数変化（比）である。示差的な発現を示す変化の程度（発現比）およびテスターサンプルの数の両方を反映するが、極めて高い値を有する小画分のテスターサンプルによっては占有されないようにスコアを設計した。この「異常値」の影響を軽減するために、遺伝子は、10を超える発現比で、10の比を有する遺伝子と有意に異なることはないとして処理した。マーカースコアに由来するこの所望の能力は、テスターサンプルにまたがる平均倍数変化をとる前に、漸近的圧縮関数を用いてテスター：コントロール発現比を変換することによって達成した。マーカースコアは、テスターがコントロールよりも高度に発現されると思われる場合に1の値であり、そうでなければ1より大きい値である。マーカースコアは、いずれの遺伝子についても10の値を超えることはできない。

10

【0275】

従って、遺伝子 g についてのマーカースコア S_g は、以下に従って、個々のテスターおよびコントロールレベルの重み付け強度の比の平均として算出される：

20

$S_g = (S_{g_s}) / N_{tester}$
 $S_{g_s} = C(x_{g_s} / (k + x_g^Q))$ 、ここで S_{g_s} は遺伝子 g およびサンプル s についてのマーカースコアであり、

$C(r)$ は、 $r > 1$ 、については、圧縮関数 $C(r) = A(1 - e^{-r/A})$ であり、そして $r < 1$ については $C(r) = 1$ であり、

A は、変化倍数值（本発明者らは、10を用いた）の上の漸近線であり、

x_{g_s} は、サンプル s 上の遺伝子 g の発現値であり、

x_g^Q は、コントロールサンプルの発現値の Q 番目の百分位数であり；代表的には $Q = 50$ であり、

k は、データ中の付加ノイズを反映する定数、すなわち、繰り返し測定での変動の固定成分である。0.25という値は、マイクロアレイ技術を用いて較正実験からこのパートナーについて誘導された。

30

N_{tester} はテスターサンプルの数である。

【0276】

（定量的PCRを用いる遺伝子発現分析）

遺伝子発現は、正常および疾患（例えば、癌性）のヒト組織サンプルから調製されたcDNA中でTAQMAN（登録商標）定量的PCR（Applied Biosystems）によって測定した。要するに、製造業者（Invitrogen）の指示に従ってTRIzol Reagentを用いて単回工程の抽出方法によって患者サンプルから総RNAを調製した。各々のRNA調製物をDNase I（Ambion）を用いて37で1時間処置した。内部アンプリコン参照として β -2ミクログロブリンを用いて、蛍光の閾値レベルに達するのに少なくとも38回のPCR増幅サイクル（または18sリボソーム遺伝子については35回のPCR増幅）をサンプルが必要とした場合、DNase I処理は、完全であると確認された。DNase I処理後のRNAサンプルの完全性をアガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって確認した。フェノール抽出後、製造業者（Applied Biosystems）の指示に従ってTaqman Reverse Transcription Reagentsを用いてサンプルからcDNAを調製した。逆転写酵素なしのRNAの陰性コントロールを、各々のRNAサンプルについて偽の逆転写した。

40

【0277】

プローブは、特定の遺伝子およびその関連転写物の配列に基づいてPrimer Exp

50

ressソフトウェア (Applied Biosystems) によって設計した。各々の標的遺伝子プローブは、FAM (6 - カルボキシフルオレセイン) を用いて標識し、そして18 s 参照プローブを種々の蛍光色素VICで標識した。従って、標的遺伝子および内部参照遺伝子の種々の標識は同じウェル中で測定可能であった。プライマーおよびプローブを、特定の遺伝子の各々の転写物についての感度および特異性についてチェックした。フォワードプライマーおよびリバースプライマー、ならびに18 s および標的遺伝子の両方についてのプローブを、TAQMAN (登録商標) Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) に添加した。プライマーおよびプローブの最終濃度は変化してもよいが、各々は所定の実験内において内部で一致していた。代表的な実験では、18 s については、100 nM のフォワードプライマーおよびリバースプライマーに加えて200 nM プローブを、そして標的遺伝子については900 nM のフォワードプライマーおよびリバースプライマーに加えて250 nM のプローブを含んだ。TAQMAN (登録商標) マトリックス実験は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で行なった。サーマルサイクラー条件は以下のとおりであった：50 で2分間および95 で10分間の保持、その後、95 15秒間、その後60 1分間の40サイクルの2工程PCR。

