(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2004-507254
(P2004-507254A)
(43)公表日　平成16年3月11日(2004.3.11)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A61K 31/7115	A61K 31/7115		4B024
A61K 38/00	A61K 45/00		4B063
A61K 38/43	A61K 48/00		4B065
A61K 45/00	A61P 35/00		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 226 頁）　最終頁に続く

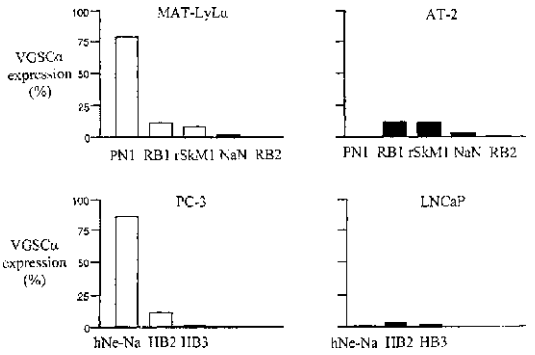
(21)出願番号　特願2002-522542(P2002-522542)
(86)(22)出願日　平成13年9月3日(2001.9.3)
(85)翻訳文提出日　平成15年2月28日(2003.2.28)
(86)国際出願番号　PCT/GB2001/003940
(87)国際公開番号　WO2002/018637
(87)国際公開日　平成14年3月7日(2002.3.7)
(31)優先権主張番号　0021617.6
(32)優先日　平成12年9月2日(2000.9.2)
(33)優先権主張国　イギリス(GB)

(71)出願人　500165809
インペリアル・カレッジ・イノベイションズ・リミテッド
イギリス、エスダブリュー７・２エイゼット、ロンドン、インペリアル・カレッジ、シャーフィールド・ビルディング
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100108578
弁理士　高橋　詔男
(74)代理人　100089037
弁理士　渡邊　隆
(74)代理人　100101465
弁理士　青山　正和

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌の診断および治療

(57)【要約】
ヒト患者の癌を診断する方法であって、（ｉ）核酸および／またはタンパク質を含むサンプルを患者から得る工程、および（ｉｉ）癌と関連するあるレベルのｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの核酸またはタンパク質をサンプルが含むかどうかを判定する工程を含む方法。癌を治療する方法であって、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を選択的に妨げる薬剤を患者に投与する工程を含む方法。細胞中で発現されるｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を妨げることができる分子をコードする核酸を含む遺伝子構築体。これらの方法および組成物は、前立腺癌に特に適している。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒト患者の癌に対する感受性を判定する方法であって、（ｉ）核酸および／またはタンパク質を含むサンプルを患者から得る工程、および（ｉｉ）癌と関連するあるレベルのｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルの核酸またはタンパク質をサンプルが含むかどうかを判定する工程を含む方法。
【請求項２】
ヒト患者の癌を診断する方法であって、（ｉ）核酸および／またはタンパク質を含むサンプルを患者から得る工程、および（ｉｉ）癌と関連するあるレベルのｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルの核酸またはタンパク質をサンプルが含むかどうかを判定する工程を含む方法。
【請求項３】
ヒト患者の癌の特定の結果の相対的見通しを予測する方法であって、（ｉ）核酸および／またはタンパク質を含むサンプルを患者から得る工程、および（ｉｉ）癌と関連するあるレベルのｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルの核酸またはタンパク質をサンプルが含むかどうかを判定する工程を含む方法。
【請求項４】
癌が前立腺癌である、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
癌が転移性である、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
サンプルが核酸を含み、前記核酸をｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルの核酸に選択的にハイブリダイズする核酸と接触させることによって、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルの核酸のレベルを測定する、請求項１から５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
サンプルがｍＲＮＡを含み、前記核酸がｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルのｍＲＮＡに選択的にハイブリダイズする、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
ハイブリダイズする前記核酸を検出可能に標識する、請求項６または７に記載の方法。
【請求項９】
選択的にハイブリダイズする前記核酸が一本鎖である、請求項６から８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
選択的にハイブリダイズする前記核酸が核酸の増幅反応において使用するのに適している、請求項６から９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
サンプルがタンパク質を含んでおり、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルのタンパク質のレベルを測定する、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記タンパク質のレベルを、タンパク質をｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^+$チャネルのタンパク質に選択的に結合する分子と接触させることによって測定する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
選択的結合分子が抗体、またはその断片もしくは誘導体、または抗体様の分子である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
選択的結合分子が検出可能な標識を含む、請求項１２または１３に記載の方法。
【請求項１５】
サンプルが、癌が疑われる組織、または癌が発見される可能性があるかもしくは既に発見されている組織のサンプルであるか、あるいは前記組織からの細胞を含んでいる、請求項

１から１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
組織が前立腺であり、癌が前立腺癌である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
サンプルが尿、精液、血液またはリンパ循環液のうちのいずれか１つであり、癌が前立腺癌である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
サンプル中のｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルのタンパク質または核酸のレベルを判定する際に使用することができる薬剤の、癌を診断するための試薬の製造における使用。
【請求項１９】
薬剤がｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの核酸に選択的にハイブリダイズする核酸である、請求項１８に記載の使用。
【請求項２０】
薬剤がｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルのタンパク質に選択的に結合する分子である、請求項１８に記載の使用。
【請求項２１】
癌を診断する方法における、請求項１８から２０のいずれか一項で定義した薬剤の使用。
【請求項２２】
癌を診断するための、請求項１８から２０のいずれか一項で定義した薬剤の使用。
【請求項２３】
癌を診断するのに有用なパーツのキットであって、サンプル中のｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣのタンパク質または核酸のレベルを判定する際に使用することができる薬剤を含むキット。
【請求項２４】
陰性コントロールおよび／または陽性コントロールをさらに含む、請求項２３に記載のパーツのキット。
【請求項２５】
サンプルから前立腺の上皮細胞を分離する手段をさらに含む、請求項２３または２４のいずれか一項に記載のパーツのキット。
【請求項２６】
癌を治療する方法であって、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を選択的に妨げる薬剤を患者に投与する工程を含む方法。
【請求項２７】
薬剤がｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの発現を妨げる、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
薬剤がｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの活性を阻害する、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
薬剤がアンチセンス分子である、請求項２７に記載の方法。
【請求項３０】
薬剤がリボザイムである、請求項２７に記載の方法。
【請求項３１】
癌を治療するための薬剤の製造における、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を選択的に妨げる薬剤の使用。
【請求項３２】
細胞中で発現され、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を妨げることができる分子をコードする核酸を含む遺伝子構築体。
【請求項３３】

ヒト細胞への送達用に適合させた、請求項３２に記載の遺伝子構築体。
【請求項３４】
該適合によって癌細胞への送達が可能である、請求項３３に記載の遺伝子構築体。
【請求項３５】
核酸を癌細胞に選択的に送達するための手段を含む、請求項３３または３４に記載の遺伝子構築体。
【請求項３６】
癌細胞中で前記分子をコードする核酸を選択的に発現させるための手段を含む、請求項３２から３５のいずれか一項に記載の遺伝子構築体。
【請求項３７】
医療において使用するための、請求項３２から３６のいずれか一項に記載の遺伝子構築体。
【請求項３８】
請求項３２から３６のいずれか一項に記載の遺伝子構築体、および製薬上許容される担体を含む薬剤組成物。
【請求項３９】
ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルを選択的に阻害する化合物を同定する方法であって、（ａ）試験化合物を前記電位依存性Na^+チャネルのいずれか１つと接触させ、前記化合物が阻害的であるかどうかを判定すること、（ｂ）試験化合物を他の電位依存性Na^+チャネルと接触させ、前記化合物が阻害的であるかどうかを判定すること、および（ｃ）（ａ）では実質的に阻害的であるが（ｂ）では実質的に阻害的でない化合物を選択することを含む方法。
【請求項４０】
ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルのタンパク質に選択的に結合する部分、および他の部分を含む化合物。
【請求項４１】
他の部分が直接的または間接的に細胞毒性部分である、請求項４０に記載の化合物。
【請求項４２】
他の部分が容易に検出可能な部分である、請求項４０に記載の化合物。
【請求項４３】
ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルのタンパク質に選択的に結合する部分および他の部分が融合したポリペプチドである、請求項４０に記載の化合物。
【請求項４４】
請求項４３に記載の化合物をコードする核酸分子。
【請求項４５】
請求項４４に記載の核酸分子を含む宿主細胞。
【請求項４６】
医療において使用するための、請求項４０から４３のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項４７】
請求項４０から４３のいずれか一項に記載の化合物および製薬上許容される担体を含む薬剤組成物。
【請求項４８】
癌を有しているかあるいは癌の危険があるヒト患者を治療および／または診断するための薬剤の製造における、請求項４０から４３のいずれか一項に記載の化合物の使用。
【請求項４９】
癌を治療する方法であって、請求項４０、４１または４３のいずれか一項に記載の化合物をヒト患者に有効量投与することを含み、かつ該化合物の他の部分が患者に対して直接的または間接的に治療上有益な部分である方法。
【請求項５０】
ヒト患者中の癌を画像化する方法であって、有効量の請求項４２に記載の化合物を患者に

投与することを含む方法。
【請求項５１】
（１）請求項４１に記載の化合物であって、該他の部分が比較的毒性のないプロドラッグを細胞毒性の薬物に変換することができる細胞毒性部分である化合物、および（２）比較的毒性のないプロドラッグを含むパーツのキット。
【請求項５２】
（１）請求項４０に記載の化合物であって、該他の部分が直接的または間接的細胞毒性部分または容易に検出可能な部分に選択的に結合することができる化合物、および（２）該化合物の該他の部分が結合することができる、直接的または間接的細胞毒性部分または容易に検出可能な部分のいずれか１つを含むパーツのキット。
【請求項５３】
本明細書で開示した、癌を治療あるいは診断するいずれかの新規な方法。
【請求項５４】
本明細書で開示した、癌を治療あるいは診断する際に使用するための、いずれかの新規な化合物または組成物。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、患者が癌を有しているかどうか、さらにその癌が転移する可能性があるかどうかを判定する方法に関するものであり、さらに本発明は、癌、特に前立腺癌を治療する方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
癌は重大な疾患であり、主たる死因である。近年、いくつかの癌の診断および治療においては進展があるが、診断および治療を改善する必要性が依然として存在する。
【０００３】
癌は遺伝性疾患であり、たいていの場合、１つまたは複数の遺伝子の突然変異と関係がある。ヒト・ゲノム中には約６０，０００個の遺伝子が存在すると考えられているが、これらの遺伝子の一握りのみが癌と関係があることが示されている。現在同定されている遺伝子よりも多くの遺伝子が、癌と関係があることが発見されるであろうことが推量されるが、分子の分析技法が利用可能であるにもかかわらず、この分野の進歩は依然として遅い。これは、今日までに同定されている遺伝子のさまざまな構造および機能のためであり、このことは、癌遺伝子が多くの形をとり、多くの異なる機能を有することができることを示唆している。
【０００４】
前立腺の癌腫は多くの国々で最も重大な疾患となっており、癌腫は西側の世界の男性において最も一般的に診断される悪性物であり、その発生率は年齢と共に大幅に増大する。この２０年でその死亡率は倍になっており、現在ではこれが、西側の世界において男性の癌による死亡の２番目に一般的な原因である（Ｗｉｎｇｏ他（１９９５）Ｃａｎｃｅｒ Ｊ．Ｃｌｉｎ．４５、８－３０；Ｍｏｒｔａｌｉｔｙ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ：Ｃａｕｓｅ Ｅｎｇｌａｎｄ ａｎｄ Ｗａｌｅｓ．ＯＰＣＳ ＤＨ２ １９、１９９３、Ｈｅｒ Ｍａｊｅｓｔｙ’ｓ Ｓｔａｔｉｏｎｅｒｙ Ｏｆｆｉｃｅ）。前立腺癌の有病率はこの１０年で２８％増大しており、この疾患は現在イングランドおよびウェールズにおける男性の癌全体の１２％を占めている（Ｃａｎｃｅｒ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ：Ｒｅｇｉｓｔｒａｔｉｏｎｓ Ｅｎｇｌａｎｄ ａｎｄ Ｗａｌｅｓ．ＯＰＣＳ ＭＢＩ Ｎｏ２２、１９９４、Ｈｅｒ Ｍａｊｅｓｔｙ’ｓ Ｓｔａｔｉｏｎｅｒｙ Ｏｆｆｉｃｅ；Ｆｏｓｔｅｒ他（１９９９）Ｂｒ．Ｊ．Ｕｒｏｌ．８３、１７１－１９４）。２０１８年までには前立腺癌が、その患者の男性群の５０％を占める最大の死因となることが予想される（８０才までででは８０％）。最近の物証によって、前立腺癌は若い男性の間でも増大していることも示唆されている（Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ（１９９９）７９、１３－１７）。これらの増大、およ

び前立腺癌による近年の多くの有名人の死が作用して、この癌に対して何かを行う必要性が強調されている。スクリーニングが広範囲で利用可能であることによって、前立腺癌による死亡率が制限される可能性があることが示唆されている。

【０００５】

前立腺のスクリーニングは現在、直腸内診および前立腺に特異的な抗原（ＰＳＡ）レベルの測定からなっている。これらの方法には特異性が欠けている。なぜなら、直腸指診は試験者の間で大幅に異なるからである（Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｃａｔａｌｏｎａ（１９９５）Ｕｒｏｌｏｇｙ ４５、７０－７４）。前立腺の房および管の上皮細胞によって合成され、精液の正常な部分として分泌される、漿液の前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）の測定値は、現在最も一般に適用されている癌の診断指標である（たとえば、Ｇａｏ他（１９９７）Ｔｈｅ Ｐｒｏｓｔａｔｅ３１、２６４－２８１）。しかしながら、ＰＳＡ測定によって矛盾した情報が与えられ、その結果前立腺癌を有する何人かの患者はＰＳＡのレベルが低いが、一方でＰＳＡのレベルを、非悪性の前立腺疾患、たとえば良性前立腺肥大症（ＢＨＰ）、前立腺炎症および他の病状の存在下で評価することができる（たとえば、Ｍａｎｄｅｌｓｏｎ他（１９９５）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ １６、２８３－３０６；Ｆｏｏｄ他（１９９６）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｉｎｔ．Ｍｅｄ．１１、３４２－３４９；Ｍｏｒｇａｎ他（１９９６）Ｔｈｅ Ｐｒｏｓｔａｔｅ ５７、５８－６３；Ｃｈａｎ ａｎｄ Ｓｕｌｍａｓｙ（１９９８）Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．１０８、２２６－２７４）。診断試験時のＰＳＡの相対的な不具合が前立腺癌が進行している３６６人の男性において見られ、一方これは２２，０００人を超える男性の前向き研究、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｔｕｄｙ中に含まれている。研究の開始時に保存された漿液中のＰＳＡのレベルが測定され、評価されたレベルは、以後４年以内に前立腺癌が進行する男性のわずか４７％で発見された（Ｇａｎｎ他（１９９５）ＪＡＭＡ２７３、２８９－２９４）。

【０００６】

現在のスクリーニング法はしたがって満足なものではない。癌を診断するための、あるいは癌の考えられる転移の広がりを予想または予防するための信頼できる方法は存在せず、このことが大部分の患者の死の主な原因となっている。

【０００７】

Ｇｒｉｍｅｓ他（１９９５）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．３６９、２９０－２９４は、２つの前立腺腫瘍の細胞系における電位活性型であるNa^+の流れの差次的発現を記載しており、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおけるその侵襲性への貢献を論じている。研究された細胞系はラットの細胞系であり、どの特定のNa^+チャネルが関係しているかは示されていない。

【０００８】

Ｌａｎｉａｄｏ他（１９９７）Ａｍ Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５０、１２１３－１２２１は、ヒト前立腺癌の細胞系における電位活性型Na^+チャネルの発現および機能分析を記載しており、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおけるその侵襲性への貢献を論じている。どの特定のNa^+チャネルが関係しているかは示されていない。

【０００９】

Ｓｍｉｔｈ他（１９９８）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４２３、１９－２４は、Na^+チャネルのタンパク質の発現によって、ラットおよびヒトの前立腺腫瘍の細胞系の侵襲性が高まることを示唆している。

【００１０】

Ｇｒｉｍｅｓ ａｎｄ Ｄｊａｍｇｏｚ（１９９８）Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１７５、５０－５８は、転移性が高いラットの前立腺癌のＭａｔ－ＬｙＬｕ細胞系において発現される、電位依存性であるNa^+の流れの電気生理学的特性および薬理学的特性を記載している。

【００１１】

Ｄａｗｅｓ他（１９９５）Ｖｉｓｕａｌ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ １２、１００１－１００５は、培養した網膜色素の上皮細胞中で誘導されるNa^+チャネルのサブタイプを同定したことを記載している。

【００１２】
Na^+チャネルの概説は、たとえばＢｌａｃｋ ａｎｄ Ｗａｘｍａｎ（１９９６）Ｄｅｖｅｌｏｐ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１８、１３９－１５２；ＦｏｚｚａｒｄａｎｄＨａｎｃｋ（１９９６）、Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．７６、８８７－９２６；Ｂｕｌｌｍａｎ（１９９７）Ｈｕｍ．－Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．６、１６７９－１６８５；Ｃａｎｎｏｎ、（１９９９）；およびＭａｒｂａｎ他（１９９８）Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．５０８、６４７－６５７中において発見することができる。Ｂｕｌｌｍａｎ（１９９７）Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．６、１６７９－１６８５；Ｂｕｒｇｅｓｓ他（１９９５）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．１０、４６１－４６５；およびＣａｎｎｏｎ、（１９９８）Ｍｏｌ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ（ＪＢ Ｍａｒｔｉｎ，Ｅｄ）Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｉｎｃ．、ＮＹ中に記載されたように、いくつかのNa^+および他のイオン・チャネルが、いくつかの遺伝的欠陥の根底にあることはよく知られている。しかしながら、診断目的で現在使用されているNa^+チャネルの配列は、現在存在しない。

【００１３】
したがって、このように以前の研究では、細胞系の働きに基づいて、前立腺癌およびその転移における電位依存性Na^+チャネル（ＶＧＳＣｓ）に関するいくつかの一般的な役割が示唆されていた可能性があるが、この情報を効果的に利用することは現在までできていない。なぜなら、ｉｎ ｖｉｖｏでの前立腺癌におけるＶＧＳＣの関与は実証されておらず、ヒトの前立腺癌と関係がある特定のＶＧＳＣは同定されていないからである。

【００１４】
驚くべきことに、我々は現在、ＶＧＳＣの発現は病気の進行と相関関係があり、ヒトの癌、特に前立腺癌およびその転移と関連があるＶＧＳＣは、ｈＮｅ－Ｎａ（Ｎａｖ１．７とも呼ばれる）であることを発見している。前述のように、これは知られているＶＧＳＣであり（ただし、ヒトの癌または癌細胞系、特にヒトの前立腺癌と関連があることは以前には知られていない）、タンパク質、およびそれをコードしているｍＲＮＡのｃＤＮＡのアミノ酸配列は報告されている（Ｋｌｕｇｂａｕｅｒ他（１９９５）ＥＭＢＯ Ｊ．１４、１０８４－１０９０）。実施例１で論じたように、ｈＮｅ－Ｎａ（ヒト）およびＰＮ１（ラット）はＳＣＮ９Ａ遺伝子と対応した。近年では、新しいＶＧＳＣの命名法が採用されている（Ｇｏｌｄｉｎ他（２０００）Ｎｅｕｒｏｎ ２８（２）、３６５－３６８）。この系では、ｈＮｅ－ＮａおよびＰＮ１はそれぞれ、$Na_v1.7$のヒトおよびラットのオーソロガス遺伝子（オーソログ）である。

【００１５】
ｈＮｅ－Ｎａの染色体の位置は、いまだに決定されていない。しかしながら、マウスの相当物は、マウス染色体２上の電位依存性Na^+チャネル群に位置することは特定されている（Ｂｅｃｋｅｒｓ他（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ３６、２０２－２４５）。ｈＮｅ－Ｎａが同様に存在する可能性があるヒト染色体２にも、この群は存在する（Ｍａｌｏ他（１９９４）Ｃｙｔｏｇｅｎ．Ｃｅｌｌ．Ｇｅｎｅｔ．６７、１７８－１８６；Ｍａｌｏ他（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１、２９７５－２９７９；Ｇｅｏｒｇｅ他（１９９４）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １９、３９５－３９７）。ｈＮｅ－Ｎａ遺伝子（ヒトＳＣＮ９Ａ）イントロン／エクソンの編成はいまだに決定されていないが、他の知られている保存型のＶＧＳＣイントロンの位置から推測することも可能であろう（Ｌｏｕｇｈｅｙ他（１９８９）Ｃｅｌｌ５８、１１４３－１１５４；Ｇｅｏｒｇｅ他（１９９３）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ１５、５９８－６０６Ｗａｎｇ他（１９９６）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ３４、９－１６；およびＳｏｎｓｌｏｖａ他（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ４１、２０１－２０９）。

【００１６】
ｈＮｅ－Ｎａと最も類似な脳タイプのNa^+チャネル（ラットの脳Ｉ－ＩＩＩ（Ｎｏｄａ他（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ３２２、８２６－８２８；Ｋａｙａｎｏ他（１９８８）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２２８、１８７－１９４）は、全体の配列と２０％異なる（ヒト骨格は３０％；心臓は３４％異なる）。しかしながら、（ｉ）特定の構造／機能ドメイン内で配

列の比較を行う場合、この相同性は大幅に低くなる（たとえば最初に、ＤＩＩ－ＤＩＩＩ細胞質連結領域の３分の１は、大部分の類似のチャネル（ＲＢＩＩ／ＨＢＩＩ）とわずか４５％の相同性しかなく、（ｉｉ）ｈＮｅ－Ｎａは、特異的な抗体を作成するための充分異なる領域（たとえば、残基４４６－４６０：ＥＹＴＳＩＲＲＳＲＩＭＧＬＳＥ）を有している（たとえばＴｏｌｅｄｏ－Ａｒａｌ他（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９４、１５２７－１５３２を参照のこと）。

【００１７】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、癌、特に前立腺癌の診断および予後治療を行う際に有用であり、癌、特に前立腺癌を処理する際に臨床医を手助けするための方法を提供することである。詳細には、本発明の目的は、癌、特に前立腺癌の転移の可能性を評価する方法を提供することである。

【００１８】

本発明の他の目的は、癌、特に前立腺癌を治療する方法、およびヒトの癌、特に前立腺癌と関連があるＶＧＳＣを選択的に抑制する化合物を同定する方法を提供することを含む。なぜなら、これらの方法は癌を治療する際に有用である可能性があるからである。

【００１９】

【課題を解決するための手段】

本発明の第１の態様では、ヒト患者の癌に対する感受性を判定する方法であって、（ｉ）核酸および／またはタンパク質を含むサンプルを患者から得る工程、および（ｉｉ）癌と関連がある一定レベルのｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^{+}$チャネルの核酸またはタンパク質を、サンプルが含むかどうかを判定する工程を含む方法を提供する。

【００２０】

本発明の第２の態様では、ヒト患者の癌を診断する方法であって、（ｉ）核酸および／またはタンパク質を含むサンプルを患者から得る工程、および（ｉｉ）癌と関連がある一定レベルのｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^{+}$チャネルの核酸またはタンパク質を、サンプルが含むかどうかを判定する工程を含む方法を提供する。

【００２１】

サンプルが癌と関連がある一定レベルのｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの核酸またはタンパク質が含むかどうかを判定することは、それ自体が癌の診断となる可能性があり、あるいは診断にいたる際の補助として、その判定を臨床医によって使用することができることは理解されるであろう。

【００２２】

たとえば、前立腺癌に関しては、臨床医が生験組織の病理組織学的試験を行う、あるいは漿液のＰＳＡレベルを測定する、あるいは外部指診を行う、あるいは画像化を行う場合、それが有用である。最近では、血液のＩＧＦ－１レベルを使用する可能性も示唆されている（Ｃｈａｎ他（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７９、５６３－５６６）。診断を行う前に、臨床医がこれらおよび他の要因を考慮に入れ、さらに前記ＶＧＳＣのレベルを考慮すること望むことは理解されるであろう。

【００２３】

本発明の第３の態様では、ヒト患者の癌の個々の結果の関連のある見通しを予測する方法であって、（ｉ）核酸および／またはタンパク質を含むサンプルを患者から得る工程、および（ｉｉ）癌と関連がある一定レベルのｈＮｅ－Ｎａ電位依存性$Ｎａ^{+}$チャネルの核酸またはタンパク質を、サンプルが含むかどうかを判定する工程を含む方法を提供する。

【００２４】

したがって、本発明の第３の態様の方法は、予後あるいは予後を助成する際に有用である可能性がある。この方法は、生験組織の病理組織学的試験、あるいは漿液のＰＳＡレベルの測定、外部指診または画像化などの、知られている予後法の付属物として使用することができる。

【００２５】

【発明の実施の形態】
サンプル中の前記ＶＧＳＣのレベルを判定することは、患者の癌の取り扱い方を決定する際には、臨床医にとって有用であろうことは理解されるであろう。たとえば、高レベルの前記ＶＧＳＣは特に前立腺癌の転移の可能性と関連があり、アンドロゲン不感受性と関連がある可能性があるので、臨床医は前記ＶＧＳＣのレベルに関する情報を使用して、患者の治療に関する意思決定を容易にすることができる。したがって、前記ＶＧＳＣのレベルが前記前立腺癌の転移の可能性が低いことを示す場合、不要な根治手術は回避することができる。同様に、前記ＶＧＳＣのレベルが前記前立腺癌の転移の可能性が高いことを示す場合、根治手術（すなわち、前立腺切除術）が好ましい治療である可能性がある。
【００２６】
前述の事項、および以下の実施例から、前記ＶＧＳＣのレベルを判定することを診断上で利用して、所定の癌、特に前立腺の癌が転移するかどうかを予測することができることは理解されるであろう。なぜなら前記ＶＧＳＣの発現は、癌の考えられる将来的な広がりと対応すると考えられているからである。
【００２７】
考慮する癌が前立腺癌である場合は、それが特に好ましい。
【００２８】
本発明の方法を使用して、所定の前立腺の癌が転移するかどうかを予測する場合も、それが特に好ましい。
【００２９】
癌または転移の可能性を示す前記ＶＧＳＣのレベルは、知られている非癌性または非転移性前立腺細胞を超える、知られている癌性または転移性前立腺細胞中に存在する高いレベルとして定義することができる。前記ＶＧＳＣタンパク質のレベルは、たとえば癌性細胞または転移性細胞中では少なくとも１．５倍高く、あるいはそのレベルは少なくとも２倍または３倍高い可能性がある。免疫組織化学的に加工した組織部分のミクロ濃度測定による定量分析によって、前立腺管の癌性領域でのＶＧＳＣの発現は、対応する良性領域の３倍高いことが示されている（実施例３を参照のこと）。使用する抗体はすべてのＶＧＳＣと反応すると考えられているが、実施例１の我々の発見によって、ｈＮｅ－Ｎａ Na^+ チャネルはヒト前立腺癌細胞中の主要形である可能性があり、したがって認識されるのは主にｈＮｅ－Ｎａ Na^+ チャネルであろうことが示される。前記ＶＧＳＣをコードしているｍＲＮＡのレベルは、たとえば癌性細胞または転移性細胞中では少なくとも１．５倍高く、あるいはそのレベルは少なくとも２倍または３倍高く、あるいは少なくとも１０、５０、１００、５００または１０００倍高い可能性がある。半定量的なＰＣＲによる測定によって、実施例中に記載したように、ｍＲＮＡのレベルは、転移性の高い細胞系では、転移性の低い細胞系よりも約１０００倍高いことが示される。
【００３０】
本発明の１つの好ましい実施形態では、前記ＶＧＳＣの核酸、特にｍＲＮＡのレベルが癌と関連があるレベルであるかどうかを判定する。ｍＲＮＡなどの核酸を含むサンプル、および前記ＶＧＳＣのレベルは、前記核酸を前記ＶＧＳＣ核酸に選択的にハイブリダイズする核酸と接触させることによって、測定することが好ましい。
【００３１】
「選択的にハイブリダイズする」によって、核酸が前記ヒト核酸と充分なヌクレオチド配列類似性があり、したがってこの核酸は、適度あるいは非常に厳密な条件下でハイブリダイズすることができることが意味される。当分野でよく知られているように、核酸のハイブリダイゼーションの厳密度は、ハイブリダイゼーションが起こる核酸の長さ、ハイブリダイズする配列の同一性の程度などの要因、および温度、イオン強度、および配列のＣＧまたはＡＴ含有率などの要因に依存している。したがって、前記選択的にハイブリダイズすることができる任意の核酸が、本発明を実施する際に有用である。
【００３２】
前記ヒト核酸に選択的にハイブリダイズすることができる核酸には、核酸の少なくとも一

部および前記ヒト核酸について、９５％を超える配列同一性、好ましくは９８％を超える配列同一性、より好ましくは９９％を超える配列同一性を有する核酸がある。よく知られているように、ヒト遺伝子は通常はイントロンを含み、したがって、たとえば遺伝子に由来するｍＲＮＡまたはｃＤＮＡは、その全長は前記ヒト・ゲノムＤＮＡとは完全には一致しないと思われるが、それでもこれは前記ヒトＤＮＡと選択的にハイブリダイズすることができる核酸であると思われる。したがって、具体的には本発明は、前記ＶＧＳＣ ｍＲＮＡまたはｃＤＮＡに選択的にハイブリダイズするが、前記ＶＧＳＣ遺伝子にはハイブリダイズすることができない核酸を含む。たとえば、前記ＶＧＳＣ遺伝子のイントロン－エクソン境界に広がる核酸は、前記ＶＧＳＣのｍＲＮＡまたはｃＤＮＡに選択的にハイブリダイズすることができない。

【００３３】

選択的なハイブリダイゼーションをもたらす、典型的な適度あるいは非常に厳密なハイブリダイゼーション条件は当分野でよく知られており、たとえば、参照により本明細書に組み込んである、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ、Ｓａｍｂｒｏｏｋ他（ｅｄｓ）、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、ＵＳＡ中に記載された条件がある。

【００３４】

核酸がナイロン膜上に固定され、プローブの核酸が５００以上の塩基または塩基対であるときの、典型的なハイブリダイゼーション溶液の一例は以下のものである：

６ｘＳＳＣ（生理的食塩水、クエン酸ナトリウム）

０．５％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）

１００μｇ／ｍｌの変性、分画したサケ精液のＤＮＡ

【００３５】

ハイブリダイゼーションは６８℃で行う。核酸を固定したナイロン膜は６８℃において１ｘＳＳＣで、あるいはさらに高い厳密度のために０．１ｘＳＳＣで洗浄することができる。

【００３６】

２０ｘＳＳＣは、以下の方法で調製することができる。１７５．３ｇのＮａＣｌおよび８８．２ｇのクエン酸ナトリウムを８００ｍｌのH_2Oに溶かす。ＮａＯＨの１０Ｎ溶液数滴を用いて、ｐＨを７．０に調節する。H_2Oを用いて、体積を１リットルに調節する。アリコートに分配する。オートクレーブ処理によって滅菌する。

【００３７】

核酸がナイロン膜上に固定され、プローブが１５個と５０個の間の塩基のオリゴヌクレオチドであるときの、典型的なハイブリダイゼーション溶液の一例は以下のものである：

３．０Ｍ塩化トリメチルアンモニウム（ＴＭＡＣｌ）

０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ ６．８）

１ｍｍ ＥＤＴＡ（ｐＨ ７．６）

０．５％ＳＤＳ

１００μｇ／ｍｌの変性、分画したサケ精液のＤＮＡ

０．１脱脂粉乳

【００３８】

ハイブリダイゼーションの最適温度は、通常は所定の鎖長のT_iより５℃低い温度を選択する。T_iとは、プローブとその標的配列の間で形成されるハイブリッドの、不可逆的な融解温度である。Ｊａｃｏｂｓ他（１９８８）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６、４６３７は、T_iの決定を論じている。３Ｍ ＴＭＡＣｌ中の１７量体について奨励されているハイブリダイゼーション温度は４８－５０℃であり、１９量体については、それは５５－５７℃であり、２０量体については、それは５８－６６℃である。

【００３９】

「選択的にハイブリダイズする核酸」によって、以下でより詳細に記載するシステム、特

にポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの、よく知られている任意の増幅システムにより、前記ＶＧＳＣのｍＲＮＡからＤＮＡを増幅する核酸も含まれる。ＰＣＲ増幅に関する適切な条件は、以下の適切な１ｘ増幅用緩衝液中での増幅を含む：
１０ｘ増幅用緩衝液は５００ｍＭのＫＣＩである；１００ｍＭ Ｔｒｉｓ．Ｃｌ（室温でｐＨ ８．３）；１５ｍＭ Ｍｇ Cl_2；０．１％ゼラチン。

【００４０】
適切な変性剤または手順（９５℃に加熱するなど）を使用して、二本鎖ＤＮＡの鎖を分離する。

【００４１】
適切には、増幅のアニーリング部分は３７℃と６０℃の間、好ましくは５０℃である。

【００４２】
本発明の方法において有用である核酸はＲＮＡまたはＤＮＡであってよいが、ＤＮＡが好ましい。本発明の方法において有用である核酸は二本鎖または一本鎖であってよいが、核酸の増幅反応などのいくつかの条件下では、一本鎖の核酸が好ましい。

【００４３】
本発明の方法において有用である核酸は、任意の適切なサイズであってよい。しかしながら、核酸が１００００個より少ない、より好ましくは１０００個より少ない、さらに好ましくは１０個から１００個、さらに好ましくは１５個から３０個の塩基対（核酸が二本鎖である場合）または塩基（核酸が一本鎖である場合）である場合、いくつかの診断、プローブまたは増幅目的には、その核酸が好ましい。以下により詳細に記載するように、ポリメラーゼ連鎖反応において使用するのに適した、一本鎖ＤＮＡのプライマーが特に好ましい。

【００４４】
本発明の方法において使用するための核酸は、前記ＶＧＳＣのｍＲＮＡにハイブリダイズすることができる核酸である。前記ＶＧＳＣ遺伝子の断片、および前記ＶＧＳＣ遺伝子によってコードされているｍＲＮＡから誘導可能なｃＤＮＡも、本発明の方法において使用するための好ましい核酸である。

【００４５】
本発明の方法において使用するための核酸がオリゴヌクレオチド・プライマーであり、これを使用して前記ＶＧＳＣ核酸、特にＶＧＳＣのｍＲＮＡの一部分増幅することができる場合、そのような核酸が特に好ましい。

【００４６】
ｈＮｅ－ＮａのｍＲＮＡは他のＶＧＳＣのｍＲＮＡと類似しているが、これらとは異なる。本発明において使用するための核酸は、２つ以上、たとえばＶＧＳＣのｍＲＮＡのすべて、ほぼすべて、または特定のサブセットにハイブリダイズすることができる。このことは、実施例１および２でさらに論じる。したがって、本発明において使用するための核酸は、ＶＧＳＣ間で保存されており、たとえばＶＧＳＣのすべて、ほぼすべて、または特定のサブセット中に同じアミノ酸配列を有するＶＧＳＣポリペプチドの領域をコードしている、ＶＧＳＣのｍＲＮＡの一部分にハイブリダイズすることができる。本発明において使用するのに好ましい核酸は、ｈＮｅ－ＮａのｍＲＮＡには選択的にハイブリダイズするが、他のＶＧＳＣのｍＲＮＡにはハイブリダイズしない核酸である。たとえば、核酸が前記ＶＧＳＣのｍＲＮＡにハイブリダイズし、他のＶＧＳＣのｍＲＮＡにはハイブリダイズしないかどうかを参照することによって、このような選択的にハイブリダイズする核酸を容易に得ることができる。

【００４７】
たとえば実施例１に記載した、方法および核酸を使用することができる。詳細には、たとえば実施例１に記載した、半定量的なＰＣＲ技法を使用することができる。

【００４８】
これらの方法は任意の癌に関して適切であるが、癌が前立腺の癌である場合は、その方法が好ましい。

【００４９】
癌が疑われる、すなわち癌が発見される可能性があるかあるいは発見されている組織のサンプルに核酸が由来する場合は、本発明の方法が好ましい。たとえば、癌が疑われる、すなわち癌が発見される可能性があるかあるいは発見されている組織が前立腺である場合、核酸を含むサンプルが患者の前立腺に由来する場合は、本発明の方法が好ましい。前立腺のサンプルは、手術による切除、腹腔鏡検査および生体組織検査、内視鏡検査および生体組織検査、および画像誘導生体組織検査によって得ることができる。超音波、テクネチウム－９９－標識した抗体、または前立腺に選択的に結合するかあるいはその位置を特定する抗体断片によって、画像を生み出すことができる。
【００５０】
患者に由来する核酸を含む任意のサンプルが本発明の方法において有用であるが、サンプルが前立腺組織、血液、尿または精液からなる群から選択される場合は、そのサンプルが好ましい。前立腺組織は、標準的な外科手術技法を使用して患者から得ることができる。前立腺に由来する細胞は、尿中および血液中で少数見られる。患者からの核酸を含むサンプルは、前立腺細胞などの患者の細胞であるか、あるいは患者の細胞に直接的に由来することが好ましいが、培養において増殖した細胞などの、患者に間接的に由来するサンプルも本発明中に含まれる。同様に、患者に由来する核酸は物理的に患者の内部に存在していた可能性があるが、あるいはその核酸は、患者の内部に物理的に存在していた核酸からコピーされた可能性がある。腫瘍組織は原発性の腫瘍から、あるいは転移物から取り出すことができ、詳細には腫瘍の縁から取り出すことができる。
【００５１】
癌に関する危険がある群の患者の前駆症状のスクリーニング用に、前述の方法を使用することができることは理解されるであろう。たとえば、約６０才を超える男性は、３５才未満の男性よりも前立腺癌の危険が高い可能性がある。同様に、本発明の方法を、前立腺腫瘍などの腫瘍を病理学的に分類するために使用することができる。
【００５２】
血液、精液、リンパ管循環物または尿が、患者に由来する核酸を含む前記サンプルの源である場合、そのサンプルを前立腺由来の組織または細胞用に富化することが好ましい。前立腺細胞用の富化は、前立腺に特異的な抗原（ＰＳＡ）を対象とする抗体などの前立腺選択的な抗体を使用する、たとえば蛍光活性型細胞の選別（ＦＡＣＳ）などの細胞選別法を使用して行うことができる。あるいは、磁気ビーズまたは他の固形担体、たとえばこのような前立腺に特異的な抗体、たとえば抗ＰＳＡ抗体で覆われたカラムを使用して、富化を行うことができる。前記サンプルの源はバイオプシー材料および腫瘍サンプルも含み、固定パラフィン封入標本、および新鮮であるかあるいは凍結された組織も含む。
【００５３】
好都合には、ｍＲＮＡなどの前記ヒト核酸に選択的にハイブリダイズすることができ、本発明の方法において使用する核酸は、検出可能な標識体をさらに含む。
【００５４】
「検出可能な標識体」によって、よく知られている方法を使用して核酸分子中に容易に取り込ませることができる、^{32}Ｐ、^{33}Ｐまたは^{35}Ｓなどの任意の好都合な放射性標識体が含まれる；核酸中に容易に取り込ませることができる、任意の好都合な蛍光または化学発光標識体も含まれる。さらに、「検出可能な標識体」という語は、他の部分（ストレプトアビジンとの結合によって検出することができるビオチンなど）との結合によって検出することができる部分；無色の化合物を有色の化合物に転換する能力、あるいはこの逆の能力によって検出することができる（たとえば、アルカリホスファターゼは無色のｏ－ニトロフェニルホスフェートを有色のｏ－ニトロフェノールに転換することができる）、酵素などの部分も含む。好都合には、核酸プローブは固定配列中のある位置を占めていてよく、核酸が前記ＶＧＳＣの核酸にハイブリダイズするかどうかは、固定配列中のハイブリダイゼーションの位置を参照することによって判定することができる。
【００５５】

ポリメラーゼ連鎖反応において使用するのに適したプライマー（ＰＣＲ；Ｓａｉｋｉ他（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２３９、４８７－４９１）が好ましい。適切なＰＣＲプライマーは、以下の諸性質を有していてよい：

【００５６】

オリゴヌクレオチドの５’端の配列は、増幅させる標的配列と一致している必要は無いことはよく知られている。

【００５７】

ＰＣＲプライマーは、特にその３’端には、２塩基より長い任意の互いに相補的な構造を含まないことが普通である。なぜならこの特徴は、「プライマー二量体」と呼ばれる人工的産物の形成を促進する可能性があるからである。２つのプライマーの３’端がハイブリダイズすると、これらは「プライマー化された鋳型」複合体を形成し、プライマーの伸張によって、「プライマー二量体」と呼ばれる短い重複産物がもたらされる。

【００５８】

プライマー中の内部二次構造は、回避すべきである。対称性ＰＣＲに関しては、いずれの塩基も長い伸張部を有していない両方のプライマーについて、４０－６０％のＧ＋Ｃ含有率がしばしば勧められる。ＤＮＡプローブのハイブリダイゼーションの研究に関して使用される、古典的な融解温度の計算によって、所定のプライマーは特定の温度でアニールするはずであり、あるいは７２℃という伸張温度によってプライマー／鋳型ハイブリッドが時期尚早に解離するであろうことがしばしば予測される。実際ハイブリッドは、単純なT_m計算によって一般的に予測するよりも、ＰＣＲ法において効果的である。

【００５９】

最適なアニーリング温度は経験的に決定することができ、予測した温度よりも高くてよい。Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼは３７－５５℃の領域で活性があり、したがってプライマーの伸張がアニーリング・工程中に起こり、ハイブリッドが安定化するであろう。プライマーの濃度は、従来の（対称性）ＰＣＲでは等しく、典型的には０．１－１μＭの範囲である。

【００６０】

ポリメラーゼ連鎖反応、ＱＢレプリカーゼおよびリガーゼ連鎖反応を含めた、任意の核酸増幅プロトコルを、本発明の方法において使用することができる。さらに、３ＳＲとも呼ばれるＮＡＳＢＡ（増幅に基づく核酸配列）をＣｏｍｐｔｏｎ（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５０、９１－９２およびＡＩＤＳ（１９９３）、Ｖｏｌ ７（Ｓｕｐｐｌ，２）に記載されたように使用することができ、Ｓ１０８またはＳＤＡ（鎖置換増幅）をＷａｌｋｅｒ他（１９９２）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０、１６９１－１６９６に記載されたように使用することができる。その簡潔性のために、ポリメラーゼ連鎖反応が特に好ましい。

【００６１】

本発明の１対の適切な核酸をＰＣＲにおいて使用するとき、ゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって、その産物を検出することが好都合である。ＤＮＡのアガロース・ゲル電気泳動および臭化エチジウム染色を使用し、ＤＮＡ増幅の産物を検出するための代替方法として、増幅させたＤＮＡにプローブとしてハイブリダイズすることができる、標識したオリゴヌクレオチド使用することが好都合である。増幅がＰＣＲによるものであるとき、オリゴヌクレオチド・プローブは、２つのプライマーによって定義される内部プライマー配列にハイブリダイズする。オリゴヌクレオチド・プローブは、１０個と５０個の間のヌクレオチド長、より好ましくは１５個と３０個の間のヌクレオチド長である。プローブは、標準的な技法を使用して、^{32}Ｐ、^{33}Ｐおよび^{35}Ｓなどの放射性核種で標識することができ、あるいは蛍光染料で標識することができる。オリゴヌクレオチド・プローブを蛍光的に標識するとき、増幅させたＤＮＡ産物は溶液中で検出することができる（たとえば、Ｂａｌａｇｕｅｒ他（１９９１）「Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｂｔａｉｎｅｄ ｂｙ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ａ ｂｉｏｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ ａｄｓｏｒｂｅｎｔ」Ａｎ

ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９５、１０５－１１０およびＤｉｌｅｓａｒｅ他（１９９３）「Ａ ｈｉｇｈ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ ｅｌｅｃｔｒｏｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ－ｂａｓｅｄ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ａｕｔｏｍａｔｅｄ ＰＣＲ ｐｒｏｄｕｃｔ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ」ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ１５、１５２－１５７を参照のこと）。

【００６２】

ＰＣＲ産物は、プローブを使用して検出することもでき、プローブは蛍光体と抑制物質の対を有していてよく、または固形担体に結合してよく、またはビオチン・タグを有していてよく、あるいは捕獲プローブと検出プローブの組み合わせを使用して、ＰＣＲ産物を検出することができる。

【００６３】

蛍光体と抑制物質の対は、ＰＣＲ反応（たとえばＲＴ－ＰＣＲ）の定量測定に特に適している。適切なプローブを使用する蛍光性の分極化を使用して、ＰＣＲ産物を検出することもできる。

【００６４】

他の好ましい実施形態では、前記ＶＧＳＣタンパク質のレベルを測定する。前記タンパク質のレベルは、ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣに選択的に結合する分子とタンパク質を接触させることによって、測定することが好ましい。

【００６５】

患者に由来するタンパク質を含むサンプルは、サンプル組織であることが好都合である。

【００６６】

患者に由来するタンパク質を含むサンプルは、癌が疑われる、すなわち癌が発見される可能性があるかあるいは発見されている組織のサンプルであることが好都合である。これらの方法は任意の癌に使用することができるが、これらは前立腺の癌に関して特に適切である。適切なサンプルを得る方法は、初期の方法に関して記載されている。

【００６７】

前記ＶＧＳＣタンパク質を検出することを含む本発明の方法は、腫瘍サンプルのパラフィン包埋切片を含むサンプルなどの歴史的なサンプルに関して特に有用である。

【００６８】

サンプル中の前記ＶＧＳＣタンパク質のレベルは、任意の適切な方法で判定することができる。実施例２には、ヒト前立腺の組織切片中での、ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣのタンパク質を含めたＶＧＳＣタンパク質の検出を記載する。

【００６９】

ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣに選択的に結合する分子が抗体である場合、それが特に好ましい。

【００７０】

ＶＧＳＣ、または特定の１つまたは複数の形のＶＧＳＣに選択的に結合することができる抗体は、たとえばペプチドを使用して作成することができ、これらのペプチドはすべてのＶＧＳＣ中あるいは特定のＶＧＳＣ中にそれぞれ保存されており、すなわち１つの形のＶＧＳＣと他の形のＶＧＳＣの間の相違点を含んでいる。

【００７１】

抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであってよい。適切なモノクローナル抗体は、たとえばいずれも参照により本明細書に組み込んである、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ ｍａｎｕａｌ ｏｆ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」、Ｈ Ｚｏｌａ（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１９８８）および「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、ＪＧＲ Ｈｕｒｒｅｌｌ（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１９８２）中に開示された、知られている技法によって作製することができる。

【００７２】

癌または転移の可能性を示す前記ＶＧＳＣのレベルは、知られている非癌性または非転移

性前立腺細胞を超える、知られている癌性または転移性前立腺細胞中に存在する高いレベルとして定義することができる。そのレベルは、たとえば癌性細胞または転移性細胞中では少なくとも１．５倍高く、あるいはそのレベルは少なくとも２倍または３倍高い可能性がある。

