

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年10月11日 (2012.10.11)

【公表番号】特表2012-511305(P2012-511305A)

【公表日】平成24年5月24日 (2012.5.24)

【年通号数】公開・登録公報2012-020

【出願番号】特願2011-525307(P2011-525307)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 G

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 P 35/00

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/574 Z

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/15 Z

【手続補正書】

【提出日】平成24年8月20日 (2012.8.20)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、ネクチン - 4 過剰発現に関連する癌マーカーを検出するための方法  
:

( a ) 対象から採取された生物学的試料中のネクチン - 4 のレベルを決定する段階 ; および

( b ) 段階 ( a ) で決定したネクチン - 4 のレベルを正常対照の該レベルと比較する段階であって、正常対照と比較して該生物学的試料中のネクチン - 4 のレベルが高いことに

より、癌の疑いが示される段階。

【請求項 2】

前記癌が肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記生物学的試料が血液試料である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記血液試料が、全血、血清、および血漿からなる群より選択される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

ネクチン - 4 の前記レベルが、血清中のネクチン - 4 タンパク質を検出することによって決定される、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記ネクチン - 4 タンパク質がイムノアッセイによって検出される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記イムノアッセイが E L I S A 法である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記イムノアッセイが、ネクチン - 4 の細胞外ドメインに対して産生された抗体を用いて行われる、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

以下の段階をさらに含む、請求項 3 ~ 8 のいずれかに記載の方法：

(c) 同一対象から採取された血液試料中の C E A のレベルを決定する段階；

(d) 段階 (c) で決定された C E A のレベルを正常対照の該レベルと比較する段階；  
ならびに

(e) ネクチン - 4 の前記レベルおよび / または C E A の該レベルが対照レベルよりも高いことにより、癌の疑いが示される段階。

【請求項 10】

以下の段階をさらに含む、請求項 3 ~ 9 のいずれかに記載の方法：

(c) 同一対象から採取された血液試料中の C Y F R A のレベルを決定する段階；

(d) 段階 (c) で決定された C Y F R A のレベルを正常対照の該レベルと比較する段階；  
ならびに

(e) ネクチン - 4 の前記レベルおよび / または C Y F R A の該レベルが対照レベルよりも高いことにより、癌の疑いが示される段階。

【請求項 11】

前記癌が肺癌である、請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記肺癌が腺癌または扁平上皮癌である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

以下の段階を含む、ネクチン - 4 過剰発現に関連する癌を有する患者の予後の評価の指標を検出する方法：

(a) 患者から採取された生物学的試料中のネクチン - 4 遺伝子の発現レベルを決定する段階；

(b) 段階 (a) における発現レベルを対照レベルと比較する段階；および

(c) 段階 (b) の比較を、該患者の予後の評価と関連付ける段階。

【請求項 14】

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

前記対照レベルが予後良好対照レベルであり、該対照レベルと比較した前記発現レベルの上昇が予後不良と判定される、請求項 14 記載の方法。

**【請求項 16】**

前記患者から採取された生物学的試料が血液試料であり、ネクチン - 4 遺伝子の前記発現レベルが該血液試料中のネクチン - 4 のレベルとして決定される、請求項 15 記載の方法。

**【請求項 17】**

前記血液試料が、全血、血清、および血漿からなる群より選択される、請求項 16 記載の方法。

**【請求項 18】**

ネクチン - 4 の前記レベルが、血清中のネクチン - 4 タンパク質を検出することによって決定される、請求項 17 記載の方法。

**【請求項 19】**

前記ネクチン - 4 タンパク質がイムノアッセイによって検出される、請求項 18 記載の方法。

**【請求項 20】**

前記イムノアッセイが E L I S A 法である、請求項 19 記載の方法。

**【請求項 21】**

前記イムノアッセイが、ネクチン - 4 の細胞外ドメインに対して産生された抗体を用いて行われる、請求項 20 記載の方法。

**【請求項 22】**

以下からなる群より選択される試薬を含む、癌マーカーを検出するため、または癌を有する患者の予後の評価の指標を検出するためのキットであって、該癌がネクチン - 4 過剰発現に関連する、キット：