10

【0278】

以下の方法を用いて、同じ組織中の18 s 発現に対する種々の組織における遺伝子発現を定量的に算出した。閾値サイクル (Ct) 値は、蛍光中で統計的に有意な増大が検出されるサイクルとして規定する。Ct 値が低いほど、mRNA 濃度が高いことを示す。遺伝子のCt 値は、以下の式： $Ct = Ct(\text{標的転写物}) - Ct(18s)$ を用いてCt 値を得るために18 s リボソーム遺伝子のCt 値を差し引きすることによって正規化する。次いで、 2^{-Ct} によって得られる計算式を用いて相対的発現を算出する。

20

【0279】

(結果)

(前立腺マーカー選択)

「前立腺腫瘍プール」(3つの前立腺腫瘍患者サンプル)、「前立腺正常プール」(5つの正常な前立腺上皮患者サンプル)、「他の正常なプール」(正常な心臓、腎臓、小腸、脾臓、白血球(WBC)、肺、肝臓、脳、骨髄および結腸患者組織サンプルの各々由来の1サンプル)、および「他の腫瘍プール」(4つの子宮頸癌、5つの結腸腫瘍、8つの肺癌腫患者サンプルの種々のタイプ、4つの卵巣腫瘍サンプル、および5つの前立腺腫瘍サンプル)の患者サンプルからなる前立腺スクリーニングパネル由来のmRNAを用いて、上記の物質および方法のセクションにおいて規定されたような転写プロファイリングによって、表1に列挙されるマーカーの全てを同定した。それらの前立腺正常、他の正常または他の腫瘍の発現に比較して、少なくとも25%の前立腺腫瘍における少なくとも3倍高い発現を有するクローンを、前立腺腫瘍特異的スクリーニングマーカーとして設計した。これらのcDNAクローンは、決定されたそれらのタンパク質コード転写配列を有するように選択した。

30

【0280】

選択されたcDNAクローンについて全長タンパク質コード転写物を決定するためには、選択されたクローンの配列(単数または複数)を用いて、有意な重複を有する他のEST配列またはクラスターを同定するために、公的な配列および独自の配列データベースを問い合わせた。このように、連続的なEST配列および/またはクラスターをタンパク質コード転写物にアセンブルした。特許請求されるマーカーの全てについての別の転写分析は以下のとおり行なった。

40

【0281】

ヒトゲノム配列に対して任意の所定のマーカー遺伝子について公知のヌクレオチド配列の既存のマッピングを用い、そしてヒトゲノム配列上の任意の所定のマーカー遺伝子の新規なヌクレオチド配列をさらにマッピングすることによって(例えば、「UCSCゲノム

50

ブラウザー」のようなリソース、または同様の機能の社内リソースを、ゲノム配列上の検索配列の迅速かつ正確なマッピングを可能にする B L A T のようなアルゴリズムと組み合わせて用いて)、マーカー遺伝子のエキソン - イントロン構造を達成して、同じ遺伝子にマッチする E S T 配列にさらに気を配る。

【 0 2 8 2 】

目的およびコントロールのサンプルの組織からの所定のマーカー遺伝子のコード配列を増幅するために、P C R プライマーを設計した。コード配列を変更する能力を用いて、この分析から生じるマーカー遺伝子の任意の別の 5 ' または 3 ' によって、この代替の末端に特異的なさらなるプライマーの設計が得られた。

【 0 2 8 3 】

前立腺腫瘍標本に由来する c D N A テンプレートを用いて得た P C R 産物をプラスミドベクター中にクローニングして、D N A 配列分析によって特徴付けた。代表的には、96個のクローンを P C R 産物の制限消化およびゲル電気泳動によって、または D N A 配列分析によって分析した。

【 0 2 8 4 】

2 % 以上の頻度で生じるオルタナティブ遺伝子転写物の代表的なクローンを配列決定した。全ての利用可能な配列に基づいて手作業でキュレートしたアセンブリ (コンティグ) 内に含まれるオープンリーディングフレーム (O R F) の同定によって、これらのオルタナティブ転写物に相当するタンパク質配列の同定を達成した。この同定された配列は、表 1 および配列表において命名する。