【００７３】

「前記ＶＧＳＣタンパク質の相対量」によって、知られている正常な組織の単位質量当たり、あるいは正常な細胞の単位数当たりの前記ＶＧＳＣタンパク質の量と比較した、サンプル組織の単位質量当たり、あるいはサンプル細胞の単位数当たりの前記ＶＧＳＣタンパク質の量が意味される。この相対量は、任意の適切なタンパク質定量法を使用して決定することができる。詳細には、抗体を使用する場合は、定量的ウエスタン・ブロット法、酵素結合免疫吸着定量法（ＥＬＩＳＡ）または定量的免疫組織化学法を含めた方法を使用して、前記ＶＧＳＣタンパク質の量を決定することが好ましい。

【００７４】

抗体を生み出し精製するための他の技法は当分野ではよく知られており、任意のこのような技法を選択して、本発明で特許請求する方法において有用な調製物を得ることができる。本発明の好ましい実施形態では、抗体は溶液から前記ＶＧＳＣタンパク質を免疫沈降させ、さらにポリアクリルアミド・ゲルのウエスタン・ブロット法または免疫ブロット法で前記ＶＧＳＣタンパク質と反応する。他の好ましい実施形態では、免疫細胞化学的な技法を使用することによって、抗体がパラフィンまたは凍結組織切片中の前記ＶＧＳＣタンパク質を検出する。

【００７５】

前記ＶＧＳＣタンパク質を検出するための方法に関する好ましい実施形態には、モノクローナルおよび／またはポリクローナル抗体を使用するサンドウィッチ定量法を含めて、酵素結合免疫吸着定量法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫定量法（ＲＩＡ）、免疫放射定量法（ＩＲＭＡ）および免疫酵素定量法（ＩＥＭＡ）がある。代表的なサンドウィッチ定量法は、参照によりここに組み込んである米国特許第４，３７６，１１０号および４，４８６，５３０号中にＤａｖｉｄ他によって記載されている。

【００７６】

たとえば、抗原結合部位を有している抗体の断片または誘導体、一本鎖Ｆｖ断片（ＳｃＦｖ）およびドメイン抗体（ｄＡｂｓ）などの合成型の抗体様の分子、および抗体様の抗原結合モチーフを有する他の分子を含めた他の抗体様の分子を、本発明の方法において使用することができることは理解されるであろう。

【００７７】

他の実施形態では、サンプル中でのその活性を選択的に定量することによって、ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣのレベルを測定する。サンプル中でのＶＧＳＣ、たとえばｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの活性はバイオプシーを単細胞に解離させ、培養中に（ｉ）細胞の死亡率に対するNa^+チャネル遮断物質の影響を定量し、（ｉｉ）電気生理学的な記録によってNa^+チャネル活性を検出することによって定量することができる。

【００７８】

本発明の好ましい診断法には、「侵襲性の」方法および「非侵襲性の」方法として広義に記載することができる方法がある。たとえば侵襲性の方法には、たとえば（ａ）配列特異的な抗体を免疫組織化学的に適用すること、（ｂ）組織切片上でのｉｎ ｓｉｔｕのＰＣＲ、または（ｃ）バイオプシーから上皮細胞を分離した後の上皮細胞の逆転写（ＲＴ）－ＰＣＲによる、Na^+チャネルの発現を検出するためのバイオプシーの採取がある。非侵襲性の方法は、尿、精液または血液から前立腺由来の細胞を得ることを含み、これらの細胞はＰＳＡに対する親和性によって分離することができ、ＰＣＲによりNa^+チャネルの発現について定量することができる。

【００７９】

本発明の他の態様では、癌を診断するための試薬の製造における、サンプル中のｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルのタンパク質または核酸のレベルを判定する際に使用する

ことができる薬剤の使用を提供する。この薬剤は適切には、ｈＮｅ－ＮａのＶＧＳＣ核酸に選択的にハイブリダイズする核酸であってよく、あるいはこの薬剤はｈＮｅ－ＮａのＶＧＳＣタンパク質に選択的に結合する分子であってよく、あるいはこの薬剤はｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの活性を選択的に定量する際に有用な薬剤であってよい。

【００８０】

したがって定義する薬剤は、癌を診断する方法において有用である。

【００８１】

本発明の他の態様は、癌、特に前立腺癌を診断するのに有用なパーツのキットであって、サンプル中のｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣのタンパク質または核酸のレベルを判定する際に使用することができる薬剤を含むキットを含む。この薬剤は、ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの核酸に選択的にハイブリダイズする核酸であってよく、あるいはこの薬剤はｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣのタンパク質に選択的に結合する分子であってよく、あるいはこの薬剤はｈｅＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの活性を選択的に定量する際に有用な薬剤であってよい。

【００８２】

このキットは、ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの核酸またはタンパク質を含むコントロール・サンプルをさらに含むことが好ましく、そのコントロール・サンプルは陰性コントロール（癌または癌が転移する可能性が高いこととは関連がない、一定レベルのＶＧＳＣタンパク質または核酸を含む）であってよく、あるいはサンプルは陽性コントロール（癌または癌が転移する可能性が高いこと関連がある、一定レベルのＶＧＳＣタンパク質または核酸を含む）であってよい。キットは陰性コントロールと陽性コントロールの両方を含んでよい。有用なことにキットは、異なる量に対応するｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣのタンパク質または核酸を含むことができ、したがって、検量線を作成することができる。

【００８３】

キットは、サンプルから前立腺の上皮細胞を分離して前記ＶＧＳＣの定量法を行うための、手段を含むことが適切である。前立腺の上皮細胞を分離するための手段は、抗ＰＳＡ抗体で覆われたミクロのビーズまたはカラムを含むことが好ましい。

【００８４】

本発明の他の態様は、癌を治療するための方法であって、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を選択的に妨げる薬剤を患者に投与する工程を含む方法を提供する。

【００８５】

当業者には明らかであるように、「妨げる」という語は、機能を部分的に妨げること、すなわち機能を低下させることを含む。したがって薬剤の影響は、観察する機能の低下、好ましくは著しい低下として現れてよい。

【００８６】

「ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの機能を選択的に妨げる薬剤」によって、（ａ）前記ＶＧＳＣの発現を阻害するか、あるいは（ｂ）前記ＶＧＳＣの活性を阻害する薬剤を含むものとする。

【００８７】

ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの機能を妨げる薬剤は、上皮増殖因子（ＥＧＦ）のアンタゴニスト（そのアンタゴニストは、ＥＧＦまたはその受容体（ＥＧＦＲ）と反応性がある抗体であってよい）、および他の増殖因子（たとえば神経増殖因子）、およびホルモン（アンドロゲンを含めて）のアンタゴニスト（そのアンタゴニストも同様に抗体であってよい）を含んでよい。したがって、実施例４で論じるように、ＥＧＦ受容体キナーゼ阻害物質またはＥＧＦ受容体の抗体は、前立腺癌の細胞系のＶＧＳＣの機能（それは主にｈＮｅ－Ｎａ）を阻害することができる。これらの薬剤は、ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの発現を妨げる薬剤として働くことができる。

【００８８】

ＥＧＦのアンタゴニストは、ＥＧＦ受容体の細胞外結合ドメインを対象とするモノクローナル抗体（たとえばｃｅｔｕｘｉｍａａｂ［［ＩＭＣ－Ｃ２２５］］；Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ（ＨＥＲ２受容体（ヒトＥＧＦ受容体２）に結合するモノクローナル抗体；ＥＧＦ

受容体キナーゼ阻害物質、たとえばＯＳＩ－７７４、ＰＤ１８２９０５、ＰＫＩ－１６６、ＣＩ－１０３３またはＺＤ１８３９を含んでよい。

【００８９】

前記ＶＧＳＣの発現を妨げる薬剤には、アンチセンス薬剤およびリボザイムがあるが、これらだけには限られない。

【００９０】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは一本鎖の核酸であり、相補的な核酸配列に特異的に結合することができる。適切な標的配列に結合することによって、ＲＮＡ－ＲＮＡ、ＤＮＡ－ＤＮＡ、またはＲＮＡ－ＤＮＡ二量体が形成される。これらの核酸は、しばしば「アンチセンス」と呼ばれる。なぜなら、これらの核酸は、遺伝子のセンスまたはコード鎖と相補的だからである。近年、オリゴヌクレオチドがＤＮＡ二量体に結合する、三重らせんの形成が可能であることが証明されている。オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ二重らせんの主要な溝中の配列を認識できることが発見された。したがって三重らせんが形成された。このことは、主要な溝、水素結合部位を認識することによって二本鎖ＤＮＡに特異的に結合する、配列特異的な分子を合成することが可能であることを示唆している。

【００９１】

標的核酸に結合することによって、前述のオリゴヌクレオチドは、その標的核酸の機能を阻害することができる。このことは、たとえば転写、プロセッシング、ポリ（Ａ）付加、複製、翻訳を遮断し、あるいはＲＮＡの分解を促進するなど、細胞を阻害する機構を促進する結果となる可能性がある。

【００９２】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドを研究室で作製し、次いでたとえばマイクロ・インジェクション、または細胞培養基から細胞への取り込みによって細胞中に導入し、あるいはプラスミドまたはアンチセンス遺伝子を運ぶ他のベクターを用いたトランスフェクション後に、細胞中で発現させる。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、ラオス肉腫ウイルス、水疱性口炎ウイルス、単純ヘルペス・ウイルスのタイプ１、シミアン・ウイルスおよびインフルエンザ・ウイルスに関しては、細胞培養中にウイルスの複製または発現を阻害することが最初に発見された。その時以来、アンチセンス・オリゴヌクレオチドによるｍＲＮＡ転写の阻害が、ウサギ網状赤血球の溶解産物および小麦麦芽抽出物を含めた、細胞が入り込んでいない系において、詳細にわたって研究されている。アンチセンス・オリゴヌクレオチドによるウイルス機能の阻害は、ＡＩＤＳ ＨＩＶレトロウイルスのＲＮＡと相補的なオリゴヌクレオチドを使用して、ｉｎ ｖｉｔｒｏで実証されている（Ｇｏｏｄｃｈｉｌｄ，Ｊ．１９８８「Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ Ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ」）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）８５（１５）、５５０７－１１）。Ｇｏｏｄｃｈｉｌｄの研究によって、最も有効であったオリゴヌクレオチドはポリ（Ａ）シグナルと相補的であり、ＲＮＡの５’端、特にプライマー結合部位の隣のキャップおよび５’非翻訳領域、およびプライマー結合部位で標的化された、オリゴヌクレオチドも有効であったことが示された。キャップ、５’非翻訳領域、およびポリ（Ａ）シグナルは、レトロウイルスＲＮＡ（Ｒ領域）の端部で繰り返される配列中に存在し、これらと相補的であるオリゴヌクレオチドはＲＮＡに二回結合することができる。

【００９３】

オリゴヌクレオチドは、細胞内生ヌクレアーゼによって分解作用を施されるか、あるいは不活性化させられる。この問題に対抗するために、たとえば内部ヌクレオチド結合が変わっており、元来存在するリン酸ジエステル結合が他の結合で置換されている修飾オリゴヌクレオチドを使用することが考えられる。たとえば、Ａｇｒａｗａｌ他（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５、７０７９－７０８３は、アミドリン酸オリゴヌクレオチドおよびチオリン酸オリゴヌクレオチドを使用して、ＨＩＶ－１の組織培養の阻害が増大することを示した。Ｓａｒｉｎ他（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａ

ｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５、７４４８－７４５１は、メチルリン酸オリゴヌクレオチドを使用して、ＨＩＶ－１の阻害が増大することを実証した。

【００９４】

Ａｇｒａｗａｌ他（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６、７７９０－７７９４は、ヌクレオチド配列に特異的なチオリン酸オリゴヌクレオチドを使用して、初期感染および慢性的に感染した細胞培養物において、ＨＩＶ－１の複製が阻害されることを示した。Ｌｅｉｔｈｅｒ他（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７、３４３０－３４３４は、チオリン酸オリゴヌクレオチドによる組織培養物中のインフルエンザ・ウイルスの複製の阻害を報告している。

【００９５】

人工的な結合を有するオリゴヌクレオチドは、ｉｎ ｖｉｖｏでの分解に耐性があることが示されている。たとえば、Ｓｈａｗ他（１９９１）は、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９、７４７－７５０は、これ以外の非修飾型オリゴヌクレオチドが、あるキャップ構造によって３’端で遮断されるとき、ｉｎ ｖｉｖｏにおいてヌクレアーゼに対してより耐性になり、非キャップ構造のチオリン酸オリゴヌクレオチドはｉｎ ｖｉｖｏでは分解されないことを報告している。

【００９６】

チオリン酸オリゴヌクレオチドを合成するためのＨ－ホスホン酸（塩）手法の詳細な記載は、参照によりその教示を本明細書に組み込んである、ＡｇｒａｗａｌおよびＴａｎｇ（１９９０）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３１、７５４１－７５４４中に提供されている。メチルリン酸オリゴヌクレオチド、ジチオリン酸（塩）、アミドリン酸（塩）、リン酸エステル、架橋アミドリン酸（塩）および架橋チオリン酸（塩）の合成は、当分野で知られている。たとえば、参照によりその教示を本明細書に組み込んである、ＡｇｒａｗａｌおよびＧｏｏｄｃｈｉｌｄ（１９８７）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ２８、３５３９；Ｎｉｅｌｓｅｎ他（１９８８）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ２９、２９１１；Ｊａｇｅｒ他（１９８８）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２７、７２３７；Ｕｚｎａｎｓｋｉ他（１９８７）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ２８、３４０１；Ｂａｎｎｗａｒｔｈ（１９８８）Ｈｅｌｖ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ．７１、１５１７；ＣｒｏｓｓｔｉｃｋおよびＶｙｌｅ（１９８９）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３０、４６９３；Ａｇｒａｗａｌ他（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７、１４０１－１４０５を参照のこと。合成または生成のための他の方法も考えられる。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）であるが、リボ核酸（ＲＮＡ）配列も合成かつ適用することができる。

【００９７】

本発明において有用なオリゴヌクレオチドは、内生の仁の酵素による分解に耐性があるように設計することが好ましい。ｉｎ ｖｉｖｏでのオリゴヌクレオチドの分解によって、長さが減少したオリゴヌクレオチド分解産物が生成する。このような分解産物は、その完全長の相対物と比べて、非特異的なハイブリダイゼーションに携わる可能性が高く、有効である可能性は低い。したがって、身体中での分解に耐性があり、標的細胞に達することができるオリゴヌクレオチドを使用することが望ましい。本発明のオリゴヌクレオチドは、１つまたは複数の内部の人工的な内部ヌクレオチド結合を本来のリン酸ジエステル結合に置換することによって、たとえば結合中のリン酸をイオウで置き換えることによって、ｉｎ ｖｉｖｏでの分解により耐性があるようにすることができる。使用することができる結合体の例には、チオリン酸（塩）、メチルリン酸（塩）、スルホン、硫酸（塩）、ケチル、ジチオリン酸（塩）、さまざまなアミドリン酸（塩）、リン酸エステル、架橋チオリン酸（塩）および架橋アミドリン酸（塩）がある。これらの例は例示的なものであり、制限的なものではない。なぜなら、他の内部ヌクレオチド結合が当分野で知られているからである。たとえば、Ｃｏｈｅｎ、（１９９０）Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙを参照のこと。リン酸ジエステル内部ヌクレオチド結合に置換された、１つまたは複数のこれらの結合を有するオリゴヌクレオチドの合成は、混合型の内部ヌクレオチド

結合を有するオリゴヌクレオチドを生成するための合成経路を含めて、当分野でよく知られている。

【００９８】

オリゴヌクレオチドは、「キャップ化」、すなわち類似の基を５’または３’末端のヌクレオチドに取り込ませることによって、内生酵素による伸張に耐性があるようにすることができる。キャップ化用の試薬は、Ａｍｉｎｏ－Ｌｉｎｋ ＩＩ（商標）としてＡｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏＳｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡから市販されている。キャップ化するための方法は、たとえば、参照によりその教示を本明細書に組み込んである、Ｓｈａｗ他（１９９１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９、７４７－７５０およびＡｇｒａｗａｌ他（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８（１７）、７５９５－７５９９によって記載されている。

【００９９】

オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼの攻撃に耐性があるようにする他の方法は、参照により本明細書に組み込んであるＴａｎｇ他（１９９３）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２１、２７２９－２７３５によって記載されたように、オリゴヌクレオチドを「自己安定型」にすることである。自己安定型のオリゴヌクレオチドは、その３’端にヘアピン・ループ構造を有しており、ヘビ毒のホスホジエステラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼＩおよびウシ胎児血清による分解に対してより高い耐性を示す。オリゴヌクレオチドの自己安定型の領域は、ハイブリダイゼーション中に相補的な核酸を害することはなく、マウスにおける薬物動態および安定性の研究によって、自己安定型のオリゴヌクレオチドのｉｎ ｖｉｖｏでのより高い残存率が、その線状の相対物に対して示されている。

【０１００】

本発明にしたがって、塩基対に特徴的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドの固有の結合特異性を、ｉｎ ｖｉｖｏにおいてアンチセンス化合物をその目的とする遺伝子座へ利用することを制限することによって高めることができ、これによって使用する用量を少なくすることができ、全身性の影響を最小限にする。したがって、オリゴヌクレオチドを局所的に施用して、望ましい効果を得る。所望の遺伝子座におけるオリゴヌクレオチドの濃度は、オリゴヌクレオチドを全身に投与する場合はより高くなり、非常に少ない合計量を使用して治療効果を得ることができる。オリゴヌクレオチドの局所的な高濃度によって標的細胞の侵入性が高まり、標的核酸配列の翻訳を効果的に遮断する。

【０１０１】

薬剤を局所的に投与するのに適した任意の手段によって、オリゴヌクレオチドを遺伝子座に送達することができる。たとえば、オリゴヌクレオチドの溶液を部位に直接注射することができるか、あるいは注入ポンプを使用する注入によって送達することができる。オリゴヌクレオチドを植え込み用デバイス中に取り込ませることもでき、これを所望の部位に置くと、オリゴヌクレオチドが周囲の遺伝子座に放出される。

【０１０２】

オリゴヌクレオチドは、ヒドロゲル材料を介して投与することができる。ヒドロゲルは不燃性かつ生物分解性である。天然および合成ポリマーから作成された材料を含めた、多くのこのような材料が現在知られている。好ましい実施形態では本発明の方法は、体温未満では液体であるが、体温付近では形状保持されている半固体ヒドロゲルを形成するためのゲルである、ヒドロゲルを利用する。好ましいヒドロゲルは、エチレンオキシド－プロピレンオキシド繰り返し単位のポリマーである。ポリマーの性質は、ポリマーの分子量、およびポリマー中のポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドの相対的なパーセンテージに依存する。好ましいヒドロゲルは、約１０～約８０重量％のエチレンオキシド、および約２０～約９０重量％のプロピレンオキシドを含む。特に好ましいヒドロゲルは、約７０％のポリエチレンオキシド、および３０％のポリプロピレンオキシドを含む。使用することができるヒドロゲルは、たとえばＢＡＳＦ Ｃｏｒｐ．、Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，ＮＪから Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）の商用名で入手可能である。

【０１０３】

この実施形態では、ヒドロゲルは液体状態に冷却し、オリゴヌクレオチドをこの液体に混合し、ヒドロゲル１グラム当たり約１ｍｇのオリゴヌクレオチド濃度にする。次いで生成した混合物を、たとえばカテーテルまたは内視鏡による手順を使用し、手術中にスプレーまたは塗布することによって、処理する表面に施用する。ポリマーが暖まると、それは凝固してゲルを形成し、ゲルそのものの組成によって定義される一定の時間で、オリゴヌクレオチドはゲルから周囲の細胞に拡散する。

【０１０４】

オリゴヌクレオチドは、リポソーム、マイクロ・カプセルおよび植え込み用デバイスを含めた、市販されているかあるいは科学文献中に記載されている他のインプラントによって投与することができる。たとえば、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ乳酸およびポリグリコール酸およびこれらのコポリマー、コラーゲン、およびタンパク質ポリマーなどの生物分解性材料、またはエチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）、ポリ酢酸ビニル、エチレンビニルアルコール、およびこれらの誘導体などの非生物分解性材料でできているインプラントを使用して、オリゴヌクレオチドを局所的に送達することができる。オリゴヌクレオチドは、材料中に取り込ませることができる。なぜならそれは、溶融体または溶媒の蒸発技法を使用して重合または凝固し、材料と機械的に混合することができるからである。一実施形態では、デキストランでコーティングされたシリカ・ビーズ、ステント、またはカテーテルなどの植え込み用デバイスのコーティングに、オリゴヌクレオチドを混合あるいは施用する。ポリマー状のナノ粒子／生物分解性薬剤の担体を使用することもできる（Ｍａｄｅｒ（１９９８）Ｒａｄｉｏｌ、Ｏｎｃｏｌ．３２、８９－９４）。

【０１０５】

オリゴヌクレオチドの用量は、オリゴヌクレオチドのサイズ、およびそれを投与する目的に依存する。一般にその範囲は、治療する組織の表面積に基づいて計算する。オリゴヌクレオチドの有効な用量は、オリゴヌクレオチドの長さおよび化学的組成にある程度は依存するが、一般には組織表面積の１平方センチメートル当たり約３０～３０００μｇの範囲である。

【０１０６】

オリゴヌクレオチドは、治療および予防の両方の目的で、患者に全身的に投与することができる。オリゴヌクレオチドは、たとえば非経口的な（たとえば静脈内、皮下、筋肉内に）任意の有効な方法、あるいは経口的、鼻用または他の手段によって投与することができ、このことによってオリゴヌクレオチドが患者の血液流に接近し、その中で循環することができる。全身に投与されるオリゴヌクレオチド、および局所投与しなくても有用性がある局所的に投与されるオリゴヌクレオチドが与えられることが好ましい。一般に、ヒト成人への１回の投与当たり約０．１～約１０グラムの範囲の用量が、この目的のためには有効であろう。

【０１０７】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドを前立腺に向けることが望ましいであろうことは理解されるであろう。このことは、アンチセンス・オリゴヌクレオチドを前立腺に投与することによって行うことができるか、あるいはアンチセンス・オリゴヌクレオチドを前立腺に選択的に向ける分子と関連がある、アンチセンス・オリゴヌクレオチドを使用して行うことができる。たとえば、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、ＰＳＡなどの前立腺関連の抗原に選択的に結合する、抗体または抗体様の分子と関連があってよい。「関連がある」によって、アンチセンス・オリゴヌクレオチドと前立腺を対象とする物体は非常に関連があり、前立腺を対象とする物体はアンチセンス・オリゴヌクレオチドを前立腺細胞に向かわせることができることを意味する。

【０１０８】

アンチセンス薬剤は、より大きな分子、たとえば前記ＶＧＳＣのｍＲＮＡまたは遺伝子に結合し、前記ＶＧＳＣのｍＲＮＡまたは遺伝子の発現を実質的に妨げ、前記ＶＧＳＣタンパク質の発現を実質的に妨げる、約百個から数百個の塩基も含むことは理解されるであろう。したがって、前記ＶＧＳＣのｍＲＮＡと実質的に相補的であるアンチセンス分子の発

現は、本発明の一部として想定される。

【０１０９】

したがって、この手法では一般に、（ｉ）ｈＮｅ－Ｎａチャネルまたは（ｉｉ）ＶＧＳＣの特異敵領域に対するアンチセンス配列を有する合成オリゴヌクレオチドを投与して、チャネルの活性を遮断する。個々の合成オリゴヌクレオチドの詳細は、実施例２で与える。アンチセンス・オリゴヌクレオチド技術が、ｉｎ ｖｉｔｒｏでカリウム・チャネルを操作するため（Ｒｏｙ他（１９９６）Ｇｌｉａ １８、１７４－１８８）、およびｉｎ ｖｉｔｒｏでＶＧＳＣを操作するため（Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍ（１９９７）２３４、２３５－２４１）、さらに神経の痛みを遮断する際に（Ｌａｉ他（１９９９）「Ｂｌｏｃｋａｄｅ ｏｆ ｎｅｕｒｏｐａｔｈｉｃ ｐａｉｎ ｂｙ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ ｔｅｔｒｏｄｏｔｏｘｉｎ－ｒｅｓｉｓｔａｎｔ ｓｏｄｉｕｍ ｃｈａｎｎｅｌｓ ｉｎ ｓｅｎｓｏｒｙ ｎｅｕｒｏｎｓ」Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ３１４、２０１－２１３）既に使用されていることは注目すべきことである。

【０１１０】

前記ＶＧＳＣの活性を遮断するための他の方法には、優勢ネガティブ抑制法がある。この技法では、突然変異したＶＧＳＣ遺伝子の産物は、対応する正常な遺伝子の産物の活性を、これら２つが同時に発現するとき抑制するか失わせる。４つのαサブユニットを含む電位依存性カリウム・チャネル（ＶＧＰＣ）の場合、充分に切断された遺伝子の産物を利用するこのような手法は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでのＶＧＰＣの機能的発現（Ｔｕ他（１９９５）Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．６８、１４７－１５６）、およびｉｎ ｖｉｖｏでの発現（Ｌｏｎｄｏｎ他（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９５、２９２６－２９３１）を抑制するために、首尾よく使用されている。切断されたサブユニットは、他のＶＧＰＣサブユニットに結合することができるが、チャネル機能に必要とされる残基は含んでいない。したがって、「組み合わさった」ＶＧＰＣの活性は遮断される。天然に存在し他の方法で接合しているチャネル・サブユニットのいくつかが検出されており、これらはｉｎ ｖｉｖｏでの類似の機構によって、ＶＧＰＣの活性を抑制するために機能することができる（Ｂａｕｍａｎｎ他（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６、３４１９－３４２９；Ｋａｍｂ他（１９８８）Ｎｅｕｒｏｎ １、４２１－４３０；およびＰａｎｇｓ他（１９８８）ＥＭＢＯ Ｊ、７、１０８７－１０９６）。機能性チャネルの形成を害することによって、ＶＧＳＣを同様に抑制することができると考えられる。ＶＧＳＣは１つのαサブユニット（４つの機能性ドメインを含む）から形成されるが、近年の研究によって、優勢ネガティブ方式で働いてＶＧＳＣの活性を調節する可能性があるわずか２つのドメインを有する、切断型ＶＧＳＣタンパク質が特異的な発現をすること（ヒト、マウスおよび魚類の発生中に）が実証されている（Ｐｌｕｍｍｅｒ他（１９９７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２、２４００８－２４０１５；およびＯｈ ａｎｄ Ｗａｘｍａｎ（１９９８）ＮｅｕｒｏＲｅｐｏｒｔ９、１２６７－１２７１）。

【０１１１】

より大きな分子は、以下に記載するように任意の適切な遺伝子構築体から発現させ、患者に送達することができる。典型的には、アンチセンス分子を発現する遺伝子構築体は、前記ＶＧＳＣのｃＤＮＡの少なくとも一部分、または癌性であるかあるいは癌性になる可能性がある細胞中、好ましくは前立腺癌中で、アンチセンス分子を発現させることができるプロモーターに動作可能に連結した遺伝子を含む。

【０１１２】

遺伝子構築体はＤＮＡまたはＲＮＡであってよいが、構築体がＤＮＡである場合はそれが好ましい。

【０１１３】

遺伝子構築体は、ヒト細胞への送達用に適合させることが好ましい。

【０１１４】

遺伝子構築体を動物の身体の細胞中に導入する手段および方法は、当分野で知られている

。たとえば本発明の構築体は、任意の好都合な方法、たとえばレトロウイルスに関する方法によって腫瘍細胞中に導入することができ、その結果、構築体が腫瘍細胞のゲノム中に挿入される。たとえばＫｕｒｉｙａｍａ他（１９９１）Ｃｅｌｌ Ｓｔｒｕｃ．ａｎｄＦｕｎｃ．１６、５０３－５１０では、精製したレトロウイルスを投与している。レトロウイルスによって、癌細胞を選択的に感染する可能性のある手段がもたらされる。なぜなら、レトロウイルスは分裂している細胞のゲノムにのみ組み込むことができ、癌の周囲の大部分の正常な細胞は細胞増殖の静止、非受容段階にあるか、あるいは少なくとも腫瘍細胞よりはるかに遅く分裂しているからである。前記アンチセンス薬剤をコードするレトロウイルスのＤＮＡ構築体は、当分野でよく知られている方法を使用して作成することができる。このような構築体から活性のあるレトロウイルスを生成するためには、１０％のウシ胎児血清（ＦＣＳ）を含むダルベッコの改質型イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で増殖させた、エコトロンｐｓｉ２パッケージング細胞系を使用することが普通である。細胞系のトランスフェクションは、リン酸カルシウムの共沈殿によることが好都合であり、１ｍｇ／ｍｌの最終濃度までＧ４１８を加えることによって、安定性のある形質転換体を選択する（レトロウイルスの構築体がｎｅｏ（登録商標）を含むと仮定する）。独立したコロニーを単離し広げ、培養物の上澄みを除去し、０．４５μｍの孔サイズのフィルタを通して濾過し、－７０°で保存する。レトロウイルスを腫瘍細胞中に導入するためには、１０μｇ／ｍｌのポリブレンを加えたレトロウイルス上澄み液を直接注射することが好都合である。直径が１０ｍｍを超える腫瘍については、０．１ｍｌと１ｍｌの間、好ましくは０．５ｍｌのレトロウイルス上澄み液を注射することが適切である。

【０１１５】

あるいは、Ｃｕｌｖｅｒ他（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ２５６、１５５０－１５５２中に記載されたように、レトロウイルスを生成する細胞を、腫瘍に注射する。このように導入したレトロウイルス生成細胞を工学処理して、レトロウイルスのベクターの粒子を活発に生成させ、その結果ベクターの連続的な生成が、腫瘍塊中においてｉｎ ｓｉｔｕで起こった。このように、増殖している腫瘍細胞は、レトロウイルスのベクターを生成する細胞と混合する場合、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて首尾よく形質導入することができる。

【０１１６】

標的レトロウイルスは、本発明で使用するために利用することもできる。たとえば、特異的な結合親和性を与える配列は、先在するウイルスのｅｎｖ遺伝子中において工学処理することができる（遺伝子治療用のこのベクターおよび他の標的ベクターの概要に関する、Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｖｉｌｅ（１９９５）、Ｆａｓｅｂ Ｊ．９、１９０－１９９を参照のこと）。

【０１１７】

他の方法は、細胞中で限られた時間発現させるため、あるいはさらに長い時間をかけたその後のゲノムへの組み込みのための、構築体の細胞への単純な送達を含む。後者の手法の一例は、リポソーム（腫瘍細胞を標的とすることが好ましい）を含む（Ｎａｓｓａｎｄｅｒ他（１９９２）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２、６４６－６５３）。

【０１１８】

免疫リポソーム（抗体に向けられるリポソーム）は、癌細胞タイプを標的化する際に特に有用であり、免疫リポソームは細胞表面のタンパク質を過剰発現させ、そのために抗体が利用可能である。たとえば、以下でさらに論じるように、前記ＶＧＳＣに結合する抗体によって、免疫リポソームを標的化することができる。免疫リポソームを作製するために、ＭＰＢ－ＰＥ（Ｎ－［４（ｐ－マレイミドフェニル）ブチリル］－ホスファチジルエタノールアミン）を、Ｍａｒｔｉａｎ ａｎｄ Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓ（１９８２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７、２８６－２８８の方法に従って合成する。ＭＰＢ－ＰＥをリポソームの二重層中に取り込ませて、抗体、またはその断片をリポソーム表面に共有結合させる。リポソームは、標的細胞に送達するため、本発明のＤＮＡまたは他の遺伝子構築体と共に装入することが好都合であり、たとえばこれは、ＤＮＡまたは他の遺伝子構築体の溶液中で前記リポソームを形成し、次に０．８Ｍｐａまでの窒素圧の下で０．６

μｍおよび０．２μｍの孔サイズを有するポリカーボネート膜フィルタを介した一連の押し出しによる。押し出し後、８００００ｘｇで４５分間の超遠心分離によって、遊離ＤＮＡ構築体から捕捉ＤＮＡ構築体を分離する。酸素除去した緩衝液中で新たに作製したＭＰＢ－ＰＥ－リポソームを、新たに作製した抗体（またはその断片）と混合させ、一定に際限なく一晩攪拌しながら、４℃において窒素雰囲気中で結合反応を行う。８００００ｘｇで４５分間の超遠心分離によって、結合していない抗体から免疫リポソームを分離する。免疫リポソームは腹膜内に、あるいは腫瘍に直接注射することができる。

【０１１９】

他の送達の方法には、抗体－ポリリシン架橋を介して外部ＤＮＡを運ぶアデノウイルス（Ｃｕｒｉｅｌ Ｐｒｏｇ．Ｍｅｄ．Ｖｉｒｏｌ．４０、１－１８を参照のこと）、および担体としてのトランスフェリン－ポリカチオン結合体（Ｗａｇｎｅｒ他（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃｉｄ．Ｓｃｌ．ＵＳＡ ８７、３４１０－３４１４）がある。これらの第１の方法では、本発明のＤＮＡ構築体または他の遺伝子構築体と共にポリカチオン－抗体の複合体が形成され、この抗体は野生型アデノウイルスまたは変異体アデノウイルスのいずれかに特異的であり、抗体に結合する新しいエピトープが導入されている。ポリカチオン部分は、リン酸バックボーンとの静電的相互作用によってＤＮＡに結合する。アデノウイルスは不変の繊維およびペントン・タンパク質を含んでいるため、細胞に内在化し、それを有する細胞中に本発明のＤＮＡ構築体を運ぶ。ポリカチオンがポリリシンである場合は、それが好ましい。

【０１２０】

ＤＮＡはアデノウイルスによって送達することができ、たとえば以下に記載するように、ＤＮＡはアデノウイルス粒子中に存在する。

【０１２１】

これらの第２の方法では、受容体仲介型のエンドサイトーシスを使用してＤＮＡの巨大分子を細胞中に運ぶ、非常に効率の良い核酸送達系を使用する。この方法は、イオン輸送タンパク質、トランスフェリンを核酸に結合するポリカチオンに結合させることによって行う。ヒトのトランスフェリン、またはニワトリの相同体コンアルブミン、またはこれらの組み合わせは、ジスルフィド結合を介して、小さなＤＮＡ結合タンパク質であるプロタミン、またはさまざまなサイズのポリリシンに共有結合する。これらの改変型トランスフェリン分子は、それらの同族の受容体に結合し、細胞中への効率の良いイオン輸送を仲介する、その能力を維持している。トランスフェリン－ポリカチオン分子は、核酸のサイズ（短いオリゴヌクレオチドから２１キロベース対のＤＮＡまで）に関係なく、本発明のＤＮＡ構築体または他の遺伝子構築体と共に電気泳動的に安定した複合体を形成する。トランスフェリン－ポリカチオンと本発明のＤＮＡ構築体または他の遺伝子構築体の複合体を腫瘍細胞に供給すると、細胞中の構築体からの高レベルの発現が予想される。

【０１２２】

Ｃｏｔｔｅｎ他（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９、６０９４－６０９８の方法によって生成された、欠陥性または化学的に不活性化されたアデノウイルス粒子のエンドゾーム破壊活性を使用する、本発明のＤＮＡ構築体または他の遺伝子構築体の、非常に効率の良い受容体仲介型の送達を使用することもできる。この手法は、アデノウイルスを適合させて、リソソームを通過させずにエンドゾームからそれらのＤＮＡを切り離すことができ、たとえば本発明のＤＮＡ構築体または他の遺伝子構築体に連結したトランスフェリンの存在下では、アデノウイルス粒子と同様の経路で、細胞により構築体が取り込まれるという事実を利用するものであるようである。

【０１２３】

この手法には、複合レトロウイルス構築体を使用する必要がない、レトロウイルス感染と共に起こるゲノムの恒久的改変がない、さらに標的発現系が標的送達系と結びつき、これによって他の細胞タイプに対する毒性が低下するという利点がある。

【０１２４】

遺伝子構築体を含む適切な送達媒体を、一定時間で腫瘍に局所的にまき散らすことが望ま

しい可能性がある。追加的あるいは代替的に、送達媒体または遺伝子構築体を、接近可能な腫瘍に直接注射することができる。

【０１２５】

「裸のＤＮＡ」およびカチオン性および中性脂質と複合体形成したＤＮＡも、本発明のＤＮＡを治療する患者の細胞中に導入する際に、有用である可能性があることは理解されるであろう。遺伝子治療のための非ウイルス的な手法は、Ｌｅｄｌｅｙ（１９９５）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６、１１２９－１１４４中に記載されている。

【０１２６】

ＷＯ９４／１０３２３中に記載された改変型アデノウイルス系などの、代替的な標的送達系も知られており、典型的にはＤＮＡは、アデノウイルス、またはアデノウイルス用の粒子内に運ばれる。Ｍｉｃｈａｅｌ他（１９９５）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２、６６０－６６８は、細胞選択的な部分を繊維タンパク質に加えるためのアデノウイルスの改変を記載している。Ｂｉｓｃｈｏｆｆ他（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７４、３７３－３７６中に記載されたアデノウイルスなどの、ｐ５３欠失型ヒト腫瘍細胞中で選択的に複製する突然変異体アデノウイルスも、本発明の遺伝子構築体を細胞に送達するために有用である。したがって、本発明の他の態様が、本発明の遺伝子構築体を含むウイルス、またはウイルス用の粒子を提供することは理解されるであろう。他の適切なウイルス、またはウイルス用の粒子にはＨＳＶ、ＡＡＶ、ワクシニアウイルスおよびパルボウイルスがある。

【０１２７】

他の実施形態では、ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの機能を選択的に妨げる薬剤は、標的とするＶＧＳＣ ＲＮＡまたはＤＮＡを切断することができるリボザイムである。前記リボザイムを発現する遺伝子は、アンチセンス分子の場合とほぼ同じ方法で、ほぼ同じ媒体を使用して投与することができる。

【０１２８】

本明細書で開示した、ウイルスまたはウイルス様の粒子のゲノム中にコードすることができるリボザイムは、Ｃｅｃｈ ａｎｄ Ｈｅｒｓｃｈｌａｇ「Ｓｉｔｅｓｐｅｃｉｆｉｃ ｃｌｅａｖａｇｅ ｏｆ ｓｉｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄｅｄ ＤＮＡ」米国特許第５，１８０，８１８号、Ａｌｔｍａｎ他「Ｃｌｅａｖａｇｅ ｏｆ ｔａｒｇｅｔｅｄ ＲＮＡ ｂｙ ＲＮＡｓｅ Ｐ」米国特許第５，１６８，０５３号、Ｃａｎｔｉｎ他「Ｒｉｂｏｚｙｍｅ ｃｌｅａｖａｇｅ ｏｆ ＨＩＶ－１ ＲＮＡ」米国特許第５，１４９，７９６号、Ｃｅｃｈ他「ＲＮＡ ｒｉｂｏｚｙｍｅ ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ ｅｎｄｏｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ」米国特許第５，１１６，７４２号、Ｂｅｅｎ他「ＲＮＡ ｒｉｂｏｚｙｍｅ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅｓ，ｄｅｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｓｅｓ，ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ」米国特許第５，０９３，２４６号、およびＢｅｅｎ他「ＲＮＡ ｒｉｂｏｚｙｍｅ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅｓ，ｄｅｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｓｅｓ，ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ ｅｎｄｏｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ；ｃｌｅａｖｅｓ ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ＲＮＡ ａｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｓｉｔｅ ｂｙ ｔｒａｎｓｅｓｔｅｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ」米国特許第４，９８７，０７１号中に記載されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込んである。

【０１２９】

アンチセンス分子またはリボザイムは、前立腺細胞に特異的なプロモーター要素から発現されることが望ましいであろうことは理解されるであろう。前立腺に特異的な抗原（ＰＳＡ）は、ヒト前立腺分泌物の主要なタンパク質部分の１つである。ＰＳＡは、前立腺癌を検出し調べるための有用なマーカーとなっている。ＰＳＡをコードしている遺伝子、およびＰＳＡの前立腺に特異的な発現を指示するそのプロモーター領域は記載されている（Ｌｕｎｄｗａｌｌ（１９８９）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１６１、１１５１－１１５９；Ｒｉｅｇｍａｎ他（１９８９）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１５９、９５－１０２；Ｂｒａｗｅｒ（１９９１）Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌ．３０、１６１－１６８）。したがって、プロモーターはＰＳＡのプロモーター

であることが適切である。

【０１３０】

本発明の遺伝子構築体は、当分野でよく知られている方法を使用して作製することができる。

【０１３１】

相補的な粘着末端を介してＤＮＡをベクターに動作可能に連結させるための、さまざまな方法が開発されている。たとえば、相補的なホモポリマー領域を、ベクターのＤＮＡに挿入するＤＮＡ切片に加えることができる。次いでベクターとＤＮＡ切片を、相補的なホモポリマー尾部間の水素結合によって結合させて、組み換えＤＮＡ分子を形成する。

【０１３２】

１つまたは複数の制限部位を含む合成リンカーによって、ＤＮＡ切片をベクターに結合させる代替的な方法がもたらされる。初期に記載されたようにエンドヌクレアーゼの制限的消化によって生み出されるＤＮＡ切片を、バクテリオファージＴ４ＤＮＡポリメラーゼまたは大腸菌ＤＮＡポリメラーゼＩ、３’－５’－外ヌクレアーゼ鎖分解活性を有する突出した３’一本鎖末端を除去し、および重合活性を有するくぼんだ３’端中を充填する酵素で処理する。

【０１３３】

したがって、これらの活性を組み合わせることによって、平滑末端型のＤＮＡ切片が生成する。次いで平滑末端型切片を、バクテリオファージＴ４ＤＮＡリガーゼなどの、平滑末端型ＤＮＡ分子の連結を触媒することができる酵素の存在下で、充分モル過剰のリンカー分子と共に培養する。したがって、この反応の生成物は、その端にポリマー・リンカー配列を有するＤＮＡ切片である。次いでこれらのＤＮＡ切片を適切な制限酵素を用いて切断し、ＤＮＡ切片の末端と適合性がある末端を生成する酵素を用いて切断した発現ベクターに連結させる。

【０１３４】

さまざまな制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ、Ｎｅｗ Ｈａｖｅｎ、ＣＮ、ＵＳＡを含めた、いくつかの源から市販されている。

【０１３５】

本発明のポリペプチドをコードしているＤＮＡを改変するための望ましい方法は、Ｓａｉｋｉ他（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２３９、４８７－４９１によって開示されたような、ポリメラーゼ連鎖反応を使用することである。

【０１３６】

この方法では、酵素によって増幅されるＤＮＡは、それら自体が増幅されたＤＮＡ中に取り込まれる、２つの特異的なオリゴヌクレオチド・プライマーの側面に位置している。前記特異的なプライマーは、当分野で知られている方法を使用して発現ベクターへのクローニング用に使用することができる、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含んでよい。

【０１３７】

本発明は、本発明の遺伝子構築体（好ましくはＤＮＡ構築体）を用いて形質転換した宿主細胞にも関する。宿主細胞は原核性または真核性のいずれかであってよい。細菌細胞は好ましい原核性宿主細胞であり、典型的には、たとえばＢｅｔｈｅｓｄａ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ.、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、ＵＳＡから入手可能な大腸菌の菌株ＤＨ５、およびＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）ｏｆ Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ、ＵＳＡ（Ｎｏ ＡＴＣＣ ３１３４３）から入手可能なＲＲ１などの大腸菌の菌株である。好ましい真核性宿主細胞には酵母菌および哺乳動物細胞、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒト繊維芽細胞系からの細胞などの脊椎動物細胞がある。酵母菌宿主細胞には、ＹＰＨ４９９、ＹＰＨ５００およびＹＰＨ５０１があり、これらは一般にＳｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ ９２０３７、ＵＳＡから入手可能である。好ましい哺乳動物宿主細胞には、ＡＴＣＣからＣＣＬ６１として入手可能なチャイニーズ・ハムス

ターの卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＡＴＣＣからＣＲＬ１６５８として入手可能なＮＩＨスイス・マウスの胚細胞ＮＩＨ／３Ｔ３、およびＡＴＣＣからＣＲＬ１６５０として入手可能なサルの腎臓由来のＣＯＳ－１細胞がある。

【０１３８】

本発明のＤＮＡ構築体を用いた適切な細胞宿主の形質転換は、典型的には使用するベクターのタイプに依存する、よく知られている方法によって行う。原核性宿主細胞の形質転換に関しては、たとえばＣｏｈｅｎ他（１９７２）．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ６９、２１１０およびＳａｍｂｒｏｏｋ他（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹを参照のこと。酵母菌細胞の形質転換は、Ｓｈｅｒｍａｎ他（１９８６）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ中に記載されている。Ｂｅｇｇｓ（１９７８）Ｎａｔｕｒｅ ２７５、１０４－１０９の方法も有用である。脊椎動物細胞に関しては、このような細胞をトランスフェクトする際に有用な試薬、たとえばリン酸カルシウムおよびＤＥＡＥ－デキストランまたはリポソーム調合物は、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ、またはＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ ２０８７７、ＵＳＡから入手可能である。

【０１３９】

エレクトロポレーションも細胞を形質転換するためには有用であり、酵母菌細胞、細菌細胞および脊椎動物細胞を形質転換するために、当分野ではよく知られている。

【０１４０】

たとえば多くの細菌種は、参照により本明細書に組み込んだＬｕｃｈａｎｓｋｙ他（１９８８）Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２、６３７－６４６中に記載された方法によって、形質転換することができる。２５μＦＤで１ｃｍ当たり６２５０Ｖを使用する、２．５Ｘ ＰＥＢ中に懸濁したＤＮＡ－細胞混合物のエレクトロポレーションに従って、最大数の形質転換体が一貫して回収される。

【０１４１】

エレクトロポレーションにより酵母菌を形質転換するための方法は、Ｂｅｃｋｅｒ ａｎｄ Ｇｕａｒｅｎｔｅ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１９４、１８２中に開示されている。

【０１４２】

首尾よく形質転換された細胞、すなわち本発明のＤＮＡ構築体を含む細胞は、よく知られている技法によって同定することができる。たとえば、本発明の発現構築体を導入した結果生じる細胞を増殖させて、本発明において定義する分子を生成することができる。細胞を採取し溶解させることができ、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ（１９７５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．９８、５０３またはＢｅｒｅｎｔ他（１９８５）Ｂｉｏｔｅｃｈ．３、２０８によって記載された方法などの方法を使用して、ＤＮＡの存在についてそのＤＮＡ含有量を調べる。あるいは、上澄み中の分子、たとえばタンパク質の存在を、以下に記載したように抗体を使用して検出することができる。

【０１４３】

組み換えＤＮＡの存在を直接分析することに加えて、組み換えＤＮＡがタンパク質の発現を指示することができるときは、よく知られている免疫学的方法によって首尾の良い形質転換を確認することができる。たとえば、発現ベクターを用いて首尾よく形質転換された細胞は、適切な抗原性を示すタンパク質を生成する。形質転換された疑いがある細胞のサンプルを採取し、適切な抗体を使用してタンパク質について分析する。

【０１４４】

したがって、形質転換された宿主細胞そのもの以外に、本発明は、栄養培地中のこれらの細胞の培養物、好ましくはモノクローナル（クローン的に相同である）培養物、またはモノクローナル培養物由来の培養物も企図する。