(a) ネクチン - 4 m R N A を検出するための試薬；

(b) ネクチン - 4 遺伝子によってコードされるタンパク質を検出するための試薬；および

(c) ネクチン - 4 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

**【請求項 23】**

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、請求項 22 記載のキット。

**【請求項 24】**

予後良好対照試料をさらに含む、予後を評価または判定する場合の請求項 22 記載のキット。

**【請求項 25】**

陽性対象試料をさらに含む、請求項 22 ~ 24 のいずれかに記載のキット。

**【請求項 26】**

前記試薬が、ネクチン - 4 遺伝子によってコードされるタンパク質を検出するためのイムノアッセイ試薬である、請求項 22 ~ 25 のいずれかに記載のキット。

**【請求項 27】**

前記イムノアッセイ試薬が、ネクチン - 4 の細胞外ドメインに対して産生された抗体を含む、請求項 26 記載のキット。

**【請求項 28】**

血液試料中の C E A および / または C Y F R A のレベルを決定するためのイムノアッセイ試薬をさらに含む、請求項 22 ~ 27 のいずれかに記載のキット。

**【請求項 29】**

C E A および / または C Y F R A の陽性対照試料をさらに含む、請求項 28 記載のキット。

**【請求項 30】**

細胞に導入されるとネクチン - 4 の発現および細胞増殖を阻害する、単離された二本鎖分子であって、該分子がセンス鎖およびそれに相補的なアンチセンス鎖を含み、該鎖が互いにハイブリダイズして該二本鎖分子を形成し、該センス鎖が S E Q I D N O : 1

に相当するオリゴヌクレオチド配列を含み、該二本鎖分子が約 19 ~ 約 25 ヌクレオチドの長さを有する、単離された二本鎖分子。

【請求項 31】

前記センス鎖が、標的配列として SEQ ID NO: 10 または 11 のヌクレオチド配列に相当するヌクレオチド配列を含む、請求項 30 記載の二本鎖分子。

【請求項 32】

2 または 3 ヌクレオチドからなる少なくとも 1 つの 3' オーバーハングを有する、請求項 30 または 31 記載の二本鎖分子。

【請求項 33】

介在一本鎖によって連結された前記センス鎖および前記アンチセンス鎖の両方を含む単一ポリヌクレオチドからなる、請求項 30 記載の二本鎖分子。

【請求項 34】

一般式

5' - [A] - [B] - [A'] - 3'

を有し、[A] は前記センス鎖であり、[B] は 3 ~ 23 ヌクレオチドからなる前記介在一本鎖であり、かつ [A'] は [A] に相補的な配列を含む前記アンチセンス鎖である、請求項 33 記載の二本鎖分子。

【請求項 35】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項記載の二本鎖分子をコードするベクター。

【請求項 36】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項記載の単離された二本鎖分子の少なくとも 1 つまたはそれらをコードするベクターを含む、癌を治療または予防するための組成物であって、該癌がネクチン - 4 過剰発現に関連する、組成物。

【請求項 37】

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、請求項 36 記載の組成物。

【請求項 38】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項記載の単離された二本鎖分子の少なくとも 1 つまたはそれらをコードするベクターを投与する段階を含む、癌を治療または予防するための方法であって、該癌がネクチン - 4 過剰発現に関連する、方法。

【請求項 39】

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4 過剰発現に関連する、方法：

(a) 試験化合物を、ネクチン - 4 のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(b) 該ポリペプチドと該試験化合物との間の結合活性を検出する段階；および

(c) 該ポリペプチドに結合する化合物を候補化合物として選択する段階。

【請求項 41】

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4 過剰発現に関連する、方法：

(a) 試験化合物を、ネクチン - 4 のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(b) 段階 (a) のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および