【 0 2 8 5 】

同定されたオルタナティブ転写物を有する遺伝子の示差的な遺伝子発現を、患者の組織標本から調製した c D N A 中の T A Q M A N (登録商標) 定量的 P C R (A p p l i e d B i o s y s t e m s) によって確認した。所定の遺伝子について同定された全ての転写物について鋭敏であった遺伝子特異的 T A Q M A N (登録商標) 試薬を、特定の場合に調製した (例えば、A M A C R、L I M)。さらに、スプライシング形態の特異的 T A Q M A N (登録商標) 試薬セットを各々の転写物について、または特定のマーカーの転写物の群について別々に発色させた (例えば、M 6 8 3 A、M 6 8 4 A、M 6 8 6 ; M 2 8 3 A、M 7 4 7 ; M 7 4 2、M 7 4 3、M 7 4 4、M 7 4 5、M 2 6 0 A ; M 3 2 2 A)。同様の増幅有効性を有する、種々の腫瘍正常発現を実証する、遺伝子特異的および転写物特異的発現プロフィールが見出された。表 1 に示されるマーカー M 6 8 3 A、M 6 8 4 A、M 6 8 6 ; M 2 8 3 A、M 7 4 7 ; M 7 4 2、M 7 4 3、M 7 4 4、M 7 4 5、M 2 6 0 A ; M 3 2 2 A の各々が、正常または他の腫瘍サンプルに比較して、正常なレベルの発現よりも高いレベルを示す。M 7 4 7 および M 2 8 3 A は、L I M 遺伝子の別のスプライス変体を構成する (表 2 を参照のこと)。しかし、M 7 4 7 のみが、正常または他の腫瘍サンプルに比較して上方制御された発現を生じる、種々の異なる発現を示した。M 7 4 7 は、M 2 8 3 A よりも実質的に短い L I M 転写物を示し、そして固有の別の転写開始部位によって特徴付けられる。M 7 4 7 は、M 2 8 3 A よりも短い、M 2 8 3 A タンパク質配列の C 末端部分に対して同一である (表 2 ; 配列番号 2 7、配列番号 2 9 および配列番号 2 8、配列番号 3 0 を参照のこと)。

【 0 2 8 6 】

【表 2】

表 2

マーカー	遺伝子名	配列番号 (ヌクレオチド)	配列番号 (アミノ酸)	CDS
M747	LIM: LIM タンパク質 (ラットプロテインキナーゼ C 結合エニグマと類似), 変体 2	29	30	394..828
M283A	LIM: LIM タンパク質 (ラットプロテインキナーゼ C 結合エニグマと類似), 変体 1	27	28	121..1911

10

20

30

40

50

(実施例2：エンドポイントPCRによる遺伝子発現分析)

(材料および方法)

(エンドポイントPCR分析)

要するに、第1鎖cDNAを生成するためのテンプレートとして用いられるように種々のサンプル由来の総RNAをプールした。各々のサンプルの等量がこのプールに含まれた。前立腺スクリーニングパネルは、「前立腺腫瘍プール」(3つの前立腺腫瘍患者サンプル)、「前立腺正常プール」(5つの正常前立腺上皮患者サンプル)、「他の正常なプール」(正常な心臓、腎臓、小腸、脾臓、白血球、肺、肝臓、脳、骨髄および結腸組織患者組織サンプルの各々由来の1サンプル)、および「他の腫瘍プール」(4つの子宮頸癌、5つの結腸腫瘍、種々のタイプの8つの肺癌腫患者サンプル、4つの卵巢腫瘍サンプル、および5つの前立腺腫瘍サンプル)の患者サンプルから構成された(例えば、表3を参照のこと)。

10

【0287】

総RNAは、製造業者(Invitrogen)の指示に従ってTRIzol試薬を用いて単一工程抽出方法によって患者サンプルから調製した。各々のRNA調製物をDNase I(Ambion)を用いて37℃で1時間処理した。各々の患者サンプル由来のRNAを4つの患者プール、例えば、前立腺正常プール、前立腺腫瘍プール、他の正常なプール、他の腫瘍プールのうちの1つにプールした。

【0288】

ThermoScript RT-PCRシステム(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて4つのプールの各々からcDNAを得た。要するに、製造業者の指示に従って、1μlの50μMオリゴ(dT)20プライマーを、10μlの容積中において用いて、1μg RNAを、65℃で5分間変性した。この反応は、85℃で5分間のインキュベーションによって終わらせた。最終産物は、水を用いて100μlの最終容積まで希釈した。