【０１４５】
遺伝子構築体がプラスミドＤＮＡ構築体であるときは、それを精製することができる。本発明のＤＮＡ構築体は、よく知られている方法を使用して宿主細胞から精製する。
【０１４６】
たとえばプラスミド・ベクターのＤＮＡは、Ｃｌｅｗｅｌｌ ａｎｄ Ｈｅｌｉｎｓｋｉ（１９７０）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ９、４４２８－４４４０およびＣｌｅｗｅｌｌ（１９７２）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１１０、６６７－６７６の方法に従って、ＣｓＣｌ勾配中でバンド化することにより、切断された溶解産物から大規模で作製することができる。このようにして抽出したプラスミドのＤＮＡは、Ｖｉｓｋｉｎｇチューブを介した滅菌され発熱性物質を含まない緩衝液に対する透析によって、あるいはサイズ除去クロマトグラフィによって、ＣｓＣｌから遊離させることができる。
【０１４７】
あるいはプラスミドのＤＮＡは、たとえばＱｉａｇｅｎによって供給されるイオン交換クロマトグラフィを使用して、透明な溶解産物から精製することができる。ヒドロキシアパタイト・カラム・クロマトグラフィを使用することもできる。
【０１４８】
本発明の他の態様は、癌を治療するための薬剤の製造における、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を選択的に妨げる薬剤の使用を提供する。
【０１４９】
本発明の他の態様は、細胞内で発現するｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルの機能を妨げることができる分子をコードしている核酸を含む遺伝子構築体を提供する。
【０１５０】
前述のように、遺伝子構築体はＲＮＡまたはＤＮＡであってよい。ｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの機能を妨げることができる分子は、前に開示したようにアンチセンス分子またはリボザイムであることが好都合である。
【０１５１】
遺伝子構築体は、ヒト細胞、特に癌性であるか癌が発生する可能性がある細胞への送達用に適合させてあり、より詳細には遺伝子構築体は、前立腺細胞に送達させるために適合させてある。本発明のこの態様の遺伝子構築体は、前に記載したウイルス性および非ウイルス性の送達系を含む。
【０１５２】
適切には、リボザイムまたはアンチセンス分子などの分子は、ＶＧＳＣ、たとえばｈＮｅ－Ｎａ ＶＧＳＣの機能を妨げることができ、癌細胞中で選択的に発現される。たとえば、遺伝子構築体による前記分子の発現は、癌細胞または組織選択的プロモーターを介して行うことができ、前立腺癌の場合は、ＰＳＡプロモーターまたは任意の他の前立腺癌選択的プロモーターであってよい。
【０１５３】
本発明の他の態様は、医療において使用するための遺伝子構築体を提供する。したがって、遺伝子構築体は、医療において使用するためにパッケージングされており提示される。
【０１５４】
本発明の他の態様は、本発明の遺伝子構築体および製薬上許容される担体を含む薬剤組成物を提供する。本発明の遺伝子構築体と適合性があり、そのレシピエントに害がないという意味で、担体は「許容される」ものでなければならない。典型的には担体は、滅菌されており発熱性物質を含まない、水または生理食塩水であろう。
【０１５５】
不確かさを避けるために、本発明の遺伝子構築体は、具体的にはウイルスまたはウイルス様の粒子を含む。
【０１５６】
本発明の他の態様は、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルを選択的に阻害する化合物を同定するための方法であって、（ａ）試験化合物を前記電位依存性Na^+チャネルのい

ずれか１つと接触させ、前記化合物が阻害的であるかどうかを判定すること、（ｂ）試験化合物を他の電位依存性Na^+チャネルと接触させ、前記化合物が阻害的であるかどうかを判定すること、および（ｃ）（ａ）では実質的に阻害的であるが（ｂ）では実質的に阻害的でない化合物を選択することを含む方法を提供する。

【０１５７】

典型的には、Na^+チャネルに対して知られている影響がある薬理学的薬剤（たとえばテロドトキシンと類似の影響がある化合物）、または生理学的薬剤（たとえば増殖因子またはホルモン、たとえば上皮増殖因子またはアンドロゲン）を含めたある範囲の化合物を、いくつかの定量法においてその有効性を調べる。適切な定量法の型には、細胞系としての長期培養中の細胞から、およびバイオプシーから解離した細胞の短期培養中の電気生理学的な記録（たとえばＧｒｉｍｅｓ ａｎｄ Ｄｊａｍｇｏｚ（１９９８）Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１７５、５０－５８を参照のこと）、組み換え前記ＶＧＳＣを機能的に発現する卵母細胞からの電気生理学的な記録、その後のｃＲＮＡの注射（たとえばＦｒａｓｅｒ他（１９９３）Ｉｎ Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ，Ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｄ．Ｗｉｌｌｉｓ，ｅｄ）ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓを参照のこと）、およびｉｎ ｖｉｔｒｏでの（Ｂｏｙｄｅｎチャンバ）侵襲性の定量法（たとえばＧｒｉｍｅｓ他（１９９５）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ３６９、２９０－２９４；およびＳｍｉｔｈ他（１９９８）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４２３、１９－２４を参照のこと）がある。適切な定量法は、たとえばＡｂｄｕｌ ａｎｄ Ｈｏｏｓｅｉｎ（２００１）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ２１、２０４５－２０４８中に記載されたような、前立腺癌細胞系からのＰＳＡ分泌の影響の測定も含んでよい。

【０１５８】

本発明は、前記ＶＧＳＣを発現している細胞を標的化することによって、治療が癌細胞を標的とする方法も提供し、この方法は前述のように、遺伝子構築体をこのような細胞に向けることに関する。たとえば、染料物質と結合する抗－前記ＶＧＳＣ抗体（ＶＧＳＣ－Ａｂ）は、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて前立腺に施すことができる（たとえばＹａｓｍｕｃｈ他（１９９３）「Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｐｈｏｔｏｌｙｓｉｓ」Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｒｅｖｕｅ Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍ １０、１９７－２５２；Ｐｏｇｒｅｂｎｉａｋ他（１９９３）「Ｔａｒｇｅｔｔｅｄ ｐｈｏｔｏｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ｓｅｎｓｉｔｉｚｅｒ－ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ａｎｄ ｌｉｇｈｔ」Ｓｕｒｇｉｃａｌ Ｏｎｏｃｌｏｇｙ ２、３１－４２）。したがって前立腺を、「付着した」染料の吸収ピークに一致する光線／レーザーの波長で、局所的に照射する。染料による光エネルギーの吸収によって、局所的な加熱および細胞の死がもたらされる。このようにして、標識された（すなわち転移性である）細胞のみが除去されるであろう。以下の染料で標識されたＶＧＳＣ－Ａｂを使用することができる：フルオロセン（Ｐｅｌｅｇｒｉｎ他（１９９１）「Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ ｐｈｏｔｏｉｍｍｕｎｏｄｉａｇｎｏｓｉｓ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃｏｌｏｎ－ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｉｎ ｎｕｄｅ－ｍｉｃｅ」Ｃａｎｃｅｒ ６７、２５２９－２５３７）、ローダミン（Ｈａｇｈｉｇｈａｔ他（１９９２）「Ｌａｓｅｒ－ｄｙｅｓ ｆｏｒ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ｐｈｏｔｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃａｎｃｅｒ－ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ３ ｒｈｏｄａｍｉｎｅｓ」Ｌａｒｙｎｇｏｓｃｏｐｅ１０２、８１－８７）、シアニン（Ｆｏｌｌｉ他（１９９４）「Ａｎｔｉｂｏｄｙｉｎｄｏｃｙａｎｉｎ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｐｈｏｔｏｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｓｑｕａｍｏｕｓ－ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｉｎ ｎｕｄｅ－ｍｉｃｅ」Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５４、２６４３－２６４９；Ｌｉｐｓｈｕｔｚ他（１９９４）「Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ４ ｎｅｗ ｃａｒｂｏｃｙａｎｉｎｅ ｄｙｅｓ ｆｏｒ ｐｈｏｔｏｄｙｎａｍｉｃ ｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ｌａｓｅｒｓ」Ｌａｒｙｎｇｏｓｃｏｐｅ １０４、９９６－１００２；Ｈａｄｄａｄ他（１９９８）「Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｐｈｏｔｏｄｙｎａｍｉｃ ｔｈｅｒａｐｙ ｏｎ ｍａｒｉｎｅ ｍ

ａｌｉｇｎａｎｔ ｍｅｌａｎｏｍａ」Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｓｕｒｇｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ５、２４１－２４７）。

【０１５９】

したがって本発明の他の態様は、ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルのタンパク質に選択的に結合する部分、および他の部分を含む化合物を提供する。

【０１６０】

「ｈＮｅ－Ｎａ電位依存性Na^+チャネルのタンパク質に選択的に結合する部分」によって、前記ＶＧＳＣには結合するが、他の分子、たとえば他のＶＧＳＣには実質的に結合しない、任意の適切なこのような部分を意味する。結合部分を含む化合物は、使用時に癌性細胞、特に転移性癌細胞の領域に局在することができるが、癌性細胞が存在しない他の領域は実質的に局在することができない化合物であることが好ましい。

【０１６１】

結合部分は、高い親和性で前記ＶＧＳＣに結合することができることが好ましい。たとえば、結合部分の前記ＶＧＳＣへの結合に関する結合定数は、10^{-7}と10^{-10}Ｍの間であることが好ましい。典型的には、結合部分は抗ｈＮｅ－Ｎａ抗体である。このような抗体および適切な抗体を作製する方法は、前で論じている。

【０１６２】

他の部分は、癌の治療または画像化または診断に関する有用な性質を化合物に与える、任意の他の部分であってよい。詳細には他の部分は、癌細胞、特に転移性癌細胞を殺傷または画像化する際に有用な部分である。他の部分は、化合物が標的とする癌細胞を、殺傷することができる部分であることが好ましい。

【０１６３】

本発明の好ましい実施形態では、他の部分は直接的あるいは間接的に細胞毒性である。詳細には他の部分は、癌細胞、特に転移性癌細胞に対して直接的あるいは間接的に毒性であることが好ましい。

【０１６４】

「直接的に細胞毒性である」によって、その部分はそれ自体が毒性である部分であるという意味を含む。「間接的に細胞毒性である」によって、その部分はそれ自体は毒性ではないが、たとえば他の分子に対する作用によって、あるいは他の分子に対する他の作用によって、細胞毒性を誘導する可能性がある部分であるという意味を含む。

【０１６５】

一実施形態では、細胞毒性部分は細胞毒性の化学療法剤である。細胞毒性の化学療法剤は、当分野においてよく知られている。

【０１６６】

抗癌剤などの細胞毒性の化学療法剤には以下のものがある；メクロレタミン（HN_2）、シクロホスファミド、イフォスファミド、メルファラン（Ｌ－サルコリシン）およびクロラムブチルなどの窒素マスタードを含むアルキル化剤；ヘキサメチルメラミン、チオラパなどのエチレンイミンおよびメチルメラミン；ブスルファンなどのスルホン酸アルキル；カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、セムスチン（メチル－ＣＣＮＵ）およびストレプトゾシン（ストレプトゾトシン）などのニトロソ尿素；デカルバジン（ＤＴＩＣ；ジメチルトリアゼノイミダゾール－カルボキサミド）などのトリアゼン；メトトレキサート（アメトプテリン）などの葉酸類似体を含めた代謝拮抗物質；フルオロウラシル（５－フルオロウラシル；５－ＦＵ）、フロクスリジン（フルオロデオキシウリジン；ＦＵｄＲ）およびシタラビン（シトシンアラビノシド）などのピリミジン類似体；およびメルカプトプリン（６－メルカプトプリン；６－ＭＰ）、チオグアニン（６－チオグアニン；ＴＧ）およびペントスタイン（２□－デオキシコフォルマイシン）などのプリン類似体および関連阻害物質。ビンブラスチン（ＶＬＢ）およびビンクリスチンなどのビンカアルカノイドを含めた天然産物；エトポシドおよびテニポシドなどのエピポドフィロトキシン；ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、ダウノルビシン（ダウノマイシン；ルビノマイシン）、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）お

よびマイトマイシン（マイトマイシンＣ）などの抗生物質；Ｌ－アスパラギナーゼなどの酵素；およびインターフェロン・アルフェノム（ａｌｐｈｅｎｏｍｅ）などの生物学的応答の改変剤。シスプラチン（ｃｉｓ－ＤＤＰ）およびカルボプラチンなどのプラチナ配位複合体を含めた混合剤；ミトキサントロンおよびアントラサイクリンなどのアントラセンジオン；ヒドロキシ尿素などの置換尿素；プロカルバジン（Ｎ－メチルヒドラジン、ＭＩＨ）などのメチルヒドラジン誘導体；およびミトタン（ｏ，ｐ□－ＤＤＤ）およびアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制物質；タキソールおよび類似体／誘導体；およびフルタミドおよびタモフェキシンなどのホルモンのアゴニスト／アンタゴニスト。

【０１６７】

さまざまなこれらの薬剤は、以前から抗体および他の標的部位送達用の薬剤に結合させており、したがって、これらの薬剤を含む本発明の化合物は、当業者によって容易に作成することができる。たとえば、カルボジイミド結合を使用して、ドキソルビシンを含めたさまざまな薬剤を抗体またはペプチドに結合させることができる（参照により本明細書に組み込んである、ＢａｕｍｉｎｇｅｒおよびＷｉｌｃｈｅｋ（１９８０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．７０、１５１－１５９）。

【０１６８】

カルボジイミドは、一般式Ｒ－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－Ｒ’を有する化合物であって、ＲおよびＲ’が脂肪族または芳香族であってよく、ペプチド結合を合成するために使用される化合物のグループを含む。その調製手順は簡潔で、比較的迅速であり、穏やかな条件下で行われる。カルボジイミド化合物は、カルボキシル基を攻撃して、これらの基を遊離アミノ基と反応性のある部位に変える。

【０１６９】

水溶性カルボジイミド、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）は、機能的部分を結合部分に結合させる際に非常に有用であり、これを使用して、腫瘍が宿るペプチドにドキソルビシンを結合させることができる。ドキソルビシンと結合部分の結合には、ドキソルビシンによって提供されるアミノ基、抗体またはペプチドなどの結合部分によって提供されるカルボキシル基の存在が必要とされる。

【０１７０】

ペプチド結合を直接形成するためにカルボジイミドを使用することに加えて、ＥＤＣを使用して、Ｎ－ヒドロキシサクシンイミド（ＮＨＳ）エステルなどの活性エステルを調製することもできる。したがって、アミノ基にのみ結合するＮＨＳエステルを使用して、ドキソルビシンの１つのアミノ基を有するアミド結合の形成を誘導することができる。ＥＤＣとＮＨＳを組み合わせた使用は、結合体が形成される収率を高めるための結合用に一般的に使用されている（Ｂａｕｍｉｎｇｅｒ ａｎｄ Ｗｉｌｃｈｅｋ、上記、１９８０）。

【０１７１】

機能的部分を結合部分に結合させるための他の方法も使用することができる。たとえば、グルタルアルデヒドの架橋に使用することができるのと同様に、過ヨウ酸ナトリウムの酸化、次いで適切な反応物の還元アルキル化を使用することができる。しかしながら、本発明の結合体を生成する方法のどれを選択するかに関係なく、結合部分がその標的化能力を維持していること、機能的部分がその関連機能を維持していることを判定しなければならないことが認められる。

【０１７２】

本発明の他の実施形態では、細胞毒性部分は細胞毒性ペプチドまたはポリペプチド部分であり、これによって細胞の死をもたらす任意の部分が含まれる。細胞毒性ペプチドまたはポリペプチド部分は当分野でよく知られており、これにはたとえばリシン、アブリン、シュードモナスの外毒素、組織因子などがある。これらを抗体などの標的部分に連結させるための方法も、当分野では知られている。細胞毒性剤としてのリシンの使用は、参照により本明細書に組み込んである、Ｂｕｒｒｏｗｓ ａｎｄ Ｔｈｏｒｐｅ（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０、８９９６－９０００中に記載されており、局所的な血液凝固および腫瘍の梗塞形成をもたらす組織因子の使用は、Ｒａｎ他（１

９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８、４６４６－４６５３およびＨｕａｎｇ他（１９９７）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７５、５４７－５５０によって記載されている。Ｔｓａｉ他（１９９５）Ｄｉｓ．Ｃｏｌｏｎ Ｒｅｃｔｕｍ ３８、１０６７－１０７４は、モノクローナル抗体に結合したアブリンＡ鎖を記載しており、これは参照により本明細書に組み込んである。細胞毒性剤としての他のリボゾーム不活性化タンパク質は、ＷＯ９６／０６６４１中に記載されている。シュードモナスの外毒素は、細胞毒性ポリペプチド部分として使用することもできる（たとえば参照により本明細書に組み込んである、Ａｉｅｌｌｏ他（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２、１０４５７－１０４６１を参照のこと）。

【０１７３】

ＴＮＦαおよびＩＬ－２などのいくつかのサイトカインも、細胞毒性剤として有用である可能性がある。

【０１７４】

いくつかの放射性原子も、充分な用量で送達される場合は細胞毒性である可能性がある。したがって細胞毒性部分は、使用の際に充分な量の放射活性を標的部位に送達して細胞毒性にする放射性原子を含むことができる。適切な放射性原子にはリン－３２、ヨウ素－１２５、ヨウ素－１３１、インジウム－１１１、レニウム－１８６、レニウム－１８８、またはイットリウム－９０、または近隣の細胞、細胞器官または核酸を破壊するための充分なエネルギーを発する任意の他のアイソトープがある。本発明の化合物中の放射性原子のアイソトープおよび濃度は、４０００ｃＧｙを超える（少なくとも６０００、８０００または１００００ｃＧｙであることが好ましい）線量が標的部位、好ましくは標的部位の細胞、および細胞器官、特に核に送達されるようなものであることが好ましい。

【０１７５】

放射性原子は、知られている方法で結合部分に結合させることができる。たとえば、ＦＤＴＡまたは他のキレート剤を結合部分に結合させることができ、^{111}Ｉｎまたは^{90}Ｙを結合させるためにこれらを使用することができる。チロシン残基は、^{125}Ｉまたは^{131}Ｉで標識することができる。

【０１７６】

細胞毒性部分は、適切な間接的に細胞毒性であるポリペプチドであってよい。特に好ましい実施形態では、間接的に細胞毒性であるポリペプチドは、酵素の能力を有しており、比較的毒性のないプロドラッグを細胞毒性の薬剤に転換することができるポリペプチドである。標的部分が抗体であるとき、このタイプの系はＡＤＥＰＴ（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｅｎｚｙｍｅ Ｐｒｏｄｒｕｇ Ｔｈｅｒａｐｙ）と呼ばれることが多い。この系では、標的部分が酵素部分を患者の身体の所望の部位（すなわち前記ＶＧＳＣを発現する部位、転移性癌細胞など）に向け、その後酵素をその部位に局在化させる時間を与え、酵素の基質であるプロドラッグを投与することが必要であり、触媒作用の最終産物は細胞毒性化合物である。この手法の目的は、所望の部位における薬剤の濃度を最大にし、正常な組織中の薬剤の濃度を最小にすることである（Ｓｅｎｔｅｒ，Ｐ．Ｄ．他（１９８８）「Ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ａｌｋａｌｉｎｅ ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｉｎ ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５、４８４２－４８４６；Ｂａｇｓｈａｗｅ（１９８７）Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ５６、５３１－２；およびＢａｇｓｈａｗｅ，Ｋ．Ｄ．他（１９８８）「Ａ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ ａｇｅｎｔ ｃａｎ ｂｅ ｇｅｎｅｒａｔｅｄ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅｌｙ ａｔ ｃａｎｃｅｒ ｓｉｔｅｓ」Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ．５８、７００－７０３を参照のこと）。

【０１７７】

任意の前記ＶＧＳＣ結合部分を、このタイプの定方向酵素プロドラッグ療法系において、抗ｈＮｅ－Ｎａ抗体の代わりに使用することができることは明らかである。

【０１７８】

本明細書に記載した前記ＶＧＳＣ標的酵素を使用する系の酵素およびプロドラッグは、前に示した任意のものであってよい。細胞毒性物質は、アルキル化剤などの任意の既存の抗癌薬剤、ＤＮＡ中に挿入される薬剤、チミジンシンテターゼ、リボヌクレオチドリダクターゼ、ヌクレオシドキナーゼまたはトポイソメラーゼなどの任意の重要な酵素を阻害する薬剤、任意の他の細胞部分と相互作用することによって細胞の死に影響を与える薬剤であってよい。エトポシドは、トポイソメラーゼ阻害剤の一例である。

【０１７９】

報告されているプロドラッグ系には、大腸菌β－グルクロニダーゼによって活性化されるフェノールマスタード・プロドラッグ（Ｗａｎｇ他、１９９２およびＲｏｆｆｌｅｒ他、１９９１）、ヒトβ－グルクロニダーゼによって活性化されるドキソルビシン・プロドラッグ（Ｂｏｓｓｌｅｔ他、１９９４）、コーヒー豆α－ガラクトシダーゼによって活性化される他のドキソルビシン・プロドラッグ（Ａｚｏｕｌａｙ他、１９９５）、コーヒー豆α－Ｄ－ガラクトシダーゼによって活性化されるダウノルビシン・プロドラッグ（Ｇｅｓｓｏｎ他、１９９４）、大腸菌β－Ｄ－ガラクトシダーゼによって活性化される５－フルオロウリジン・プロドラッグ（Ａｂｒａｈａｍ他、１９９４）、カルボキシペプチダーゼＡによって活性化されるメトトレキセート・プロドラッグ（たとえばメトトレキセート－アラニン）（Ｋｕｅｆｎｅｒ他、１９９０、Ｖｉｔｏｌｓ他、１９９２およびＶｉｔｏｌｓ他、１９９５）がある。これらおよび他のものは、以下の表中に含まれる。

【表１】

酵素	プロドラッグ
カルボキシペプチダーゼG2	L-グルタミン酸およびベンゼン酸マスタード、アニリンマスタード、フェノールマスタードおよびフェニレンジアミンマスタードの誘導体、フッ素化したこれらの誘導体
アルカリホスファターゼ	エトポシドホスフェート ミトマイシンホスフェート
β-グルクロニダーゼ	p-ヒドロキシアニリンマスタード-グルクロニド エピルビシン-グルクロニド
ペニシリン-V-アミダーゼ	アドリアマイシン-Nフェノキシアセチル
ペニシリン-G-アミダーゼ	N-(4'-ヒドロキシフェニルアセチル)パリトキシン ドキソルビシンおよびメルファラン
β-ラクタマーゼ	窒素マスタード-セファロスポリン p-フェニレンジアミン;ドキソルビシン誘導体; ビンブラスチン誘導体-セファロスポリン セファロスポリンマスタード;タキソール誘導体
β-グルコシダーゼ	シアノフェニルメチル-β-D-グルコ-ピラノシド酸
ニトロリダクターゼ	5-(アザリジン-1-イル)-2,4-ジニトロベンズアミド
シトシンデアミナーゼ	5-フルオロシトシン
カルボキシペプチダーゼA	メトトレキセート-アラニン

この表はBagshawe(1995)Drug Dev.Res.34、220-230から適合させたものであり、ここからこれらのさまざまな系に関する充分な言及を得ることができ、タキソール誘導体はRodrigues、M.L.他(1995)Chemistry and Biology 2、223)中に記載されている。

【０１８０】
本発明の酵素部分の一部を形成する適切な酵素には、カルボキシペプチダーゼＧ、Ｇ１およびＧ２などのエキソペプチダーゼ（グルタミン化マスタード・プロドラッグ用）、カルボキシペプチダーゼＡおよびＢ（ＭＴＶベースのプロドラッグ用）、およびアミノペプチダーゼ（２－α－アミノシルＭＴＣプロドラッグ用）、たとえばトロンボリシンなどのエンドペプチダーゼ（トロンビン・プロドラッグ用）、ホスファターゼ（たとえばアルカリホスファターゼ）などのヒドロラーゼまたはスルファターゼ（たとえばアリールスルファターゼ）（リン酸化または硫化プロドラッグ用）、ペニシリンアミダーゼおよびアリールアシルアミダーゼなどのアミダーゼ、β－ラクタマーゼなどのラクタマーゼ、β－グルクロニダーゼ（β－グルクロノミドアントラサイクリン用）、α－ガラクトシダーゼ（アミグダリン用）およびβ－ガラクトシダーゼ（β－ガラクトースアントラサイクリン用）などのグリコシダーゼ、シトシンデアミナーゼ（５ＦＣ用）などのデアミナーゼ、ウロキナーゼおよびチミジンキナーゼ（ガンシクロフィア用）などのキナーゼ、ニトロリダクターゼなどのリダクターゼ（ＣＢ１９５４および類似体用）、アゾリダクターゼ（アゾベンゼンマスタード用）、およびＤＴ－ジアホラーゼ（ＣＢ１９５４用）、グルコースオキシダ

ーゼ（グルコース用）、キサンチンオキシダーゼ（キサンチン用）およびラクトペルオキシダーゼなどのオキシダーゼ、ＤＬ－ラセマーゼ、触媒的抗体およびシクロデキストリンがある。

【０１８１】

プロドラッグは、細胞毒性の薬剤と比べると比較的毒性がない。典型的には、プロドラッグは、適切なｉｎ ｖｉｔｒｏでの細胞毒性試験において測定される毒性の１０％未満の毒性、好ましくは１％未満の毒性を有する。

【０１８２】

プロドラッグを細胞毒性の薬剤に転換することができる部分は、化合物の残り部分から単離する際には活性がある可能性があるが、その部分は（ａ）化合物の残り部分と組み合わさっている、（ｂ）化合物が標的細胞に結合しているか、隣接しているか、あるいは標的細胞中に内在化しているときにのみ活性である必要がある。

【０１８３】

化合物のそれぞれの部分がポリペプチドであるとき、その２つの部分を、Ｏ’Ｓｕｌｌｉｖａｎ他（１９７９）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１００、１００－１０８中に概略的に記載された方法などの、ポリペプチドを架橋させる任意の従来的な方法で１つに結合させることができる。たとえば前記ＶＧＳＣ結合部分は、チオール基およびこれらのチオール基と反応することができる二機能性の薬剤と反応する他の部分、たとえばヨード酢酸のＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＨＩＡ）またはＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）を用いて富化させることができる。たとえば、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルと共に得られる、アミドまたはチオエーテル結合は、ジスルフィド結合よりもｉｎ ｖｉｖｏにおいて一般的に安定性がある。

【０１８４】

あるいは化合物は、組み換えＤＮＡ技法によって融合化合物として生成させることができ、ＤＮＡの長さ部分は、互いに隣接しているかあるいは化合物の所望の性質を害さないリンカー・ペプチドをコードしている領域によって分離されている、本発明の化合物の２つの部分をコードしている個々の領域を含んでいる。化合物の２つの部分は、完全あるいは部分的に重複している可能性があると考えられる。

【０１８５】

したがって、ＤＮＡは適切な宿主中で発現して、本発明の化合物を含むポリペプチドを生成する。

【０１８６】

細胞毒性部分は、放射線感受性増強物質であってよい。放射線感受性増強物質には、フルオロピリミジン、チミジン類似体、ヒドロキシ尿素、ゲムシタビン、フルダラビン、ニコチンアミド、ハロゲン化ピリミジン、３－アミノベンズアミド、３－アミノベンゾジアミド、エタニキサドール、ピリモニダゾールおよびミソニダゾールがある（たとえばＭｃＧｉｎｎ他（１９９６）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８８、１１９３－１１２０３；Ｓｈｅｗａｃｈ ａｎｄ Ｌａｗｒｅｎｃｅ（１９９６）Ｉｎｖｅｓｔ．Ｎｅｗ Ｄｒｕｇｓ １４、２５７－２６３；Ｈｏｒｓｍａｎ（１９９５）Ａｃｔａ ＯｎｃｏＬ ３４、５７１－５８７；Ｓｈｅｎｏｙ ａｎｄ Ｓｉｎｇｈ（１９９２）Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０、５３３－５５１；Ｍｉｔｃｈｅｌｌ他（１９８９）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｒａｄｉａｔ．Ｂｉｏｌ．５６、８２７－８３６；Ｉｌｉａｋｉｓ ａｎｄ Ｋｕｒｔｚｍａｎ（１９８９）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｒａｄｉａｔ．Ｏｎｃｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｐｈｙｓ．１６、１２３５－１２４１；Ｂｒｏｗｎ（１９８９）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｒａｄｉａｔ．Ｏｎｃｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｐｈｙｓ．１６、９８７－９９３；Ｂｒｏｗｎ（１９８５）Ｃａｎｃｅｒ ５５、２２２２－２２２８を参照のこと）。

【０１８７】

さらに、細胞への遺伝子の送達、たとえばｐ５３遺伝子またはサイクリンＤの送達によって、細胞の放射線感受性を増強させることができる（Ｌａｎｇ他（１９９８）Ｊ．Ｎｅｕ

ｒｏｓｕｒｇ．８９、１２５－１３２；Ｃｏｃｏ Ｍａｒｔｉｎ他（１９９９）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５９、１１３４－１１４０）。

【０１８８】

他の部分は、照射時に細胞毒性になるか、あるいは細胞毒性部分を放出する部分であってよい。たとえば、ホウ素－１０アイソトープは、適切に照射されると、細胞毒性であるα粒子を放出する（たとえば、Ｇｏｌｄｅｂｅｒｇへの米国特許第４，３４８，３７６号；Ｐｒｉｍｕｓ他（１９９６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．７、５３２－５３５を参照のこと）。

【０１８９】

同様に、細胞毒性部分は、フォトフリンなどの光力学的療法において有用な部分であってよい。（たとえば、Ｄｏｕｇｈｅｒｔｙ他（１９９８）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．９０、８８９－９０５を参照のこと）。

【０１９０】

他の部分は、直接的あるいは間接的に細胞毒性である核酸分子を含んでよい。たとえば核酸分子は、標的部位に局在すると、細胞に侵入し細胞の死をもたらすアンチセンス・オリゴヌクレオチドであってよい。したがってオリゴヌクレオチドは、必須遺伝子の発現を妨げるオリゴヌクレオチド、またはアポトーシスを引き起こす遺伝子発現の変化をもたらすオリゴヌクレオチドであってよい。

【０１９１】

適切なオリゴヌクレオチドの例には、ｂｃｌ－２（Ｚｉｅｇｌｅｒ他（１９９７）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８９、１０２７－１０３６）、およびＤＮＡポリメラーゼαおよびトポイソメラーゼＩＩα（Ｌｅｅ他（１９９６）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１６、１８０５－１８１１．を対象とするオリゴヌクレオチドがある。

【０１９２】

ペプチド核酸は、従来の核酸の代わりに有用である可能性がある（Ｋｎｕｄｓｅｎ ａｎｄ Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９７）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇｓ ８、１１３－１１８を参照のこと）。

【０１９３】

他の実施形態では結合部分は、標的に核酸、たとえば本発明の前述の態様に関連して論じた核酸を送達するための、送達媒体中に含まれていてよい。送達媒体は任意の適切な送達媒体であってよい。たとえば送達媒体は核酸を含むリポソームであるか、あるいはそれは、核酸を送達することができるウイルスまたはウイルス様の粒子であってよい。これらの場合、前記ＶＧＳＣに選択的に結合する部分は、典型的には送達媒体の表面に存在する。たとえば、適切な抗体断片などの、前記ＶＧＳＣに選択的に結合する部分は、リポソームの外側表面に存在する可能性があり、送達される核酸はリポソームの内側に存在する可能性がある。他の例として、レトロウイルスまたはアデノウイルス・ベクターなどのウイルス・ベクターを工学処理し、その結果、前記ＶＧＳＣに選択的に結合する部分が、ウイルス粒子の表面に結合するかあるいはそこに局在し、これによってウイルス粒子を所望の部位に向けることができる。前で論じた改変型アデノウイルス系などの、標的送達系も知られている。

【０１９４】

前記ＶＧＳＣに選択的に結合する部分が抗体である、免疫リポソーム（抗体に向けられるリポソーム）を使用することができる。免疫リポソームの調製は、前に記載したとおりである。

【０１９５】

標的部位に送達される核酸は、直接的あるいは間接的に細胞毒性をもたらす任意の適切なＤＮＡであってよい。たとえば、核酸は細胞に対して細胞毒性であるリボザイムをコードすることができ、あるいは核酸は、ほとんど毒性のないプロドラッグを細胞毒性の薬剤に転換することができる酵素をコードすることができる（この後者の系はＧＤＥＰＴ：Ｇｅｎｅ Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｅｎｚｙｍｅ Ｐｒｏｄｒｕｇ Ｔｈｅｒａｐｙと呼ばれることも

ある）。
【０１９６】
標的に送達される核酸中にコードすることができるリボザイムは、前に引用した参照文献中に記載されている。リボザイム用の適切な標的には、ｃ－ｆｏｓおよびｃ－ｍｙｃ、およびｂｃｌ－２などの転写因子がある。Ｄｕｒａｉ他（１９９７）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１７、３３０７－３３１２は、ｂｃｌ－２に対するハンマーヘッド型のリボザイムを記載している。
【０１９７】
ＥＰ０４１５７３１はＧＤＥＰＴ系を記載している。酵素およびプロドラッグの選択に関する同様の考察が、前に記載したＡＤＥＰＴ系へと同じくＧＤＥＰＴ系へ適用される。
【０１９８】
標的部位に送達される核酸は、直接的に細胞毒性であるポリペプチドをコードすることができる。
【０１９９】
本発明の他の実施形態では、本発明の化合物中に含まれる他の部分は、容易に検出可能な部分である。
【０２００】
「容易に検出可能な部分」によって、この部分は、患者に本発明の化合物を投与した後に標的部位に位置するとき、身体および標的が位置する部位の外側から非侵襲的に検出することができる部分であるという意味が含まれる。したがって、本発明のこの実施形態の化合物は、画像化および診断において有用である。
【０２０１】
典型的には、容易に検出可能な部分は、画像化において有用な放射活性原子であるか、あるいはこれを含む。適切な放射活性原子には、シンチグラフ研究用のテクネチウム－９９ｍまたはヨウ素－１２３がある。他の容易に検出可能な部分には、たとえばここでもヨウ素－１２３、およびヨウ素－１３１、インジウム１１１、フッ素－１９、炭素－１３、窒素－１５、酸素－１７、カドリニウム、マンガンまたは鉄などの磁気共鳴像（ＭＲＩ）用のスピン標識体がある。本発明の化合物は、分子が容易に検出可能であるために、充分な適切な原子のアイソトープを有していなければならないことは明らかである。
【０２０２】
放射性または他の標識体は、知られている方法で本発明の化合物中に取り込ませることができる。たとえば結合部分がポリペプチドである場合、それを生合成することができるか、あるいはたとえば水素の代わりにフッ素－１９を含む適切なアミノ酸前駆体を使用して、化学的なアミノ酸合成によって合成することができる。^{99m}Ｔｃ、^{123}Ｉ、^{186}Ｒｈ、^{188}Ｒｈおよび^{111}Ｉｎなどの標識体は、たとえば結合部分中のシステイン残基を介して結合することができる。イットリウム－９０は、リシン残基を介して結合することができる。ＩＯＤＯＧＥＮ法（Ｆｒａｋｅｒ他（１９７８）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．８０、４９－５７）を使用して、ヨウ素－１２３を取り込ませることができる。参照文献（「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｓｃｉｎｔｉｇｒａｐｈｙ」Ｊ－Ｆ Ｃｈａｔａｌ、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ．、１９８９）は、他の方法を詳細に記載している。
【０２０３】
本発明の他の実施形態では、他の部分は、直接的あるいは間接的に細胞毒性である部分、または容易に検出可能な部分に選択的に結合することができる。したがって、この実施形態では他の部分は、細胞毒性あるいは容易に検出可能である他の化合物または部分に結合する任意の部分であってよい。
【０２０４】
したがって他の部分は、他の化合物または部分に選択的に結合する抗体であるか、あるいはそれは、ストレプトアビジンまたはビオチンなどの、何か他の結合部分であってよい。以下の例では、本発明中に含まれる分子のタイプを例示し、他のこのような分子は、本明

細書の教示から容易に明らかである。

【０２０５】

二重特異性抗体であって、１つの結合部位が前記ＶＧＳＣに選択的に結合する部分を含み、第２の結合部位が、たとえばほとんど毒性のないプロドラッグを細胞毒性の薬剤に転換することができる酵素に結合する部分を含む抗体。

【０２０６】

化合物は、ビオチンが結合する前記ＶＧＳＣに選択的に結合する抗体であってよい。容易に検出可能な標識体で標識されているアビジンまたはストレプトアビジンは、二相画像系においてビオチン標識された抗体と共に使用することができ、最初にビオチン標識された抗体を患者中の標的部位に局在させ、次いで標識されたアビジンまたはストレプトアビジンを患者に投与する。二重特異性抗体およびビオチン／ストレプトアビジン（アビジン）系は、Ｒｏｓｅｂｒｏｕｇｈ（１９９６）Ｑ Ｊ Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４４、２３４－２５１によって概説されている。

【０２０７】

本発明の好ましい実施形態では、前記ＶＧＳＣに選択的に結合する部分および他の部分は、縮重したポリペプチドである。

【０２０８】

本発明の他の態様は、本発明の前述の態様の化合物をコードしている核酸分子を含む。

【０２０９】

本発明の他の態様では、医療において使用するための本発明の化合物を提供する。典型的には化合物は、患者に使用するための薬剤として、または画像化剤として、あるいは診断剤として、パッケージングおよび提示される。

【０２１０】

本発明の他の態様では、本発明の化合物および製薬上許容される担体を含む薬剤組成物を提供する。

【０２１１】

典型的には、本発明の薬剤組成物または調合物は非経口投与用、より詳細には静脈内投与用のものである。

【０２１２】

非経口投与に適した調合物には、調合物を目的とするレシピエントの血液と等張にする、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬および溶質を含むことができる水性および非水性の滅菌した注射用溶液、懸濁剤および増粘剤を含むことができる水性および非水性の滅菌した懸濁溶液がある。

【０２１３】

本発明の他の態様では、癌を有しているかあるいは癌の危険があるヒト患者を治療および／または診断するための薬剤の製造における、本発明の化合物の使用を提供する。

【０２１４】

本発明の他の態様は、癌を治療する方法であって、本発明の化合物をヒト患者に有効量投与することを含み、かつ化合物の他の部分が患者に対して直接的または間接的に治療上有益である部分であることを含む方法を含む。

【０２１５】

本発明の他の態様は、ヒト患者中の癌を画像化するための方法（この方法はヒト患者の癌に対する感受性を判定する際に、あるいはヒト患者の癌を診断するのに、あるいは癌の個々の結果の関連のある見通しを予測するのに有用である可能性がある）であって、本発明の化合物を患者に有効量投与することを含み、かつ化合物の他の部分が容易に検出可能な部分であることを含む方法を含む。

【０２１６】

治療、画像化または診断において使用する個々の化合物に応じて、投与の時間が変わる可能性があり、本明細書で開示する療法系において使用する他の部分の数が変わる可能性があることは容易に理解されるだろう。

【０２１７】
たとえば、本発明の化合物が容易に検出可能な部分または直接的に細胞毒性である部分を含む場合、適切な調合の化合物のみを、患者に投与することが可能である。当然ながら、免疫抑制剤などの他の薬剤を投与することができる。
【０２１８】
検出可能に標識した化合物に関しては、ひとたび化合物が標的部位に局在化した後に、画像化が起こる。
【０２１９】
しかしながら化合物が、治療、画像化または診断に有用であるために他の部分を必要とする化合物である場合は、本発明の化合物を投与し、標的部位に局在化させ、次いで他の部分をその後の適切な時間に投与することができる。
【０２２０】
たとえば、前述のＡＤＥＰＴおよびＡＤＥＰＴ様の系に関しては、結合部分－酵素部分の化合物を投与し、標的部位に局在化させる。ひとたびこれが行われた後に、プロドラッグを投与する。
【０２２１】
同様に、たとえば化合物中に含まれる他の部分がその他の部分と結合する部分である化合物に関しては、最初にこの化合物を投与し、標的部位に局在化させ、その後他の部分を投与する。
【０２２２】
したがって一実施形態では、ビオチン標識した抗ｈＮｅ－Ｎａ抗体を患者に投与し、適切な時間の後、検出可能に標識したストレプトアビジンを投与する。ひとたびストレプトアビジンが抗体が局在化した部位（すなわち標的部位）に局在化した後に、画像化が起こる。
【０２２３】
他の部分が容易に検出可能な部分である本発明の化合物は、癌細胞の転移状態を決定する際に有用である可能性があると考えられる。これは、将来の療法の性質および結果に影響を与える、重要な因子である可能性がある。
【０２２４】
本発明の他の態様では、（１）本発明の化合物であって、他の部分が比較的毒性のないプロドラッグを細胞毒性の薬剤に転換することができる細胞毒性部分である化合物、および（２）比較的毒性のないプロドラッグを含むパーツのキット（すなわち療法系）を提供する。このパーツのキットは、本明細書に記載した任意の本発明の化合物および適切なプロドラッグを含んでよい。
【０２２５】
本発明の他の態様では、（１）本発明の化合物であって、他の部分が直接的または間接的細胞毒性部分または容易に検出可能な部分に選択的に結合することができる部分である化合物、および（２）化合物の他の部分が結合することができる、直接的または間接的細胞毒性部分または容易に検出可能な部分のいずれか１つを含むパーツのキット（すなわち療法系）を提供する。
【０２２６】
たとえば、このパーツのキットは、前に定義したビオチンで標識した抗ｈＮｅ－Ｎａ抗体、および容易に検出可能な標識体で標識したストレプトアビジンを含んでよい。
【０２２７】
【実施例】
実施例１：ラットおよびヒトの前立腺癌細胞系における、電位依存性Na^+チャネルのα－サブユニットの遺伝子の発現の概略：転移性が高いラットおよびヒトの前立腺癌細胞系における、ＰＮ１／ｈＮｅ－Ｎａタイプの電位依存性Na^+チャネルおよびサブユニットの優性発現
電位依存性Na^+チャネル（ＶＧＳＣ）はさまざまな細胞活動を制御しており、それらの

機能不全は、前立腺癌の転移を含めたいくつかの病体生理学的条件と関係している。ＶＧＳＣは多様なサブユニットの集合体として生じる可能性があるが、α－サブユニット（ＶＧＳＣα）のみが機能的チャネルをコードすることができる。我々は、２つの新しい逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）法、縮重プライマー・スクリーニング法および新規の半定量ＰＣＲ技法を開発した。これらの方法によって、転移の可能性が著しく異なるラット（ＭＡＴ－ＬｙＬｕ／ＡＴ－２）およびヒト（ＰＣ－３／ＬＮＣａＰ）前立腺癌細胞中の、ＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現の詳細な定性および定量調査が可能になり、非常に首尾一貫した結果を生み出した。転移性の高い細胞（ＭＡＴ－ＬｙＬｕおよびＰＣ－３）のみが、機能的ＶＧＳＣ活性を有することは以前に示された。ＶＧＳＣα縮重プライマーＰＣＲスクリーニング法によって、８個の異なるＶＧＳＣα遺伝子：ＳＣＮ１Ａ－４Ａ、ＳＣＮ７Ａ－９ＡおよびＳＣＮ１１Ａを同定した。特異的なプライマーのＰＣＲによって、大部分のＶＧＳＣαは、機能的および非機能的（充分に切断された）タンパク質をコードしていると思われる、多様な接合変異体として発現されることを実証した。半定量ＰＣＲ（ＳＱＴ－ＰＣＲ）の結果は、転移性の低い細胞（ＡＴ－２／ＬＮＣａＰ）中で起こるＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現の基礎レベルと一致し、このレベルは転移の可能性が高い細胞（ＭＡＴ－ＬｙＬｕ／ＰＣ－３）中では非常に高かった。ＳＣＮ９Ａ遺伝子（ＰＮ１／ｈＮｅ－Ｎａとも呼ばれる）の発現の特異的な著しい増大は、ラットおよびヒト細胞中のＶＧＳＣαのｍＲＮＡのレベルの、この上昇が主たる原因であった。したがってＳＣＮ９Ａは、検出される機能的ＶＧＳＣの主な源である可能性が高い。

【０２２８】

略語：ＶＧＳＣ、電位依存性Na^+チャネル；ＶＧＳＣα、電位依存性Na^+チャネルα－サブユニット；ＶＧＳＣβ、電位依存性Na^+チャネルβ－サブユニット；ＤＲＧ、背根神経節；ＲＴ－ＰＣＲ、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応；Ｓ、膜内外断片；Ｄ、膜内外ドメイン；ＩＤ、内部ドメイン；ＴＴＸ、テトロドトキシン；ｓｓｃＤＮＡ、一本鎖ｃＤＮＡ；Ｒ６、ランダム・ヘキサマー・プライマー；ｎｔ、ヌクレオチド；ＳＱＴ－ＦＣＲ、半定量ポリメラーゼ連鎖反応；ＴＢＥ、トリズマーホウ酸（塩）－ＥＤＴＡ緩衝液；$Cytb_5R$、ＮＡＤＨ－シトクロームｂ５リダクターゼ；ＮＧＦ、神経増殖因子。

【０２２９】

背景

電位依存性Na^+チャネル（ＶＧＳＣ）[1]は、大きな（２４０ｋＤ以上）４つの膜内外ドメインのα－サブユニット（ＶＧＳＣα）、および２つまでの異なる補助β－サブユニット（ＶＧＳＣβ）から構成される、大きな膜に広がる糖タンパク質である（１）。ＶＧＳＣα単独の発現は、機能的チャネルを形成するのに充分である（２）。ＶＧＳＣβは、機能的チャネルの利用性を容易にする（３）、チャネルの動態を制御する（４、５）、およびおそらく薬理学的特性さえ変える（６）などの、いくつかの支持的役割を果たす。

【０２３０】

ＶＧＳＣαは、ＳＣＮ１ＡからＳＣＮ１１Ａで示される、高等脊椎動物（７）中の少なくとも１１個の異なる遺伝子のファミリーを構成する。これらの産物は、さまざまな興奮性の細胞タイプからクローン化している。ＶＧＳＣα遺伝子の少なくとも２つのサブファミリー、Na_V1およびNa_V2が、配列データに基づいて記載されている（８）。まだ実験的によって決定されたわけではないが、これらのサブファミリーは、著しく異なる電気生理学的性質を有するＶＧＳＣαであると一般的に考えられる（９）。実際、Na_V2ＶＧＳＣα中の境界のＶＧＳＣα配列が保存されていないことによって、これらは電位依存性あるいはNa^+選択的でない可能性があることが暗示される（９、１０）。第３のサブファミリー、Na_V3の存在、およびラットの背根神経節（ＤＲＧ）細胞からのｃＤＮＡ（ＮａＮ／ＳＮＳ２）のクローン化が、最近明示されている。ＮａＮ／ＳＮＳ２は他のＶＧＳＣαと５０％未満の配列相同性を共有しており、その演繹アミノ酸配列は、Na_V1ＶＧＳＣαのすべての特徴的な配列を有している（１１）。