(c) 試験化合物の非存在下で検出されたネクチン - 4 の該ポリヌクレオチドによってコードされる該ポリペプチドの生物学的活性と比較して、該ポリペプチドの生物学的活性を抑制する該試験化合物を候補化合物として選択する、段階。

【請求項 42】

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4 過剰発現に関連する、方法：

( a ) 候補化合物を、ネクチン - 4 遺伝子を発現している細胞と接触させる段階；および

( b ) 試験化合物の非存在下で検出されたネクチン - 4 の発現レベルと比較して、該発現レベルを低下させる候補化合物を候補化合物として選択する段階。

【請求項 4 3】

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4 過剰発現に関連する、方法：

( a ) 候補化合物を、ネクチン - 4 遺伝子の転写調節領域および該転写調節領域の制御下で発現するレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と接触させる段階；

( b ) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；ならびに

( c ) 対照と比較して、該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを低下させる候補化合物を候補化合物として選択する段階。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 6】

本発明の 1 つまたは複数の局面はある特定の目的を満たすことができ、その他の 1 つまたは複数の局面はその他のある特定の目的を満たすことができることが、当業者によって理解されるであろう。各目的は、本発明の全ての局面に、そのすべての点で、同等に当てはまるとは限らない。そのため、先の目的は、本発明のいずれか 1 つの局面に関して、別の選択肢において考慮され得る。以下の詳細な説明を添付の図面および以下の実施例と共に参照することにより、本発明のこれらおよびその他の目的および特色が、より完全に明白になるであろう。しかしながら、上記の発明の概要および以下の詳細な説明は、いずれも、好ましい態様のものであって、本発明または本発明のその他の別の態様を限定するものではないことを理解されたい。

[本発明1001]

以下の段階を含む、ネクチン - 4 過剰発現に関連する癌を診断するための方法：

( a ) 対象由来の生物学的試料中のネクチン - 4 のレベルを決定する段階；および

( b ) 段階 ( a ) で決定したネクチン - 4 のレベルを正常対照の該レベルと比較する段階であって、正常対照と比較して該生物学的試料中のネクチン - 4 のレベルが高いことにより、該対象が癌に罹患していることが示される段階。

[本発明1002]

前記癌が肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記生物学的試料が血液試料である、本発明1001の方法。

[本発明1004]

前記血液試料が、全血、血清、および血漿からなる群より選択される、本発明1003の方法。

[本発明1005]

ネクチン - 4 の前記レベルが、血清中のネクチン - 4 タンパク質を検出することによって決定される、本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記ネクチン - 4 タンパク質がイムノアッセイによって検出される、本発明1005の方法。

[本発明1007]

前記イムノアッセイが E L I S A 法である、本発明1006の方法。

[本発明1008]

前記イムノアッセイが、ネクチン - 4の細胞外ドメインに対して産生された抗体を用いて行われる、本発明1007の方法。

[本発明1009]

以下の段階をさらに含む、本発明1003の方法：

(c) 同一対象由来の血液試料中のCEAのレベルを決定する段階；

(d) 段階(c)で決定されたCEAのレベルを正常対照の該レベルと比較する段階；  
ならびに

(e) ネクチン - 4の前記レベルおよび / またはCEAの該レベルが対照レベルよりも高い場合に、該対象が癌に罹患していると判断する段階。

[本発明1010]

以下の段階をさらに含む、本発明1003の方法：

(c) 同一対象由来の血液試料中のCYFRAのレベルを決定する段階；

(d) 段階(c)で決定されたCYFRAのレベルを正常対照の該レベルと比較する段階；  
ならびに

(e) ネクチン - 4の前記レベルおよび / またはCYFRAの該レベルが対照レベルよりも高い場合に、該対象が癌に罹患していると判断する段階。

[本発明1011]