20

【0289】

遺伝子特異的プライマーは、オープンリーディングフレームのすぐ外側に設計した(表3のカテゴリーに示されるように、「エンドポイントPCRプライマー1」および「エンドポイントPCRプライマー2」)。PCR条件は、プライマーおよび予想される産物のサイズについて最適化した。タッチダウンサイクリング条件を用いて20μlの反応液中で2μlのcDNAを用いた。生成物は臭化エチジウム含有アガロースゲルで泳動して、得られたゲルの図は半定量的に分析してスコア付けした。組織パネル上のエンドポイントPCRのゲルの図は、1~5のスケールでスコア付けした。各々の図は、可視のバンド強度および編集された結果に基づいて3人が独立してスコア付けし、スコアを比較して、3つ全てがバンドの相対強度に一致することを確認し、必要に応じて修正した。次いで、3つのスコアの中央値を最終スコアとして記録した。

30

【0290】

(II. 結果)

【0291】

【表 3 - 1】

表 3. 前立腺スクリーニングエンドポイントPCRデータ

マーカー	遺伝子名	PCR プライマー 1	PCR プライマー 2	正常プール	腫瘍 プール	前立腺正常	前立腺腫瘍
M245A	ABCC4: ATP結合カセット、 サブファミリーC (CFTR/MRP), メンバー 4	3225... 3247	3611... 3634	1	2	3	4
M683A	AMACR: α メチルアシル-CoA ラセマーゼ, 改変体 1	60..79	2103... 2127	1	1	2	2
M684A	AMACR: α メチルアシル-CoA ラセマーゼ, 改変体 2	60..79	1354... .1378	0	0	0	1
M686	AMACR: α メチルアシル-CoA ラセマーゼ, 改変体 3	36..55	1019... 1042	n/d	n/d	1	3
M261	FABP5: 脂肪酸結合タンパク質 5 (乾癬関連)	45..65	463..... 488	1	3	2	4
M746	FLJ23153: 腫瘍壊死因子- α 誘導性脂肪関連タンパク質	85..105	1606... .1626	0	0	4	2
M271A	GOLPH2: ゴルジリンタンパク質 2	185..... 205	1426.... 1445	1	2	3	5
M279A	HSRG1: HSV-1 刺激関連遺伝子 1	587..... 606	1178... .1197	2	0	3	1
M283A	LIM: LIMタンパク質 (ラットプロテインキナーゼC	93..115	2081... .2104	2	1	5	3

10

20

【 0 2 9 2 】

30

【表 3 - 2】

	結合エニグマと類似), 改変体 1						
M747	LIM: LIMタンパク質 (ラットプロテインキナーゼC 結合エニグマと類似), 改変体 2	232..... 255	995..... 1019	0	1	1	3
M164A	NET-6: 4回膜貫通スーパー ファミリーメンバー テトラスパン NET-6	130..... 149	984..... 1004	1	1	3	5
M301A	NPY: ニューロペプチドY	34..52	446..... 465	1	3	5	5
M308A	PLA2G2A: ホスホリパーゼA2, グループ IIA (血小板、滑液)	206..... 227	832..... 853	2	3	5	5
M318A	SMS: スベルミンシンターゼ スベルミジンアミノ プロピルトランスフェラーゼ	102..... 119	1178... .1199	2	3	5	5
M320	SPON2: スポンジン2, 細胞外基質タンパク質	191..... 211	1364... 1383	n/d	n/d	0	3
M389	TACSTD1: 腫瘍関連 カルシウム シグナル伝達因子1	146..... 163	1185... 1204	0	1	1	3
M322A	TARP: T細胞レセプター γ鎖選択的 リーディング フレームタンパク質	1..24	141..... 160	2	5	0	3

10

20

マーカーは、他の腫瘍サンプルまたは正常なサンプル群から得たサンプルよりも前立腺腫瘍サンプルにおいて高いレベルで発現された（表 3）。前立腺正常群、他の正常群、または他の腫瘍群から得られた発現に比較した場合、前立腺腫瘍群において、M 2 4 5 A、M 6 8 6、M 2 6 1、M 2 7 1 A、M 7 4 7、M 1 6 4 A、M 3 2 0 および M 3 8 9 で特に強力な発現が観察された。

30

【 0 2 9 3 】

本出願を通じて引用される、文献、特許、公開特許出願、ならびに GenBank、IMAG E コンソーシアムおよび Derwent を含むデータベース記録を含む、本明細書に引用される参考文献は、本明細書に参考として援用される。

【 0 2 9 4 】

（他の実施形態）

当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する等価物を、慣用的な実験のみを用いて認識するか、または確認することができる。このような等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されるものとする。