【０２３１】

ＲＴ－ＰＣＲおよびｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション法を使用することによって、

いくつかの研究は、多様な細胞タイプ中での多様なＶＧＳＣαの同時発現を文書化している（１２－１４）。特定のＶＧＳＣαが、異なるレベルで発現されること、および動的制御下（たとえば、発生または損傷中）での発現が分かっている。たとえば、少なくとも８個の異なるＶＧＳＣαのｍＲＮＡが成体ラットのＤＲＧ細胞中で見られ、その発現レベルは広範囲でありＲＢ１、Ｎａ６、ＮａＮ／ＳＮＳ２およびＳＣＬ－１１のｍＲＮＡｓは非常に高いレベルで発現され、ＰＮ１およびＳＮＳ／ＰＮ３は中間レベルであり、ＲＢ２およびＲＢ３は非常に低いレベルであった（１１、１５、１６）。軸策損傷後に、ＳＮＳおよびＮａＮ／ＳＮＳ２のｍＲＮＡは劇的に下方制御され、一方ＲＢ１、ＲＢ２およびＲＢ３の発現は上方制御された（１７、１８）。

【０２３２】

ＶＧＳＣαの遺伝子は、いくつかの可変スプライシングされたイソ形として生じる可能性があり、その発現も動的制御下にある。第１の膜内外ドメイン（Ｄ１）の第３の断片（Ｓ３）をコードしているエクソンの可変スプライシングは、ＳＣＮ２ＡおよびＳＣＮ３Ａについては発生的に調節されており（１９、２０）、これによって「新生児」および「成体」形が生み出される。これらは、１つのアミノ酸のみが異なるタンパク質をコードしており、Ｓ３の最も細胞外の端に位置している。ＶＧＳＣαの機能に対するこの変化の影響は、現在明らかではない。類似の可変スプライシングされたエクソンが、ＳＣＮ８ＡおよびＳＣＮ９Ａ（２１、２２）中の対応する位置に存在するが、ＳＣＮ４Ａ、ＳＣＮ５Ａ、ＳＣＮ１０ＡおよびＳＣＮ１１Ａ（２３－２６）中には存在しない。今日まで、このような可変スプライシングの物証は、ＳＣＮ１ＡまたはＳＣＮ７Ａについては発見されていない。

【０２３３】

可変スプライシングは、ＶＧＳＣαの他の領域、特に内部ドメイン（ＩＤ）１－２およびＤ３中でも起こる。

【０２３４】

利用可能なＶＧＳＣαのｍＲＮＡプール中で、異なる組織のタイプ間で、さらに発生またはその後の損傷中に、多様なＶＧＳＣαの遺伝子および接合産物の発現を厳格に調節することにより（たとえば１７、１８、２７）、異なるＶＧＳＣαの遺伝子産物およびそれらのイソ形が大幅に異なる機能的役割を有している可能性があることが示唆されると思われるが、現在このことは大部分が知られていない。

【０２３５】

ＶＧＳＣαの機能的役割は、ＶＧＳＣの活動が標的特異的な軸策を通した移動および局所のシナプス結合（２８－３０）を含めて、基本的な衝撃の生成および伝導だけでなく指向的でパターン化された増殖も調節する、中央神経系において最もよく理解される。ＶＧＳＣｓは、興奮性組織（７、３１）のいくつかの遺伝性疾患、および慢性的な痛みの症候群（３２）、てんかん（３３）、虚血による発作（３４）およびアルツハイマー病（３５）を含めた、より複雑な病的障害とも関係している。ＶＧＳＣの発現は、前立腺癌のラット（ＭＡＴ－ＬｙＬｕ）およびヒト（ＰＣ－３）モデル中（３６－３８）で転移の可能性が高いこととも関連している、ますます多くの物証が存在している。実際、機能的ＶＧＳＣの発現は、転移プロセスに対して直接的でポジティブな影響を与える可能性がある。したがって、テトロドトキシン（ＴＴＸ）を多量に（３０％まで）施用することによって、これらの転移性の高い細胞系中でのＶＧＳの電流を遮断することによって、細胞の侵襲の可能性が下がった。ラット中の電流の電気生理学および薬理学的性質は、神経性で、ＴＴＸ感受性（Na_V1）タイプ（３９）のチャネルと一致した。ＳＣＮ４Ａ遺伝子の発現は、ヒトおよびラットの転移性の高い細胞系と転移性の低い細胞系の両方において見られた（４０）。しかしながら、ラットＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞中のＶＧＳの電流の薬理学的性質は、このＶＧＳＣαについて報告された性質と一致しなかった。このことは、（１）ＭＡＴ－ＬｙＬｕ／ＡＴ－２ ｒＳｋＭｌの主要配列で決定された多数の相違点、（２）これらの細胞中の転写後機構の違い（たとえば、補助サブユニットとの結合、チャネルのグリコシル化／リン酸化）、または（３）記録されるＶＧＳの電流を生み出すＭＡＴ－ＬｙＬｕ

細胞中の他のＶＧＳＣαの存在に原因がある可能性がある。

【０２３６】

本研究では、比較定量的なＲＴ－ＰＣＲ手法を使用して、転移性の高い前立腺癌細胞（ＭＡＴ－ＬｙＬｕおよびＰＣ－３）および転移性の低い前立腺癌細胞（ＡＴ－２およびＬＮＣａＰ）中での、他のＶＧＳＣαのｍＲＮＡの発現を決定するために、我々は作業を拡大している。

【０２３７】

実験手順

細胞の培養　ＭＡＴ－ＬｙＬｕ、ＡＴ－２、ＬＮＣａＰおよびＰＣ－３細胞系を、前に記載したように培養し採取した（３６、３７）。

【０２３８】

ＲＮＡの抽出　これは（４１）と同様に、あるいは以下に記載したように行った。簡潔には、組織０．１ｇ当たり溶液１ｍｌを使用するように、ＩＫＡホモジェナーザーを使用して、細胞を溶液（「Ａ」）中で均質にした。溶液Ａは、４Ｍのグアニジニウムチオシアン酸塩、２５ｍＭのクエン酸$Ｎａ^{+}$（ｐＨ７．０）、０．５％のサルコシルおよび０．７２％（ｖ／ｖ）のβ－メルカプトエタノールを含んでいた。次いで以下のもの、２Ｍの酢酸$Ｎａ^{+}$、ｐＨ４．０（溶液Ａの１０％の体積）、フェノール（溶液Ａと同体積）およびクロロホルム（溶液Ａの２０％の体積）を加え、１０秒間激しく攪拌した。４℃において２０分間１０，０００ｘｇで、遠心分離を行った。その上澄みを採取し、イソプロパノールを用いて沈殿させた。次いで、前と同様にサンプルを遠心分離し、溶液Ａの最初の体積の約３０％中に、ペレットを再懸濁させた。第２回目のイソプロパノール沈殿を行い、ペレットを７５％エタノールで洗浄し、滅菌した蒸留水中で再懸濁させた。

【０２３９】

３つの異なるＲＮＡ抽出物を、それぞれのラット細胞系の３つの異なる細胞バッチから得て（ＭＬＬ．１、ＭＬＬ．２、ＭＬＬ．３、ＡＴ．１、ＡＴ．２、ＡＴ．４と名づけた）、ヒト細胞系の２つの異なる細胞バッチから２つの抽出物を得た（ＰＣ．１、ＰＣ．２、ＬＮ．１、ＬＮ．２と名づけた）。

【０２４０】

ＶＧＳＣαの縮重プライマーのスクリーニング　知られているすべてのＶＧＳＣαを増幅することができるＰＣＲ戦略を、増幅するため、さらにその後クローン化および配列決定によって、前立腺癌細胞系中で発現されているすべてのＶＧＳＣαを同定するために使用した。最初の配列決定の結果に従って、特異的なＶＧＳＣαのプライマーを使用して、それぞれの細胞系に由来する多数のＶＧＳＣαクローンの迅速なＰＣＲスクリーニングを可能にした。

【０２４１】

簡潔には、ＤＮａｓｅ　Ｉを用いた消化によって抽出物からＤＮＡを除去し、合計５μｇＲＮＡを一本鎖ｃＤＮＡ（ｓｓｃＤＮＡ）合成用の鋳型として使用した。（Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ、ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ）。最終体積２０μｌ中でランダムなヘキサマー混合体（Ｒ６）を用いて、ｓｓｃＤＮＡ合成を刺激した。次いでＶＧＳＣαのｃＤＮＡを、成体ラットの網膜色素上皮細胞（４２）から$Ｎａ_{Ｖ}１$および$Ｎａ_{Ｖ}２$のＶＧＳＣα、および原索動物であるホヤ類（４３）から新規のＶＧＳＣαを増幅させるために、前に使用した縮重ＰＣＲプライマー（ＹＪＩおよびＹＪ２Ｃ）を使用し、ＰＣＲ（Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ）によってＲ６－ｓｓｃＤＮＡのプールから増幅した。ＰＣＲ反応は、最終体積２０μｌ中で２００μＭのそれぞれのｄＮＴＰ、１単位のＴａｑ、１ｘＴａｑ緩衝液、および１μＭのそれぞれのプライマーを使用して、４μｌのＲ６－ｓｓｃＤＮＡ鋳型に行った。増幅は（ｉ）最初に９４℃で５分間変性させること、（ｉｉ）１Ｕの酵素を加えること、（ｉｉｉ）９４℃で１分間３３－３５サイクルの変性を行い、４０℃で１分間アニーリングを行い、７２℃で１分間延長を行い、さらに（ｉｖ）７２℃で１０分間延長を行うことによって行った。このＰＣＲおよび行ったすべてのＰＣＲについて、他のＤＮＡ源からの交差汚染を制御するためにｓｓｃＤＮＡ

を加えない反応も行った。

【０２４２】

ｐＧＥＭ－Ｔベクター（ｐＧＥＭ－Ｔ Ｅａｓｙ Ｖｅｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍ、Ｐｒｏｍｅｇａ）への連結の前に、電気泳動および精製したゲルによってＰＣＲ産物を分析した。次いでこれらを使用して、大腸菌を形質転換した（ｐＭｏｓＢｌｕｅ、Ａｍｅｒｓｈａｍ）。プラスミドＤＮＡを、Ｖｉｓｔｒａ Ｌａｂｓｔａｔｉｏｎの６２５分調製手順（Ｖｉｓｔｒａ ＤＮＡ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ａｍｅｒｓｈａｍ）の改変型を使用して、細菌の培養物から回収した。５０個のクローンおよび「挿入体」を、それぞれの１０個のＲＮＡ抽出物をゲル電気泳動することによって明確に選択した。Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｅｑｕｅｎａｓｅの蛍光サイクル配列決定キットおよびＶｉｓｔｒａ ＤＮＡ ７２５自動型配列決定装置（Ａｍｅｒｓｈａｍ．Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用して行った、それぞれのスクリーニングからの約１０個のクローンのサブセットのＤＮＡを配列決定した後に、スクリーニング中に発見され、一般的なベクター・プライマーと共に使用される最も多量のＶＧＳＣα用に、特異的なＰＣＲプライマーを設計し、広範囲の配列決定を必要としないクローンの迅速なＰＣスクリーニングを可能にした。これらのプライマーは、それぞれＰＮ１（５８℃）、ＳＣＬ－１１（５０℃）、ＲＢ１（４６℃）、ｒＳｋＭ１（６４℃）、ｈＮｅ－Ｎａ（５４℃）、ＨＢ２（５６℃）およびｈＮａ６（５４℃）ＶＧＳＣαの、ヌクレオチド（ｎｔ）４１１８－４１３７、３４０６－３４２５、４４４１－４４６０、４０６６－４０８５、４１３９－４１５８、４２６５－４２８４および４３２５－４３４４に対応した（番号付けはＧｅｎＢａｎｋに従うものであり、使用した反応のアニーリング温度は丸括弧中に示した）。これらのプライマーを、配列決定したクローンで試験して、これらが特異的な産物のみを生成することを確認した。これらのＶＧＳＣαについての試験で明確ではなかったクローンは、配列決定によって同定した。所定のＶＧＳＣαを表すクローンのパーセンテージを（それぞれのスクリーニングにおける５０個のクローンから）平均化した。データは、平均値±標準誤差で表した。

【０２４３】

ＶＧＳＣα特異的なＰＣＲ試験　２つの縮重プライマー間の領域は、研究したＶＧＳＣαの遺伝子（２２－２５）中に保存されたイントロン部位を含んでいない。したがって、保存されたＶＧＳＣαの遺伝子のイントロン部位中でＰＣＲを行って、スクリーニング中に発見されたＶＧＳＣαが、汚染しているゲノムＤＮＡから増幅しなかったことを確認した。さらに、縮重プライマーのスクリーニング中に発見されたいくつかのＶＧＳＣαは（特にＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ３Ａ、ＳＣＮ８ＡおよびＳＣＮ９Ａ）、多数の接合形で存在することが発見されている。したがって、特異的な２０量体プライマーを設計して、Ｄ１：Ｓ２とＤ１：Ｓ５／Ｓ６の間の保存されたイントロンに広がる産物を増幅させ、ＳＣＮ２Ａ（ラットおよびヒト）、ＳＣＮ３Ａ（ヒト）、およびＳＣＮ９Ａ（ラットおよびヒト）の発現した接合形の同定を可能にし、ゲノムＤＮの汚染を制御する。ｈＮａ６（ＳＣＮ８Ａ）およびＮａＮ／ＳＮＳ２（ＳＣＮ１１Ａ）のプライマーをＤ３のために設計したが、しかしながらこの場合、Ｄ１：Ｓ３用のプライマーの同様の可変スプライシングがｈＮａ６ ＶＧＳＣα中で起こる（２２、４４）。反応によって、それぞれＰＮｌ（６０℃）、ＳＣＬ－１１（５８℃）、ＲＢ１（５８℃）、ＲＢ２（５９℃）、ｒＳｋＭ１（５８℃）、ＮａＮ／ＳＮＳ２（５８℃）、ｈＮｅ－Ｎａ（５９℃）、ｈＮａ６（６０℃）、ＨＢ２（５８℃）およびＨＢ３（６０℃）の、４２４－８４７、３８６－８７９、６８４－１１６０、６３２－１１２９、８７０－１３４７、３３５３－３６７４、４７４－８６２、３８５５－４３７０、５１２－１０２４、４９３－８９７に対応するヌクレオチドを増幅させた。

【０２４４】

２．５μｌのＲ６－ｓｓｃＤＮＡ混合物および０．５μＭのそれぞれのプライマーを使用して、３０－３５回のサイクルで、前述のように反応を行った。これらのＶＧＳＣαが以前にスクリーニング中に発見されたかどうかに関係なく、転移性の高い細胞系と転移性の低い細胞系の両方に、ＰＣＲを行った。観察した産物をクローン化および配列決定し、そ

れぞれの細胞系中のそれぞれのＶＧＳＣαのコンセンサス配列を次いで生成させた（それぞれ異なるＲＮＡ抽出物に由来する少なくとも３つのクローンを使用した）。ＲＢ２、ＨＢ２、ＨＢ３、ＰＮ１およびｈＮｅ－Ｎａについては、それぞれの細胞系の抽出物からの少なくとも４つのクローンを、それぞれ４９８ｎｔ、５１３ｎｔ、４０５ｎｔ、４２４ｎｔおよび３８９ｎｔのＰＣＲ産物について、配列決定した（図２に示した）。

【０２４５】

半定量ＰＣＲ（ＳＱＴ－ＰＣＲ）　８つのＤＮａｓｅｄ　ＲＮＡ抽出物（それぞれの細胞系の２つの抽出物）を使用して、それぞれの抽出物について３組のＲ６－ｓｓｃＤＮＡｓを生成させた。２．４μｌのこれらのＲ６－ｓｓｃＤＮＡｓを、６０μｌの最終体積中で、ＶＧＳＣα特異的ＰＣＲ（前と同様に行った）用の鋳型として使用した。転移性の高い細胞系と転移性の低い細胞系から得た結果を直接比較することを可能にするために、すべての比較可能なＲ６－ｓｓｃＤＮＡｓの反応およびＰＣＲ反応を同時に行った。

【０２４６】

動態観察手法（４５；Ｈｏｏｆ他（１９９１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９６、１６１－１６９Ｗｉｅｓｎｅｒ他（１９９２）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１８３、５５３－５５９）を採用して、６０μｌからの５μｌの反応混合物のアリコートをそれぞれの増幅サイクル、１１サイクルの終期に採取し、一方で反応混合物は７２℃に保った。アリコートを最初に採取した増幅サイクルは、研究対象のＶＧＳＣαに応じて変えた。次いでこれらのアリコートを、知られている濃度のＤＮＡマーカーを用いて、電気泳動（０．８％アガロース・ゲル）にかけた。ゲルを１５分間後染色し（臭化エチジウム０．８μｇ／ｍｌを含むＴＢＥ緩衝液）、デジタル方式で画像化した（ＧＤＳ７５００ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｇｅｌ Ｄｏｃｕｍｅｎｔａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ、Ｕｌｔｒａ－Ｖｉｏｌｅｔ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）。それぞれのアリコートの生成物の合計質量（ナノグラム）を、画像分析（１Ｄ Ｉｍａｇｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｋｏｄａｋ Ｄｉｇｉｔａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ、ＮＹ）によって決定した。それぞれのＰＣＲ反応の２つの特徴的な段階を定量化した：

（１）画像解析ソフトウェア（デフォルト設定）を使用することによって、所定のＰＣＲ産物をちょうど検出することができた、閾値ＰＣＲサイクル数（CN_t）。

（２）反応の対数増殖期が終了したＰＣＲサイクル数（CN_e）。

【０２４７】

ＰＣＲサイクル数の増加による反応生成物の累積は、Ｓ字曲線（４５）をたどる。しかしながら、ＳＱＴ－ＰＣＲデータに関するこの曲線の２つの極値は、知られておらず決定されていない（すなわち、ゼロ・サイクルでのｃＤＮＡの最初の質量が知られておらず、ＰＣＲの終期の最終生成物の質量が決定されていない）。したがって、Ｓ字曲線をデータに適合させることができなかった。その代わりに、これもまたただ１つの変曲の予想点（ここではＰＣＲの対数増殖期の終期に対応する）を有する、三次の多項式を使用して、Ｓ字曲線を近似した。曲線の適合化はＳＴＡＴＩＳＴＩＣＡ（ＳｏｆｔＳｔａｔ Ｉｎｃ．、Ｔｕｌｓａ、ＯＫ）を使用して行い、次いで二次微分係数を計算して、CN_eを得た。この手順は首尾よく行うことができ、CN_eの計算値は実験によって得られたデータ・ポイントの範囲内であった（図１）。データは、それぞれの細胞系について平均値＋標準誤差で表した（それぞれのＶＧＳＣαの２つの抽出物に３回繰り返した）。CN_tおよびCN_eの値を直接使用して、転移性の高い細胞系と転移性の低い細胞系における、それぞれのＶＧＳＣαの発現のレベルを比較した。

【０２４８】

多数の組織タイプ（４６、４７）に由来する、正常な細胞、癌性細胞および転移性の高い細胞において非常に似たレベルで発現される、ＮＡＤＨ－シトクロームｂ５リダクターゼ（$Cytb_5R$）は、ラットおよびヒトの縮重プライマーのスクリーニングで、発見された非特異的産物（非ＶＧＳＣαクローン）の主部分として存在した。したがってこれを、ＳＱＴ－ＰＣＲにおけるコントロールの増幅産物として使用した。$Cytb_5R$ ２０量体プライマーによって、ラットおよびヒト相同体のヌクレオチド３８５－８０９および２

９９－７９０がそれぞれ増幅された（両方共にアニーリング温度は６０℃）。

【０２４９】

ＰＮ１、ｈＮｅ－Ｎａ、ＲＢ２、ＨＢ２、ｈＮａ６およびＨＢ３の特異的ＰＣＲによって多様なＶＧＳＣα産物を生成し、可変スプライシングのために、ＶＧＳＣαの発現のレベルを決定することがより難しくなった。これらのＶＧＳＣαの単独の産物を得るために、新しい２０量体プライマーを使用して異なるＰＣＲを行い、これによって、それぞれＰＮ１（６０℃）、ＲＢ２（６０℃）、ｈＮｅ－Ｎａ（５６℃）、ｈＮａ６（６０℃）、ＨＢ２（５８℃）およびＨＢ３（５９℃）のヌクレオチド２０－３４５、１７２－５４４、５９４１－６３０８、３８２７－４３４４、５９１４－６２７０、１５９４－１８７５を増幅させた。ｈＮｅ－Ｎａ、ｈＮａ６、ＨＢ２およびＨＢ３の産物は保存されたイントロン部位には広がらず、したがって、逆転写酵素を加えていない逆転写反応からのアリコートでｓｓｃＤＮＡの鋳型を置換した、コントロールのＰＣＲ反応を行った。産物はすべて、クローン化および配列決定した。

【０２５０】

２つの追加的な２０量体プライマー（「新生児の」：ｎｔ５００－５１９、ＧｅｎＢａｎｋ番号および「成体」：ｎｔ３９９６－４０１５）を使用して、前立腺癌細胞中におけるｈＮａ６の新生児および成体接合形の相対的な発現のレベルを決定した。ＶＧＳＣα特異的ＰＣＲ試験用に使用する３’ｈＮａ６特異的プライマーと共に、ＰＣ－３およびＬＮＣａＰ細胞のただ１つのＲＮＡ抽出物に、反応を行った（「新生児の」アニーリング温度、５８℃、「成体」ＰＣＲ、５７℃）。

【０２５１】

ＧｅｎＢａｎｋの配列ヌクレオチド番号　ヌクレオチド番号は、ＰＮ１、ＳＣＬ－１１、ＲＢ１、ＲＢ２、ｒＳｋＭ１、ＮａＮ／ＳＮＳ２、ｈＮｅ－Ｎａ、ｈＮａ６、ｈＮａ６「新生児」、ＨＢ２、ＨＢ３、ｒＣｙｔｂ$_5$ＲおよびｈＣｙｔｂ$_5$Ｒについてそれぞれ、受託番号Ｕ７９５６８、Ｙ０３６３９、Ｘ０３６３８、Ｘ０３６３９、Ｙ１７１５３、ＡＦ０５９０３０、Ｘ８２８３５、ＡＢ０２７５６７、ＡＦ０５０７３０、Ｍ９４０５５、ＡＦ０３５６８５、Ｄ００６３６、Ｙ０９５０１に従った。

【０２５２】

結果

ＶＧＳＣαの縮重プライマーのスクリーニング　異なる細胞系のｍｉｎｉｐｒｅｐ調製したクローンの、ＰＣＲと配列決定スクリーニングを併せた結果を表１に示す。８個の異なるＶＧＳＣαタイプをスクリーニング中に発見し、これらはＳＣＮ１Ａ－４Ａ、ＳＣＮ７Ａ－９ＡおよびＳＣＮ１１Ａ遺伝子からの産物であった。これらのうちでは、６つの異なるＶＧＳＣαがラット中で見られ、４つがヒト中で見られ、ヒトのスクリーニングで発見された２つのＶＧＳＣαの相同体は、ラット細胞中にも存在した（ＳＣＮ９Ａに由来するＰＮ１、およびＳＣＮ２Ａに由来するＲＢ２）。発見されたすべてのＶＧＳＣαは、増幅した領域（縮重プライマーによって表される）中のそれぞれの発表されている配列と同一であった。

【０２５３】

表１　ＶＧＳＣαの縮重プライマーによるスクリーニングの結果の概要

結果は、試験したクローンのパーセンテージとして示す（いずれの場合もｎ＝５０）。それぞれのスクリーニングは、それぞれの細胞系からの２－３の抽出物の結果である。誤差は標準誤差を示す。破線（－）は、実施したスクリーニングにおいて、特定のＶＧＳＣαと同一性を有するクローンが存在しなかったことを示す。

【表２】

VGSCαの遺伝子	遺伝子産物	ラットの細胞系 MAT-LyLu	ラットの細胞系 AT-2	ヒトの細胞系 PC-3	ヒトの細胞系 LNCaP
SCN1A	RB1/HB1	5.3 ± 0.7	34.0 ± 13.3	-	-
SCN2A	RB2/HB2	-	1.3 ± 0.7	11.0 ± 5.0	11.0 ± 7.0
SCN3A	RB3/HB3	-	-	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0
SCN4A	rSkM1/ hSkM1	-	34.0 ± 12.0	-	-
SCN7A	SCL-11 I $hNa_v2.1$	55.3 ± 7.3	10.7 ± 7.7	-	-
SCN8A	rNaCh6/ hNa6	-	-	41.0 ± 5.0	47.0 ± 15.0
SCN9A	PN1/hNe-Na	37.3 ± 8.7	-	45.0 ± 3.0	-
SCN11A	NaN/-	-	8.0 ± 2.0	-	-
非VGSCα		2.0 ± 1.2	12.0 ± 2.0	2.0 ± 2.0	41.0 ± 7.0

【０２５４】
縮重プライマーを設計して、好ましくは今までクローン化および配列決定したすべてのNa_V1 ＶＧＳＣα（ＹＪ１＝ＦＷＬＩＦＳＩＭ；ＹＪ２Ｃ＝ＱＶＡＴＦＫＧＷ）中で保存されている、２つのアミノ酸配列モチーフをコードすることができる、考えられるすべてのｃＤＮＡの組み合わせを増幅し、２２５－２３７ｂｐｓの産物を生成させた。したがって（少なくともNa_V1チャネルについては）、それぞれのＶＧＳＣαのタイプを表すクローンの比率は、細胞のＶＧＳＣαのｍＲＮＡプール中における、このＶＧＳＣαの実際の比率をおおまかに反映している可能性があった。

【０２５５】
２つの充分に保存されているプライマー結合領域間の配列は、すべてのＶＧＳＣαにおいて非常に異なっており、ＤＮＡの配列決定、またはＰＣＲによる（１つのＶＧＳＣαタイプのみの産物を増幅すると思われるＶＧＳＣα特異的なプライマーを使用する）、ＶＧＳＣαタイプ間の区別が可能になる。

【０２５６】
唯一のNa_V1タイプのＶＧＳＣα遺伝子、ＳＣＮ９Ａ（ＰＮｌ／ｈＮｅ－Ｎａ）の産物は、すべての転移性が高い抽出物（ラットおよびヒトに由来する）のスクリーニングにおいて豊富：ＭＡＴ－ＬｙＬｕおよびＰＣ－３細胞について、それぞれ３７．３±８．７％および４５．０±３．０％であったことが分かった。対照的に、対応する転移性が低い細胞では、実施したスクリーニングにおいてＳＣＮ９Ａの遺伝子産物は発見されなかった。ＡＴ－２細胞と比較して（１０．７±７．７％）、ｎＳＣＬ－１１もＭＡＴ－ＬｙＬｕのスクリーニングにおいてより多く存在した（５５．３±７．３％）。

【０２５７】
多数の非ＶＧＳＣαクローンを同定した。当業者に明らかであるように、クローンがＶＧＳＣαをコードしていない知られているＧｅｎＢａｎｋのＤＮＡ配列の登録物と一致する可能性がある場合、あるいはクローンが、縮重プライマーによって表される領域に保存されたＶＧＳＣα配列のモチーフを有する配列を有していない、以前に発表されていないｃＤＮＡを表す場合、非ＶＧＳＣαとしてクローンを分類した。非ＶＧＳＣαと同一性があるクローンのパーセンテージは、転移性が高い細胞と比べて、転移性が低い細胞で大きかった（ラットとヒトの両方で）。さらに全体的なレベルは、ラットのスクリーニングと比べてヒト中で高かった。$hCytb_5R$は、ヒト細胞のスクリーニングにおいて最もよく見られた非ＶＧＳＣαであった（ＰＣ－３中では１００％の非ＶＧＳＣαクローン、およ

びＬＮＣａＰ中では６１％）。
【０２５８】
ＶＧＳＣα特異的なＰＣＲ試験　これらの試験によって、縮重スクリーニングで発見したすべてのＶＧＳＣαの産物を生成し（ＭＡＴ－ＬｙＬｕ由来のｓｓｃＤＮＡのＳＣＮ１Ａ、ＳＣＮ７ＡおよびＳＣＮ９Ａ；ＡＴ－２由来のｓｓｃＤＮＡのＳＣＮ１Ａ、ＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ４Ａ、ＳＣＮ７Ａ、ＳＣＮ１１Ａ）、実際これらすべてがｍＲＮＡ転写物として発現したこと（およびゲノムＤＮＡに由来しないこと）が示された。さらに、ＡＴ－２のスクリーニングにおいてのみ発見されたラットのＶＧＳＣαは、ＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞（ＲＢ２（ＳＣＮ２Ａ）、ｒＳｋＭ１（ＳＣＮ４Ａ）およびＮａＮ（ＳＣＮ１１Ａ））中で発現することが分かった。転移性が高い細胞のスクリーニング（ＭＡＴ－ＬｙＬｕおよびＰＣ－３）においてのみ発見されたＶＧＳＣα（ＳＣＮ９Ａ）は、いくつかまたはすべての転移性が低い細胞抽出物において発現した。（３つのＡＴ－２抽出物の１つで検出されたＰＮ１；両方のＬＮＣａＰ抽出物中のｈＮｅ－Ｎａ）。
【０２５９】
配列分析によって、ＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ３Ａ、ＳＣＮ８ＡおよびＳＣＮ９Ａのいくつかの接合形が、転移性が低い細胞と転移性が高い細胞の両方で発現していたことが示された（図２）。これらの接合形は、ＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ３Ａ、およびＳＣＮ８Ａの新生児形および成体形からなっていたが、ＳＣＮ９Ａについては新生児形のみであった（ラットおよびヒト細胞について、それぞれ１０個と１２個のクローンを配列決定した）。興味深いことに、ＳＣＮ２ＡおよびＳＣＮ３Ａについては、転移性が低いヒト細胞系と転移性が高いヒト細胞系の両方で、新生児形は成体形よりも明らかに豊富に存在した。（両方のＶＧＳＣαについて８個と１個のクローン）。対照的に、ＳＣＮ２Ａの成体形は、ＭＡＴ－ＬｙＬｕおよびＡＴ－２細胞の両方で、より豊富に存在した（１３個と２個のクローン）。
【０２６０】
ｍＲＮＡ転写物からの成体および新生児のエクソンから接合したためにエクソン全体が欠けている、切断型の接合形（△で示す）も、ＳＣＮ２Ａ（ＡＴ－２細胞中の）、ＳＣＮ８ＡおよびＳＣＮ９Ａから増幅させ、配列決定した（図２）。△ＳＣＮ９Ａは、転移性が高い細胞（ラットおよびヒト）においてのみ発見された。公表されているオープン・リーディングフレームを想定すると、ＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ３Ａ、およびＳＣＮ９Ａの転写物は、Ｄ１：Ｓ３で切断されたＶＧＳＣαのタンパク質をコードしていると思われる。対照的に、（ＳＣＮ８Ａからの）△ｈＮａ６は、前に記載したように、Ｄ３：Ｓ３の半分とＤ３：Ｓ４の全部のみが欠けている、ＶＧＳＣαのタンパク質をコードしていると思われる（４８）。さらに、新生児および成体のエクソンを含むＲＢ２（ＳＣＮ２Ａ）の接合形を配列決定し（ＡＴ－２抽出物から）、部分的に接合されたＲＢ２転写物を表した。これはＲＢ２タンパク質に翻訳され、新生児のＤ１：Ｓ３の直後で切断されると思われる（図２）。
【０２６１】
４つのＶＧＳＣαタイプ（ＳＣＬ－１１、ＲＢ２、ＨＢ３およびｈＮａ６）は、クローン化した領域中の個々の発表されている配列とは若干異なっていた。部分的な配列分析によって、（ＰＣ－３およびＬＮＣａＰ細胞中の）ｈＮｅ－Ｎａは、３’非コード領域の一部が対応するＧｅｎＢａｎｋの配列と異なることも明らかになった。これらの変化を表ＩＩ中に概略する。他の変化も、特に非コード領域中に存在する可能性があることが予想される。
【０２６２】
表ＩＩ　ＧｅｎＢａｎｋの配列と比べた、部分的に配列決定したＶＧＳＣαのヌクレオチド（ｎｔ）の違い
他のＶＧＳＣα中の演繹アミノ酸の変化、および変化した残基の保存の相対的な度合いを示す。
【表３】

Ntの違い	Ntの位置	アミノ酸の変化	VGSCαの領域	配列の保存
rSCN2A-1	775 (A to G)	Asn to Asp (Asn 189)	DI: S3	すべてのVGSCα中のAsp
rSCN2A-2	918 (T to C)	なし (Thr 236)	DI: S4/S5	-
hSCN3A-1	578 (T to C)	Val to Ala (Val 175)	DI: S2	すべてのVGSCα中のAla
rSCN7A-1	427 (C to T)	なし (Asn 139)	DI: S1	-
rSCN7A-2	462 (- to T)	Cys to Len (Cys 151)	DI: S2	すべてのNa_V2中のLeu
rSCN7A-3	469 (A to -)	なし (Gly 153)	DI: S2	-
rSCN7A-4	481 (C to T)	なし (Phe 157)	DI: S2	-
rSCN7A-5	490 (G to T)	なし (Leu 160)	DI: S2	-
rSCN7A-6	661 (C to T)	なし (Ile 217)	DI: S4	-
rSCN7A-7	842 (G to A)	Ser to Asn (Ser 281)	DI :S5/S6	すべてのNa_V2中のAsn
hSCN8A-N1	493 (C to A)	なし (停止後)	D3: S3	-
hSCN8A-N2	511 (N to A)	なし (停止後)	D3: S3	-
hSCN9A-1	6230 (G to -)	なし (停止後)	-	-
hSCN9A-2	6231 (A to-)	なし (停止後)	-	-
hSCN9A-3	6232 (T to -)	なし (停止後)	-	-
hSCN9A-4	6233 (T to -)	なし (停止後)	-	-

【０２６３】
ＳＱＴ－ＰＣＲそれぞれラットおよびヒトのＶＧＳＣαの、典型的な電気泳動の結果を図３および４に示す。転移性が高い細胞と転移性が低い細胞のＲＮＡ抽出物に行ったＰＣＲ反応の効率が同様であったと仮定すると、計算したCN_tおよびCN_e値の違い（ゲル画像から誘導した）は、真の発現レベルの違いを表す。この仮定と一致して、コントロールの増幅産物（$Cytb_5R$）は、ラット細胞の抽出物（CN_t＝１８．３±０．２および１７．３±０．４、CN_e＝２３．１±０．４および２２．１±０．２）またはヒト細胞の抽出物（CN_t＝１９．２±０．３および１９．５±０．４、CN_e＝２３．５±０．２および２３．４±０．３）において、ほとんどあるいはまったく違いを示さなかった。
【０２６４】
さらに、誘導したCN_tおよびCN_e値を使用して、ＶＧＳＣαの発現レベルのおおよその絶対的な違いを計算することも可能である（８０％のＰＣＲ効率を仮定する（Ｂｉｓｈｏｐ他（１９９７）Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ７５、１４２－１４７））、表ＩＩＩ（ａおよびｂ）に示す）
【０２６５】
ＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞とＡＴ－２細胞では、検出可能な産物を生成しCN_eに達するために、２つのＶＧＳＣα（ＰＮ１およびＳＣＬ－１１）のみが非常に少ない増幅を必要とし、このことによってＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞中の発現が高レベルであることが示された。重要なことに、ＰＮ１について最も著しい違いが見られた：CN_t＝２５．２±０．５、CN_e＝２９．２±０．４（図３ａ）。実際ＰＮ１は、４５サイクル後でさえも、広範囲に研究した２つのＡＴ－２細胞抽出物中では決して検出されなかった。明らかに低レベルのＰＮ１が、第３のＡＴ－２抽出物中に存在した（CN_t＝３５．７±０．３）。
【０２６６】

１つの他のＶＧＳＣα（ＲＢ２）は、有意な細胞依存性の増幅プロファイルの違いを示した（図３ｅ）。しかしながら、その結果は、全体的に低レベルの発現を示した：CN_t＝３５．４±０．４（ＭＡＴ－ＬｙＬｕ）および２９．８±０．８（ＡＴ－２）。わずかな細胞依存性の違いは、ｒＳｋＭ１（図３ｄ）およびＮａＮ／ＳＮＳ２（図３ｆ）についても見られ、ここでも転移性の低い細胞中で明らかに高レベルの発現が起こっていた。あるＶＧＳＣα、ＲＢ１は、２つの細胞系の間の発現レベルに明らかな違いは示さなかった（図３ｃ）。

【０２６７】

ＰＣ－３およびＬＮＣａＰ抽出物では、ｈＮｅ－Ｎａについて最も有意な細胞依存性の違いがあり（図４ａ）、ＰＮ１のオーソロガス遺伝子はCN_t＝２５．７±０．８（ＰＣ－３）および３７．７±０．３（ＬＮＣａＰ）であった。２つの細胞系中のｈＮａ６、ＨＢ２およびＨＢ３の発現レベル間にも違いがあり（それぞれ、CN_t＝２２．６±０．５および２６．８±０．２；２６．８±０．５および３０．７±０．５；３４．０±０．７および３９．７±０．９）、ここでもＰＣ－３細胞のレベルは高かったが、これらの違いはｈＮｅ－Ｎａに関する違いよりもはるかに少なかった。

【０２６８】

ｈＮａ６の新生児（ｈＮａ６Ｎ）および成体（ｈＮａ６Ａ）イソ形を増幅した、ＳＱＴ－ＰＣＲの結果（図４ｆおよび４ｇ）によって、両方の形は転移性の低い細胞中よりも、転移性の高い細胞中において高レベルで発現されたことが示された：それぞれ、新生児形についてはCN_t＝２５．３±０．３および２８．０±０、CN_e＝２８．１±０．２および３１．８±０．３、および成体形についてはCN_t＝３６．７±０．３および＞４５．０。これらのCN_t値は、両方の細胞系において、新生児形が成体形よりもはるかに高いレベルで発現していたことも示唆すると思われる。

【０２６９】

多様な産物を生成した、ＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ３Ａ、ＳＣＮ８ＡおよびＳＣＮ９Ａの最初のＳＱＴ－ＰＣＲを図２に示す。したがって、決定した相対的な発現レベルのｓｃｎ２ａ、ｓｃｎ３ａ、ｓｅｎ８ａおよびｓｃｎ９ａ ＶＧＳＣαは、異なる形のこれらのＶＧＳＣαを含む。多様な産物を生成したＳＱＴ－ＰＣＲは、単一の産物を生成するＳＱＴ－ＰＣＲの結果と一般的に一致し、重要なことに、たとえばＶＧＳＣαの発現レベルは、ＬＮＣａＰよりもＰＣ－３中で高かった。新生児／成体のイソ形は、一貫して優性に発現したＲＢ２、ＨＢ３、ＰＮ１およびｈＮｅ－Ｎａの接合変異体であったようであり、生成物は少ないサイクル数では他のイソ形よりも顕著であった。しかしながら、ＨＢ２については、△および新生児／成体のイソ形は、明らかに同等なレベルで発現した（図２ａ）。対照的に、ｈＮａ６の発現は、ＬＮＣａＰ細胞中では新生児形によって、ＰＣ－３細胞中では新生児および△形によって支配されていたようである（図２ｃ）。

【０２７０】

考察

この研究では、我々は新規のＲＴ－ＰＣＲ法を開発して、前立腺癌細胞系における多様なＶＧＳＣα遺伝子の発現を調べ、（ｉ）多様なＶＧＳＣαおよびそれらの接合変異体が、ラットおよびヒトの源に由来する、転移性の高い前立腺癌細胞系および転移性の低い前立腺癌細胞系の両方で発現されたこと、（ｉｉ）ＶＧＳＣα発現の全体的なレベルは、転移性の低い細胞と比べて、転移性の高い細胞中で大幅に高かったこと、および（ｉｉｉ）特定の機能的ＶＧＳＣαタイプ、ＳＣＮ９Ａ（ＰＮ１／ｈＮｅ－Ｎａ）の産物の発現が優性であり、前立腺癌であるラットおよびヒト・モデルの転移性の高い細胞中で大幅に上方制御されていたことを示した。

【０２７１】

使用した細胞系は、それらの転移能力が非常に異なるために、研究用に選択した。ラットのＡＴ－２細胞は、コペンハーゲン・ラットの皮下に注射すると、転移性が低かった（１０％未満の動物で肺およびリンパ節転移が進行する（Ｉｓａａｃｓ他（１９８６）Ｐｒｏｓｔａｔｅ ９、２６１－２８１）。対照的に、ＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞は転移性が高く（

８０％を超える動物で肺およびリンパ節転移が進行する（Ｉｓａａｃｓ他（１９８６））。同様に、ヒトＰＣ－３細胞は、無胸腺ヌード・マウスの皮下に注射すると容易に転移し、５６％の動物で腋窩リンパ節での転移が生じるが（Ｓｈｅｖｒｉｎ他（１９８９）Ｐｒｏｓｔａｔｅ１５、１８７－１９４；Ｗａｔｅｒｓ他（１９９５）Ｐｒｏｓｔａｔｅ ２６、２２７－２３４）、ＬＮＣａＰ細胞は無胸腺マウス中では転移しなかった（Ｌｅｅ他（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｔｓｉｓ Ｒｅｖ １２、２１－２８）。さらに、レシピエントであるヌード・マウスの前立腺に、転移性である変異体ＰＣ－３細胞を正所注射することによって、９０％の動物でリンパ節転移が起こり、一方ＬＮＣａＰ細胞も腫瘍形成性を示したが、明らかなリンパ節転移は起こらなかった（Ｓｔｅｐｈｅｎｓｏｎ他（１９９２）Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ ８４、９５１－９５７）。

【０２７２】

方法の態様－縮重プライマーＰＣＲスクリーニング技法によって、これらの細胞中で発現されているＶＧＳＣαを決定することを最初に可能にした。縮重プライマー－制限酵素消化技法（Ｆｊｆｅｌｌ，Ｊ他（１９９７）Ｍｏｌ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．５０、１９７－２０４）、および一般的なＶＧＳＣαプローブを使用するノーザン・ブロッティング（Ｂｅｃｋｈ，Ｓ．（１９９０）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｓ．２６２、３１７－３２２）を含めた他の技法が、ＶＧＳＣαの発現をサンプル化するために同様に使用されている。しかしながら、このような方法とは別に、縮重スクリーニングも定量的な情報を与える。我々の縮重ＰＣＲプライマーは、発表されているすべてのＶＧＳＣαの（Ｄ３：Ｓ５およびＤ３：Ｓ５／Ｓ６中）の２つの充分に保存された領域用に設計したので、Na_V1サブファミリーのすべてのＶＧＳＣαはほぼ同じ効率で増幅された、すなわち、スクリーニングにおけるＶＧＳＣαの相対的な比率は、広義には細胞のｍＲＮＡ中におけるその相対的な豊富さを表す可能性がある。このことは、転移性の高い細胞と転移性の低い細胞の間で見積もられるＶＧＳＣαの発現レベルの違いを比較するときは特に、スクリーニングの結果と非常に一致したＳＱＴ－ＰＣＲデータによって支持される（表ＩＩＩａおよびＩＩＩｂ）。したがって、スクリーニングおよびＳＱＴ－ＰＣＲの結果を直接使用して、ＶＧＳＣαの発現の絶対的なレベル、ＶＧＳＣαに関する情報を決定することはできないが、互いに比べたｍＲＮＡレベルは、スクリーニング中のそれぞれのタイプのクローンのパーセンテージによって表した。

【０２７３】

重要なことに、最も顕著な違いは、転移性の高い細胞中において少なくとも１０００倍発現されたＳＣＮ９Ａに関するものである。ＳＣＮ９Ａも転移性の高い細胞系中の優性なＶＧＳＣαであり、ＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞およびＰＣ－３細胞中の約８０％の「機能的ＶＧＳＣα」のｍＲＮＡ群である。

【０２７４】

定量分析に関するＰＣＲの有用性は、増幅のある段階で定量化ができなくなることによって制限され、その段階を超えると、反応は指数関数的に増幅することを止め、最終的には安定状態に達する（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｃ．ａｎｄ Ｇａｎｎｏｎ，Ｆ．（１９９４）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ１２１９、４９３－４９８）。したがって、一般的に使用されている「定量的」ＰＣＲ技法（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ａｎｄ Ｇａｎｎｏｎ（１９９４）中に概説された）の大部分は、この非指数関数的な増幅の開始に注意することが必要である。本研究中に導入した新規のＳＱＴ－ＰＣＲデータ分析法によって、このポイントは容易に決定した。三次の多項データ分析を、動態観察に基づいて、簡潔で時間を節約するＳＱＴ－ＰＣＲ技法に適用して、指数関数的な増幅が停止するＰＣＲの段階（サイクル数CN_eとして表す）を決定した。したがってCN_eは、CN_tの比較と同様の方法で、異なる細胞系のＶＧＳＣαのｍＲＮＡレベルを容易に直接的に比較するための、参照値として使用することができた。しかしながら、CN_eはCN_tよりも信頼できるパラメータである可能性がある。なぜなら、（１）CN_eは１つのCN_t読み取り値ではなく数個のデータ・ポイントから誘導され、さらに（２）CN_eは離散値ではなく連続値であり、したがってより正確だからである。

【０２７５】
結論としては、我々の新規な縮重スクリーニングおよびＳＱＴ－ＰＣＲ技法によって、これらの細胞中におけるＶＧＳＣα発現の、一貫性のある定量概略が生み出された。この分析の信頼度のレベルは、異なる細胞系から得られるＣｙｔｂ$_5$Ｒのコントロール・データの確かさによって、さらに高まる。したがって、この２つの方法は、特に組み合わせると、ＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現の迅速で信頼できる定性／定量分析の強力な新しい手段となり、異なる表現型の細胞を、あるいは異なる条件下で同じ細胞タイプを比較するときに特に有用である。
【０２７６】
表ＩＩＩ （ａ）ラットおよび（ｂ）ヒトの、転移性の高い細胞系と転移性の低い細胞系間で計算した、それぞれのＶＧＳＣαの発現レベルの違い
ＣＮ$_t$値、ＣＮ$_e$値（ＳＱＴ－ＰＣＰからのもの）、およびスクリーニングのデータの違いを示し、これらを増殖の要因として述べる。陽性および陰性値は、それぞれ転移性の高い細胞と転移性の低い細胞における、高い発現レベルと低い発現レベルを示す。ＣＮ$_t$とＣＮ$_e$の違いは、いずれの場合も８０％のＰＣＲ効率を仮定して（Ｂｉｓｈｏｐ他（１９９７）Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｃｅｌｌ ＢＩＯｌ ７５、１４２－１４７中で報告されたものと同等）、以下の等式：$1.8^{[MAT-LyLu値-AT-2値]}$にしたがって計算した（４５）。縮重スクリーニングの違いは、転移性の高い細胞と転移性の低い細胞中で、「ｓｔｄ」で示した指定の標準体（ラットのスクリーニングではＲＢ１、ヒトのスクリーニングではｈＣｙｔｂ$_5$Ｒ）の発現のレベルが同等であると仮定して計算した。「ＮＤ」は、違いを決定することができなかったことを示す。
【表４】

*これは、第３のAT-2細胞抽出物から誘導したSQT-PCRデータから決定した、転移性の高い細胞と転移性の低い細胞の間の発現の違いが最小であったことを示す。

ａ.