前記癌が肺癌である、本発明1009または1010の方法。

[本発明1012]

前記肺癌が腺癌または扁平上皮癌である、本発明1011の方法。

[本発明1013]

以下の段階を含む、ネクチン - 4過剰発現に関連する癌を有する患者の予後を評価または判定するための方法：

(a) 患者由来の生物学的試料中のネクチン - 4遺伝子の発現レベルを決定する段階；

(b) 段階(a)における発現レベルを対照レベルと比較する段階；および

(c) 段階(b)の比較に基づいて該患者の予後を判定する段階。

[本発明1014]

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記対照レベルが予後良好対照レベルであり、該対照レベルと比較した前記発現レベルの上昇が予後不良と判定される、本発明1014の方法。

[本発明1016]

前記患者由来の生物学的試料が血液試料であり、ネクチン - 4遺伝子の前記発現レベルが該血液試料中のネクチン - 4のレベルとして決定される、本発明1015の方法。

[本発明1017]

前記血液試料が、全血、血清、および血漿からなる群より選択される、本発明1016の方法。

[本発明1018]

ネクチン - 4の前記レベルが、血清中のネクチン - 4タンパク質を検出することによって決定される、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記ネクチン - 4タンパク質がイムノアッセイによって検出される、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記イムノアッセイがELISA法である、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記イムノアッセイが、ネクチン - 4の細胞外ドメインに対して産生された抗体を用いて行われる、本発明1020の方法。

[本発明1022]

以下からなる群より選択される試薬を含む、癌を診断するため、または癌を有する患者の予後を評価もしくは判定するためのキットであって、該癌がネクチン - 4過剰発現に関連する、キット：

( a )   ネクチン - 4   m R N Aを検出するための試薬；

( b )   ネクチン - 4遺伝子によってコードされるタンパク質を検出するための試薬；および

( c )   ネクチン - 4タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

[本発明1023]

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、本発明1022のキット。

[本発明1024]

予後良好対照試料をさらに含む、予後を評価または判定する場合の本発明1022のキット。

[本発明1025]

陽性対象試料をさらに含む、本発明1022のキット。

[本発明1026]

前記試薬が、ネクチン - 4遺伝子によってコードされるタンパク質を検出するためのイムノアッセイ試薬である、本発明1022のキット。

[本発明1027]

前記イムノアッセイ試薬が、ネクチン - 4の細胞外ドメインに対して産生された抗体を含む、本発明1026のキット。

[本発明1028]

血液試料中の C E Aおよび / または C Y F R Aのレベルを決定するためのイムノアッセイ試薬をさらに含む、本発明1022のキット。

[本発明1029]

C E Aおよび / または C Y F R Aの陽性対照試料をさらに含む、本発明1028のキット。

[本発明1030]

細胞に導入されるとネクチン - 4の発現および細胞増殖を阻害する、単離された二本鎖分子であって、該分子がセンス鎖およびそれに相補的なアンチセンス鎖を含み、該鎖が互いにハイブリダイズして該二本鎖分子を形成し、該センス鎖が S E Q   I D   N O   : 1に相当するオリゴヌクレオチド配列を含み、該二本鎖分子が約19 ~ 約25ヌクレオチドの長さを有する、単離された二本鎖分子。

[本発明1031]

前記センス鎖が、標的配列として S E Q   I D   N O : 10または11のヌクレオチド配列に相当するヌクレオチド配列を含む、本発明1030の二本鎖分子。

[本発明1032]

2または3ヌクレオチドからなる少なくとも1つの3'オーバーハングを有する、本発明1030の二本鎖分子。

[本発明1033]

介在一本鎖によって連結された前記センス鎖および前記アンチセンス鎖の両方を含む単一ポリヌクレオチドからなる、本発明1030の二本鎖分子。

[本発明1034]

一般式

5' - [ A ] - [ B ] - [ A ' ] - 3'