40

【配列表】

2008509673000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/28781																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12Q 1/68(2006.01);C07H 21/04 USPC: 435/6;536/24.3 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) U.S. : 435/6; 536/24.3 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 practicable, search terms used) EAST, NCBI, STN																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Xu, Jiangchun. et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Prostate Cancer Using Subtraction and Microarray. Cancer Research. March 2000, Vol 60. pages 1677-1682, especially pages 1677, and 1680-1681</td> <td>1, 2, 4-5, 8-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2006/0084056 AI (Harbeck et al) 20 April 2006 (20.04.2006), paragraph 0144.</td> <td>16, 18-20, 23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Ahern, Holly. Biochemical, Reagent Kits Offer Scientist Good Return On Investment. The Scientist. July 1995, Vol 9. No.15 pg 20.</td> <td>16, 18-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>23</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Xu, Jiangchun. et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Prostate Cancer Using Subtraction and Microarray. Cancer Research. March 2000, Vol 60. pages 1677-1682, especially pages 1677, and 1680-1681	1, 2, 4-5, 8-11	Y	US 2006/0084056 AI (Harbeck et al) 20 April 2006 (20.04.2006), paragraph 0144.	16, 18-20, 23	Y	Ahern, Holly. Biochemical, Reagent Kits Offer Scientist Good Return On Investment. The Scientist. July 1995, Vol 9. No.15 pg 20.	16, 18-20	Y		23			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	Xu, Jiangchun. et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Prostate Cancer Using Subtraction and Microarray. Cancer Research. March 2000, Vol 60. pages 1677-1682, especially pages 1677, and 1680-1681	1, 2, 4-5, 8-11																		
Y	US 2006/0084056 AI (Harbeck et al) 20 April 2006 (20.04.2006), paragraph 0144.	16, 18-20, 23																		
Y	Ahern, Holly. Biochemical, Reagent Kits Offer Scientist Good Return On Investment. The Scientist. July 1995, Vol 9. No.15 pg 20.	16, 18-20																		
Y		23																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">* Special categories of cited documents:</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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.</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			* Special categories of cited documents:			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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.	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:																				
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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.																		
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																		
"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)	"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																		
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																			
Date of the actual completion of the international search 13 June 2006 (13.06.2006)		Date of mailing of the international search report 17 JUL 2006																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P O Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Amanda M. Shaw Telephone No. (571) 272-0500																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/28781

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation 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 additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1,2,4,5,8-11,16,18-20 and 23

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/28781

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following invention or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCR Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups 1-210, claim(s) 1-20, 23-24, with respect to a marker (Groups 1-21) or combination of 2 or more markers (Groups 22-210) drawn to methods of assessing whether a patient is afflicted with prostate cancer and a kit containing a nucleic acid probe for assessing expression of the marker. Group 1 is considered to be drawn to methods which detect biomarkers M245A; Group 22 is considered to be drawn to methods which detect the combination of biomarkers M245A and M683A. If additional groups are to be searched please indicate the corresponding markers. Claims 1-20 and 23-24 will be searched only for their elected markers.

Group 211-231, claim(s) 21-22, with respect to a marker drawn to methods for identifying a candidate compound for inhibiting prostate cancer by determining the expression of a biomarker. Group 211 is considered to be drawn to methods for identifying a candidate compound for inhibiting prostate cancer by determining the expression of biomarker M245A. If additional groups are to be searched please indicate the corresponding markers. Claims 21-22 will be searched only for their elected markers.

Group 232-244, claim(s) 25, with respect to a single SEQ ID NO, drawn to polypeptides. Group 232 is considered to be drawn to polypeptides comprising SEQ ID 4. If additional groups are to be searched please indicate the corresponding SEQ ID NOs. Claim 25 will be searched only for the elected polypeptide sequence.

Group 245-266, claim(s) 23 and 26, with respect to a marker, drawn to a kit containing antibodies and antibodies that bind to markers. Group 245 is considered to be drawn to antibodies that bind to biomarker M245A. If additional groups are to be searched please indicate the corresponding markers. Claims 23 and 26 will be searched only for the antibodies which bind to the biomarkers and the antibodies which bind to the stated polypeptide sequences. The inventions listed as Groups 1-266 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical feature for the following reasons:

Under 37 CFR 1.475(d) Applicant is entitled to an examination of the first product, method of making said product and method of using said product. In the Instant Application, the kit for assessing whether a patient is afflicted with prostate cancer (claim 23), the nucleotides (claim 24), and the methods of assessing whether a patient is afflicted with prostate cancer (claims 1-20) constitute the first product and method of using the product and therefore these claims will be examined together. However, the methods of groups 211-231 constitute additional and distinct methods and the products of groups 232-244 and 245-266 constitute additional and distinct products.