VGSCaの遺伝子	遺伝子産物	CN_t	CN_e	スクリーニング
SCN1A	RB1	- 1.5	+ 1.4	std (1)
SCN2A	RB2	- 26.9	- 18.9	- 40
SCN4A	rSkM1	- 3.1	- 3.4	- 4
SCN7A	SCL-11	+ 13.3	+ 13.3	+ 30
SCN9A	PN1	+100,000*	ND	ND
SCN11A	NaN	- 3.2	- 2.4	- 3
$rCytb_5R$	$rCytb_5R$	- 1.8	- 1.8	1

【表５】

b．

VGSCa	遺伝子	CN_t	CN_e	スクリーニング
SCN2A	HB2	+ 9.9	ND	+ 13
SCN3A	HB3	+ 28.5	ND	+ 13
SCN8A	hNa6	+ 11.8	+ 18.9	+ 11
SCN9A	hNe-Na	+ ~1150	ND	ND
$hCytb_5R$	$hCytb_5R$	+ 1.2	+ 1.2	std (1)

【０２７７】
スクリーニングの結果は、転移性の高い細胞と転移性の低い細胞の間で非常に異なる、ＶＧＳＣαのｍＲＮＡの合計レベルと一致した。ＳＱＴ－ＰＣＲデータによって、転移の可能性が異なる細胞（ラットとヒトの両方）中での、$Cytb_5R$の発現のレベルが非常に似ていたことが示唆された。したがって、転移性の低いＬＮＣａＰ細胞とＡＴ－２細胞の縮重スクリーニングにおいて、この非ＶＧＳＣαクローンの発生が増大したことによって（表Ｉ）、これらの細胞中のＶＧＳＣαの標的とノイズの比が、転移性の高い細胞と比べて、小さくなったことが示された（したがって、ＶＧＳＣαの発現レベルが低下した）。
【０２７８】
したがってこの研究の結果は、基礎レベルのＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現は転移性の低い細胞中で起こり、この発現は転移性の高い表現型のものでは大幅に上方制御されることを示す。このような、転移性の低い細胞中での基礎レベルのＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現は、前のフロー・サイトメトリーの結果（３８）と一致し、これによって、電気生理学的に検出可能なＶＧＳの電流が存在しないにもかかわらず、ＬＮＣａＰ細胞およびＡＴ－２細胞中でのＶＧＳＣαタンパク質のレベルが低いことが明らかになった。非癌性前立腺上皮細胞中のＶＧＳＣαの発現は、本実施例では調べていない。基礎的なＶＧＳＣαの発現が新生物と関連があるかどうか、あるいはこの発現が正常な癌の上皮細胞に特徴的であるかどうかを決定するために、さらなる作業が必要とされる。
【０２７９】
スクリーニングおよびＳＱＴ－ＰＣＲの結果を直接使用して、ＶＧＳＣαの発現の絶対的なレベルを決定することはできない。しかしながら、縮重スクリーニング・ＰＣＲは、ほぼ同じＰＣＲ効率で、所定のサブファミリー（たとえばNa_V1）のすべてのＶＧＳＣαを増幅させ、これによって細胞のｍＲＮＡ中で互いに比べたＶＧＳＣαの発現レベルの情報が維持されると思われる。したがって、スクリーニングにおいてこれらの相対的な豊富さを比較し、これらの豊富さを細胞のｍＲＮＡ中の特定のＶＧＳＣαの相対的な比率と関連付けることができるはずである。利用可能なデータは、図５に示すＶＧＳＣαの相対的な発現の概略と一致する。この評価では、ＳＣＮ９Ａ遺伝子の産物は、ＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞およびＰＣ－３細胞中の「機能的ＶＧＳＣα」ｍＲＮＡ群の約８０％である。
【０２８０】
ＶＧＳＣαの発現の多様性　ＶＧＳＣαのｍＲＮＡの発現のレベルは、転移性の高いＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞中では非常に高く、大部分のＶＧＳＣαタイプは転移性の高い細胞および転移性の低い細胞中において高レベルで発現したが、３つの低度に発現したＶＧＳＣα遺伝子（ＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ４ＡおよびＳＣＮ１１Ａ）は、転移性の低いＡＴ－２細胞中ではわずかに高いレベルで存在したことが分かった。これによって、これらのＶＧＳＣαは正常ではＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞中で検出されるＶＧＳの電流には貢献しておらず、存在する場合は生理学的重要性に貢献しているが、発現のこの下方制御を調節する機構は今だに決定されていないことが強く示される。対照的に、ヒトの細胞系では、検出したすべてのＶＧＳＣαは、転移性の高いＰＣ－３細胞中では高いレベルで発現した。
【０２８１】
ＤＲＧ細胞（１４）、ＰＣ１２細胞（４９）、および培養した脊髄星状細胞（１２）中で

の、多様なＶＧＳＣαの発現は、成体ラットで以前から実証されている。ここで研究した前立腺癌上皮細胞系は、その中で多様なＶＧＳＣαの同時発現が起こることが示されている、他の細胞タイプである。これらの場合はたいてい、広範囲のＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現のレベルが、細胞中に存在することが分かった。現在、単細胞タイプ中でのこの多様な発現の機能的な重要性は明らかではない。これらの細胞中でのＶＧＳＣαの発現は、増殖因子および軸策切断（１４、１７、４９）などの多数の刺激に応答して、サブタイプに特異的な方法で、劇的かつ迅速に上方または下方制御することができる。これは、異なるＶＧＳＣαは異なる機能を有しており、その相対的な重要性は異なる条件下では急速に変わる可能性があることを強く暗示していると思われる。発現の微調整が即座に起こって、細胞のＶＧＳＣαの発現の概略と、必要とされる機能的応答とを一致させることができる。機能的ＶＧＳＣの概略のこのような変化は、既に発現されている異なるＶＧＳＣαを制御することによってのみ得ることができ、ＶＧＳＣα遺伝子を「スイッチ・オンする」より緩慢なプロセスによっては得ることができない可能性が高い。したがって、多様な低レベルのＶＧＳＣαの発現によって、細胞のミクロ環境の動的変化によって必要となる機能的要件を、細胞に満たさせることができる可能性がある。

【０２８２】

ＶＧＳＣは、網膜色素、レンズおよび角膜上皮組織などの上皮タイプを含めた、多数の「非興奮性」組織中で検出されており、これらの機能的役割は大部分は知られていない（４２、５０、５１）。活動電位の生成に関係がないＶＧＳＣの機能的役割は、ｉｎ ｖｉｔｒｏの脊髄星状細胞において決定されている（５２）。これらの細胞中では、ＶＧＳＣが代わりに、Na^+／K^+－ＡＴＰａｓｅ活性を維持しながら、Na^+の復帰経路を提供する。非興奮性細胞中のＶＧＳＣの他の役割には、細胞内のCa^{2+}の恒常性と関係がある段階電位の生成、またはさまざまな細胞内のシグナル経路の活性化が含まれてよい（５２）。

【０２８３】

前立腺癌細胞中の「非機能的ＶＧＳＣα」の高い発現レベル

ＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞およびＰＣ－３細胞中で見られるＳＣＮ７ＡおよびＳＣＮ８ＡのｍＲＮＡ転写物の、機能的ＶＧＳＣを作製する能力は疑わしい。ＳＣＮ７Ａは、明らかになっているチャネル形成能力は有していない、Na_V2のＶＧＳＣαをコードしている。ＳＣＮ８Ａ遺伝子は機能的ＶＧＳＣタンパク質を生成することができることは知られているが、ヒト前立腺癌細胞中で発現される特異的なＳＣＮ８Ａ遺伝子の産物が、これらの細胞中で実用的なチャネルとして機能することができるかどうかは疑わしい。ｈＮａ６Ｎは、Ｄ１およびＤ２のみを有する、充分に切断されたＶＧＳＣαタンパク質（４４）をコードしている。この変異体は非神経および新生児組織中で発見されており、機能的ＶＧＳＣを形成すること、「絶対確実な」機構として代わりに作用して、完全長であるｈＮａ６ ＶＧＳＣαタンパク質（４４）の成体合成を妨げることができないことが示されている。実際、充分に切断された電位依存性K^+チャネルのαサブユニットを首尾よく使用して、ラット下垂体前葉細胞（５３）中の内生のK^+の電流を人工的に抑制している。ｈＮａ６の成体イソ形も、転移性の高いヒト細胞と転移性の低いヒト細胞中において非常に低いレベルで発現していることが分かっているが、新生児のイソ形の存在がｈＮａ６Ａの機能的発現を妨げている可能性がある。Ｄ３中の電位感受性Ｓ４断片を効果的に失った△ｈＮａ６変異体は、特異的ＰＣＲ試験で発見された△ｈＮｅ－Ｎａ、△ＰＮ１、△ＨＢ２および△ＲＢ２接合形と類似である。これらの転写物は、ミス・スプライシングされた非実用的な形のＳＣＮ８Ａ、ＳＣＮ９ＡおよびＳＣＮ２Ａ ＶＧＳＣα遺伝子（４８）を表している可能性がある。明らかに非機能的ＶＧＳＣαを発生させることが、前立腺癌細胞中の効果的なＶＧＳＣ発現を制御する追加的な手段となる可能性がある。

【０２８４】

転移性の高い細胞中でのＰＮ１／ｈＮｅ－Ｎａの優性発現　縮重スクリーニングおよびＳＱＴ－ＰＣＲの結果によって、ＰＮ１／ｈＮｅ－Ｎａは転移性の高い細胞中で発現される優性ＶＧＳＣαであることが一貫して実証された。さらに配列データによって、大部分の

ＳＣＮ９Ａ転写物は新生児形であったことが示された。実際、成体の接合形は今日まで、新生児のウサギＳｃｈｗａｎｎ細胞（２１）非常に低いレベルでのみ発見されており、したがってＳＣＮ９Ａ遺伝子のＤ１：Ｓ３可変スプライシングが発生的に制御されているかどうかは現在明らかではない。前立腺癌細胞中のＤ１：Ｓ３で可変スプライシングされたことが分かったすべてのＶＧＳＣαも、ＲＢ２を除いて、新生児形で主に発現されたことは注目に値するであろう。

【０２８５】

本研究によって、癌腫中におけるＳＣＮ９Ａ遺伝子の発現の一例が提供されており、ＳＣＮ９Ａ遺伝子の発現の上方制御は、一般的な癌腫関連の現象である可能性があることが示されている。ｈＮｅ－Ｎａは本来、ヒト髄質甲状腺癌腫（ｈＭＴＣ細胞）のクローンＣ－細胞系からクローン化および配列決定され、ヒトＣ－細胞の癌腫組織（５４）中で発現することが分かっている。ＰＮ１のクローンは、ラット副腎髄質（４９）のクロム親和性細胞腫に由来するＰＣ１２細胞から得た。これらの研究において、ｈＮｅ－ＮａまたはＰＮ１の発現と癌腫の間の関連を示唆するものはない。

【０２８６】

ＳＣＮ９Ａの産物は、末梢神経系では高レベルで、脳、脊髄、Ｓｃｈｗａｎｎ細胞、心臓、副腎および甲状腺（４９、５４－５６）、特に神経内分泌細胞（５４、５５）中でははるかに低いレベルで以前に発見されている。神経内分泌細胞は前立腺にも存在する。近年の研究により、神経内分泌細胞の増殖および分化によって前立腺癌の進行を予測することができることが示唆されている。（Ｃｏｈｅｎ他（１９９４）Ｃａｎｃｅｒ ７４、１８９９－１９０３；Ａｎｔｈｏｎｙ ｄｉ Ｓａｎｔ’Ａｇｎｅｓｅ，Ｐ．（１９９８）Ｐｒｏｓｔａｔｅ Ｓｕｐｐｌ．８、７４－７９；Ｂｏｎｋｈｏｆｆ，Ｈ．（１９９８）Ｐｒｏｓｔａｔｅ Ｓｕｐｐｌ．８、１８－２２）。前立腺の神経内分泌細胞は、検出可能な核アンドロゲン受容体を欠いており（Ｂｏｎｋｈｏｆｆ，Ｈ他（１９９３）Ｖｉｒｃｈｏｗｓ Ａｒｃｈ．Ａ．Ｐａｔｈｏｌ．Ａｎａｔ．４２３、２９１－２９４；Ｋｒｉｊｎｅｎ，Ｊ他（１９９３）Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １００、３９３－３９８）、これらの細胞がアンドロゲン無感性であることが示唆される。この神経内分泌細胞の無感性は、前立腺癌をアンドロゲン無感性に進行させることを担う機構において役割を果たしている可能性がある。興味深いことに、アンドロゲンはＶＧＳＣの活性を阻害することができ（Ｔａｂｂ，Ｊ．Ｓ他（１９９４）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１４、７６３－７７３）、ＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現を低下させることもでき、他のステロイド・ホルモンが発現を低下させることも分かっている（Ｒｉｃｈ，Ｍ．Ｍ．、Ｋｒａｎｅｒ，Ｓ．Ｄ．およびＢａｒｃｈｉ，Ｒ．Ｌ．（１９９９）Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．Ｄｉｓ．６、５１５－５２２）。したがって、高レベルのＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現が、アンドロゲン無感性が変化しながら、前立腺上皮細胞中で起こる可能性がある。

【０２８７】

比較を行うことができる場合、ＰＮ１およびｈＮｅ－ＮａタイプのＶＧＳＣの電気生理学的および薬理学的性質は、転移性の高いラットおよびヒトの前立腺癌細胞（３６、３７、３９、４９、５４、５６）中で観察されるＶＧＳの電流の性質と非常に似ている。これは、具体的にはこれらの細胞中で記録されるＶＧＳの電流の源であるＳＣＮ９Ａの産物と一致する。このＶＧＳＣαは侵襲プロセス（３６－３８）を増強することが示されているので、これが特定の亜細胞の分布パターン、細胞骨格との相互作用および／またはこの活性を助長する特化した電気生理学的性質を有していることは予想することができる。実際、近年の電気生理学の研究は、ｈＮｅ－Ｎａの１つの明らかに独特な性質、閉じた状態での不活性化の速度が非常に遅いことに焦点を当てている。この性質によって、ゆっくりではあるが徐々に増大する閾値未満の刺激に応じて、「ランプの電流」を生み出すことができる（Ｃｕｍｍｉｎｓ他（１９９８）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１８、９６０７－９６１９）。閉じた状態での不活性化の速度が速いＶＧＳＣαは、このような刺激に応答することができない。

【０２８８】

ＰＮ１タンパク質も、神経増殖因子（ＮＧＦ）、分化したＰＣ１２細胞および培養したラットＤＲＧニューロン中において特異的な亜細胞の局在性があり、神経突起の末端中、成長円錐（４９）の最先端に特異的に存在する。ＮＧＦはＰＣ１２細胞中のＰＮ１発現を上方制御し、これに丸形から非常に枝分かれした形への形態分化が続き、細胞の形態を向上させる際のこのＶＧＳＣαの役割が示される（５７）。これと一致して、ＴＴＸ処理はＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞の形態に対して正反対の影響を与え、細胞の突起を収縮させ細胞をコンパクトにした（５８）。

【０２８９】

疾患状態であるラットおよびヒトのモデルの転移性の高い前立腺癌細胞中において、ＶＧＳＣの機能的発現の源として、ＳＣＮ９Ａ遺伝子産物を具体的に決定することにより、より特異的な実験器具を使用して、転移性機構のあらゆる態様、（１）この遺伝子の発現の増大に特異的に影響を与える、ＳＣＮ９Ａ遺伝子の上流の要素、たとえばホルモン、増殖因子および転写因子／抑制物質、（２）ＣＮ９Ａを発現させて侵襲性／転移性を高める下流の要素をさらに解明することが現在は可能である。

【０２９０】

前立腺癌細胞中の他のＶＧＳＣサブユニットの考えられる発現　本研究では、転移性の高い細胞および転移性の低い細胞中のＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現を特徴付けすることのみを試みた。なぜなら、ＶＧＳＣαのみが機能的ＶＧＳＣをコードするのに充分であるからである。前立腺細胞について決定したＶＧＳＣの発現の多様性は、さらに低レベルでの他のＶＧＳＣαの転写物の考えられる発現によって、およびＶＧＳＣβの発現によって、さらに複雑になる可能性がある。ＳＣＮ１Ａ、ＳＣＮ２Ａ、ＳＣＮ３Ａ、ＳＣＮ４ＡおよびＳＣＮ８Ａ遺伝子の産物は、一般に１つまたは複数のＶＧＳＣβと関連していることが分かっており、したがっていくつかのＶＧＳＣβの発現は、これらの細胞中で起こる可能性がある。しかしながら、ＳＣＮ９Ａ遺伝子の産物はＶＧＳＣβ（５４；５５）とは関係がないようであり（５４；５５）、したがって、これらの補助的なサブユニットが、転移性細胞中の高レベルの機能的ＶＧＳＣの発現を担う機構に、大きく貢献するであろう可能性はない。

【０２９１】

これらの細胞中で発現することがわかっているＶＧＳＣα遺伝子のすべてが、実際にタンパク質に翻訳されるかは確かではない。発現されるＶＧＳＣα遺伝子のすべてを翻訳することができる可能性がある場合、細胞のこのような多様性によって、サブタイプ特異的な方法で、増殖因子および損傷などのさまざまな刺激に対する細胞の応答において、ＶＧＳＣαを迅速に上方制御または下方制御することが可能であると思われる（おそらくＶＧＳＣα遺伝子の「スイッチ・オン」転写よりも速い）（Ｆｊｅｌｌ他（１９９９）Ｍｏｌｅｃ Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ ６７、２６７－２８２；Ｄｉｂ－Ｈａｊｊ他（１９９６）ＰＮＡＳ ９３、１４９５０－１４９５４；Ｔｏｌｅｄｏ－Ａｒａｌ他（１９９７）ＰＮＡＳ ９４、１５２７－１５３２）。このことは、異なるＶＧＳＣαは異なる機能を助長することを暗示していると思われ、その相対的な重要性は多様な条件下ですぐに変わる可能性がある。したがって、多様な低レベルのＶＧＳＣαの発現によって、細胞のミクロ環境の動的変化によって必要となる機能的要件を、細胞に満たさせることができる可能性がある。

【０２９２】

最終的な所見

本研究には、２つの広義の含意がある。第１に、機能的に異なる前立腺上皮細胞のＶＧＳＣαのｍＲＮＡ発現の概略を特徴付けることによって、（ｉ）非興奮性の細胞中でのＶＧＳＣの発現、および（ｉｉ）単細胞タイプ中でのＶＧＳＣの発現の多様性、すなわち多様なＶＧＳＣサブユニット、およびこれらのサブユニットの多様な接合形の発現の新しい概念のパターン、制御および機能的重要性を研究するための好都合なモデルとして、これらの細胞を現在確立させている。第２に、前立腺癌そのものに関して、現在の管理法の堅い制約は、転移性の表現型用の入手可能なマーカー（前立腺に特異的な抗原など）は信頼性がないことである（５９、６０）。したがって臨床的に重要な癌を、臨床的に重要ではな

く激しい治療を必要としない癌（患者の高い死亡率と関連がある）と、容易に区別することができない。前立腺癌であるラットおよびヒトのモデルにおける優性なＶＧＳＣαとして、ＳＣＮ９Ａ遺伝子の産物を同定することによって、転移性の高い前立腺癌細胞系においてＶＧＳＣαの発現が保たれていることに焦点が当てられる。したがって本研究は、この疾患の考えられる診断および治療における、これらのイオン・チャネルの潜在的な価値をさらに支持するものである。

【参考文献】

1. Catterall, W.A. (1986) Ann. Rev. Biochem. **55**, 953-985
2. Goldin, A. L *et al* (1986). Proc. Natl. Acad. Sci USA **83**, 7503-7507
3. Isom, L.L., *et al* (1995) Cell **83**, 433-442
4. Isom, L.L., *et al* (1992) Science **256**, 839-842
5. Cannon, S.C., *et al* (1993) Pflugers Arch. **423**, 155-157
6. Bonhaus, D.W., *et al* (1996) Neuropharmacol. **35**, 605-613
7. Plummer, N.W. and Meisler, M.H. (1998) Genomics **57**, 323-331
8. George, A.L., *et al* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 4893-4897
9. Akopian, A.N., *et al* (1997) FEBS Letts. **400**, 183-187
10. Schlief, T., *et al* (1996) Eur. Biophys. J. **25**, 75-91

11. Dib-Hajj, S.D, *et al* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 8963-8968
12. Black, J.A., *et al* (1994) Mol. Brain Res. **23**, 235-245
13. Dib-Hajj, S.D., *et al* (1996) FEBS Letts. **384**, 78-82
14. Fjell, J., *et al* (1999) Mol. Brain Res. **67**, 267-282
15. Black, J.A., *et al* (1996) Molec. Brain Res. **43**, 117-131
16. Sangameswaren, L., *et al* (1997) J. Biol. Chem. **272**, 14805-14809
17. Dib-Hajj, S., *et al* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14950-14954
18. Dib-Hajj, S.D., *et al* (1998) J. Neurophysiology **79**, 2668-2676
19. Sarao, R., *et al* (1991) Nucleic Acids Res. **19**, 5673-5679
20. Gustafson, T. A., *et al* (1993) J. Biol. Chem. **268**, 18648-18653
21. Belcher, S.M *et al* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 11034-11038
22. Plummer, N.W., *et al* (1998) Genomics **54**, 287-296
23. George, A.L., *et al* (1993) Genomics **15**, 598-606
24. Wang, D.W., *et al* (1996) Biophys. J. **70**, 238-245
25. Souslova, V.A., *et al* (1997) Genomics **41**, 201-209
26. Dib-Hajj, S.D., *et al* (1999) Genomics **59**, 309-318
27. Kallen, R.G., *et al* (1990) Neuron **4**, 233-242
28. Catalano, S.M. and Shatz, C.J. (1998) Science **281**, 559-562
29. Penn, A.A., *et al* (1998) Science **279**, 2108-2112
30. Shatz, C.J. (1990) Neuron **5**, 745-756
31. Zhou, J. and Hoffman, E.P. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 18563-18571.
32. Tanaka, M., *et al* (1998) NeuroReport **9**, 967-972
33. Bartolomei, F., *et al* (1997) J.Neurocytol. **26**, 667-678
34. Skaper, S.D., *et al* (1998) FASEB J. **12**, 725-731

35. Kanazirska, M., *et al* (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. **232**, 84-87

36. Grimes, J.A., *et al* (1995) FEBS Letts. **369**, 290-294

37. Laniado, M., *et al* (1997) Am. J. Pathol. **150**, 1213-1221

38. Smith, P., *et al* (1998) FEBS Letts **423**, 19-24

39. Grimes, J.A. and Djamgoz, M.B.A. (1998) J. Cell. Physiol. **175**, 50-58

40. Diss, J.K.J., *et al* (1998) FEBS Letts **427**, 5-10

41. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Ann. Biochem. **162**, 156-159

42. Dawes, H., *et al* (1995) Vis. Neurosci. **12**, 1001-1005

43. Okamura, Y., *et al* (1994) Neuron **13**, 937-948

44. Plummer, N.W., *et al* (1997) J. Biol. Chem. **272**, 24008-24015

45. Kohler, T. (1995).*Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction*, pp 3-14, eds. Kohler, T., Lassner, D., Rost, A.-K., Thamm, B., Pustowoit, B. and Remke, H. (Springer, Heidelberg).

46. Fitzsimmons, S.A., *et al* (1996) J. Natl. Cancer Inst. **88**, 259-269

47. Marin, A., *et al* (1997) Br. J. Cancer **76**, 923-929

48. Oh, Y. and Waxman, S.G. (1998) NeuroReport **9**,1267-1272

49. Toledo-Aral, J.J., *et al* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 1527-1532

50. Watsky, M.A., *et al* (1991) Pflugers Arch. **419**, 454-459

51. Cooper, K., *et al* (1990) J. Memb. Biol. **117**, 285-298

52. Sontheimer, H., *et al* (1994) J. Neurosci. **14**, 2464-2475

53. Tu, L.W., *et al* (1995) Biophys. J. **68**, 147-156

54. Klugbauer, N., *et al* (1995) EMBO J. **14**, 1084-1090

55. Sangameswaren, L., *et al* (1996) J. Biol. Chem. **272**, 14805-14809

56. Safo, P., *et al* (1998) Soc. Neurosci. Abstr. **24**, 1324

57. Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2424-2428

58. Fraser, S.P., *et al* (1999) Cell Tissue Res. **295**, 505- 512

59. Mandelson, M.T., *et al* (1995) Ann. Rev. Public Health **16**, 283-306

60. Chan, E.C. and Sulmasy, D.P. (1998) Am. J. Med. **105**, 266-274

【表６】

表1.ラットおよびヒトの前立腺癌細胞系の、縮重VGSCαプライマーによるスクリーニングで使用したPCRプライマー。発表されている配列のプライマーのアニーリング温度およびプライマーのアニーリング位置を、括弧内に示す。配列の受託番号は以下の通りである：
hNe-Na (X82835), HB2 (M94055), HB3 (AF035685), RB1 (X03638), RB2 (X03639), SCL-11 (Y09164), PN1 (U79568), rSkM1 (Y17153), NaN (AF059030)。

縮重VGSCαプライマー			
YJ1	-5'GCGAAGCTT(C/T)TGG(C/T)TIATITT(C/T)I(A/C/G/T)AC(C/T)TG 3'	YJ2C	-5'ATAGGATCCAICCI(A/C/G/T)I(A/G)AAIGC(A/C/G/T)IAT(A/T/C)ATGGG3'
YJI/YJ2C特異的プライマー			
MPN1	-5'ACGTTAGTGGAAATGTGCGA3' (Tm = 58°C)	MRB1	-5'ATTTCTTTCTATTAGTTTTA3' (Tm = 46°C)
MSCL1	-5'ATTTAATGAATCAATGCCAT3' (Tm = 50°C)	NA29	-5'TGTATACAGGCCAGGTCCGC3' (Tm = 64°C)
MhNe	-5'ATGTTAGTCAAAATGTGCGA3' (Tm 54°C)	MHS6	-5'AACAATACAGAGATCAGATG3' (Tm = 54°C)
MHB2	-5'ATTGCTCTCAATGAGAGCTT3' (Tm = 56°C)		
Specific特異的プライマーによるPCR試験			
HNE1	-5'TATGACCATGAATAACCCGC3' (474-493)	SPN1	-5'TTCATGACCTTGAGCAACCC3' (424-443)
HNE3	-5'TCAGGTTTCCCATGAACAGC3' (843-862)	SPN4	-5'GAGTCCCATGATCCTGCTCC3' (1355-1374)
2HB1	-5'TGTGCACGATTCTTACCAAC3' (512-531)	NAN1	-5'GTATCTCTGTCCATTCAGTC3' (423-442)
2HB3	-5'AAGTAGTACCATTCCCATCC3' (1005-1024)	NAN2	-5'GAACAGCTGCTGACCGACCA3' (849-868)
1RB	-5'ATGACAATGAGTAACCCTCC3' (684-703)	H3A	-5'TTGAGCAACCCTCCTGACTG3' (493-512)
3RB	-5'TGTGCCGTTGTAATCCGTAG3' (1141-1160)	H3C	-5'GGGCCACTGCAAACATTTAT3' (878-897)
SC1	-5'ATTAGTGTTCTCACCGACAG3' (386-405)	H6A	-5'TT(T/C)GA(A/G)GA(T/C)AT(A/T/C)TA(C/T)AT(A/T/C)GA3'
SC3	-5'AGAATATGGTACTGGCTTCC3' (860-879)	H6B	-5'CATCTGATCTCTGTATTGTT3'
R2A	-5'CCAACTGTGTGTTTATGACC3' (632-651)	H6C	-5'TGTCAAAGTTGATCTTCACG3'
R2C	-5'AGGCAGTACCATTCCAATCC3' (1110-1129)	NA7	-5'CTGAGGACCTTCCGTGTGCT3' (632-651)
		NA19	-5'TGCACACTTGTACCACCACG3' (1599-1618)

【０２９３】
実施例２：ヒト前立腺癌中のＶＧＳＣ発現を抑制するための、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの設計
１．ＶＧＳＣサブタイプに特異的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドを設計するために、可能性のある部位を同定するための、現在知られているすべてのＶＧＳＣタイプの配列。
Ｃｏｎｓ　ａｇｔｇａｇｔｇｔｇａａａｇｔｃｔｔａｔｇｇａｇａｇｃａａｃａａａａｃｔｇ－－－ｔｃｃｇａｔｇｇａａａ
ｈＮａｖ２．１　ａｇｔｃｇｇｔｇｔｇａａａｇｃｃｔｔｃｔｇｔ－－－ｔｔａａｃｇａａｔｃｃａ－－－ｔｇｃｔａｔｇｇｇａａ
ｈＮｅ－Ｎａ　ｔｃｃｇａａｔｇｔｔｔｔｇｃｃｃｔｔａｔｇａＡＴＧＴＴＡＧＴＣＡＡＡＡＴＧ－－－ＴＧＣＧＡｔｇｇａａａ
ヒトの脳１　ａｃｔｇａｔｔｇｃｃｔａａａａｃｔａａｔａｇａａａｇａａａｔｇａｇａｃｔｇ－－－ｃｔｃｇａｔｇｇａａａ
ヒトの脳２　ａｇｔｇａｇｔｇｃａＡＡＧＣＴＣＴＣＡＴＴＧＡＧＡＧＣＡＡＴｃａａａｃｔｇ－－－ｃｃａｇｇｔｇｇａａａ
ヒトの脳３　ａｇｔｇａｃｔｇｔｃ－－ａｇｇｃｔｃｔｔｇｇｃａａｇｃａａ－－－－－ｇ－－ｃｔｃｇｇｔｇｇａａａ
Ｎａ６（ヒト）　ａｃｔｇａａｔｇｔｇａａａａｇｃｔｔａｔｇｇａｇｇｇｇＡＡＣＡＡＴＡＣＡＧＡＧＡＴＣＡＧＡＴＧｇａａｇ
ｈＳｋＭ１　ａａｃａａｇｔｃｔｇａｇｔｇｃｇａｇａｇＣＣＴＣＡＴＧＣＡＣＡＧＧＣＣＡＧＧｔｃｃｇｃｔｇｇｃｔｃ
ヒトの心臓１　ａａｃａａｇａｇｃｃａｇｔｇｔｇａｇｔｃｃｔｔｇａａｃｔｔｇａｃｃｇｇａｇａａｔｔｇｔａｃｔｇｇａｃｃ
ＰＮ３／ＳＮＳ（ラット）　ａａｃａａｇｔｃｃｇａｇｔｇｔｃａｃａａｔｃａａａａｃａｇｃａｃｃｇｇｃｃａｃｔｔｃｔｔｃｔｇｇｇｔｃ

【０２９４】
上の配列では、可能な場合、ヒトＶＧＳＣの相当物が使用されている。この配列は、ダッシュによって示される配列ギャップを挿入することによって最適化されているが、実際の配列または任意のオリゴヌクレオチド設計体中に、ギャップが実際に存在するわけではない。最も一般的に存在するヌクレオチドは、共通の線（Ｃｏｎｓ）で示す。２０量体のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを設計するための、可能性のある部位は太字で示し、ＰＣ－３およびＬＮＣａＰ細胞系の縮重スクリーニングと特異的ＰＣＲ試験の両方で発見された、４つのヒトＶＧＳＣタイプには下線を引く。縮重スクリーニングによって生成した断片の、最も保存されていなかった領域を使用して、ここに一覧したものを生成した。

【０２９５】
いくつかのＶＧＳＣタイプを同時に「接合する」ことが個別にできる２０量体のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを、３／４細胞質リンカー中で設計することも可能であると思われる（ＶＧＳＣ配列がすべてのタイプで充分に保存されている場合）。たとえば、３つのＶＧＳＣタイプからの３／４リンカーの２０未満のヌクレオチド切片は、一直線に並ぶことが示される。この切片中では、ｈＮｅ－Ｎａとヒトの脳２の配列は同一であり、ｈＳｋＭ１配列は２個所のヌクレオチド位置でのみ異なる。したがってこの領域では、少なくとも３つのチャネルをノック・アウトするであろう、２つのアンチセンス・オリゴヌクレオチドを設計することが可能である（Ｎａ６（ヒト）配列がこの領域で確認されているときは４つであることも考えられる）。
ｈＮｅ－Ｎａｑ　ＴＴＡＴＧＡＣＡＧＡＡＧＡＡＣＡＧＡＡＧ
ヒトの脳２　ＴＴＡＴＧＡＣＡＧＡＡＧＡＡＣＡＧＡＡＧ
ｈＳｋＭ１　ＴＴＡＴＧＡＣｇＧＡｇＧＡＡＣＡＧＡＡＧ

【０２９６】
表２．試験したクラインのパーセンテージとして表した、（ａ）ラット由来のＭＡＴ－Ｌ

ｙＬｕおよびＡＴ－２、および（ｂ）ヒト由来のＰＣ－３およびＬＮＣａＰ細胞系の、ＶＧＳＣαの縮重プライマーによるスクリーニングの結果。

【表７】

VGSCαの遺伝子	遺伝子産物	MLL (1) n=50	MLL (2) n=50	MLL (3) n=50	AT-2 (1) n=50	AT-2 (3) n=50	AT4 (4) n=50
SCN1A	RB1	6	6	4	12	58	32
SCN2A	RB2	0	0	0	2	2	0
SCN4A	rSkM1	0	0	0	58	22	22
SCN7A	SCL-11	70	48	48	2	4	26
SCN9A	PN1	20	44	48	0	0	0
SCN11A	NaN	0	0	0	12	6	6
非VGSCα	同定されていない	4	2	0	4	2	12
非VGSCα	知られていない	0	0	0	10	6	2

【表８】

VGSCαの遺伝子	遺伝子産物	PC-3 (1) n=50	PC-3 (2) n=50	LNCaP (1) n=50	LNCaP (2) n=50
SCN2A	HB2	6	6	4	18
SCN3A	HB3	0	2	0	2
SCN8A	hNa6	46	50	62	32
SCN9A	hNe-Na	48	30	0	0
非VGSCα	同定されていない	0	12	22	40
非CGSCα	知られていない	0	0	12	8

【０２９７】

表３．今日までに転移性の高い前立腺癌細胞系および転移性の低い前立腺癌細胞系で発見された、ＶＧＳＣαの接合変異体。ＶＧＳＣαのタイプの成体形および新生児形が記載されている場合、前立腺癌細胞中で発見されたその形は特定される。△は、Ｓ４断片Ｄ１またはＤ３をコードしているエクソンが欠けている、接合変異体を示す（セクション４．３を参照のこと）。

【表９】

VGSCαのタイプ	転移性の高い細胞	転移性の低い細胞
PN1	完全長	決定された
SCL-11	完全長	決定された
RB1	成体	成体
RB2	決定された	決定された
rSkM1	完全長	完全長
NaN	決定された	決定された
hNe-Na	完全長 ΔhNe-Na 新生児	完全長
hNa6	ΔnHA6 完全長	ΔnHA6 完全長
HB2	ΔHB2	ΔHB2
HB3	新生児	成体

【０２９８】
実施例３：ヒト前立腺癌の病的進行と相関関係がある電位依存性Ｎａ$^{+}$チャネルの発現
以前の電気生理学的研究によって、機能的電位依存性Ｎａ$^{+}$チャネル（ＶＧＳＣ）は、ラット（ＭＡＴ－ＬｙＬｕ）およびヒト（ＰＣ－３）前立腺癌の転移性の高い細胞系によって選択的に発現されていることが示されている。さらに、テトロドトキシンを用いてこれらのチャネルを遮断することによって、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの細胞の侵襲性が大幅に低下した（Ｇｒｉｍｅｓ他（１９９５）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｓ．３６９、２９０－２９４；Ｌａｎｉａｄｏ他（１９９７）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５０ １２１３－１２２１。いくつかの異なるラットおよびヒト前立腺癌細胞系による、直接的で侵襲性とＮａ$^{+}$チャネルのタンパク質発現の間のポジティブな相関関係が、Ｓｍｉｔｈ他（１９９８）ＦＥＢＳ Ｌｅｎｓ．４２３、１９－２４によってその後実証された。しかしながら、ＶＧＳＣの発現がｉｎ ｖｉｖｏにおいてヒト前立腺癌中で起こるかどうか、さらにそのような場合、その発現のレベルが構成要素である悪性上皮細胞の転移性の概略と関係があるかどうかは知られていない。
【０２９９】
ｉｎ ｓｉｔｕおよび侵襲性癌細胞を含めた、転移性がさまざまである上皮管を含むヒト前立腺の、組織切片中におけるＶＧＳＣタンパク質の免疫組織化学的な局在化を図６に示す。上皮細胞の病的性質が正常から侵襲性の新生物に進行するにつれて、染色の強度の強く漸増的な増加を観察した（図６ＡからＥ）。良性前立腺肥大症（ＢＰＨ）では、構成要素である上皮細胞によるＶＧＳＣ発現のレベルは非常に低く、主に基底細胞に限られていた（図６Ａ）。低級な前立腺の内部上皮細胞の新生物（低級ＰＩＮ）では、全体の発現のレベルは、基底細胞の免疫組織化学的な染色によって増大し、わずかに強く現れた（図６Ｂ）。ＢＰＨと低級ＰＩＮについてひとまとめに考えると、先端と基部の光学濃度の比は０．７４±０．０５（ｎ＝４５０管、３０切片、１０患者）であった。ＶＧＳＣ発現の顕著で段階的な増大は、多層の特徴的な構造および細胞的特徴、重度の核異常および仁の拡大によって認識された、高級ＰＩＮの出現と関連があった（図６Ｃ）。この傾向はｉｎ ｓｉｔｕの悪性腫瘍（ＩｎｓＭ）を含む管および小胞中で保たれており、ここには基底細胞は存在せず（図６Ｄ）、侵襲性癌（ＩｎｖＣ）細胞も存在しなかった（図６Ｅ）。ＩｎｓＭの段階では、管腔の上皮細胞の先端の原形質膜全体で、ＶＧＳＣの発現が顕著であっ

た（図６Ｄ）。ＩｎｖＣ中でも、細胞の原形質膜全体で、染色が強かった（図６Ｅ）。高級ＰＩＮとＩｎｓＭ上皮細胞についてひとまとめに考えると、ＶＧＳＣ染色の先端と基部の光学濃度の比は、１．５７±０．１９（ｎ＝７５０管、３０切片、１０患者）であった。低級ＰＩＮ管のそれと比較すると、この比は非常に大きかった（Ｐ＜０．０１）。

【０３００】

結論として、ｉｎ ｖｉｔｒｏで前立腺癌細胞の転移性の表現型と関連があるとして我々が以前に同定した高レベルのＶＧＳＣ発現が、ｉｎ ｖｉｖｏで起こることが現在確認されている。したがって、機能的ＶＧＳＣ発現の上方制御は、高い転移能力の不可欠な要素として起こると思われる。ＶＧＳＣの活性は、細胞プロセスの延長を促進すること（Ｆｒａｓｅｒ他（１９９９）Ｃｅｌｌ Ｔｉｓｓｕｅ Ｒｅｓ．２９５．５０５－５１２）、運動性を高めること（Ｆｒａｓｅｒ他（１９９８）Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．５１３．Ｐ、１３１Ｐ）、侵襲性を高めること（Ｃｒｉｍｅｓ他、１９９５；Ｌａｎｉａｄｏ他、１９９７；Ｓｍｉｔｈ他、１９９８）、または細胞内の恒常性を高めること（Ｆｏｓｔｅｒ他（１９９９）Ｂｒ．Ｊ．Ｕｒｏｌ．８３、１７１－１９４）によって転移に貢献している可能性がある。したがって、ＶＧＳＣの上方制御による細胞極性（先端および基部）によって、隣接組織を指向的に侵襲性にすることができる可能性がある。本観察によって、ｉｎ ｖｉｔｒｏのクローン由来の細胞系のモデル系で以前に得られた基本的な情報が、選択されなかった非クローン性の原発性のヒト組織に転換される。これらの結果によって、ＶＧＳＣが発現することは転移性である前立腺癌細胞の表現型の要件であり、したがって、原発性組織の診断時に転移性である可能性がある疾患を同定するための、貴重で新規の指標となる可能性があることが示唆される。

【０３０１】

実施例４：前立腺癌細胞系におけるＶＧＳＣの機能の制御

げっ歯類ＭＡＴ－ＬｙＬｕ細胞中でのＶＧＳＣの機能的発現を調べた。上皮増殖因子（ＥＧＦ）は、ＶＧＳＣの機能的発現を上方制御する。図９に示すように、外性ＥＧＦは機能的なＶＧＳＣの発現を高める。ＥＧＦ受容体キナーゼ阻害物質を同時に施用することによって、この効果は遮断される（ＡＧ１４７８；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、ＵＳＡ）。ＥＧＦ受容体の抗体（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ、ＵＳＡ）を施用することによっても、基部のＶＧＳＣの電流は低下し、この現象が内生的に起こっていることを示す。

【０３０２】

他の増殖因子（たとえば神経増殖因子）およびホルモン（アンドロゲンを含めて）に、同様の効果がある可能性がある。

【０３０３】

ここで本発明を、以下の非制限的な実施例および図面を参照することにより記載する。

【図面の簡単な説明】

【図１】

ＰＮ１ ＶＧＳＣαの画像分析データへの三次の多様な適合性を示す図である。第１のＭＡＴ－ＬｙＬｕ抽出物に行った三回の繰り返しの適合性を示す。ＰＣＲ産物の質量（ナノグラム）を、ＰＣＲのサイクル数に対してプロットする。上部の挿入写真は、データを誘導したゲル画像を示す。所定のバンドに関する代表的なＰＣＲのサイクル数を、ゲルの上部に示す。

【図２Ａ】

前立腺癌細胞中で見られるＶＧＳＣαの接合変異体の詳細を示す図である。特異的なＰＣＲ試験から決定した、ラット（ＲＢ２およびＰＮ１）およびヒト（ＨＢ２、ＨＢ３、ｈＮａ６およびｈＮｅ－Ｎａ）細胞系中で見られる、（ａ）ＳＣＮ２Ａ、（ｂ）ＳＣＮ３Ａ遺伝子産物の接合変異体を示す。典型的なＳＱＴ－ＰＣＲゲル画像を左側に示し、それぞれＰＣＲ産物を表す理想的なバンドをその側に示す。それぞれの産物に対応する構造的特徴の概略図は右側に示し、産物のサイズ（ヌクレオチド中）を示す。ＶＧＳＣαの正常なドメイン構造に関する、イントロンの位置（異なる影がついた領域は異なるエクソンを表す

）およびＰＣＲプライマーの位置（矢印）の配置も示す。所定のバンドの代表的なＰＣＲのサイクル数を、ゲルの上に示す。ＮおよびＡは、新生児および成体の可変スプライシングしたエクソンをそれぞれ示す。△は、可変スプライシングしたエクソンの両方が欠けている産物を示す。

【図２Ｂ】

前立腺癌細胞中で見られるＶＧＳＣαの接合変異体の詳細を示す図である。特異的なＰＣＲ試験から決定した、ラット（ＲＢ２およびＰＮ１）およびヒト（ＨＢ２、ＨＢ３、ｈＮａ６およびｈＮｅ－Ｎａ）細胞系中で見られる、（ｃ）ＳＣＮ８Ａおよび（ｄ）ＳＣＮ９Ａ遺伝子産物の接合変異体を示す。典型的なＳＱＴ－ＰＣＲゲル画像を左側に示し、それぞれＰＣＲ産物を表す理想的なバンドをその側に示す。それぞれの産物に対応する構造的特徴の概略図は右側に示し、産物のサイズ（ヌクレオチド中）を示す。ＶＧＳＣαの正常なドメイン構造に関する、イントロンの位置（異なる影がついた領域は異なるエクソンを表す）およびＰＣＲプライマーの位置（矢印）の配置も示す。所定のバンドの代表的なＰＣＲのサイクル数を、ゲルの上に示す。ＮおよびＡは、新生児および成体の可変スプライシングしたエクソンをそれぞれ示す。△は、可変スプライシングしたエクソンの両方が欠けている産物を示す。

【図３】

ラットＶＧＳＣαのＳＱＴ－ＰＣＲゲル画像を示す図である。（ａ）ＰＮ１、（ｂ）ＳＣＬ－１１、（ｃ）ＲＢ１、（ｄ）ｒＳｋＭ１、（ｅ）ＲＢ２および（ｆ）ＮａＮ／ＳＮＳ２のＳＱＴ－ＰＣＲ産物、および（ｇ）ｒＣｙｔｂ$_5$Ｒコントロールを示す。所定のバンドの代表的なＰＣＲのサイクル数を、ゲルの上に示す。それぞれのパネルでは、上部の画像がＭＡＴ－ＬｙＬｕの細胞抽出物に由来し、下部の画像はＡＴ－２の抽出物に由来した。

【図４】

ヒトＶＧＳＣαのＳＱＴ－ＰＣＲゲル画像を示す図である。（ａ）ｈＮｅ－Ｎａ、（ｂ）ｈＮａ６、（ｃ）ＨＢ２および（ｄ）ＨＢ３のＳＱＴ－ＰＣＲ産物、および（ｅ）ｈＣｙｔｂ$_5$Ｒコントロール、およびｈＮａ６（ｆ）新生児および（ｇ）成体の接合変異体を示す。所定のバンドの代表的なＰＣＲのサイクル数を、ゲルの上に示す。それぞれのパネルでは、上部の画像がＰＣ－３細胞の抽出物に由来し、下部の画像はＬＮＣａＰ細胞の抽出物に由来した。

【図５】

転移性が強い前立腺癌細胞系（白いバー）および転移性が弱い前立腺癌細胞系（黒いバー）中における、さまざまな「機能的ＶＧＳＣα」のｍＲＮＡが示した発現レベルを示す図である。いずれの場合も垂直軸は、転移性が強い相当物中の機能的ＶＧＳＣαのレベルに関する、発現のおおよそのレベルを示す（それぞれラットおよびヒト細胞のＭＡＴ－ＬｙＬｕおよびＰＣ－３）。ＲＢ１（ラット）およびｈＣｙｔｂ$_5$Ｒ（ヒト）を基準として使用し、縮重スクリーニングから、発現レベルを決定した。比較的多量の機能的ＶＧＳＣαのｍＲＮＡが、多様な接合型で発現されているＶＧＳＣαに関して、若干過剰に評価することができる（最も顕著なのはＨＢ２、その大部分は△ＨＢ２形で存在する）。

【図６】

免疫組織化学的に染色したさまざまな病的段階のヒト前立腺の切片およびＶＧＳＣ抗体を示す図である。Ａは良性前立腺肥大症である。Ｂは低級ＰＩＮ．ｌ、管腔、ストロマである。Ｃは高級ＰＩＮである。Ｄはｉｎ ｓｉｔｕでの悪性腫瘍ＩｎｓＭである。Ｅは侵襲性癌細胞ＩｎｖＣｓである（矢印によって示されるいくつかの例を示す）。免疫組織化学的方法を１０％ホルマリン中に固定しパラフィンに包埋した臨床用組織に適用した。年齢およびＧｌｅａｓｏｎ等級が異なる１０の異なる患者からの切片を使用した。抗原を回収するために電子レンジ中で処理した後の組織を、任意のタイプの脊椎動物のＶＧＳＣを認識するペプチド抗体（Ｅｎｇｌａｎｄ他（１９９１）Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．５４８、３３４－３３７）である、Na^+チャネルの抗体（Ｕｐｓｔａｔｅ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃ．）と共に培養した。最初に切片を、４℃において一晩、この抗体を用いて