を有し、[ A ]は前記センス鎖であり、[ B ]は3 ~ 23ヌクレオチドからなる前記介在一本鎖であり、かつ[ A ' ]は[ A ]に相補的な配列を含む前記アンチセンス鎖である、本発明1033の二本鎖分子。

[本発明1035]

本発明1030 ~ 1034のいずれかの二本鎖分子をコードするベクター。

[本発明1036]

本発明1030～1034のいずれかの単離された二本鎖分子の少なくとも1つまたはそれらをコードするベクターを含む、癌を治療または予防するための組成物であって、該癌がネクチン - 4過剰発現に関連する、組成物。

[本発明1037]

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、本発明1036の組成物。

[本発明1038]

本発明1030～1034のいずれかの単離された二本鎖分子の少なくとも1つまたはそれらをコードするベクターを投与する段階を含む、癌を治療または予防するための方法であって、該癌がネクチン - 4過剰発現に関連する、方法。

[本発明1039]

前記癌が、肺癌、膀胱癌、および子宮頸癌からなる群より選択される、本発明1038の方法。

[本発明1040]

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4過剰発現に関連する、方法：

- (a) 試験化合物を、ネクチン - 4のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- (b) 該ポリペプチドと該試験化合物との間の結合活性を検出する段階；および
- (c) 該ポリペプチドに結合する化合物を候補化合物として選択する段階。

[本発明1041]

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4過剰発現に関連する、方法：

- (a) 試験化合物を、ネクチン - 4のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- (b) 段階(a)のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および
- (c) 試験化合物の非存在下で検出されたネクチン - 4の該ポリヌクレオチドによってコードされる該ポリペプチドの生物学的活性と比較して、該ポリペプチドの生物学的活性を抑制する該試験化合物を候補化合物として選択する、段階。

[本発明1042]

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4過剰発現に関連する、方法：

- (a) 候補化合物を、ネクチン - 4遺伝子を発現している細胞と接触させる段階；および
- (b) 試験化合物の非存在下で検出されたネクチン - 4の発現レベルと比較して、該発現レベルを低下させる候補化合物を候補化合物として選択する段階。

[本発明1043]

以下の段階を含む、癌を治療または予防するための候補化合物をスクリーニングする方法であって、該癌がネクチン - 4過剰発現に関連する、方法：

- (a) 候補化合物を、ネクチン - 4遺伝子の転写調節領域および該転写調節領域の制御下で発現するレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と接触させる段階；
- (b) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；ならびに
- (c) 対照と比較して、該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを低下させる候補化合物を候補化合物として選択する段階。

**【手続補正3】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0269

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**



## 【 0 2 6 9 】

( i i i ) ファージディスプレイ :

別のアプローチは、ライブラリを作成するために組換えバクテリオファージを使用する。この「ファージ法」(Scott & Smith, Science 1990, 249: 386-90、Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 6378-82、Devlin et al., Science 1990, 249: 404-6)を用いて、非常に大きなライブラリを構築することができる(例えば $10^6$ 個 $\sim 10^8$ 個の化学物質)。第2のアプローチは、主として化学的な方法を使用するが、Geysenの方法(Geysen et al., Molecular Immunology 1986, 23: 709-15、Geysen et al., J Immunologic Method 1987, 102: 259-74)、およびFodor et al.の方法(Science 1991, 251: 767-73)がその例である。Furka et al. (14th International Congress of Biochemistry 1988, Volume #5, Abstract FR: 013; Furka, Int J Peptide Protein Res 1991, 37: 487-93)、Houghten (米国特許第4,631,211号)、およびRutter et al. (米国特許第5,010,175号)は、アゴニストまたはアンタゴニストとして試験可能なペプチドの混合物を生成する方法を記載している。

## 【 手 続 補 正 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 3 1 8

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 3 1 8 】

特記しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本発明を実施または試験の際には、本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を用いることができるが、適切な方法および材料を後述する。