The inventions of, groups 1-210 and 211-231 are drawn to different methods such that each method requires different active process steps, require the use of different reagents and have different objectives, and do not share a special technical feature. The methods of groups 1-210 require determining the level of expression of marker in a patient to diagnose or prognose a disease. These steps are not required to practice the methods of groups 211-231. The method of group 211-231 requires determining the level of expression of marker in a patient sample in the presence of a compound and then determining the level of expression of marker in a patient sample in the absence of a compound and comparing the level of

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/28781

expression wherein significantly lower expression is an indication that the compound is efficacious for inhibiting prostate cancer. These steps are not required to practice the methods of groups 1-210.

Furthermore, the products of groups 1-210, 232-244, and 245-266 do not share a corresponding structural property. The special technical feature of the nucleic acids of Groups 1-210 is the identity of its monomers which are nucleotides and which determine its structure, properties and function. In contrast, the special technical feature of the proteins of Groups 232-244 are its amino acid monomers, which determine its structure, properties and function which are arranged in a specific 3-dimensional structure. The special technical feature of the antibodies of groups 245-266 are also its amino acid monomers. However, in an antibody, the amino acids are arranged in a specific tertiary structure wherein four subunits (2 light chains and 2 heavy chains) are joined via disulfide bonds. The antibodies of groups 245-266 differ from the proteins of groups 232-244 with respect to their amino acid sequence, secondary and tertiary structure and their functional activities. While antibodies bind to specific target antigens and function in immunological reactions, such that they may neutralize an antigen, polynucleotides do not have these functional activities. Proteins may be used for therapeutic purposes or in ligand binding assays. Further, while nucleic acids may be used in hybridization assays, antibodies and proteins may not be utilized in hybridization assays. As the products differ from each other in structure, function, and effect, they do not belong to a recognized class of chemical compound, or have both a "common property or activity" and a common structure as would be required to show that the inventions are "of a similar nature".

It is noted that the present claims have been presented in improper Markush format, as distinct products and distinct methods are improperly joined in the claims. Each marker is structurally and functionally distinct from all other markers and has a different special technical feature. The chemical structure of each marker is different. For example marker M245A is structurally and functionally different from marker M683A. As the products encompassed by the claims do not share a special technical feature, the distinct products and methods may not properly be presented in the alternative. Accordingly, the claims have been separated into a number of groups corresponding to the number of different inventions encompassed by the claims and the claims will be examined only as they read upon the invention of the elected group. For the same reasons, the remainder of the claims have been separated in a number of groups corresponding to the number of different inventions encompassed thereby.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/08	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	

(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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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

- (72)発明者 モナハン , ジョン イー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 8 1 , ウォルポール , ウェスト ストリート 9
4 2
- (72)発明者 カマトカー , シュブハンギ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9 , ニュートン , ソー ミル ブルック パー
クウェイ 6 5 5 , ナンバー 1
- (72)発明者 ホールシュ , セバシュティアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 4 , アーリントン , ブラットル ストリート
1 2 7
- (72)発明者 ゴルバチェワ , ベラ オー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 1 5 , ボストン , エスティー . ボトルフ スト
リート 1 8 1 , ナンバー 1
- (72)発明者 グラット , カレン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 6 0 , ナティック , ビーコン ストリート 1 7
- (72)発明者 フォード , ドナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 7 6 2 , ブレーンビル , モーニングサイド ロード
8
- (72)発明者 エンディゲ , ウィルソン オー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 6 2 , ノーウッド , リバティー レーン 3 1
- (72)発明者 アンダーソン , ダスティン エル .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 5 , ブライトン , キンロス ロード 3 4 ,
ナンバー 1 1

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 CA25 CB01 CB03 CB14 DA12 DA36 DA78 FB02
FB03
4B024 AA11 BA07 BA32 BA80 CA04 HA14
4B050 DD07 LL03
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ43 QQ44 QR32 QR56 QR62 QR66 QS16
QS25 QS34 QS36 QX02
4C084 AA17 MA16 MA31 MA35 MA36 MA37 MA52 MA55 MA57 MA59
MA60 MA63 MA66 NA14 ZA812 ZB262

4H045 AA10 BA10 CA40 EA50