処理した（２μｇ／ｍｌ）。シグナルを検出するために、ビオチン化二次抗体、アビジン－ビオチン複合体、および色原体としてジアミノベンジジンを使用した。二次結合部位を遮断するために、二次抗体の宿主の漿液を施用した。２つの異なるタイプの陰性コントロールを行った（１）一次抗体をスキップし、（２）一次抗体を免疫ペプチドを用いて予め吸収させた。いずれの場合も、ＶＧＳＣ染色が見られなかった。定量分析用に、Ｎｉｋｏｎ顕微鏡およびＡｐｐｌｅ Ｍａｃコンピュータを使用し、３色コードのデジタル・カメラ（Ｐｉｘｅｒａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｌｏｓ Ｇａｔｏｓ、ＣＡ、ＵＳＡ）を用いて画像を得た。画像分析プログラム（ＯＰＴＩＭＡＳ、ｖｅｒｓｉｏｎ ５．２（Ｓｔｅｍｍｅｒ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、光学濃度測定を行った。測定バーは１３．５μｍであった。

【図７】

脊椎動物ＶＧＳＣαのＹＪ１／ＹＪ２Ｃ領域の、アミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＬａｓｅｒｇｅｎｅのＭＥＧＡＬＩＧＮソフトウェアを使用して、このアラインメントを生成した。ＰＡＭ２５０重量表を用いるＣｌｕｓｔａｌ法を使用して、すべての配列を整列させた。保存されている残基は箱で囲み影を付けた。配列の受託番号は以下の通りである。ＰＮｌ（ＧＢ：Ｕ７９５６８）、ウサギＳｃｈｗａｎｎ細胞（ＧＢ：Ｕ３５２３８）、ｈＮｅ－Ｎａ（ＰＩＲ：Ｓ５４７７１）、Ｅｅｌ（ＧＢ：Ｘ０１１１９）、ウマＳｋＭ１（ＧＢ：Ｕ２５９９０）、ｈＳｋＭ１（ＧＢ：Ｍ８１７５８）、ｒＳｋＭ１（ＧＢ：Ｍ２６６４３）、マウスｍＮａｖ２．３（ＰＩＲ：Ａ５５１３８）、ＳＣＬ－１１（ＧＢ：Ｙ０９１６４）、ｈＮａｖ２．１（ＧＢ：Ｍ９１５５６）、ＲＢ１（ＳＷ：Ｐ０４７７４）、ＨＢ１（ＧＢ：５７１４４６）、ＲＢ３（ＳＷ：Ｐ０８１０４）、ＨＢ３（ＧＢ：Ｓ６９８８７）、ＲＢ２（ＰＩＲ：Ｂ２５０１９）、ＨＢ２（ＧＢ：Ｍ９４０５５）、マウスＳＣＮ８ａ（ＧＢ：Ｕ２６７０７）、ｒＮａ６（ＧＢ：Ｌ３９０１８）、フグ（ＧＢ：Ｄ３７９７７）、マウスＳＮＳ（ＧＢ：Ｙ０９１０８）、ラットＳＮＳ／ＰＮ３（ＧＢ：Ｘ９２１８４）、ヒト心臓（ＰＩＲ：Ａ３８１９５）、ラット心臓（ＳＷ：Ｐ１５３８９）、ＮａＮ（ＧＢ：ＡＦ０５９０３０）。

【図８】

特異的プライマーＰＣＲから決定した、ラットおよびヒト前立腺癌細胞系中で発現される（Ａ）ｈＮａ６および（Ｂ）ＰＮ１、ｈＮｅ－ＮａおよびＩＩＢ２の、接合変異体の予想される形態を示す図である。暗色のバー（■）は、ＶＧＳＣα遺伝子中で保存されているイントロンの位置を示す。Ｏｈ ａｎｄ Ｗａｘｍａｎ（１９９８）から適合させた。

【図９】

図９Ａは、ＭＡＴ－ＬｙＬｕラット前立腺癌細胞系からの電流の記録を示す図である。この電流は、膜を－１００ｍＶの保持電流から０ｍＶに減極し、次に０％ＦＢＳ、１００ｎｇ／ｍｌのＥＧＦおよびｌμＭのＡＧ１４７８中で２４時間培養することによって誘導される。電位依存性$Ｎａ^{+}$チャネルの発現は、ＥＧＦの存在下で上方制御された。

図９Ｂは、０％ＦＢＳ、１００ｎｇ／ｍｌのＥＧＦおよびｌμＭのＡＧ１４７８およびＥＧＦ受容体の抗体（ｌμｇ／ｍｌ）中で２４時間培養した後の、平均したピークの$Ｎａ^{+}$の電流密度±標準誤差を示すヒストグラムである。統計上の有意性は、それぞれ＊＊＝ｐ＜０．０１および＊＊＊＝ｐ＜０．００１として示す。

【図１】

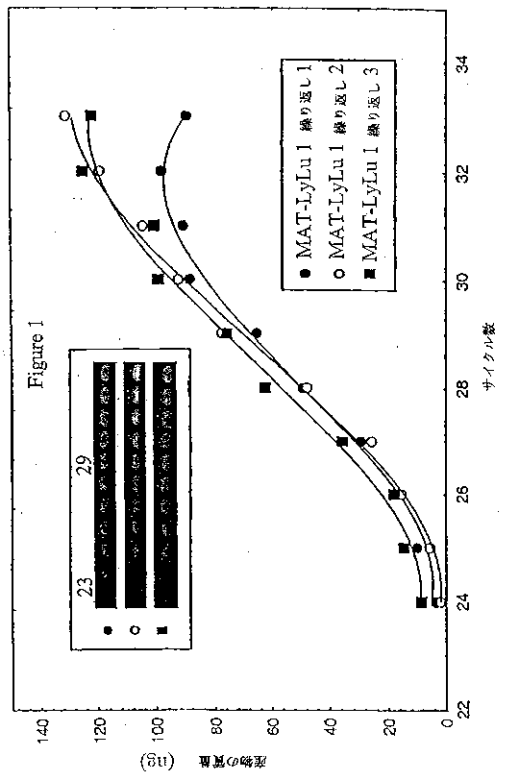


Figure 1
MAT-LyLu 1 繰り返し 1
MAT-LyLu 1 繰り返し 2
MAT-LyLu 1 繰り返し 3
産物の質量 (pg)
サイクル数

【図２Ａ】

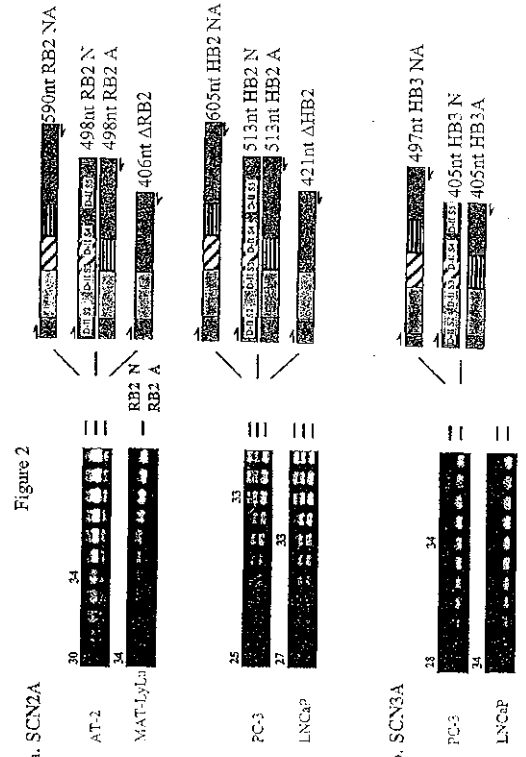


Figure 2
a. SCN2A
AT-2
MAT-LyLu
590nt RB2 NA
498nt RB2 N
498nt RB2 A
406nt ΔRB2
RB2 N
RB2 A
PC-3
LNCaP
605nt HB2 NA
513nt HB2 N
513nt HB2 A
421nt ΔHB2
b. SCN3A
497nt HB3 NA
405nt HB3 N
405nt HB3A

【図２Ｂ】

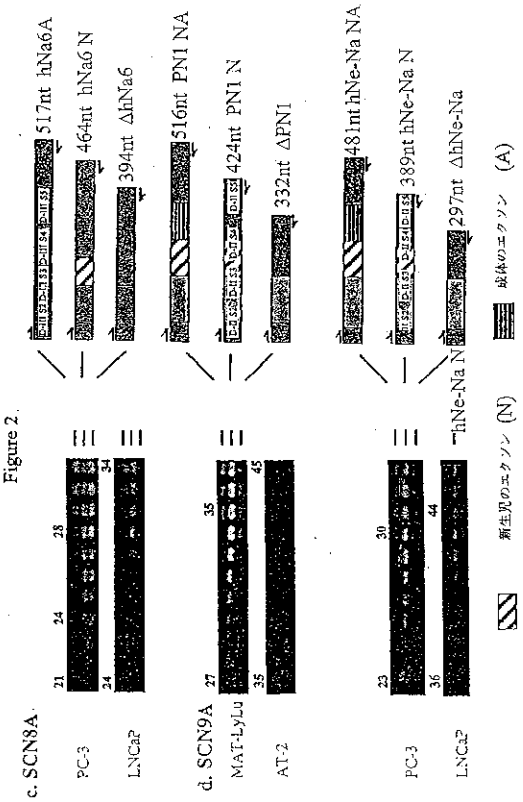


Figure 2.
c. SCN8A
PC-3
LNCaP
517nt hNa6A
464nt hNa6 N
394nt ΔhNa6
d. SCN9A
MAT-LyLu
AT-2
516nt PN1 NA
424nt PN1 N
332nt ΔPN1
PC-3
LNCaP
481nt hNe-Na NA
389nt hNe-Na N
297nt ΔhNe-Na
hNe-Na N
新生児のエクソン (N)
成体のエクソン (A)

【図５】

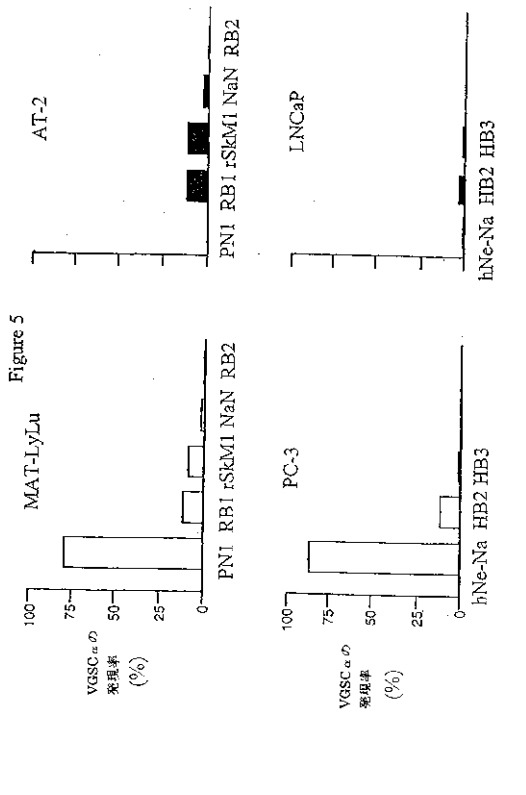


Figure 5
MAT-LyLu
PC-3
AT-2
LNCaP
PN1 RB1 rSkM1 NaN RB2
hNe-Na HB2 HB3
VGSC α の発現率 (%)

【図７】

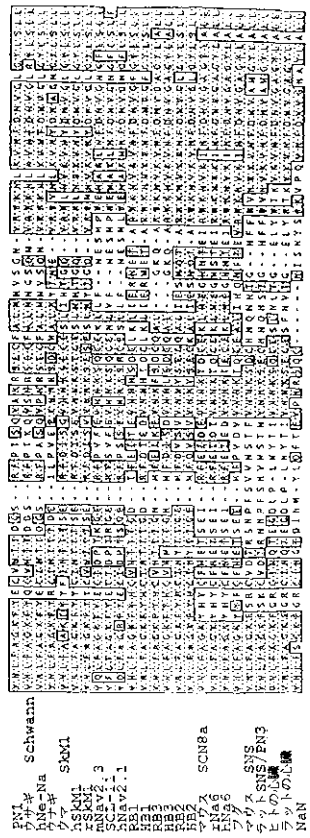
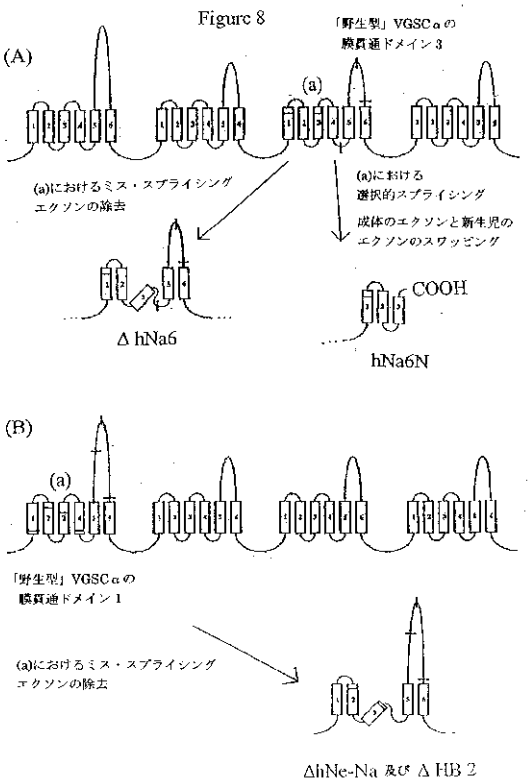


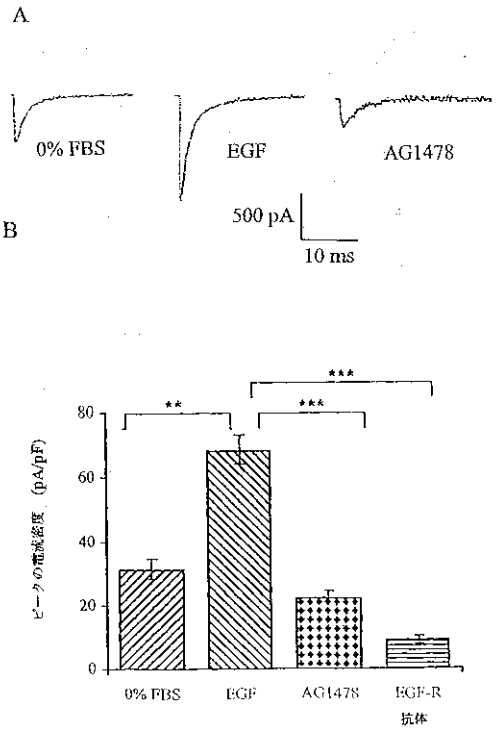
Figure 7

【図８】



【図９】

Figure 9



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/18637 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68, G01N 33/53, C07K 14/705, A61K 39/00, C12N 15/11, 9/00, 15/87

(21) International Application Number: PCT/GB01/03940

(22) International Filing Date:
3 September 2001 (03.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0021617.6 2 September 2000 (02.09.2000) GB

(71) Applicant (*for all designated States except US*): IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED [GB/GB]; Sherfield Building, Imperial College, London SW7 2AZ (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): DJAMGOZ, Mustafa, Bilgin, Ali [GB/GB]; Department of Biology, Neurobiology Group, Imperial College of Science, Technology & Medicine, Imperial College Road, London SW7 2AZ (GB). FRASER, Scott, Paton [GB/GB]; Department of Biology, Neurobiology Group, Imperial College of Science, Technology & Medicine, Imperial College Road, London SW7 2AZ (GB). DISS, James, Kenneth, Joseph [GB/GB]; Department of Biology, Neurobiology Group, Imperial College of Science, Technology & Medicine, Imperial College Road, London SW7 2AZ (GB).

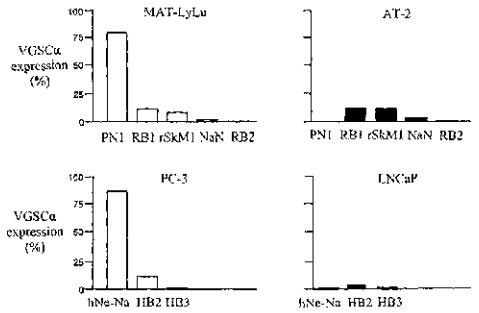
(74) Agent: MILES, John, S.; Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham NG1 5DD (GB).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER



(57) Abstract: A method of diagnosing cancer in a human patient comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNeNa voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer. A method of treating cancer comprising the step of administering to the patient an agent which selectively prevents the function of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel. A genetic construct comprising a nucleic acid encoding a molecule capable of preventing the function of hNeNa voltage gated Na^+ channel expressed in a cell). The methods and compositions are particularly suited to prostate cancer.

WO 02/18637 A2

WO 02/18637 A2

patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER

The present invention relates to methods of determining whether a patient has cancer and whether the cancer is likely to metastasise; and it relates to methods of treating cancer, particularly prostate cancer.

Cancer is a serious disease and a major killer. Although there have been advances in the diagnosis and treatment of certain cancers in recent years, there is still a need for improvements in diagnosis and treatment.

Cancer is a genetic disease and in most cases involves mutations in one or more genes. There are believed to be around 60,000 genes in the human genome but only a handful of these genes have been shown to be involved in cancer. Although it is surmised that many more genes than have been presently identified will be found to be involved in cancer, progress in this area has remained slow despite the availability of molecular analytical techniques. This may be due to the varied structure and function of genes which have been identified to date which suggests that cancer genes can take many forms and have many different functions.

Carcinoma of the prostate has become a most significant disease in many countries and it is the most commonly diagnosed malignancy in men in the western world, its occurrence increasing significantly with age. Over the last 20 years the mortality rates have doubled and it is now the second commonest cause of male cancer deaths in the Western world (Wingo *et al* (1995) *Cancer J. Clin.* 45, 8-30; Mortality Statistics: Cause England and Wales. OPCS DH2 19, 1993, Her Majesty's Stationery Office). The prevalence of prostate cancer has increased by 28% in the last decade and this disease now accounts for 12% of the total cancers of men in England

and Wales (Cancer Statistics: Registrations England and Wales. OPCS MBI No 22, 1994, Her Majesty's Stationery Office; Foster *et al* (1999) *Br. J. Urol.* **83,** 171-194). By the year 2018 it is expected to be the biggest killer with 50% of the male population suffering from it (80% by age 80 years). Recent evidence suggests that prostate cancer is also increasing amongst younger men as well (*Br J Cancer* (1999) **79**, 13-17). These increases and the recent deaths of many public figures from prostatic cancer have served to highlight the need to do something about this cancer. It has been suggested that the wider availability of screening may limit mortality from prostate cancer.

Prostate cancer screening currently consists of a rectal examination and measurement of prostate specific antigen (PSA) levels. These methods lack specificity as digital rectal examination has considerable inter-examiner variability (Smith & Catalona (1995) *Urology* **45**, 70-74). Measurement of serum prostate specific antigen (PSA), synthesised by the epithelial cells of the prostatic acini and ducts and secreted as a normal constituent of seminal fluid, is currently the most commonly applied diagnostic marker of the cancer (e.g. Gao *et al* (1997) *The Prostate* **31,** 264-281). However, PSA measurements can give inconsistent information so that some patients with prostate cancer have low levels of PSA, while PSA levels may be elevated in the presence of non-malignant prostatic disease, for example benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic inflammation and other conditions (e g. Mandelson *et al* (1995) *Annu. Rev. Public Health* **16,** 283-306; Flood *et al* (1996) *J. Gen. Int. Med.* **11**, 342-349; Morgan *et al* (1996) *The Prostate* **57,** 58-63; Chan & Sufmasy (1998) *Am. J. Med.* **108**, 226-274. The comparative failure of PSA as a diagnostic test was shown in 366 men who developed prostate cancer while being included in the Physicians Health Study, a prospective

study of over 22,000 men. PSA levels were measured in serum, which was stored at the start of the study, and elevated levels were found in only 47% of men developing prostate cancer within the subsequent four years (Gann *et al* (1995) *JAMA* **273**, 289-294).

Present screening methods are therefore unsatisfactory; there is no reliable method for diagnosing the cancer, or predicting or preventing its possible metastatic spread, which is the main cause of death for most patients.

Grimes *et al* (1995) *FEBS Lett.* **369**, 290-294 describes the differential expression of voltage-activated Na^+ currents in two prostatic tumour cell lines and discusses their contribution to invasiveness *in vitro*. The cell lines studied were rat cell lines and there is no indication of which particular Na^+ channels may be involved.

Laniado *et al* (1997) *Am J. Pathol.* **150**, 1213-1221 describes the expression and functional analysis of voltage-activated Na^+ channels in human prostate cancer cell lines and discusses their contribution to invasion *in vitro*. There is no indication of which particular Na^+ channels may be involved.

Smith *et al* (1998) *FEBS Lett.* **423**, 19-24 suggests that Na^+ channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cell lines.

Grimes & Djamgoz (1998) *J. Cell. Physiol.* **175**, 50-58 describes the electrophysiological and pharmacological characterisation of voltage-gated Na^+ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer.

Dawes *et al* (1995) *Visual Neuroscience* **12**, 1001-1005 describes the identification of Na^+ channel subtypes induced in cultured retinal pigment epithelium cells.

Reviews of Na^+ channels may be found in, for example, Black & Waxman (1996) *Develop. Neurosci.* **18**, 139-152; Fozzard & Hanck (1996) *Physiol. Rev.* **76**, 887-926; Bullman (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1679-1685; Cannon (1999); and Marban *et al* (1998) *J. Physiol.* **508**, 647-657. Some Na^+ and other ion channels are well known to underly certain genetic defects as is described in Bullman (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1679-1685; Burgess *et al* (1995) *Nature Genet.* **10**, 461-465; and Cannon (1998) *Mol Neurology* (JB Martin, Ed) Scientific American Inc., NY. However, no Na^+ channel sequence is used presently for diagnostic purposes.

Thus, although previous work may have suggested some general role for voltage-gated Na^+ channels (VGSCs) in prostate cancer and its metastasis based on work in cell lines, until now it has not been possible to make use of this information effectively since the involvement of VGSCs in prostate cancer *in vivo* has not been demonstrated, and the particular VGSC(s) involved in human prostate cancer have not been identified.

We have now found, surprisingly, that VGSC expression correlates with pathological progression and that the VGSC which is associated with human cancer, particularly prostate cancer and its metastases, is hNe-Na (also termed $Na_v1.7$). As noted above, this is a known VGSC (although not previously known to be associated with human cancer or cancer cell lines, in particular human prostate cancer) and an amino acid sequence of the protein, and cDNA of the mRNA encoding it has been reported

(Klugbauer *et al* (1995) *EMBO J.* **14**, 1084-1090). hNe-Na (human) and PN1(rat) correspond to the SCN9A gene, as discussed in Example 1. Recently, a new VGSC nomenclature has been adopted (Goldin *et al* (2000) *Neuron* **28(2)**, 365-368). In this system hNe-Na and PN1 are the human and rat orthologs, respectively, of $Na_v1.7$.

The chromosomal location of hNe-Na has not yet been determined. However, the mouse equivalent has been located to the voltage-gated Na^+ channel cluster on mouse chromosome 2 (Beckers *et al* (1997) *Genomics* **36**, 202-205). This cluster is also present in human chromosome 2 where hNe-Na may similarly be present (Malo *et al* (1994) *Cytogen. Cell. Genet.* **67**, 178-186; Malo *et al* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2975-2979; George *et al* (1994) *Genomics* **19**, 395-397). The hNe-Na gene (human SCN9A) intron/exon organisation has not yet been determined but could be inferred from other known, conserved VGSC intron positions (Loughey *et al* (1989) *Cell* **58**, 1143-1154; George *et al* (1993) *Genomics* **15**, 598-606; Wang *et al* (1996) *Genomics* **34**, 9-16; and Sonslova *et al* (1997) *Genomics* **41**, 201-209).

The brain-type Na^+ channels (rat brain I-III (Noda *et al* (1986) *Nature* **322**, 826-828; Kayano *et al* (1988) *FEBS Lett.* **228**, 187-194) that are most similar to hNe-Na are 20% different over the whole sequence (human skeletal, 30%; heart 34% different). However, (i) if sequence comparison is made within specific structural/functional domains this homology is much reduced (eg first one-third of DII-DIII cytoplasmic linker region is only 45% homologous to the most similar channel (RBII/HBII); (ii) hNe-Na has sufficiently different regions (eg residues 446-460: EYTSIRRSRIMGLSE) to make specific antibodies (see, for example, Toledo-Aral *et al* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1527-1532).

It is an object of the invention to provide methods useful in providing diagnoses and prognoses of cancer, especially prostate cancer, and for aiding the clinician in the management of cancer, particularly prostate cancer. In particular, an object of the invention is to provide a method of assessing the metastatic potential of cancer, in particular prostate cancer.

Further objects of the invention include the provision of methods of treatment of cancer, in particular prostate cancer, and methods of identifying compounds which selectively inhibit the VGSC associated with human cancer, particularly prostate cancer, since these may be useful in treating cancer.

A first aspect of the invention provides a method of determining the susceptibility of a human patient to cancer comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer.

A second aspect of the invention provides a method of diagnosing cancer in a human patient comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer.

It will be appreciated that determining whether the sample contains a level of hNe-Na VGSC nucleic acid or protein associated with cancer may in itself be diagnostic of cancer or it may be used by the clinician as an aid in reaching a diagnosis.

For example, in relation to prostate cancer, it is useful if the clinician undertakes a histopathological examination of biopsy tissue or measures plasma PSA level or carries out external digital examination or carries out imaging. Recently, the possibility of using the blood IGF-1 level has also been suggested (Chan *et al* (1998) *Science* **279**, 563-566). It will be appreciated that the clinician will wish to take in to account these or other factors, as well as consider the level of said VGSC, before making a diagnosis.

A third aspect of the invention provides a method of predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer in a human patient comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer.

Thus, the method of the third aspect of the invention may be useful in prognosis or aiding prognosis. The method may be used as an adjunct to known prognostic methods such as histopathological examination of biopsy tissue, or measurement of plasma PSA levels, external digital examination or imaging.

It will be appreciated that determination of the level of the said VGSC in the sample will be useful to the clinician in determining how to manage the cancer in the patient. For example, since elevated levels of the said VGSC are associated with metastatic potential, particularly in a prostate cancer, and may be associated with androgen-insensitivity, the clinician may use the information concerning the levels of the said VGSC to

facilitate decision making regarding treatment of the patient. Thus, if the level of said VGSC is indicative of a low metastatic potential of said prostate cancer, unnecessary radical surgery may be avoided. Similarly, if the level of said VGSC is indicative of a high metastatic potential of said prostate cancer, radical surgery (ie prostatectomy) may be the preferred treatment.

It will be appreciated from the foregoing, and from the Examples below, that the determination of the levels of the said VGSC may be exploited diagnostically to predict whether a given cancer, particularly cancer of the prostate, would metastasise since expression of said VGSC is believed to correspond to possible future spread of a tumour.

It is particularly preferred if the cancer under consideration is prostate cancer.

It is also particularly preferred if the method of the invention is employed to predict whether a given cancer of the prostate would metastasise.

The level of said VGSC which is indicative of cancer or metastatic potential may be defined as the increased level present in known cancerous or metastatic prostate cells over known non-cancerous or non-metastatic prostate cells. The level of said VGSC protein may be, for example, at least 1½ fold higher in cancerous cells or metastatic cells, or it may be at least 2-fold or 3-fold higher. Quantitative analysis by micro-densitometry of immunohistochemically processed tissue sections has shown that VGSC expression in cancerous regions of prostatic ducts is three times higher than the corresponding benign region (see Example 3). The antibody used is believed to react with all VGSCs, but our findings in Example 1

indicate that the hNe-Na Na^+ channel is likely to be the predominant form in human prostate cancer cells, and it is therefore likely that it is mainly the hNe-Na Na^+ channel which is being recognised. The level of mRNA encoding said VGSC may be, for example, at least 1½ fold higher in cancerous cells or metastatic cells, or it may be at least 2-fold or 3-fold higher, or at least 10, 50, 100, 500 or 1000-fold higher. Measurements by semi-quantitative PCR indicates that the level of mRNA is about 1000-fold higher in the highly metastatic cell lines than in the lowly-metastatic cell lines, as described in the Examples.

In one preferred embodiment of the invention it is determined whether the level of said VGSC nucleic acid, in particular mRNA, is a level associated with cancer. Preferably, the sample contains nucleic acid, such as mRNA, and the level of said VGSC is measured by contacting said nucleic acid with a nucleic acid which hybridises selectively to said VGSC nucleic acid.

By "selectively hybridising" is meant that the nucleic acid has sufficient nucleotide sequence similarity with the said human nucleic acid that it can hybridise under moderately or highly stringent conditions. As is well known in the art, the stringency of nucleic acid hybridization depends on factors such as length of nucleic acid over which hybridisation occurs, degree of identity of the hybridizing sequences and on factors such as temperature, ionic strength and CG or AT content of the sequence. Thus, any nucleic acid which is capable of selectively hybridising as said is useful in the practice of the invention.

Nucleic acids which can selectively hybridise to the said human nucleic acid include nucleic acids which have >95% sequence identity, preferably

those with >98%, more preferably those with >99% sequence identity, over at least a portion of the nucleic acid with the said human nucleic acid. As is well known, human genes usually contain introns such that, for example, a mRNA or cDNA derived from a gene would not match perfectly along its entire length with the said human genomic DNA but would nevertheless be a nucleic acid capable of selectively hybridising to the said human DNA. Thus, the invention specifically includes nucleic acids which selectively hybridise to said VGSC mRNA or cDNA but may not hybridise to a said VGSC gene. For example, nucleic acids which span the intron-exon boundaries of the said VGSC gene may not be able to selectively hybridise to the said VGSC mRNA or cDNA.

Typical moderately or highly stringent hybridisation conditions which lead to selective hybridisation are known in the art, for example those described in *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd edition, Sambrook *et al* (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, incorporated herein by reference.

An example of a typical hybridisation solution when a nucleic acid is immobilised on a nylon membrane and the probe nucleic acid is ≥ 500 bases or base pairs is:

6 x SSC (saline Na^+ citrate)
0.5% Na^+ dodecyl sulphate (SDS)
100 μg/ml denatured, fragmented salmon sperm DNA

The hybridisation is performed at 68°C. The nylon membrane, with the nucleic acid immobilised, may be washed at 68°C in 1 x SSC or, for high stringency, 0.1 x SSC.

20 x SSC may be prepared in the following way. Dissolve 175.3 g of NaCl and 88.2 g of Na^+ citrate in 800 ml of H_2O. Adjust the pH to 7.0 with a few drops of a 10 N solution of NaOH. Adjust the volume to 1 litre with H_2O. Dispense into aliquots. Sterilize by autoclaving.

An example of a typical hybridisation solution when a nucleic acid is immobilised on a nylon membrane and the probe is an oligonucleotide of between 15 and 50 bases is:

3.0 M trimethylammonium chloride (TMACl)
0.01 M Na^+ phosphate (pH 6.8)
1 mm EDTA (pH 7.6)
0.5% SDS
100 µg/ml denatured, fragmented salmon sperm DNA
0.1% nonfat dried milk

The optimal temperature for hybridization is usually chosen to be 5°C below the T_l for the given chain length. T_l is the irreversible melting temperature of the hybrid formed between the probe and its target sequence. Jacobs *et al* (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 4637 discusses the determination of T_ls. The recommended hybridization temperature for 17-mers in 3 M TMACl is 48-50°C; for 19-mers, it is 55-57°C; and for 20-mers, it is 58-66°C.

By "nucleic acid which selectively hybridises" is also included nucleic acids which will amplify DNA from the said VGSC mRNA by any of the well known amplification systems such as those described in more detail below, in particular the polymerase chain reaction (PCR). Suitable

conditions for PCR amplification include amplification in a suitable 1 x amplification buffer;

10 x amplification buffer is 500 mM KCl; 100 mM Tris.Cl (pH 8.3 at room temperature); 15 mM $MgCl_2$; 0.1% gelatin.

A suitable denaturing agent or procedure (such as heating to 95°C) is used in order to separate the strands of double-stranded DNA.

Suitably, the annealing part of the amplification is between 37°C and 60°C, preferably 50°C.

Although the nucleic acid which is useful in the methods of the invention may be RNA or DNA, DNA is preferred. Although the nucleic acid which is useful in the methods of the invention may be double-stranded or single-stranded, single-stranded nucleic acid is preferred under some circumstances such as in nucleic acid amplification reactions.

The nucleic acid which is useful in the methods of the invention may be any suitable size. However, for certain diagnostic, probing or amplifying purposes, it is preferred if the nucleic acid has fewer than 10 000, more preferably fewer than 1000, more preferably still from 10 to 100, and in further preference from 15 to 30 base pairs (if the nucleic acid is double-stranded) or bases (if the nucleic acid is single stranded). As is described more fully below, single-stranded DNA primers, suitable for use in a polymerase chain reaction, are particularly preferred.

The nucleic acid for use in the methods of the invention is a nucleic acid capable of hybridising to the said VGSC mRNAs. Fragments of the said

VGSC genes and cDNAs derivable from the mRNA encoded by the said VGSC genes are also preferred nucleic acids for use in the methods of the invention.

It is particularly preferred if the nucleic acid for use in the methods of the invention is an oligonucleotide primer which can be used to amplify a portion of the said VGSC nucleic acid, particularly VGSC mRNA.

The hNe-Na mRNA is similar to, but distinct from other VGSC mRNAs. Nucleic acids for use in the invention may hybridise to more than one, for example all, substantially all or a particular subset of VGSC mRNAs. This is discussed further in Examples 1 and 2. Thus the nucleic acid for use in the invention may hybridise to a part of VGSC mRNAs that encodes a region of the VGSC polypeptide that is conserved between VGSCs, for example has the same amino acid sequence in all, substantially all or a particular subset of VGSCs. Preferred nucleic acids for use in the invention are those that selectively hybridise to the hNe-Na mRNA and do not hybridise to other VGSC mRNAs. Such selectively hybridising nucleic acids can be readily obtained, for example, by reference to whether or not they hybridise to the said VGSC mRNA and not to other VGSC mRNAs.

Methods and nucleic acids as described, for example, in Example 1, may be used. In particular, a semi-quantitative PCR technique, for example as described in Example 1, may be used.

The methods are suitable in respect of any cancer but it is preferred if the cancer is cancer of the prostate.

It is preferred if the nucleic acid is derived from a sample of the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found. For example, if the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found is prostate, it is preferred if the sample containing nucleic acid is derived from the prostate of the patient. Samples of prostate may be obtained by surgical excision, laproscopy and biopsy, endoscopy and biopsy, and image-guided biopsy. The image may be generated by ultrasound or technetium-99-labelled antibodies or antibody fragments which bind or locate selectively at the prostate.

Although any sample containing nucleic acid derived from the patient is useful in the methods of the invention, it is preferred if the sample is selected from the group consisting of prostate tissue, blood, urine or semen. Prostate tissue can be obtained from a patient using standard surgical techniques. Cells derived from the prostate are found in small numbers in the urine and in the blood. Although it is preferred that the sample containing nucleic acid from the patient is, or is derived directly from, a cell of the patient, such as a prostate cell, a sample indirectly derived from a patient, such as a cell grown in culture, is also included within the invention. Equally, although the nucleic acid derived from the patient may have been physically within the patient, it may alternatively have been copied from nucleic acid which was physically within the patient. The tumour tissue may be taken from the primary tumour or from metastases, and particularly may be taken from the margins of the tumour.

It will be appreciated that the aforementioned methods may be used for presymptomatic screening of a patient who is in a risk group for cancer. For example, men older than about 60 years may be at greater risk of

prostate cancer than men below the age of 35. Similarly, the methods may be used for the pathological classification of tumours such as prostate tumours.

It is preferred that if blood, semen, lymphatic circulation or urine is the source of the said sample containing nucleic acid derived from the patient that the sample is enriched for prostate-derived tissue or cells. Enrichment for prostate cells may be achieved using, for example, cell sorting methods such as fluorescent activated cell sorting (FACS) using a prostate-selective antibody such as one directed to prostate-specific antigen (PSA). Alternatively, enrichment may be achieved using magnetic beads or other solid support, for example a column, coated with such a prostate-specific antibody, for example an anti-PSA antibody. The source of the said sample also includes biopsy material and tumour samples, also including fixed paraffin mounted specimens as well as fresh or frozen tissue.

Conveniently, the nucleic acid capable of selectively hybridising to the said human nucleic acid such as mRNA and which is used in the methods of the invention further comprises a detectable label.

By "detectable label" is included any convenient radioactive label such as ^{32}P, ^{33}P or ^{35}S which can readily be incorporated into a nucleic acid molecule using well known methods; any convenient fluorescent or chemiluminescent label which can readily be incorporated into a nucleic acid is also included. In addition the term "detectable label" also includes a moiety which can be detected by virtue of binding to another moiety (such as biotin which can be detected by binding to streptavidin); and a moiety, such as an enzyme, which can be detected by virtue of its ability

to convert a colourless compound into a coloured compound, or *vice versa* (for example, alkaline phosphatase can convert colourless o-nitrophenylphosphate into coloured *o*-nitrophenol). Conveniently, the nucleic acid probe may occupy a certain position in a fixed array and whether the nucleic acid hybridises to the said VGSC nucleic acid can be determined by reference to the position of hybridisation in the fixed array.

Primers which are suitable for use in a polymerase chain reaction (PCR; Saiki *et al* (1988) *Science* **239**, 487-491) are preferred. Suitable PCR primers may have the following properties:

It is well known that the sequence at the 5′ end of the oligonucleotide need not match the target sequence to be amplified.

It is usual that the PCR primers do not contain any complementary structures with each other longer than 2 bases, especially at their 3′ ends, as this feature may promote the formation of an artifactual product called "primer dimer". When the 3′ ends of the two primers hybridize, they form a "primed template" complex, and primer extension results in a short duplex product called "primer dimer".

Internal secondary structure should be avoided in primers. For symmetric PCR, a 40-60% G+C content is often recommended for both primers, with no long stretches of any one base. The classical melting temperature calculations used in conjunction with DNA probe hybridization studies often predict that a given primer should anneal at a specific temperature or that the 72°C extension temperature will dissociate the primer/template hybrid prematurely. In practice, the hybrids are more effective in the PCR process than generally predicted by simple T_m calculations.

Optimum annealing temperatures may be determined empirically and may be higher than predicted. *Taq* DNA polymerase does have activity in the 37-55°C region, so primer extension will occur during the annealing step and the hybrid will be stabilized. The concentrations of the primers are equal in conventional (symmetric) PCR and, typically, within 0.1- to 1-μM range.

Any of the nucleic acid amplification protocols can be used in the method of the invention including the polymerase chain reaction, QB replicase and ligase chain reaction. Also, NASBA (nucleic acid sequence based amplification), also called 3SR, can be used as described in Compton (1991) *Nature* **350**, 91-92 and *AIDS* (1993), Vol 7 (Suppl 2), S108 or SDA (strand displacement amplification) can be used as described in Walker *et al* (1992) *Nucl. Acids Res.* **20**, 1691-1696. The polymerase chain reaction is particularly preferred because of its simplicity.

When a pair of suitable nucleic acids of the invention are used in a PCR it is convenient to detect the product by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. As an alternative to detecting the product of DNA amplification using agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of the DNA, it is convenient to use a labelled oligonucleotide capable of hybridising to the amplified DNA as a probe. When the amplification is by a PCR the oligonucleotide probe hybridises to the interprimer sequence as defined by the two primers. The oligonucleotide probe is preferably between 10 and 50 nucleotides long, more preferably between 15 and 30 nucleotides long. The probe may be labelled with a radionuclide such as ^{32}P, ^{33}P and ^{35}S using standard techniques, or may be labelled with a fluorescent dye. When the oligonucleotide probe is

fluorescently labelled, the amplified DNA product may be detected in solution (see for example Balaguer *et al* (1991) "Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescence adsorbent" *Anal. Biochem.* **195**, 105-110 and Dilesare *et al* (1993) "A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation" *BioTechniques* **15**, 152-157.

PCR products can also be detected using a probe which may have a fluorophore-quencher pair or may be attached to a solid support or may have a biotin tag or they may be detected using a combination of a capture probe and a detector probe.

Fluorophore-quencher pairs are particularly suited to quantitative measurements of PCR reactions (eg RT-PCR). Fluorescence polarisation using a suitable probe may also be used to detect PCR products.

In a further preferred embodiment, the level of said VGSC protein is measured. Preferably, the level of said protein is measured by contacting the protein with a molecule which selectively binds to hNe-Na VGSC.

The sample containing protein derived from the patient is conveniently a sample tissue.

The sample containing protein derived from the patient is conveniently a sample of the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found. These methods may be used for any cancer, but they are particularly suitable in respect of cancer of the prostate. Methods of obtaining suitable samples are described in relation to earlier methods.

The methods of the invention involving detection of the said VGSC proteins are particularly useful in relation to historical samples such as those containing paraffin-embedded sections of tumour samples.

The level of said VGSC protein may be determined in a sample in any suitable way. Example 2 describes the detection of VGSC protein, including hNe-Na VGSC protein, in tissue sections of human prostate.

It is particularly preferred if the molecule which selectively binds to hNe-Na VGSC is an antibody.

Antibodies which can selectively bind to VGSCs or a particular form or forms of VGSC can be made, for example, by using peptides which are respectively conserved in all or in particular VGSCs, or which encompass the differences between one form of VGSC and the other forms.

The antibodies may be monoclonal or polyclonal. Suitable monoclonal antibodies may be prepared by known techniques, for example those disclosed in "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) and in "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982), both of which are incorporated herein by reference.

The level of said VGSC which is indicative of cancer or metastatic potential may be defined as the increased level present in known cancerous or metastatic prostate cells over known non-cancerous or non-metastatic prostate cells. The level may be, for example, at least 1½ fold higher in cancerous or metastatic cells, or it may be at least 2-fold or 3-fold higher.

By "the relative amount of said VGSC protein" is meant the amount of said VGSC protein per unit mass of sample tissue or per unit number of sample cells compared to the amount of said VGSC protein per unit mass of known normal tissue or per unit number of normal cells. The relative amount may be determined using any suitable protein quantitation method. In particular, it is preferred if antibodies are used and that the amount of said VGSC protein is determined using methods which include quantitative western blotting, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) or quantitative immunohistochemistry.

Other techniques for raising and purifying antibodies are well known in the art and any such techniques may be chosen to achieve the preparations useful in the methods claimed in this invention. In a preferred embodiment of the invention, antibodies will immunoprecipitate said VGSC proteins from solution as well as react with said VGSC protein on western or immunoblots of polyacrylamide gels. In another preferred embodiment, antibodies will detect said VGSC proteins in paraffin or frozen tissue sections, using immunocytochemical techniques.

Preferred embodiments relating to methods for detecting said VGSC protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), radioimmunoassay (RIA), immunoradiometric assays (IRMA) and immunoenzymatic assays (IEMA), including sandwich assays using monoclonal and/or polyclonal antibodies. Exemplary sandwich assays are described by David *et al* in US Patent Nos. 4,376,110 and 4,486,530, hereby incorporated by reference.

It will be appreciated that other antibody-like molecules may be used in the method of the inventions including, for example, antibody fragments

or derivatives which retain their antigen-binding sites, synthetic antibody-like molecules such as single-chain Fv fragments (ScFv) and domain antibodies (dAbs), and other molecules with antibody-like antigen binding motifs.

In a further embodiment the level of hNe-Na VGSC is measured by selectively assaying its activity in the sample. The activity of VGSC, for example hNe-Na VGSC, in a sample may be assayed by dissociating a biopsy into single cells and in culture assaying (i) the effect of Na^+ channel blockers on their motility and (ii) detecting Na^+ channel activity by electrophysiological recording.

Preferred diagnostic methods of the invention include what can broadly be described as "invasive" methods and "non-invasive" methods. Invasive methods include, for example, the taking of a biopsy for detection of Na^+ channel expression by, for example, (a) immunohistochemical application of a sequence-specific antibody, (b) *in situ* PCR on tissue sections, or (c) reverse transcription (RT)-PCR of epithelial cells after separating them from the biopsy. Non-invasive methods include obtaining prostate-derived cells from urine, ejaculate or blood, which may be separated by affinity to PSA, and assayed for Na^+ channel expression by PCR.

A further aspect of the invention provides use of an agent which is capable of use in determining the level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel protein or nucleic acid in a sample in the manufacture of a reagent for diagnosing cancer. The agent may suitably be a nucleic acid which selectively hybridises to hNe-Na VGSC nucleic acid or the agent may be a molecule which selectively binds to hNe-Na VGSC protein or the agent

may be an agent useful in selectively assaying the activity of hNe-Na VGSC.

The agents as defined are therefore useful in a method of diagnosing cancer.

A further aspect of the invention comprises a kit of parts useful for diagnosing cancer, especially prostate cancer, comprising an agent which is capable of use in determining the level of hNe-Na VGSC protein or nucleic acid in a sample. The agent may be a nucleic acid which selectively hybridises to hNe-Na VGSC nucleic acid or the agent may be a molecule which selectively binds to hNe-Na VGSC protein or the agent may be an agent useful in selectively assaying the activity of heNe-Na VGSC.

Preferably, the kit further comprises a control sample containing hNe-Na VGSC nucleic acid or protein wherein the control sample may be a negative control (which contains a level of VGSC protein or nucleic acid which is not associated with cancer or a high metastatic potential for cancer) or it may be a positive control (which contains a level of VGSC protein or nucleic acid which is associated with cancer or a high metastatic potential for cancer). The kit may contain both negative and positive controls. The kit may usefully contain controls of hNe-Na VGSC protein or nucleic acid which correspond to different amounts such that a calibration curve may be made.

Suitably, the kit further comprises means for separating prostatic epithelial cells from a sample in order to carry out said VGSC assay. Preferably,

the means for separating prostatic epithelial cells includes anti PSA-antibody-coated micro-beads or columns.

A further aspect of the invention provides a method of treating cancer comprising the step of administering to the patient an agent which selectively prevents the function of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel.

As will be apparent to the skilled person, the term "prevents" encompasses partial prevention of the function ie reduction of the function. Thus, the effect of the agent may appear as reduction, preferably marked reduction, of the observed function.

By "an agent which selectively prevents the function of hNe-Na VGSC" we include agents that (a) inhibit the expression of said VGSCs or (b) inhibit the activity of said VGSCs.

Agents that prevent the function of hNe-Na VGSC may include antagonists of epidermal growth factor (EGF) (which antagonist may be an antibody reactive with EGF or its receptor (EGFR)) and antagonists of other growth factors (for example nerve growth factor) and hormones (including androgens) (which antagonist may similarly be an antibody). Thus, an EGF receptor kinase inhibitor or an EGF receptor antibody may inhibit VGSC function (which is predominantly hNe-Na) in a prostate cancer cell line, as discussed in Example 4. These agents may act as agents that prevent the expression of hNe-Na VGSCs.

EGF antagonists may include monoclonal antibodies (for example cetuximab [IMC-C225]) directed against the extracellular binding domain of the EGF receptor; Trastuzumab (a monoclonal antibody binding to the

HER2 receptor (human EGF receptor 2); an EGF receptor kinase inhibitor, for example OSI-774, PD182905, PKI-166, CI-1033 or ZD1839.

Agents that prevent the expression of said VGSCs include but are not limited to antisense agents and ribozymes.

Antisense oligonucleotides are single-stranded nucleic acid, which can specifically bind to a complementary nucleic acid sequence. By binding to the appropriate target sequence, an RNA-RNA, a DNA-DNA, or RNA-DNA duplex is formed. These nucleic acids are often termed "antisense" because they are complementary to the sense or coding strand of the gene. Recently, formation of a triple helix has proven possible where the oligonucleotide is bound to a DNA duplex. It was found that oligonucleotides could recognise sequences in the major groove of the DNA double helix. A triple helix was formed thereby. This suggests that it is possible to synthesise sequence-specific molecules which specifically bind double-stranded DNA *via* recognition of major groove hydrogen binding sites.

By binding to the target nucleic acid, the above oligonucleotides can inhibit the function of the target nucleic acid. This could, for example, be a result of blocking the transcription, processing, poly(A)addition, replication, translation, or promoting inhibitory mechanisms of the cells, such as promoting RNA degradations.

Antisense oligonucleotides are prepared in the laboratory and then introduced into cells, for example by microinjection or uptake from the cell culture medium into the cells, or they are expressed in cells after

transfection with plasmids or retroviruses or other vectors carrying an antisense gene. Antisense oligonucleotides were first discovered to inhibit viral replication or expression in cell culture for Rous sarcoma virus, vesicular stomatitis virus, herpes simplex virus type 1, simian virus and influenza virus. Since then, inhibition of mRNA translation by antisense oligonucleotides has been studied extensively in cell-free systems including rabbit reticulocyte lysates and wheat germ extracts. Inhibition of viral function by antisense oligonucleotides has been demonstrated *in vitro* using oligonucleotides which were complementary to the AIDS HIV retrovirus RNA (Goodchild, J. 1988 "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Replication by Antisense Oligodeoxynucleotides", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**(15), 5507-11). The Goodchild study showed that oligonucleotides that were most effective were complementary to the poly(A) signal; also effective were those targeted at the 5′ end of the RNA, particularly the cap and 5′ untranslated region, next to the primer binding site and at the primer binding site. The cap, 5′ untranslated region, and poly(A) signal lie within the sequence repeated at the ends of retrovirus RNA (R region) and the oligonucleotides complementary to these may bind twice to the RNA.

Oligonucleotides are subject to being degraded or inactivated by cellular endogenous nucleases. To counter this problem, it is possible to use modified oligonucleotides, eg having altered internucleotide linkages, in which the naturally occurring phosphodiester linkages have been replaced with another linkage. For example, Agrawal *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7079-7083 showed increased inhibition in tissue culture of HIV-1 using oligonucleotide phosphoramidates and phosphorothioates. Sarin *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7448-7451 demonstrated increased inhibition of HIV-1 using oligonucleotide methylphosphonates.

Agrawal *et al* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7790-7794 showed inhibition of HIV-1 replication in both early-infected and chronically infected cell cultures, using nucleotide sequence-specific oligonucleotide phosphorothioates. Leither *et al* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3430-3434 report inhibition in tissue culture of influenza virus replication by oligonucleotide phosphorothioates.

Oligonucleotides having artificial linkages have been shown to be resistant to degradation *in vivo*. For example, Shaw *et al* (1991) in *Nucleic Acids Res.* **19**, 747-750, report that otherwise unmodified oligonucleotides become more resistant to nucleases *in vivo* when they are blocked at the 3' end by certain capping structures and that uncapped oligonucleotide phosphorothioates are not degraded *in vivo*.

A detailed description of the H-phosphonate approach to synthesizing oligonucleoside phosphorothioates is provided in Agrawal and Tang (1990) *Tetrahedron Letters* **31**, 7541-7544, the teachings of which are hereby incorporated herein by reference. Syntheses of oligonucleoside methylphosphonates, phosphorodithioates, phosphoramidates, phosphate esters, bridged phosphoramidates and bridge phosphorothioates are known in the art. See, for example, Agrawal and Goodchild (1987) *Tetrahedron Letters* **28**, 3539; Nielsen *et al* (1988) *Tetrahedron Letters* **29**, 2911; Jager *et al* (1988) *Biochemistry* **27**, 7237; Uznanski *et al* (1987) *Tetrahedron Leiters* **28**, 3401; Bannwarth (1988) *Helv. Chim. Acta.* **71**, 1517; Crosstick and Vyle (1989) *Tetrahedron Letters* 30, 4693; Agrawal *et al* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1401-1405, the teachings of which are incorporated herein by reference. Other methods for synthesis or production also are possible. In a preferred embodiment the oligonucleotide

is a deoxyribonucleic acid (DNA), although ribonucleic acid (RNA) sequences may also be synthesized and applied.

The oligonucleotides useful in the invention preferably are designed to resist degradation by endogenous nucleolytic enzymes. *In vivo* degradation of oligonucleotides produces oligonucleotide breakdown products of reduced length. Such breakdown products are more likely to engage in non-specific hybridization and are less likely to be effective, relative to their full-length counterparts. Thus, it is desirable to use oligonucleotides that are resistant to degradation in the body and which are able to reach the targeted cells. The present oligonucleotides can be rendered more resistant to degradation *in vivo* by substituting one or more internal artificial internucleotide linkages for the native phosphodiester linkages, for example, by replacing phosphate with sulphur in the linkage. Examples of linkages that may be used include phosphorothioates, methylphosphonates, sulphone, sulphate, ketyl, phosphorodithioates, various phosphoramidates, phosphate esters, bridged phosphorothioates and bridged phosphoramidates. Such examples are illustrative, rather than limiting, since other internucleotide linkages are known in the art. See, for example, Cohen, (1990) *Trends in Biotechnology*. The synthesis of oligonucleotides having one or more of these linkages substituted for the phosphodiester internucleotide linkages is well known in the art, including synthetic pathways for producing oligonucleotides having mixed internucleotide linkages.

Oligonucleotides can be made resistant to extension by endogenous enzymes by "capping" or incorporating similar groups on the 5′ or 3′ terminal nucleotides. A reagent for capping is commercially available as Amino-Link II™ from Applied BioSystems Inc, Foster City, CA. Methods for capping are described, for example, by Shaw *et al* (1991) *Nucleic Acids*

Res. **19**, 747-750 and Agrawal *et al* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88(17)**, 7595-7599, the teachings of which are hereby incorporated herein by reference.

A further method of making oligonucleotides resistant to nuclease attack is for them to be "self-stabilized" as described by Tang *et al* (1993) *Nucl. Acids Res.* **21**, 2729-2735 incorporated herein by reference. Self-stabilized oligonucleotides have hairpin loop structures at their 3' ends, and show increased resistance to degradation by snake venom phosphodiesterase, DNA polymerase I and fetal bovine serum. The self-stabilized region of the oligonucleotide does not interfere in hybridization with complementary nucleic acids, and pharmacokinetic and stability studies in mice have shown increased *in vivo* persistence of self-stabilized oligonucleotides with respect to their linear counterparts.

In accordance with the invention, the inherent binding specificity of antisense oligonucleotides characteristic of base pairing is enhanced by limiting the availability of the antisense compound to its intend locus *in vivo*, permitting lower dosages to be used and minimizing systemic effects. Thus, oligonucleotides are applied locally to achieve the desired effect. The concentration of the oligonucleotides at the desired locus is much higher than if the oligonucleotides were administered systemically, and the therapeutic effect can be achieved using a significantly lower total amount. The local high concentration of oligonucleotides enhances penetration of the targeted cells and effectively blocks translation of the target nucleic acid sequences.

The oligonucleotides can be delivered to the locus by any means appropriate for localized administration of a drug. For example, a solution of the

oligonucleotides can be injected directly to the site or can be delivered by infusion using an infusion pump. The oligonucleotides also can be incorporated into an implantable device which when placed at the desired site, permits the oligonucleotides to be released into the surrounding locus.

The oligonucleotides may be administered *via* a hydrogel material. The hydrogel is noninflammatory and biodegradable. Many such materials now are known, including those made from natural and synthetic polymers. In a preferred embodiment, the method exploits a hydrogel which is liquid below body temperature but gels to form a shape-retaining semisolid hydrogel at or near body temperature. Preferred hydrogel are polymers of ethylene oxide-propylene oxide repeating units. The properties of the polymer are dependent on the molecular weight of the polymer and the relative percentage of polyethylene oxide and polypropylene oxide in the polymer. Preferred hydrogels contain from about 10 to about 80% by weight ethylene oxide and from about 20 to about 90% by weight propylene oxide. A particularly preferred hydrogel contains about 70% polyethylene oxide and 30% polypropylene oxide. Hydrogels which can be used are available, for example, from BASF Corp., Parsippany, NJ, under the tradename Pluronic®.

In this embodiment, the hydrogel is cooled to a liquid state and the oligonucleotides are admixed into the liquid to a concentration of about 1 mg oligonucleotide per gram of hydrogel. The resulting mixture then is applied onto the surface to be treated, for example by spraying or painting during surgery or using a catheter or endoscopic procedures. As the polymer warms, it solidifies to form a gel, and the oligonucleotides diffuse out of the gel into the surrounding cells over a period of time defined by the exact composition of the gel.

The oligonucleotides can be administered by means of other implants that are commercially available or described in the scientific literature, including liposomes, microcapsules and implantable devices. For example, implants made of biodegradable materials such as polyanhydrides, polyorthoesters, polylactic acid and polyglycolic acid and copolymers thereof, collagen, and protein polymers, or non-biodegradable materials such as ethylenevinyl acetate (EVAc), polyvinyl acetate, ethyfene vinyl alcohol, and derivatives thereof can be used to locally deliver the oligonucleotides. The oligonucleotides can be incorporated into the material as it is polymerized or solidified, using melt or solvent evaporation techniques, or mechanically mixed with the material. In one embodiment, the oligonucleotides are mixed into or applied onto coatings for implantable devices such as dextran coated silica beads, stents, or catheters. Polymeric nanoparticles/biodegradable drug carriers may also be used (Mader (1998) *Radiol. Oncol.* **32**, 89-94).

The dose of oligonucleotides is dependent on the size of the oligonucleotides and the purpose for which it is administered. In general, the range is calculated based on the surface area of tissue to be treated. The effective dose of oligonucleotide is somewhat dependent on the length and chemical composition of the oligonucleotide but is generally in the range of about 30 to 3000 μg per square centimetre of tissue surface area.

The oligonucleotides may be administered to the patient systemically for both therapeutic and prophylactic purposes. The oligonucleotides may be administered by any effective method, for example, parenterally (eg intravenously, subcutaneously, intramuscularly) or by oral, nasal or other means which permit the oligonucleotides to access and circulate in the

patient's bloodstream. Oligonucleotides administered systemically preferably are given in addition to locally administered oligonucleotides, but also have utility in the absence of local administration. A dosage in the range of from about 0.1 to about 10 grams per administration to an adult human generally will be effective for this purpose.

It will be appreciated that it may be desirable to target the antisense oligonucleotides to the prostate. This may be achieved by administering the antisense oligonucleotides to the prostate, or it may be achieved by using antisense oligonucleotides which are in association with a molecule which selectively directs the antisense oligonucleotide to the prostate. For example, the antisense oligonucleotide may be associated with an antibody or antibody like molecule which selectively binds a prostate-related antigen such as PSA. By "associated with" we mean that the antisense oligonucleotide and the prostate-directing entity are so associated that the prostate-directing entity is able to direct the antisense oligonucleotide to the prostate cells.

It will be appreciated that antisense agents also include larger molecules, for example of around one hundred to several hundred bases which bind to said VGSC mRNA or genes and substantially prevent expression of said VGSC mRNA or genes and substantially prevent expression of said VGSC protein. Thus, expression of an antisense molecule which is substantially complementary to said VGSC mRNA is envisaged as part of the invention.

Thus, in this approach, synthetic oligonucleotides with antisense sequence to specific regions of (i) hNe-Na channels or (ii) VGSCs generally are administered to block channel activity. Details of particular synthetic oligonucleotides are given in Example 2. It is noteworthy that antisense

oligonucleotide technology has already been used to manipulate potassium channels *in vitro* (Roy *et al* (1996) *Glia* **18**, 174-188) and VGSCs *in vitro* (*Biochem Biophys Res Comm* (1997) **234**, 235-241) and in blocking neuropathic pain (Lai *et al* (1999) "Blockade of neuropathic pain by antisense targeting of tetrodotoxin-resistant sodium channels in sensory neurons" *Methods in Enzymol* **314**, 201-213).

A further method for blocking said VGSC activity includes dominant negative suppression. In this technique, a mutated VGSC gene product suppresses or eliminates the activity of the corresponding normal gene product when the two are co-expressed. In the case of voltage-gated potassium channels (VGPCs) which comprise 4 alpha subunits, such an approach making use of a highly truncated gene product, has been used successfully to suppress functional expression of VGPCs *in vitro* (Tu *et al* (1995) *Biophys. J.* **68**, 147-156) and *in vivo* (London *et al* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2926-2931). The truncated subunit is capable of binding to other VGPC subunits but does not contain the residues required for channel functioning. Thus, the activity of the "combined" VGPC is blocked. A number of naturally occurring alternatively spliced channel subunits have been detected which may function to suppress VGPC activity by a similar mechanism *in vivo* (Baumann *et al* (1987) *EMBO J.* **6**, 3419-3429; Kamb *et al* (1988) *Neuron* 1, 421-430; and Pongs *et al* (1988) *EMBO J.* 7, 1087-1096). We believe that VGSC may similarly be suppressed by interfering with functional channel formation. Although VGSCs are formed from a single alpha subunit (comprising four functional domains), recent studies have demonstrated the specific expression (during development in human, mouse and fish) of truncated VGSC proteins possessing only two domains which might function in a dominant negative manner to control

VGSC activity (Plummer *et al* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24008-24015; and Oh & Waxman (1998) *NeuroReport* **9**, 1267-1271).

The larger molecules may be expressed from any suitable genetic construct as is described below and delivered to the patient. Typically, the genetic construct which expresses the antisense molecule comprises at least a portion of the said VGSC cDNA or gene operatively linked to a promoter which can express the antisense molecule in the cell, preferably prostate cell, which is or may become cancerous.

Although the genetic construct can be DNA or RNA it is preferred if it is DNA.

Preferably, the genetic construct is adapted for delivery to a human cell.

Means and methods of introducing a genetic construct into a cell in an animal body are known in the art. For example, the constructs of the invention may be introduced into the tumour cells by any convenient method, for example methods involving retroviruses, so that the construct is inserted into the genome of the tumour cell. For example, in Kuriyama *et al* (1991) *Cell Struc. and Func.* **16**, 503-510 purified retroviruses are administered. Retroviruses provide a potential means of selectively infecting cancer cells because they can only integrate into the genome of dividing cells; most normal cells surrounding cancers are in a quiescent, non-receptive stage of cell growth or, at least, are dividing much less rapidly than the tumour cells. Retroviral DNA constructs which encode said antisense agents may be made using methods well known in the art. To produce active retrovirus from such a construct it is usual to use an

ecotropic psi2 packaging cell line grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% foetal calf serum (FCS). Transfection of the cell line is conveniently by calcium phosphate co-precipitation, and stable transformants are selected by addition of G418 to a final concentration of 1 mg/ml (assuming the retroviral construct contains a *neo*^{R} gene). Independent colonies are isolated and expanded and the culture supernatant removed, filtered through a 0.45 μm pore-size filter and stored at -70°. For the introduction of the retrovirus into the tumour cells, it is convenient to inject directly retroviral supernatant to which 10 μg/ml Polybrene has been added. For tumours exceeding 10 mm in diameter it is appropriate to inject between 0.1 ml and 1 ml of retroviral supernatant; preferably 0.5 ml.

Alternatively, as described in Culver *et al* (1992) *Science* **256**, 1550-1552, cells which produce retroviruses are injected into the tumour. The retrovirus-producing cells so introduced are engineered to actively produce retroviral vector particles so that continuous productions of the vector occurred within the tumour mass *in situ*. Thus, proliferating tumour cells can be successfully transduced *in vivo* if mixed with retroviral vector-producing cells.

Targeted retroviruses are also available for use in the invention; for example, sequences conferring specific binding affinities may be engineered into preexisting viral *env* genes (see Miller & Vile (1995) *Faseb J.* **9**, 190-199 for a review of this and other targeted vectors for gene therapy).

Other methods involve simple delivery of the construct into the cell for expression therein either for a limited time or, following integration into

the genome, for a longer time. An example of the latter approach includes (preferably tumour-cell-targeted) liposomes (Nässander *et al* (1992) *Cancer Res.* 52, 646-653).

Immunoliposomes (antibody-directed liposomes) are especially useful in targeting to cancer cell types which over-express a cell surface protein for which antibodies are available. For example, the immunoliposomes may be targeted by means of antibodies binding to the said VGSC, as discussed further below. For the preparation of immuno-liposomes MPB-PE (N-[4-(p-maleimidophenyl)butyryl]-phosphatidylethanolamine) is synthesised according to the method of Martin & Papahadjopoulos (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 286-288. MPB-PE is incorporated into the liposomal bilayers to allow a covalent coupling of the antibody, or fragment thereof, to the liposomal surface. The liposome is conveniently loaded with the DNA or other genetic construct of the invention for delivery to the target cells, for example, by forming the said liposomes in a solution of the DNA or other genetic construct, followed by sequential extrusion through polycarbonate membrane filters with 0.6 μm and 0.2 μm pore size under nitrogen pressures up to 0.8 MPa. After extrusion, entrapped DNA construct is separated from free DNA construct by ultracentrifugation at 80 000 x g for 45 min. Freshly prepared MPB-PE-liposomes in deoxygenated buffer are mixed with freshly prepared antibody (or fragment thereof) and the coupling reactions are carried out in a nitrogen atmosphere at 4°C under constant end over end rotation overnight. The immunoliposomes are separated from unconjugated antibodies by ultracentrifugation at 80 000 x g for 45 min. Immunoliposomes may be injected intraperitoneally or directly into the tumour.

Other methods of delivery include adenoviruses carrying external DNA via an antibody-polylysine bridge (see Curiel *Prog. Med. Virol.* **40**, 1-18) and transferrin-polycation conjugates as carriers (Wagner *et al* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3410-3414). In the first of these methods a polycation-antibody complex is formed with the DNA construct or other genetic construct of the invention, wherein the antibody is specific for either wild-type adenovirus or a variant adenovirus in which a new epitope has been introduced which binds the antibody. The polycation moiety binds the DNA *via* electrostatic interactions with the phosphate backbone. The adenovirus, because it contains unaltered fibre and penton proteins, is internalized into the cell and carries into the cell with it the DNA construct of the invention. It is preferred if the polycation is polylysine.

The DNA may also be delivered by adenovirus wherein it is present within the adenovirus particle, for example, as described below.

In the second of these methods, a high-efficiency nucleic acid delivery system that uses receptor-mediated endocytosis to carry DNA macromolecules into cells is employed. This is accomplished by conjugating the iron-transport protein transferrin to polycations that bind nucleic acids. Human transferrin, or the chicken homologue conalbumin, or combinations thereof is covalently linked to the small DNA-binding protein protamine or to polylysines of various sizes through a disulfide linkage. These modified transferrin molecules maintain their ability to bind their cognate receptor and to mediate efficient iron transport into the cell. The transferrin-polycation molecules form electrophoretically stable complexes with DNA constructs or other genetic constructs of the invention independent of nucleic acid size (from short oligonucleotides to DNA of 21 kilobase pairs). When complexes of transferrin-polycation

and the DNA constructs or other genetic constructs of the invention are supplied to the tumour cells, a high level of expression from the construct in the cells is expected.

High-efficiency receptor-mediated delivery of the DNA constructs or other genetic constructs of the invention using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles produced by the methods of Cotten *et al* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6094-6098 may also be used. This approach appears to rely on the fact that adenoviruses are adapted to allow release of their DNA from an endosome without passage through the lysosome, and in the presence of, for example transferrin linked to the DNA construct or other genetic construct of the invention, the construct is taken up by the cell by the same route as the adenovirus particle.

This approach has the advantages that there is no need to use complex retroviral constructs; there is no permanent modification of the genome as occurs with retroviral infection; and the targeted expression system is coupled with a targeted delivery system, thus reducing toxicity to other cell types.

It may be desirable to locally perfuse a tumour with the suitable delivery vehicle comprising the genetic construct for a period of time; additionally or alternatively the delivery vehicle or genetic construct can be injected directly into accessible tumours.

It will be appreciated that "naked DNA" and DNA complexed with cationic and neutral lipids may also be useful in introducing the DNA of the invention into cells of the patient to be treated. Non-viral approaches

to gene therapy are described in Ledley (1995) *Human Gene Therapy* 6, 1129-1144.

Alternative targeted delivery systems are also known such as the modified adenovirus system described in WO 94/10323 wherein, typically, the DNA is carried within the adenovirus, or adenovirus-like, particle. Michael *et al* (1995) *Gene Therapy* 2, 660-668 describes modification of adenovirus to add a cell-selective moicty into a fibre protein. Mutant adenoviruses which replicate selectively in p53-deficient human tumour cells, such as those described in Bischoff *et al* (1996) *Science* 274, 373-376 are also useful for delivering the genetic construct of the invention to a cell. Thus, it will be appreciated that a further aspect of the invention provides a virus or virus-like particle comprising a genetic construct of the invention. Other suitable viruses or virus-like particles include HSV, AAV, vaccinia and parvovirus.

In a further embodiment the agent which selectively prevents the function of hNe-Na VGSC is a ribozyme capable of cleaving targeted VGSC RNA or DNA. A gene expressing said ribozyme may be administered in substantially the same way and using substantially the same vehicles as for the antisense molecules.

Ribozymes which may be encoded in the genomes of the viruses or virus-like particles herein disclosed are described in Cech and Herschlag "Site-specific cleavage of single stranded DNA" US 5,180,818; Altman *et al* "Cleavage of targeted RNA by RNAse P" US 5,168,053, Cantin *et al* "Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA" US 5,149,796; Cech *et al* "RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods", US 5,116,742; Been *et al* "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction

endonucleases and methods", US 5,093,246; and Been *et al* "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods; cleaves single-stranded RNA at specific site by transesterification", US 4,987,071, all incorporated herein by reference.

It will be appreciated that it may be desirable that the antisense molecule or ribozyme is expressed from a prostate cell-specific promoter element. Prostate-specific antigen (PSA) is one of the major protein constituents of the human prostate secretion. It has become a useful marker for the detection and monitoring of prostate cancer. The gene encoding PSA and its promoter region which directs the prostate-specific expression of PSA have been described (Lundwall (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **161**, 1151-1159; Riegman *et al* (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**, 95-102; Brawer (1991) *Acta Oncol.* **30**, 161-168). Thus, suitably, the promoter is the PSA promoter.

The genetic constructs of the invention can be prepared using methods well known in the art.

A variety of methods have been developed to operably link DNA to vectors via complementary cohesive termini. For instance, complementary homopolymer tracts can be added to the DNA segment to be inserted to the vector DNA. The vector and DNA segment are then joined by hydrogen bonding between the complementary homopolymeric tails to form recombinant DNA molecules.

Synthetic linkers containing one or more restriction sites provide an alternative method of joining the DNA segment to vectors. The DNA segment, generated by endonuclease restriction digestion as described

earlier, is treated with bacteriophage T4 DNA polymerase or *E. coli* DNA polymerase I, enzymes that remove protruding, 3′-single-stranded termini with their 3′-5′-exonucleolytic activities, and fill in recessed 3′-ends with their polymerizing activities.

The combination of these activities therefore generates blunt-ended DNA segments. The blunt-ended segments are then incubated with a large molar excess of linker molecules in the presence of an enzyme that is able to catalyze the ligation of blunt-ended DNA molecules, such as bacteriophage T4 DNA ligase. Thus, the products of the reaction are DNA segments carrying polymeric linker sequences at their ends. These DNA segments are then cleaved with the appropriate restriction enzyme and ligated to an expression vector that has been cleaved with an enzyme that produces termini compatible with those of the DNA segment.

Synthetic linkers containing a variety of restriction endonuclease sites are commercially available from a number of sources including International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USA.

A desirable way to modify the DNA encoding the polypeptide of the invention is to use the polymerase chain reaction as disclosed by Saiki *et al* (1988) *Science* **239**, 487-491.

In this method the DNA to be enzymatically amplified is flanked by two specific oligonucleotide primers which themselves become incorporated into the amplified DNA. The said specific primers may contain restriction endonuclease recognition sites which can be used for cloning into expression vectors using methods known in the art.

The present invention also relates to a host cell transformed with a genetic (preferably DNA construct) construct of the present invention. The host cell can be either prokaryotic or eukaryotic. Bacterial cells are preferred prokaryotic host cells and typically are a strain of *E. coli* such as, for example, the *E. coli* strains DH5 available from Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, and RR1 available from the American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville, MD, USA (No ATCC 31343). Preferred eukaryotic host cells include yeast and mammalian cells, preferably vertebrate cells such as those from a mouse, rat, monkey or human fibroblastic cell line. Yeast host cells include YPH499, YPH500 and YPH501 which are generally available from Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Preferred mammalian host cells include Chinese hamster ovary (CHO) cells available from the ATCC as CCL61, NIH Swiss mouse embryo cells NIH/3T3 available from the ATCC as CRL 1658, and monkey kidney-derived COS-1 cells available from the ATCC as CRL 1650.

Transformation of appropriate cell hosts with a DNA construct of the present invention is accomplished by well known methods that typically depend on the type of vector used. With regard to transformation of prokaryotic host cells, see, for example, Cohen *et al* (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110 and Sambrook *et al* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. Transformation of yeast cells is described in Sherman *et al* (1986) *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY. The method of Beggs (1978) *Nature* 275, 104-109 is also useful. With regard to vertebrate cells, reagents useful in transfecting such cells, for example calcium phosphate and DEAE-dextran or liposome

formulations, are available from Stratagene Cloning Systems, or Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USA.

Electroporation is also useful for transforming cells and is well known in the art for transforming yeast cell, bacterial cells and vertebrate cells.

For example, many bacterial species may be transformed by the methods described in Luchansky *et al* (1988) *Mol. Microbiol.* **2**, 637-646 incorporated herein by reference. The greatest number of transformants is consisteutly recovered following electroporation of the DNA-cell mixture suspended in 2.5X PEB using 6250V per cm at 25μFD.

Methods for transformation of yeast by electroporation are disclosed in Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* **194**, 182.

Successfully transformed cells, ie cells that contain a DNA construct of the present invention, can be identified by well known techniques. For example, cells resulting from the introduction of an expression construct of the present invention can be grown to produce the molecule as defined in the invention. Cells can be harvested and lysed and their DNA content examined for the presence of the DNA using a method such as that described by Southern (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503 or Berent *et al* (1985) *Biotech.* 3, 208. Alternatively, the presence of the molecule, for example a protein, in the supernatant can be detected using antibodies as described below.

In addition to directly assaying for the presence of recombinant DNA, successful transformation can be confirmed by well known immunological methods when the recombinant DNA is capable of directing the expression

of the protein. For example, cells successfully transformed with an expression vector produce proteins displaying appropriate antigenicity. Samples of cells suspected of being transformed are harvested and assayed for the protein using suitable antibodies.

Thus, in addition to the transformed host cells themselves, the present invention also contemplates a culture of those cells, preferably a monoclonal (clonally homogeneous) culture, or a culture derived from a monoclonal culture, in a nutrient medium.

When the genetic construct is a plasmid DNA construct it can be purified. The DNA construct of the invention is purified from the host cell using well known methods.

For example, plasmid vector DNA can be prepared on a large scale from cleaved lysates by banding in a CsCl gradient according to the methods of Clewell & Helinski (1970) *Biochemistry* **9**, 4428-4440 and Clewell (1972) *J. Bacteriol.* **110**, 667-676. Plasmid DNA extracted in this way can be freed from CsCl by dialysis against sterile, pyrogen-free buffer through Visking tubing or by size-exclusion chromatography.

Alternatively, plasmid DNA may be purified from cleared lysates using ion-exchange chromatography, for example those supplied by Qiagen. Hydroxyapatite column chromatography may also be used.

A further aspect of the invention provides use of an agent which selectively prevents the function of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel in the manufacture of a medicament for treating cancer.

A still further aspect of the invention provides a genetic construct comprising a nucleic acid encoding a molecule capable of preventing the function of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel expressed in a cell.

As noted above, the genetic construct may be RNA or DNA. The molecule capable of preventing the function of hNe-Na VGSC is conveniently an antisense molecule or a ribozyme as disclosed above.

The genetic constructs are adapted for delivery to a human cell, in particular a cell which is cancerous or in which cancer may occur, and more particularly the genetic construct is adapted for delivery to a prostate cell. The genetic constructs of this aspect of the invention include the viral and non-viral delivery systems described above.

Suitably, the molecule is capable of preventing the function of VGSC, for example hNe-Na VGSC, such as a ribozyme or antisense molecule, is selectively expressed in a cancer cell. For example, expression of said molecule by the genetic construct may be *via* a cancer cell- or tissue-selective promoter which, in the case of prostate cancer, may be the PSA promoter or any other prostate-selective promoter.

A further aspect of the invention provides the genetic constructs for use in medicine. Thus, the genetic constructs are packaged and presented for use in medicine.

A further aspect of the invention provides a pharmaceutical composition comprising a genetic construct of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. The carriers must be "acceptable" in the sense of being compatible with the genetic construct of the invention and not

deleterious to the recipients thereof. Typically, the carriers will be water or saline which will be sterile and pyrogen free.

For the avoidance of doubt, the genetic constructs of the invention specifically include virus or virus-like particles.

A further aspect of the invention provides a method of identifying a compound which selectively inhibits a hNe-Na voltage-gated Na^+ channel, the method comprising (a) contacting a test compound with any one of the said voltage-gated Na^+ channels and determining whether said compound is inhibitory; (b) contacting the test compound with other voltage-gated Na^+ channels and determining whether said compound is inhibitory; and (c) selecting a compound which is substantially inhibitory in (a) but is not substantially inhibitory in (b).

Typically, a range of compounds, including pharmacological agents with known effects upon Na^+ channels (for example compounds with effects similar to terodotoxin) or physiological (for example growth factors or hormones, for example epidermal growth factor or androgens), will be screened for their effectiveness in a number of assays. Suitable assay formats include electrophysiological recording from cells in long-term culture as cell-lines and short term culture of cells dissociated from biopsies (see, for example Grimes & Djamgoz (1998) *J. Cell Physiol.* 175, 50-58); electrophysiological recording from oocytes functionally expressing recombinant said VGSC following injection of cRNAs (see, for example, Fraser *et al* (1993) *In Electrophysiology. A practical approach* (D. Willis, ed) IRL Press); and *in vitro* (Boyden chamber) invasion assays (see, for example, Grimes *et al* (1995) *FEBS Lett* 369, 290-294; and Smith *et al* (1998) *FEBS Lett.* 423, 19-24). Suitable assays may also

include measurement of effects on PSA secretion from prostate cancer cell lines, for example as described in Abdul & Hoosein (2001) *Anticancer Res* **21**, 2045-2048.

The present invention also provides methods in which treatment is targeted to cancer cells by means of targeting to cells expressing the said VGSC, as noted above in relation to targeting of genetic constructs to such cells. For example, anti-said VGSC antibodies (VGSC-Abs) conjugated with a dye substance may be applied to the prostate gland *in vivo* (eg Yasmuch *et al* (1993) "Antibody targeted photolysis" *Critical Review Revue Ther. Drug Carrier System* **10**, 197-252; Pogrebniak *et al* (1993) "Targetted phototherapy with sensitizer-monoclonal antibody conjugate and light" *Surgical Oncology* **2**, 31-42). The gland is then irradiated locally with a wavelength of light/laser matching the absorption peak of the 'attached' dye. Absorption of the light energy by the dye leads to local heating and cell death. In this way, only the labelled (ie metastatic) cells will be ablated. VGSC-Abs labelled with the following dyes may be used: fluorescein (Pelegrin *et al* (1991) "Antibody fluorescein conjugates for photoimmunodiagnosis of human colon-carcinoma in nude-mice" *Cancer* **67**, 2529-2537); rhodamine (Haghighat *et al* (1992) "Laser-dyes for experimental phototherapy of human cancer - comparison of 3 rhodamines" *Laryngoscope* **102**, 81-87); cyanins (Folli *et al* (1994) "Antibody-indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous-cell carcinoma in nude-mice" *Cancer Research* **54**, 2643-2649; Lipshutz *et al* (1994) "Evaluation of 4 new carbocyanine dyes for photodynamic therapy with lasers" *Laryngoscope* **104**, 996-1002; Haddad *et al* (1998) "*In vitro* and *in vivo* effects of photodynamic therapy on murine malignant melanoma" *Annals of Surgical Oncology* **5**, 241-247).

Thus, a further aspect of the invention provides a compound comprising a moiety which selectively binds hNe-Na voltage-gated Na^+channel protein and a further moiety.

By "a moiety which selectively binds hNe-Na voltage-gated Na^+channel protein" we mean any suitable such moiety which binds the said VGSC but does not substantially bind other molecules, for example other VGSCs. The compound comprising the binding moiety is one which preferably, in use, is able to localise to areas of cancerous cells, particularly metastatic cancer cells, but not localise substantially to other areas where there are no cancerous cells.

Preferably the binding moiety is able to bind to the said VGSC with high affinity. For example, the binding constant for the binding of the binding moiety to the said VGSC is preferably between 10^{-7} and 10^{-10} M. Typically the binding moiety is an anti-hNe-Na antibody. Such antibodies and methods of preparing suitable antibodies are discussed above.

The further moiety may be any further moiety which confers on the compound a useful property with respect to the treatment or imaging or diagnosis of cancer. In particular, the further moiety is one which is useful in killing or imaging cancer cells, particularly metastatic cancer cells. Preferably, the further moiety is one which is able to kill the cancer cells to which the compound is targeted.

In a preferred embodiment of the invention the further moiety is directly or indirectly cytotoxic. In particular the further moiety is preferably

directly or indirectly toxic to cancer cells, particularly metastatic cancer cells.

By "directly cytotoxic" we include the meaning that the moiety is one which on its own is cytotoxic. By "indirectly cytotoxic" we include the meaning that the moiety is one which, although is not itself cytotoxic, can induce cytotoxicity, for example by its action on a further molecule or by further action on it.

In one embodiment the cytotoxic moiety is a cytotoxic chemotherapeutic agent. Cytotoxic chemotherapeutic agents are well known in the art.

Cytotoxic chemotherapeutic agents, such as anticancer agents, include: alkylating agents including nitrogen mustards such as mechlorethamine (HN_2), cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan (L-sarcolysin) and chlorambucil; ethylenimines and methylmelamines such as hexamethylmelamine, thiotepa; alkyl sulphonates such as busulfan; nitrosoureas such as carmustine (BCNU), lomustine (CCNU), semustine (methyl-CCNU) and streptozocin (streptozotocin); and triazenes such as decarbazine (DTIC; dimethyltriazenoimidazole-carboxamide); Antimetabolites including folic acid analogues such as methotrexate (amethopterin); pyrimidine analogues such as fluorouracil (5-fluorouracil; 5-FU), floxuridine (fluorodeoxyuridine; FUdR) and cytarabine (cytosine arabinoside); and purine analogues and related inhibitors such as mercaptopurine (6-mercaptopurine; 6-MP), thioguanine (6-thioguanine; TG) and pentostatin (2□-deoxycoformycin). Natural Products including vinca alkaloids such as vinblastine (VLB) and vincristine; epipodophyllotoxins such as etoposide and teniposide; antibiotics such as dactinomycin (actinomycin D), daunorubicin (daunomycin; rubidomycin), doxorubicin,

bleomycin, plicamycin (mithramycin) and mitomycin (mitomycin C); enzymes such as L-asparaginase; and biological response modifiers such as interferon alphenomes. Miscellaneous agents including platinum coordination complexes such as cisplatin (*cis*-DDP) and carboplatin; anthracenedione such as mitoxantrone and anthracycline; substituted urea such as hydroxyurea; methyl hydrazine derivative such as procarbazine (N-methylhydrazine, MIH); and adrenocortical suppressant such as mitotane (*o,p*'-DDD) and aminoglutethimide; taxol and analogues/derivatives; and hormone agonists/antagonists such as flutamide and tamoxifen.

Various of these agents have previously been attached to antibodies and other target site-delivery agents, and so compounds of the invention comprising these agents may readily be made by the person skilled in the art. For example, carbodiimide conjugation (Bauminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* **70**, 151-159; incorporated herein by reference) may be used to conjugate a variety of agents, including doxorubicin, to antibodies or peptides.

Carbodiimides comprise a group of compounds that have the general formula R-N=C=N-R', where R and R' can be aliphatic or aromatic, and are used for synthesis of peptide bonds. The preparative procedure is simple, relatively fast, and is carried out under mild conditions. Carbodiimide compounds attack carboxylic groups to change them into reactive sites for free amino groups.

The water soluble carbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) is particularly useful for conjugating a functional moiety to a binding moiety and may be used to conjugate doxorubicin to tumor homing peptides. The conjugation of doxorubicin and a binding

moiety requires the presence of an amino group, which is provided by doxorubicin, and a carboxyl group, which is provided by the binding moiety such as an antibody or peptide.

In addition to using carbodiimides for the direct formation of peptide bonds, EDC also can be used to prepare active esters such as N-hydroxysuccinimide (NHS) ester. The NHS ester, which binds only to amino groups, then can be used to induce the formation of an amide bond with the single amino group of the doxorubicin. The use of EDC and NHS in combination is commonly used for conjugation in order to increase yield of conjugate formation (Bauminger & Wilchek, *supra*, 1980).

Other methods for conjugating a functional moiety to a binding moiety also can be used. For example, sodium periodate oxidation followed by reductive alkylation of appropriate reactants can be used, as can glutaraldehyde crosslinking. However, it is recognised that, regardless of which method of producing a conjugate of the invention is selected, a determination must be made that the binding moiety maintains its targeting ability and that the functional moiety maintains its relevant function.

In a further embodiment of the invention, the cytotoxic moiety is a cytotoxic peptide or polypeptide moiety by which we include any moiety which leads to cell death. Cytotoxic peptide and polypeptide moieties are well known in the art and include, for example, ricin, abrin, *Pseudomonas* exotoxin, tissue factor and the like. Methods for linking them to targeting moieties such as antibodies are also known in the art. The use of ricin as a cytotoxic agent is described in Burrows & Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8996-9000, incorporated herein by reference, and the

use of tissue factor, which leads to localised blood clotting and infarction of a tumour, has been described by Ran *et al* (1998) *Cancer Res.* 58, 4646-4653 and Huang *et al* (1997) *Science* 275, 547-550. Tsai *et al* (1995) *Dis. Colon Rectum* 38, 1067-1074 describes the abrin A chain conjugated to a monoclonal antibody and is incorporated herein by reference. Other ribosome inactivating proteins are described as cytotoxic agents in WO 96/06641. Pseudomonas exotoxin may also be used as the cytotoxic polypeptide moiety (see, for example, Aiello *et al* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10457-10461; incorporated herein by reference).

Certain cytokines, such as TNFα and IL-2, may also be useful as cytotoxic agents.

Certain radioactive atoms may also be cytotoxic if delivered in sufficient doses. Thus, the cytotoxic moiety may comprise a radioactive atom which, in use, delivers a sufficient quantity of radioactivity to the target site so as to be cytotoxic. Suitable radioactive atoms include phosphorus-32, iodine-125, iodine-131, indium-111, rhenium-186, rhenium-188 or yttrium-90, or any other isotope which emits enough energy to destroy neighbouring cells, organelles or nucleic acid. Preferably, the isotopes and density of radioactive atoms in the compound of the invention are such that a dose of more than 4000 cGy (preferably at least 6000, 8000 or 10000 cGy) is delivered to the target site and, preferably, to the cells at the target site and their organelles, particularly the nucleus.

The radioactive atom may be attached to the binding moiety in known ways. For example EDTA or another chelating agent may be attached to the binding moiety and used to attach ^{111}In or ^{90}Y. Tyrosine residues may be labelled with ^{125}I or ^{131}I.

The cytotoxic moiety may be a suitable indirectly cytotoxic polypeptide. In a particularly preferred embodiment, the indirectly cytotoxic polypeptide is a polypeptide which has enzymatic activity and can convert a relatively non-toxic prodrug into a cytotoxic drug. When the targeting moiety is an antibody this type of system is often referred to as ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy). The system requires that the targeting moiety locates the enzymatic portion to the desired site in the body of the patient (ie the site expressing the said VGSC, such as metastatic cancer cells) and after allowing time for the enzyme to localise at the site, administering a prodrug which is a substrate for the enzyme, the end product of the catalysis being a cytotoxic compound. The object of the approach is to maximise the concentration of drug at the desired site and to minimise the concentration of drug in normal tissues (see Senter, P.D. *et al* (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4842-4846; Bagshawe (1987) *Br. J. Cancer* **56**, 531-2; and Bagshawe, K.D. *et al* (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" *Br. J. Cancer.* **58**, 700-703.)

Clearly, any said VGSC-binding moiety may be used in place of an anti-hNe-Na antibody in this type of directed enzyme prodrug therapy system.

The enzyme and prodrug of the system using a said VGSC-targeted enzyme as described herein may be any of those previously proposed. The cytotoxic substance may be any existing anti-cancer drug such as an alkylating agent; an agent which intercalates in DNA; an agent which inhibits any key enzymes such as dihydrofolate reductase, thymidine synthetase, ribonucleotide reductase, nucleoside kinases or topoisomerase;

or an agent which effects cell death by interacting with any other cellular constituent. Etoposide is an example of a topoisomerase inhibitor.

Reported prodrug systems include: a phenol mustard prodrug activated by an *E. coli* β-glucuronidase (Wang *et al*, 1992 and Roffler *et al*, 1991); a doxorubicin prodrug activated by a human β-glucuronidase (Bosslet *et al*, 1994); further doxorubicin prodrugs activated by coffee bean α-galactosidase (Azoulay *et al*, 1995); daunorubicin prodrugs, activated by coffee bean α-D-galactosidase (Gesson *et al*, 1994); a 5-fluorouridine prodrug activated by an *E. coli* β-D-galactosidase (Abraham *et al*, 1994); and methotrexate prodrugs (eg methotrexate-alanine) activated by carboxypeptidase A (Kuefner *et al*, 1990, Vitols *et al*, 1992 and Vitols *et al*, 1995). These and others are included in the following table.

Enzyme	Prodrug
Carboxypeptidase G2	Derivatives of L-glutamic acid and benzoic acid mustards, aniline mustards, phenol mustards and phenylenediamine mustards; fluorinated derivatives of these
Alkaline phosphatase	Etoposide phosphate
	Mitomycin phosphate
Beta-glucuronidase	*p*-Hydroxyaniline mustard-glucuronide
	Epirubicin-glucuronide
Penicillin-V-amidase	Adriamycin-N phenoxyacetyl
Penicillin-G-amidase	N-(4'-hydroxyphenyl acetyl) palytoxin
	Doxorubicin and melphalan
Beta-lactamase	Nitrogen mustard-cephalosporin *p*-phenylenediamine; doxorubicin derivatives; vinblastine derivative-cephalosporin, cephalosporin mustard; a taxol derivative
Beta-glucosidase	Cyanophenylmethyl-beta-D-gluco-pyranosiduronic acid
Nitroreductase	5-(Aziridin-1-yl-)-2,4-dinitrobenzamide
Cytosine deaminase	5-Fluorocytosine
Carboxypeptidase A	Methotrexate-alanine

(This table is adapted from Bagshawe (1995) *Drug Dev. Res.* **34**, 220-230, from which full references for these various systems may be obtained; the taxol derivative is described in Rodrigues, M.L. *et al* (1995) *Chemistry & Biology* **2**, 223).

Suitable enzymes for forming part of the enzymatic portion of the invention include: exopeptidases, such as carboxypeptidases G, G1 and G2 (for glutamylated mustard prodrugs), carboxypeptidases A and B (for MTX-based prodrugs) and aminopeptidases (for 2-α-aminocyl MTC

prodrugs); endopeptidases, such as eg thrombolysin (for thrombin prodrugs); hydrolases, such as phosphatases (eg alkaline phosphatase) or sulphatases (eg aryl sulphatases) (for phosphylated or sulphated prodrugs); amidases, such as penicillin amidases and arylacyl amidase; lactamases, such as β-lactamases; glycosidases, such as β-glucuronidase (for β-glucuronomide anthracyclines), α-galactosidase (for amygdalin) and β-galactosidase (for β-galactose anthracycline); deaminases, such as cytosine deaminase (for 5FC); kinases, such as urokinase and thymidine kinase (for gancyclovir); reductases, such as nitroreductase (for CB1954 and analogues), azoreductase (for azobenzene mustards) and DT-diaphorase (for CB1954); oxidases, such as glucose oxidase (for glucose), xanthine oxidase (for xanthine) and lactoperoxidase; DL-racemases, catalytic antibodies and cyclodextrins.

The prodrug is relatively non-toxic compared to the cytotoxic drug. Typically, it has less than 10% of the toxicity, preferably less than 1% of the toxicity as measured in a suitable *in vitro* cytotoxicity test.

It is likely that the moiety which is able to convert a prodrug to a cytotoxic drug will be active in isolation from the rest of the compound but it is necessary only for it to be active when (a) it is in combination with the rest of the compound and (b) the compound is attached to, adjacent to or internalised in target cells.

When each moiety of the compound is a polypeptide, the two portions may be linked together by any of the conventional ways of cross-linking polypeptides, such as those generally described in O'Sullivan *et al* (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 100-108. For example, the said VGSC binding moiety may be enriched with thiol groups and the further moiety reacted

with a bifunctional agent capable of reacting with those thiol groups, for example the N-hydroxysuccinimide ester of iodoacetic acid (NHIA) or N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP). Amide and thioether bonds, for example achieved with m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, are generally more stable *in vivo* than disulphide bonds.

Alternatively, the compound may be produced as a fusion compound by recombinant DNA techniques whereby a length of DNA comprises respective regions encoding the two moieties of the compound of the invention either adjacent one another or separated by a region encoding a linker peptide which does not destroy the desired properties of the compound. Conceivably, the two portions of the compound may overlap wholly or partly.

The DNA is then expressed in a suitable host to produce a polypeptide comprising the compound of the invention.

The cytotoxic moiety may be a radiosensitizer. Radiosensitizers include fluoropyrimidines, thymidine analogues, hydroxyurea, gemcitabine, fludarabine, nicotinamide, halogenated pyrimidines, 3-aminobenzamide, 3-aminobenzodiamide, etanixadole, pimonidazole and misonidazole (see, for example, McGinn *et al* (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) *Invest. New Drugs* **14**, 257-263; Horsman (1995) *Acta Oncol.* **34**, 571-587; Shenoy & Singh (1992) *Clin. Invest.* **10**, 533-551; Mitchell *et al* (1989) *Int. J. Radiat. Biol.* **56**, 827-836; Iliakis & Kurtzman (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 1235-1241; Brown (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **16**, 987-993; Brown (1985) *Cancer* 55, 2222-2228).

Also, delivery of genes into cells can radiosensitise them, for example delivery of the p53 gene or cyclin D (Lang *et al* (1998) *J. Neurosurg.* **89**, 125-132; Coco Martin *et al* (1999) *Cancer Res.* **59**, 1134-1140).

The further moiety may be one which becomes cytotoxic, or releases a cytotoxic moiety, upon irradiation. For example, the boron-10 isotope, when appropriately irradiated, releases α particles which are cytotoxic (see for example, US 4, 348, 376 to Goldenberg; Primus *et al* (1996) *Bioconjug. Chem.* **7**, 532-535).

Similarly, the cytotoxic moiety may be one which is useful in photodynamic therapy such as photofrin (see, for example, Dougherty *et al* (1998) *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905).

The further moiety may comprise a nucleic acid molecule which is directly or indirectly cytotoxic. For example, the nucleic acid molecule may be an antisense oligonucleotide which, upon localisation at the target site is able to enter cells and lead to their death. The oligonucleotide, therefore, may be one which prevents expression of an essential gene, or one which leads to a change in gene expression which causes apoptosis.

Examples of suitable oligonucleotides include those directed at bcl-2 (Ziegler *et al* (1997) *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1027-1036), and DNA polymerase α and topoisomerase IIα (Lee *et al* (1996) *Anticancer Res.* **16**, 1805-1811.

Peptide nucleic acids may be useful in place of conventional nucleic acids (see Knudsen & Nielsen (1997) *Anticancer Drugs* **8**, 113-118).

In a further embodiment, the binding moiety may be comprised in a delivery vehicle for delivering nucleic acid to the target, for example a nucleic acid as discussed in relation to earlier aspects of the invention. The delivery vehicle may be any suitable delivery vehicle. It may, for example, be a liposome containing nucleic acid, or it may be a virus or virus-like particle which is able to deliver nucleic acid. In these cases, the moiety which selectively binds to the said VGSC is typically present on the surface of the delivery vehicle. For example, the moiety which selectively binds to the said VGSC, such as a suitable antibody fragment, may be present in the outer surface of a liposome and the nucleic acid to be delivered may be present in the interior of the liposome. As another example, a viral vector, such as a retroviral or adenoviral vector, is engineered so that the moiety which selectively binds to the said VGSC is attached to or located in the surface of the viral particle thus enabling the viral particle to be targeted to the desired site. Targeted delivery systems are also known, such as the modified adenovirus system discussed above.

Immunoliposomes (antibody-directed liposomes) may be used in which the moiety which selectively binds to the said VGSC is an antibody. The preparation of immunoliposomes is described above.

The nucleic acid delivered to the target site may be any suitable DNA which leads, directly or indirectly, to cytotoxicity. For example, the nucleic acid may encode a ribozyme which is cytotoxic to the cell, or it may encode an enzyme which is able to convert a substantially non-toxic prodrug into a cytotoxic drug (this latter system is sometime called GDEPT: Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy).

Ribozymes which may be encoded in the nucleic acid to be delivered to the target are described in references cited above. Suitable targets for ribozymes include transcription factors such as c-fos and c-myc, and bcl-2. Durai *et al* (1997) *Anticancer Res.* 17, 3307-3312 describes a hammerhead ribozyme against bcl-2.

EP 0 415 731 describes the GDEPT system. Similar considerations concerning the choice of enzyme and prodrug apply to the GDEPT system as to the ADEPT system described above.

The nucleic acid delivered to the target site may encode a directly cytotoxic polypeptide.

In a further embodiment of the invention, the further moiety comprised in the compound of the invention is a readily detectable moiety.

By a "readily detectable moiety" we include the meaning that the moiety is one which, when located at the target site following administration of the compound of the invention into a patient, may be detected, typically non-invasively from outside the body and the site of the target located. Thus, the compounds of this embodiment of the invention are useful in imaging and diagnosis.

Typically, the readily detectable moiety is or comprises a radioactive atom which is useful in imaging. Suitable radioactive atoms include technetium-99m or iodine-123 for scinitgraphic studies. Other readily detectable moieties include, for example, spin labels for magnetic resonance imaging (MRI) such as iodine-123 again, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium,

manganese or iron. Clearly, the compound of the invention must have sufficient of the appropriate atomic isotopes in order for the molecule to be readily detectable.

The radio- or other labels may be incorporated in the compound of the invention in known ways. For example, if the binding moiety is a polypeptide it may be biosynthesized or may be synthesized by chemical amino acid synthesis using suitable amino acid precursors involving, for example, fluorine-19 in place of hydrogen. Labels such as ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{186}Rh, ^{188}Rh and ^{111}In can, for example, be attached *via* cysteine residues in the binding moiety. Yttrium-90 can be attached via a lysine residue. The IODOGEN method (Fraker *er al* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **80**, 49-57) can be used to incorporate iodine-123. Reference ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) describes other methods in detail.

In a further preferred embodiment of the invention the further moiety is able to bind selectively to a directly or indirectly cytotoxic moiety or to a readily detectable moiety. Thus, in this embodiment, the further moiety may be any moiety which binds to a further compound or component which is cytotoxic or readily detectable.

The further moiety may, therefore be an antibody which selectively binds to the further compound or component, or it may be some other binding moiety such as streptavidin or biotin or the like. The following examples illustrate the types of molecules that are included in the invention; other such molecules are readily apparent from the teachings herein.

A bispecific antibody wherein one binding site comprises the moiety which selectively binds to the said VGSC and the second binding site comprises a moiety which binds to, for example, an enzyme which is able to convert a substantially non-toxic prodrug to a cytotoxic drug.

The compound may be an antibody which selectively binds to the said VGSC, to which is bound biotin. Avidin or streptavidin which has been labelled with a readily detectable label may be used in conjunction with the biotin labelled antibody in a two-phase imaging system wherein the biotin labelled antibody is first localised to the target site in the patient, and then the labelled avidin or streptavidin is administered to the patient. Bispecific antibodies and biotin/streptavidin (avidin) systems are reviewed by Rosebrough (1996) *Q J Nucl. Med.* 40, 234-251.

In a preferred embodiment of the invention, the moiety which selectively binds to the said VGSC and the further moiety are polypeptides which are fused.

A further aspect of the invention comprises a nucleic acid molecule encoding a compound of the preceding aspect of the invention.

A further aspect of the invention provides a compound of the invention for use in medicine. Typically, the compound is packaged and presented as a medicament or as an imaging agent or as a diagnostic agent for use in a patient.

A still further aspect of the invention provides a pharmaceutical composition comprising a compound according to the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

Typically the pharmaceutical compositions or formulations of the invention are for parenteral administration, more particularly for intravenous administration.

Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents and thickening agents.

A still further aspect of the invention provides the use of a compound of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment and/or diagnosis of a human patient with or at risk of cancer.

A still further aspect of the invention comprises a method of treating cancer the method comprising administering to the human patient an effective amount of a compound of the invention wherein the further moiety of the compound is one which either directly or indirectly is of therapeutic benefit to the patient.

A still further aspect of the invention comprises a method of imaging cancer (which may be useful in determining the susceptibility of a human patient to cancer, or of diagnosing cancer in a human patient, or of predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer) in a human patient, comprising administering to the patient an effective amount of a compound of the invention wherein the further moiety of the compound is one which comprises a readily detectable moiety.

It will readily be appreciated that, depending on the particular compound used in treatment, imaging or diagnosis, the timing of administration may vary and the number of other components used in therapeutic systems disclosed herein may vary.

For example, in the case where the compound of the invention comprises a readily detectable moiety or a directly cytotoxic moiety, it may be that only the compound, in a suitable formulation, is administered to the patient. Of course, other agents such as immunosuppressive agents and the like may be administered.

In respect of compounds which are detectably labelled, imaging takes place once the compound has localised at the target site.

However, if the compound is one which requires a further component in order to be useful for treatment, imaging or diagnosis, the compound of the invention may be administered and allowed to localise at the target site, and then the further component administered at a suitable time thereafter.

For example, in respect of the ADEPT and ADEPT-like systems above, the binding moiety-enzyme moiety compound is administered and localises to the target site. Once this is done, the prodrug is administered.

Similarly, for example, in respect of the compounds wherein the further moiety comprised in the compound is one which binds a further component, the compound may be administered first and allowed to localise at the target site, and subsequently the further component is administered.

Thus, in one embodiment a biotin-labelled anti-hNe-Na antibody is administered to the patient and, after a suitable period of time, detectably labelled streptavidin is administered. Once the streptavidin has localised to the sites where the antibody has localised (ie the target sites) imaging takes place.

It is believed that the compounds of the invention wherein the further moiety is a readily detectable moiety may be useful in determining the metastatic state of cancer cells. This may be an important factor influencing the nature and outcome of future therapy.

A further aspect of the invention provides a kit of parts (or a therapeutic system) comprising (1) a compound of the invention wherein the further moiety is a cytotoxic moiety which is able to convert a relatively non-toxic prodrug into a cytotoxic drug and (2) a relatively non-toxic prodrug. The kit of parts may comprise any of the compounds of the invention and appropriate prodrugs as herein described.

A still further aspect of the invention provides a kit of parts (or a therapeutic system) comprising (1) a compound of the invention wherein the further moiety is able to bind selectively to a directly or indirectly cytotoxic moiety or to a readily detectable moiety and (2) any one of a directly or indirectly cytotoxic moiety or a readily detectable moiety to which the further moiety of the compound is able to bind.

For example, a kit of parts may contain an anti-hNe-Na antibody labelled with biotin and streptavidin labelled with a readily detectable label as defined above.

The invention will now be described by reference to the following, non-limiting Example and Figures.

Figure 1: Third-order polynomial fits to the PN1 VGSCα image analysis data. Fits for the three repeats performed on the first MAT-LyLu extract are shown. PCR product mass (in nanograms) is plotted against PCR cycle number. Top inset shows the gel images from which the data was derived. Representative PCR cycle numbers for given bands are indicated above the gels.

Figure 2: Details of the VGSCα splice variants found in the prostate cancer cells. Splice variants of (a) SCN2A, (b) SCN3A, (c) SCN8A and (d) SCN9A gene products, determined from specific PCR tests, found in rat (RB2 and PN1) and human (HB2, HB3, hNa6 and hNe-Na) cell lines, are shown. Typical SQT-PCR gel images are displayed on the left; idealised bands representing each PCR product are indicated on the side. A schematic representation of the structural features corresponding to each product is shown to the right, and product size indicated (in nucleotides). The locations of intron positions (differently shaded regions represent different exons) and PCR primer positions (arrows), in relation to the normal domain structure of the VGSCαs, are also shown. Representative PCR cycle numbers for given bands are indicated above the gels. N and A denote neonatal and adult alternatively spliced exons, respectively. Δ indicates products with both alternatively spliced exons missing.

Figure 3: SQT-PCR gel images for the rat VGSCαs. SQT-PCRs for (a) PN1, (b) SCL-11, (c) RB1, (d) rSkM1, (e) RB2 and (f) NaN/SNS2; and (g) the rCytb$_5$R control are shown. Representative PCR cycle numbers for given bands are indicated above the gels. In each panel, the top image was derived from MAT-LyLu cell extracts; the bottom image, from AT-2 extracts.

Figure 4: SQT-PCR gel images for the human VGSCαs. SQT-PCRs for (a) hNe-Na, (b) hNa6, (c) HB2 and (d) HB3; and (e) the hCytb$_5$R control; and the hNa6 (f) neonatal and (g) adult splice variants are shown. Representative PCR cycle numbers for given bands are indicated above the gels. In each panel, the top image was derived from PC-3 cell extracts; the bottom image, from LNCaP cell extracts.

Figure 5. Proposed expression levels of the various "functional VGSCα" mRNAs in the strongly (white bars) and weakly (black bars) metastatic prostate cancer cell lines. In each case, the vertical axis denotes the approximate level of expression with respect to functional VGSCα levels in the strongly metastatic counterpart (MAT-LyLu and PC-3 for rat and human cells, respectively). Expression levels were determined from degenerate screens using RB1 (rat) and hCytb$_5$R (human) as standards. The relative abundance of functional VGSCα mRNAs may be slightly over-estimated for VGSCαs expressed in multiple splice forms (most notably HB2, a high proportion of which is present in the AHB2 form).

Figure 6. Sections of human prostate at various pathological stages stained immunohistochemically with VGSC antibody. A. Benign prostatic

hyperplasia. B. Low-grade PIN. l, lumen. s, stroma. C. High-grade PIN. D. *In situ* malignancy - InsM. E. Invasive cancer cells - InvCs (several examples indicated by the arrows are shown). Immunohistochemistry methods were applied to clinical tissues, which had been fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections from 10 different patients varying in age and Gleason grading were used. The tissues, after being treated in the microwave oven to retrieve the antigens, were incubated with a Na^+ channel antibody (Upstate BioTechnology Inc.) which is a peptide antibody recognising any type of vertebrate VGSC (England *et al* (1991) *Brain Res.* **548,** 334-337). Sections were first treated with this antibody (2 μg/ml) at 4 °C overnight. For the detection of the signal, biotinylated secondary antibody, avidin-biotin complex and diaminobenzidine as the chromogen were utilised. For blocking the secondary binding sites, serum of the host of the secondary antibody was applied. Two different types of negative controls were done: (1) the primary antibody was skipped; (2) the primary antibody was pre-absorbed with the immunising peptide. In either case, no VGSC staining was seen. For quantitative analysis, the images were acquired with a 3-colour coded digital camera (Pixera Corporation, Los Gatos, CA, USA), utilising a Nikon microscope and Apple Mac computer. Optical density measurements were made by using image analysis program (OPTIMAS, version 5.2 (Stemmer, Germany). Scale bar, 13.5 μm.

Figure 7. Alignment of the amino acid sequences of the YJ1/YJ2C region of vertebrate VGSCαs. The alignment was generated using Lasergene's MEGALIGN software. All sequences were aligned using the Clustal method with the PAM 250 weight table. Conserved residues are boxed and shaded. Sequence accession numbers are as follows: PN1 (GB:

U79568); Rabbit Schwann cell (GB: U35238); hNe-Na (PIR: S54771); Eel (GB: X01119); Horse SkM1 (GB: U25990); hSkM1 (GB: M81758); rSkM1 (GB: M26643); Mouse mNav2.3 (PIR: A55138); SCL-11 (GB: Y09164); hNav2.1 (GB: M91556); RB1 (SW: P04774); HB1 (GB: 571446); RB3 (SW: P08104); HB3 (GB: S69887); RB2 (PIR: B25019); HB2 (GB: M94055); Mouse SCN8a (GB: U26707); rNa6 (GB: L39018); Puffer Fish (GB: D37977); Mouse SNS (GB: Y09108); Rat SNS/PN3 (GB: X92184); Human Cardiac (PIR: A38195); Rat Cardiac (SW: P15389); NaN (GB: AF059030).

Figure 8. Predicted topography of splice variants of (A) hNa6 and (B) PN1, hNe-Na and IIB2 expressed in the rat and human prostate cancer cell lines, as determined from specific primer PCRs. Dark bars (▬) indicate conserved intron postions in VGSCα genes. Adapted from Oh & Waxman (1998).

Figure 9. (A) Current recordings from the MAT-LyLu rat prostatic cancer cell line elicited by depolarising the membrane from a holding potential of -100mV to 0mV following 24h incubation in 0% FBS, 100ng/ml EGF and 1μM AG1478. Voltage gated Na^+ channel expression was upregulated in the presence of EGF. (B) Histograms showing mean peak Na^+ current density ± standard error following 24 h incubation in 0% FBS, 100ng/ml EGF, 1μM AG1478 and EGF receptor antibody (1μg/ml). Statistical significance is indicated as **=$p<0.01$ and ***=$p<0.001$, respectively.

Example 1: Expression profiles of voltage-gated Na^+ channel α-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines: predominant expression of PN1/hNe-Na type voltage-gated Na^+

channel and subunits in highly metastatic rat and human prostate cancer cell lines

Voltage-gated Na^+ channels (VGSCs) control a variety of cellular activities, and their dysfunction has been implicated in a number of pathophysiological conditions, including prostate cancer metastasis. Although VGSCs can occur as multiple-subunit assemblies, the α-subunits (VGSCαs) alone can encode functional channels. We have developed two new reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods, degenerate primer screening and a novel semi-quantitative PCR technique. These enabled a detailed qualitative and quantitative investigation of VGSCα mRNA expression in rat (MAT-LyLu / AT-2) and human (PC-3 / LNCaP) prostate cancer cells of markedly different metastatic potential, and produced highly consistent results. Only the strongly metastatic cells (MAT-LyLu and PC-3) were shown previously to possess functional VGSC activity. VGSCα degenerate primer PCR screens identified eight different VGSCα genes: SCN1A-4A, SCN7A-9A and SCN11A. Specific primer PCRs demonstrated that most VGSCαs were expressed as multiple splice variants which would code for both functional and non-functional (highly truncated) proteins. Semi-quantitative PCR (SQT-PCR) results were consistent with a basal level of VGSCα mRNA expression occurring in weakly metastatic (AT-2 / LNCaP) cells and this being greatly elevated in cells of stronger metastatic potential (MAT-LyLu / PC-3). The marked increase in expression of the SCN9A gene specifically (also termed PN1/hNe-Na) was largely responsible for this elevation in VGSCα mRNA levels in both rat and human cells. Thus, SCN9A is highly likely to be the main source of the functional VGSC detected.

[1]Abbreviations: VGSCs, voltage-gated Na^+ channels; VGSCα, voltage-gated Na^+ channelα-subunit; VGSCβ, voltage-gated Na^+ channel β-subunit; DRG, dorsal root ganglion; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; S, transmembrane segment; D, transmembrane domain; ID, inter-domain; *TTX*, tetrodotoxin; sscDNA, single-stranded cDNA; R6, random hexamer primers; nt, nucleotides; SQT-PCR, semi-quantitative polymerase chain reaction; TBE, trizma-borate-EDTA buffer; $Cytb_5R$, NADH-cytochrome b5 reductase; NGF, nerve growth factor.

Background

Voltage-gated Na^+ channels (VGSCs)[1] are large membrane-spanning glycoproteins composed of a large (≅ 240 kD), four-transmembrane domain α-subunit (VGSCα) and up to two different auxillary β-subunits (VGSCβs) (1). Expression of the VGSCα alone is sufficient for functional channel formation (2). The VGSCβ(s) serve a number of supporting roles such as facilitating functional channel availability (3), modulating channel kinetics (4,5) and perhaps even altering pharmacological characteristics (6).

VGSCαs constitute a family of at least eleven different genes in higher vertebrates (7), denoted SCN1A to SCN11A; their products have been cloned from a variety of excitable cell types. At least two subfamilies of VGSCα genes have been described based on sequence data: Na_V1 and Na_V2 (8). Although not yet experimentally determined, it is generally held that these subfamilies represent VGSCαs with markedly different electrophysiological properties (9). In fact the lack of conservation of landmark VGSCα sequences in Na_V2 VGSCαs implies that they may not even be voltage-gated or Na^+ selective (9, 10). The existence of a third subfamily,

Na_V3, has recently been proposed with the cloning of a cDNA (NaN/SNS2) from rat dorsal root ganglion (DRG) cells. Although NaN/SNS2 shares less than 50% sequence homology with other VGSCαs, its deduced amino acid sequence possesses all the characteristic sequences of Na_V1 VGSCαs (11).

By utilizing RT-PCR and *in situ* hybridization methods, several studies have documented the simultaneous expression of multiple VGSCαs within diverse cell types (12-14). Particular VGSCαs have been found to be expressed at different levels, with expression under dynamic control (e.g. during development or injury). For example, mRNAs for at least eight different VGSCαs were found in adult rat DRG cells, with a wide range of expression levels: RB1, Na6, NaN/SNS2 and SCL-11 mRNAs were expressed at very high levels, PN1 and SNS/PN3 at intermediate levels, and RB2 and RB3 at very low levels (11,15, 16). Following axonal injury SNS and NaN/SNS2 mRNAs were dramatically down-regulated, whilst expression of RB1, RB2 and RB3 was up-regulated (17, 18).

VGSCα genes can occur as a number of alternatively spliced isoforms, expression of which is also under dynamic control. Alternative splicing of exons coding for the third segment (S3) of the first transmembrane domain (D1) has been found to be developmentally regulated for SCN2A and SCN3A (19, 20), yielding "neonatal" and "adult" forms. These code for proteins which differ by only one amino acid, positioned at the extreme extracellular end of S3. The effect of this change on VGSCα function is presently unclear. Similar alternatively spliced exons exist at the corresponding position in SCN8A and SCN9A (21, 22) but not in SCN4A, SCN5A, SCN10A and SCN11A (23-26). To date, no evidence of such alternative splicing has been found for SCN1A or SCN7A.

Alternative splicing also occurs in other regions of the VGSCα, particularly inter-domain (ID) 1-2 and D3.

The strict regulation of multiple VGSCα gene and splice product expression within the available VGSCα mRNA pool, among different tissue types and during development or following injury (e.g. 17, 18, 27) would suggest that different VGSCα gene products and their isoforms are likely to have significantly different functional roles, which, at present, are largely unknown.

The functional roles of VGSCs are best understood in the central nervous system where VGSC activity controls not only basic impulse generation and conduction but also directional and patterned growth, including target-specific axonal migration and regional synaptic connectivity (28-30). VGSCs have also been implicated in several hereditary diseases of excitable tissues (7, 31), and in more complicated pathological disorders, including chronic pain syndromes (32), epilepsy (33), ischaemic stroke (34) and Alzheimer's disease (35). There is increasing evidence that VGSC expression is also associated with strong metastatic potential in rat (MAT-LyLu) and human (PC-3) models of prostate cancer (36-38). Indeed, expression of functional VGSCs may have a direct, positive influence upon the metastatic process. Accordingly, blockage of VGS currents in these strongly metastatic cell lines, by application of tetrodotoxin (TTX), significantly (~30 %) reduced the cells' invasive potential. Electro-physiological and pharmacological properties of the current in the rat were consistent with the channels being neuronal, TTX-sensitive (Na_v1) type (39). SCN4A gene expression was found in both strongly and weakly metastatic cell lines of human and rat (40). However, the pharmacological properties of the VGS currents in the rat MAT-LyLu

cells were not consistent with those reported for this VGSCα. This could result from (1) the numerous differences determined in the MAT-LyLu/AT-2 rSkM1 primary sequence; (2) differences in post-translational mechanisms (eg association with auxiliary subunits, level of glycosylation/ phosphorylation of the channel) in these cells; or (3) the presence of other VGSCαs in the MAT-LyLu cells that produce the recorded VGS currents.

In the present study, we extend our work to determine the expression of mRNAs of other VGSCαs in the highly (MAT-LyLu and PC-3) and lowly (AT-2 and LNCaP) metastatic prostate cancer cells using a comparative, quantitative RT-PCR approach.

Experimental procedures

Cell cultures MAT-LyLu, AT-2, LNCaP and PC-3 cell lines were cultured and harvested as described previously (36, 37).

RNA extraction This was performed as in (41) or as described below. Briefly, cells were homogenized in a solution ("A"), using an IKA homogeniser, such that 1 ml of solution was used per 0.1 g of tissue. Solution A contained 4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM Na^+ citrate (pH 7.0), 0.5% sarcosyl and 0.72% (v /v) β-mercaptoethanol. The following were then added and shaken vigorously for 10 seconds: 2 M Na^+ acetate, pH 4.0 (10% volume of solution A), phenol (equal volume of solution A) and chloroform (20% volume of solution A). Centrifugation was performed at 10,000 x g for 20 mins at 4°C. The supernatant was taken and precipitated with isopropanol. Then, the samples were centrifuged as before and the pellet was resuspended in about 30% of the initial volume of solution A. A second isopropanol precipitate was

performed, the pellet was washed with 75% ethanol, and resuspended in sterile distilled water.

Three different RNA extracts were obtained from three different cell batches of each of the rat cell lines (named: MLL.1, MLL.2, MLL.3, AT.1, AT.2, AT.4) and two extracts from the two different cell batches of the human cell lines (named PC.1, PC.2, LN.1, LN.2).

VGSCα degenerate primer screening A PCR strategy capable of amplifying all known VGSCαs was used to amplify, and subsequently identify by cloning and sequencing, all VGSCαs expressed in the prostate cancer cell lines. Specific VGSCα primers were used, following initial sequencing results, to allow rapid PCR screening of numerous VGSCα clones derived from each cell line.

Briefly, DNA was removed from the extracts by digestion with DNase I and 5 µg of the total RNA was used as the template for single-stranded cDNA (sscDNA) synthesis (Superscript II, GIBCO BRL). sscDNA synthesis was primed with a random hexamer mix (R6) in a final volume of 20 µl. VGSCα cDNA was then amplified from the R6-sscDNA pool by PCR (*Taq* DNA polymerase, Amersham Pharmacia) using degenerate PCR primers (YJ1 and YJ2C) used previously to amplify both Na_V1 and Na_V2 VGSCαs from adult rat retinal pigment epithelial cells (42), and novel VGSCαs from a protochordate ascidian (43). PCR reactions were performed on 4 µl of the R6-sscDNA template, using 200 µM of each dNTP, 1 unit of Taq, 1x Taq buffer and 1 µM of each primer, in a final volume of 20 µl. Amplification was via: (i) initial denaturation at 94 °C for 5 min; (ii) addition of 1 U enzyme; (iii) 33-35 cycles of denaturation

at 94 °C for 1 min, annealing at 40 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min; and (iv) elongation at 72 °C for 10 min. For this and all PCRs performed, reactions with no ssDNA added were also carried out to control for cross-contamination from other DNA sources.

PCR products were analysed by electrophoresis and gel purified prior to ligation into the pGEM-T vector (pGEM-T Easy Vector System, Promega). These were then used to transform *E. coli* (pMosBlue, Amersham). Plasmid DNA was recovered from bacterial cultures using a modified version of the Vistra Labstation 625 miniprep procedure (Vistra DNA Systems, Amersham). Fifty clones with "inserts" were positively selected by gel electrophoresis for each of the ten RNA extracts. Following DNA sequencing of a subset of approximately 10 clones from each screen, performed using the Amersham Thermo Sequenase fluorescent cycle sequencing kit and the Vistra DNA 725 automated sequencer (Amersham International), specific PCR primers were designed to the most abundant VGSCαs found in the screens and used in conjunction with the universal vector primers, allowing for rapid PCR screening of clones without the need for extensive sequencing. Primers corresponded to nucleotides (nt) 4118-4137, 3406-3425, 4441-4460, 4066-4085, 4139-4158, 4265-4284 and 4325-4344 for PN1 (58 °C), SCL-11 (50 °C), RB1(46 °C), rSkM1 (64 °C), hNe-Na (54 °C), HB2 (56 °C) and hNa6 (54 °C) VGSCαs, respectively (numbering according to GenBank; reaction annealing temperature used indicated in parentheses). These primers were tested on sequenced clones to confirm that they yielded only specific products. Clones that did not test positive for these VGSCαs were identified by sequencing. The percentages of clones representing a given

VGSCα (out of the 50 clones in each screen) were averaged. Data are presented as means ± standard errors.

VGSCα-specific PCR tests The region between the two degenerate primers contains no conserved intron sites in studied VGSCα genes (22-25). Consequently, PCRs across conserved VGSCα gene intron sites were performed to confirm that VGSCαs found in the screens were not amplified from contaminating genomic DNA. Additionally, several VGSCαs found in the degenerate primer screens (particularly SCN2A, SCN3A, SCN8A and SCN9A) have been found to exist in numerous splice forms. Thus, specific 20-mer primers were designed to amplify products spanning conserved introns between D1:S2 to D1:S5/S6, permitting identification of the expressed splice form(s) of SCN2A (rat and human), SCN3A (human) and SCN9A (rat and human), and controlling for genomic DNA contamination. Primers for hNa6 (SCN8A) and NaN/SNS2 (SCN11A) were designed to D3, however, where similar alternative splicing to that for D1:S3 occurs in the hNa6 VGSCα (22, 44). Reactions amplified nucleotides corresponding to 424-847; 386-879; 684-1160; 632-1129; 870-1347; 3353-3674; 474-862; 3855-4370; 512-1024; 493-897, for PN1 (60 °C), SCl-11 (58 °C), RB1 (58 °C), RB2 (59 °C), rSkM1 (58 °C), NaN/SNS2 (58 °C), hNe-Na (59 °C), hNa6 (60 °C), HB2 (58 °C) and HB3 (60 °C), respectively.

Reactions were performed as above, using 2.5 μl of the R6-ssDNA mix and 0.5 μM of each primer, cycling 30-35 times. PCRs were carried out on both strongly and weakly metastatic cell line extracts, irrespective of whether these VGSCαs had previously been found in the screens. Observed products were cloned and sequenced, and a consensus sequence

for each VGSCα in each cell line then produced (using at least three clones, each derived from different RNA extracts). For RB2, HB2, HB3, PN1 and hNe-Na at least four clones derived from each cell line extract were sequenced for the PCR products of 498 nt, 513 nt, 405 nt, 424 nt and 389 nt, respectively (illustrated in Fig. 2).

Semi-Quantitative PCRs (SQT-PCRs) Eight DNased RNA extracts (two extracts for each cell line) were used to produce three sets of R6-sscDNAs for each extract. 2.4 µl of these R6-sscDNAs was used as the template for VGSCα-specific PCRs (performed as above), in a final volume of 60 µl. To allow direct comparison of results obtained from strongly and weakly metastatic cell lines, all comparable R6-sscDNA and PCR reactions were performed simultaneously.

A kinetic observation approach (45; Hoof *et al* (1991) *Anal. Biochem.* 196, 161-169; Wiesner *et al* (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183, 553-559) was adopted such that an aliquot of 5 µl from the 60 µl reaction was taken at the end of each amplification cycle, for eleven cycles, while reactions were held at 72 °C. The amplification cycle at which aliquots were first taken differed depending on the VGSCα studied. These aliquots were then electrophoresed (0.8% agarose gels) with DNA markers of known concentration. Gels were post-stained for 15 minutes (TBE buffer containing 0.8 µg/ml ethidium bromide), and digitally imaged (GDS 7500 Advanced Gel Documentation System, Ultra-Violet Products, Cambridge, UK). Total product mass (nanograms) in each aliquot was determined by image analysis (1D Image Analysis Software, Kodak Digital Science, NY). Two characteristic stages in each PCR reaction were quantified:

(1) Threshold PCR cycle number (CN_t) at which a given PCR product could just be detected by the image analysis software (default settings).

(2) PCR cycle number at which the exponential phase of the reaction finished (CN_e).

Accumulation of reaction product with increasing PCR cycle number follows a sigmoid curve (45). However, the two extremes of this curve were unknown or undetermined for the SQT-PCR data (i.e. the initial mass of cDNA at zero cycles was unknown, and the final product mass at the end of the PCR undetermined). Thus, a sigmoid curve could not be fitted to the data. Instead a third-order polynomial equation, which also has only one possible point of inflexion (here corresponding to the end of the exponential phase of the PCR), was used to approximate a sigmoid curve. Curve-fitting was performed using STATISTICA (SoftStat Inc., Tulsa, OK), and the second derivative then calculated, to give CN_e. This procedure could be performed successfully, with the calculated values of CN_e falling within the data points obtained experimentally (Fig.1). Data are presented as means and standard errors for each cell line (three repeats on two extracts for each VGSCα). The values of CN_t and CN_e were used directly to compare the levels of expression of each VGSCα in the strongly and weakly metastatic cell lines.

NADH-cytochrome b5 reductase ($Cytb_5R$), which is expressed at very similar levels in normal, cancerous and strongly metastatic cells derived from numerous tissue types (46, 47), was present in both rat and human degenerate primer screens as a major constituent of the non-specific products found (the "non-VGSCα" clones). Consequently, this was used as a control amplicon in SQT-PCRs. $Cytb_5R$ 20-mer primers amplified

nucleotides 385-809 and 299-790 of rat and human homologues, respectively (annealing temperature, 60 °C for both).

The specific PCRs for PN1, hNe-Na, RB2, HB2, hNa6 and HB3 produced multiple VGSCα products, due to alternative splicing, making determination of the VGSCαs' levels of expression more difficult. In order to obtain single products for these VGSCαs different PCRs were performed using new 20-mer primers which amplified nucleotides 20-345; 172-544; 5941-6308; 3827-4344; 5914-6270; 1594-1875, for PN1 (60 °C), RB2 (60 °C), hNe-Na (56 °C), hNa6 (60 °C), HB2 (58 °C) and HB3 (59 °C), respectively. hNe-Na, hNa6, HB2 and HB3 products did not span conserved intron sites so control PCR reactions were performed in which the ssDNA template was replaced by an aliquot from a reverse transcription reaction which had no reverse transcriptase added. All products were cloned and sequenced.

Two additional 20-mer primers ("neonatal": nt 500-519, GenBank numbering, and "adult": nt 3996-4015), were used to determine the relative expression levels of the neonatal and adult splice forms of hNa6 in the prostate cancer cells. Reactions were performed on only one RNA extract of the PC-3 and LNCaP cells in conjunction with the 3' hNa6-specific primer used for the VGSCα-specific PCR tests ("neonatal" annealing temperature, 58 °C; "adult" PCR, 57 °C;).

GenBank Sequence Nucleotide Numbers Nucleotide numbering was according to accession numbers U79568, Y03639, X03638, X03639, Y17153, AF059030, X82835, AB027567, AF050730, M94055, AF035685, D00636, Y09501 for PN1, SCL-11, RB1, RB2, rSkM1,

NaN/SNS2, hNe-Na, hNa6, hNa6 "neonatal", HB2, HB3, rCytb5R and hCytb5R, respectively.

Results

VGSCα degenerate primer screening The combined results of the PCR and sequencing screens of the miniprcped clones for the different cell lines are shown in Table I. Eight different VGSCα types were found in the screens, representing products from SCN1A-4A, SCN7A-9A and SCN11A genes. Of these, six different VGSCαs were found in the rat and four in the human; the homologues of two VGSCαs found in the human screens were also present in the rat cells (PN1 derived from SCN9A, and RB2 from SCN2A). All VGSCαs found were identical to the respective published sequence in the amplified region (delineated by the degenerate primers).

TABLE I *Summary of the VGSCα degenerate primer screen results*
Results are shown as the percentage of clones tested (n=50 in each case). Each screen is the result of 2-3 extracts from each cell line. Errors indicate standard errors. Dashed lines (-) indicate the absence of clones with that particular VGSCα identity in the screens performed.

VGSCα Gene	Gene Product	Rat cell lines		Human cell lines	
		MAT-LyLu	AT-2	PC-3	LNCaP
SCN1A	RB1 / HB1	5.3 ± 0.7	34.0 ±13.3	-	-
SCN2A	RB2 / HB2	-	1.3 ± 0.7	11.0 ± 5.0	11.0 ± 7.0

SCN3A	RB3 / HB3	-	-	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0
SCN4A	rSkM1 / hSkM1	-	34.0 ±12.0	-	-
SCN7A	SCL-11 / $hNa_v2.1$	55.3 ±7.3	10.7 ± 7.7	-	-
SCN8A	rNaCh6 / hNa6	-	-	41.0 ± 5.0	47.0 ±15.0
SCN9A	PN1 / hNe-Na	37.3 ±8.7	-	45.0 ± 3.0	-
SCN11A	NaN / -	-	8.0 ± 2.0	-	-
Non-VGSCα		2.0 ± 1.2	12.0 ± 2.0	2.0 ± 2.0	41.0 ± 7.0

The degenerate primers were designed to amplify all the possible cDNA combinations which can code for two amino acid sequence motifs perfectly conserved in all thus far cloned and sequenced Na_v1 VGSCαs (YJ1 = FWLIFSIM; YJ2C = QVATFKGW) and yield products of 225-237 bps. It was likely (at least for Na_v1 channels), therefore, that the proportion of clones representing each VGSCα type would approximately reflect the actual proportion of that VGSCα within the cellular VGSCα mRNA pool.

The sequence between the two highly conserved primer-binding regions is very different in all VGSCαs, allowing discrimination between VGSCα types by DNA sequenceing or by PCR (using VGSCα-specific primers which would only amplify products of one VGSCα type).

Products of only one Na_v1 type VGSCα gene, SCN9A (PN1/hNe-Na), were found to be abundant in the screens of all strongly metastatic extracts

(both rat- and human-derived): 37.3 ± 8.7% and 45.0 ± 3.0% for the MAT-LyLu and PC-3 cells, respectively. In contrast, no SCN9A gene products were found in the screens performed on the corresponding weakly metastatic cells. SCL-11 was also more frequent in the screens of the MAT-LyLu (55.3 ± 7.3%) compared with the AT-2 cells (10.7 ± 7.7%).

Numerous non-VGSCα clones were identified. As would be apparent to the skilled person, clones were classified as non-VGSCα if they could be matched to known GenBank DNA sequence entries not coding for VGSCαs, or if they represented previously unpublished cDNAs that did not possess sequences with conserved VGSCα sequence motifs in the degenerate primer delineated region. The percentage of clones with a non-VGSCα identity was greater in the weakly metastatic cells compared with the strongly metastatic counterpart (in both rat and human). Furthermore, the overall levels were greater in the human compared to the rat screens. hCytb$_5$R was the non-VGSCα found most often in the screens on the human cells (100% of non-VGSCα clones in PC-3 and 61% in LNCaP).

VGSCα-specific PCR tests These yielded products for all the VGSCαs found in the degenerate screens (SCN1A, SCN7A and SCN9A for MAT-LyLu-derived sscDNAs; SCN1A, SCN2A, SCN4A, SCN7A, SCN11A for AT-2-derived sscDNAs), indicating that all were indeed expressed as mRNA transcripts (and not derived from genomic DNA). Additionally, rat VGSCαs found only in AT-2 screens were found to be expressed in the MAT-LyLu cells (RB2 (SCN2A), rSkM1 (SCN4A) and NaN(SCN11A)). VGSCαs (SCN9A) found only in the strongly metastatic cell screens (MAT-LyLu and PC-3) were expressed in some or all of the

weakly metastatic cell extracts (PN1 detected in one of the three AT-2 extracts; hNe-Na in both LNCaP extracts).

Sequence analysis indicated that several splice forms of SCN2A, SCN3A, SCN8A and SCN9A were expressed in both strongly and weakly metastatic cells (Fig. 2). These splice forms consisted of both neonatal and adult forms for SCN2A, SCN3A and SCN8A but only the neonatal form for SCN9A (10 and 12 clones sequenced, respectively, for rat and human cells). Interestingly, neonatal forms were apparently more abundant than adult forms in both strongly and weakly metastatic human cell lines for SCN2A and SCN3A (8 *vs* 1 clone for both VGSCαs). In contrast, the adult form of SCN2A was more abundant in both MAT-LyLu and AT-2 cells (13 *vs* 2 clones).

Truncated splice forms (denoted Δ), missing whole exons due to the splicing out of both adult and neonatal exons from the mRNA transcript, were also amplified and sequenced from SCN2A (in the AT-2 cells), SCN8A and SCN9A (Fig.2). ΔSCN9A was found only in the strongly metastatic cells (rat and human). Assuming the published open reading frame, the transcripts for SCN2A, SCN3A and SCN9A would code for VGSCα proteins truncated at D1:S3. In contrast, ΔhNa6 (from SCN8A) would code for a VGSCα protein only missing half of D3:S3 and all of D3:S4, as described before (48). Additionally, an RB2 (SCN2A) splice form containing both neonatal and adult exons was sequenced (from AT-2 extracts), representing a partially spliced RB2 transcript. This would translate into an RB2 protein truncated immediately after the neonatal D1:S3 (Fig. 2).

Four of the VGSCα (SCL-11, RB2, HB3 and hNa6) types differed slightly from the respective published sequences in the regions cloned. Partial sequence analysis also revealed that hNe-Na (in PC-3 and LNCaP cells) differed from the corresponding GenBank sequence in part of the 3' non-coding region. These changes are outlined in Table II. It is expected that other changes may also be present, particularly in the non-coding regions.

TABLE II *Nucleotide (nt) differences in the partially sequenced VGSCαs compared to GenBank sequences*

Deduced amino acid changes and the relative degree of conservation of changed residues in other VGSCαs are shown.

Nt difference	Nt position	Amino acid change	VGSCα Region	Sequence conservation
rSCN2A - 1	775 (A to G)	Asn to Asp (Asn 189)	D1:S3	Asp in all VGSCαs
rSCN2A - 2	918 (T to C)	None (Thr 236)	D1:S4/S5	-
hSCN3A-1	578 (T to C)	Val to Ala (Val 175)	D1:S2	Ala in all VGSCαs
rSCN7A - 1	427 (C to T)	None (Asn 139)	D1: S1	-
rSCN7A - 2	462 (- to T)	Cys to Leu (Cys 151)	D1: S2	Leu in all Na_v2s
rSCN7A - 3	469 (A to -)	None (Gly 153)	D1: S2	-

rSCN7A - 4	481 (C to T)	None (Phe 157)	D1: S2	-
rSCN7A - 5	490 (G to T)	None (Leu 160)	D1: S2	-
rSCN7A - 6	661 (C to T)	None (Ile 217)	D1: S4	-
rSCN7A - 7	842 (G to A)	Ser to Asn (Ser 281)	D1:S5/S6	Asn in all Na_v2s
hSCN8A-N1	493 (C to A)	None (after STOP)	D3: S3	-
hSCN8A-N2	511 (N to A)	None (after STOP)	D3: S3	-
hSCN9A-1	6230 (G to -)	None (after STOP)	-	-
hSCN9A-2	6231 (A to -)	None (after STOP)	-	-
hSCN9A-3	6232 (T to -)	None (after STOP)	-	-
hSCN9A-4	6233 (T to -)	None (after STOP)	-	-

SQT-PCRs Typical electrophoresis results are illustrated in Figures 3 and 4 for rat and human VGSCαs, respectively. Assuming that the PCR reactions performed on strongly and weakly metastatic cell RNA extracts had similar efficiencies, differences in the calculated CN_t and CN_e values (derived from the gel images) reflect real differences in expression levels. Consistent with this assumption, the control amplicon ($Cytb_5R$) showed little or no difference in either rat (CN_t = 18.3 ± 0.2 *vs.* 17.3 ± 0.4; CN_e = 23.1 ± 0.4 *vs.* 22.1 ± 0.2) or human cell extracts (CN_t = 19.2 ± 0.3 *vs.* 19.5 ± 0.4; CN_e = 23.5 ± 0.2 *vs.* 23.4 ± 0.3).

Further, utilising the derived CN_t and CN_e values, it is possible to calculate approximate absolute differences in expression levels of the VGSCαs (assuming an 80% PCR efficiency (Bishop *et al* (1997) *Immunol Cell Biol* 75, 142-147)), as shown in Table III (a and b)

In MAT-LyLu versus AT-2 cells, only two VGSCαs (PN1 and SCL-11) required markedly less amplification to yield detectable products and reach CN_e, indicating a greater level of expression in MAT-LyLu cells. Importantly, the most striking difference was seen for PN1: CN_t = 25.2 $\pm$ 0.5; CN_e = 29.2 $\pm$ 0.4 (Fig. 3a). In fact, PN1 was never detected in the two AT-2 cell extracts extensively studied, even after 45 cycles; an apparently low level of PN1 was present in a third AT-2 extract (CN_t = 35.7 $\pm$ 0.3).

One other VGSCα (RB2) showed a notable cell-dependent difference in the amplification profile (Fig. 3e); however, the results indicated overall low levels of expression: CN_t = 35.4 $\pm$ 0.4 (MAT-LyLu) *vs.* 29.8 $\pm$ 0.8 (AT-2). Minor cell-dependent differences were seen also for rSkM1 (Fig. 3d) and NaN/SNS2 (Fig. 3f), again the apparently greater level of expression occurring in the weakly metastatic cells. One VGSCα, RB1, showed no obvious difference in the expression levels between the two cell lines (Fig. 3c).

In PC-3 versus LNCaP extracts, the most striking cell-dependent difference was for hNe-Na (Fig. 4a), the orthologue of PN1: CN_t = 25.7 $\pm$ 0.8 (PC-3) *vs.* 37.7 $\pm$ 0.3 (LNCaP). There were also differences between the expression levels of hNa6, HB2 and HB3 across the two cell lines (CN_t = 22.6 $\pm$ 0.5 *vs.* 26.8 $\pm$ 0.2 ; 26.8 $\pm$ 0.5 *vs.* 30.7 $\pm$ 0.5;

34.0 ± 0.7 *vs.* 39.7 ± 0.9, respectively), again with a greater level in the PC-3 cells, but these were much less than for hNe-Na.

The results of SQT-PCRs amplifying the neonatal (hNa6N) and adult (hNa6A) isoforms of hNa6 (Fig. 4f and 4g) indicated that both forms were expressed at greater levels in the strongly metastatic than the weakly metastatic cells: CN_t = 25.3 ± 0.3 *vs* 28.0 ± 0, CN_e = 28.1 ± 0.2 *vs* 31.8 ± 0.3 for the neonatal form, and CN_t = 36.7 ± 0.3 *vs* > 45.0 for the adult form, respectively. These CN_t values would also suggest that the neonatal form was expressed at a much greater level than the adult form in both cell lines.

Initial SQT-PCRs for SCN2A, SCN3A, SCN8A and SCN9A that yielded multiple products are shown in Figure 2. Therefore, the relative expression levels of scn2a, scn3a, scn8a and scn9a VGSCαs determined are comprised of different forms of these VGSCαs. Multiple product SQT-PCRs generally agreed with the results of the single-product SQT-PCRs; importantly, for example, VGSCα expression levels were greater in PC-3s than LNCaPs. The neonatal/adult isoforms consistently appeared to be the dominantly expressed splice variants of RB2, HB3, PN1 and hNe-Na, with products evident at a lower cycle number than other isoforms. For HB2, however, both the Δ and the neonatal/adult isoforms were apparently expressed at similar levels (Fig.2a). In contrast, hNa6 expression appeared to be dominated by the neonatal form in LNCaP cells and by the neonatal and Δ forms in PC-3 cells (Fig. 2c).

Discussion

In this study we developed novel RT-PCR methods to investigate multiple VGSCα gene expression in prostate cancer cell lines and showed (i) that multiple VGSCαs and their splice variants were expressed in both strongly and weakly metastatic prostate cancer cell lines derived from rat and human sources; (ii) that the overall level of VGSCα expression was considerably greater in strongly metastatic compared to weakly metastatic cells; and (iii) that the expression of a particular functional VGSCα type - the product of SCN9A (PN1/hNe-Na) - was predominant, being greatly upregulated in the strongly metastatic cells of both rat and human models of prostate cancer.

The cell lines used were chosen for study due to their very different metastatic abilities. Rat AT-2 cells are weakly metastatic when inhected subcutaneously in Copenhagen rats (less than 10% of animals develop lung and lymph node metastases (Isaacs *et al* (1986) *Prostate* **9**, 261-281); in constrast, MAT-LyLu cells are strongly metastatic (more than 80% of animals develop lung and lymph node metastases (Isaacs *et al* (1986)). Similarly, human PC-3 cells, when subcutaneously injected into athymic nude mice, readily metastasised, resulting in axillary lymph node metastases in 56% of animals (Shevrin *et al* (1989) *Prostate* **15**, 187-194; Waters *et al* (1995) *Prostate* **26**, 227-234), whereas LNCaP cells did not metastasise in athymic mice (Lee *et al* (1993) *Cancer Metastatsis Rev* **12**, 21-28). Furthermore, upon orthotopic injection into the prostate of recipient nude mice metastatic variant PC-3 cells gave rise to lymph node metastases in 90% of animals, whilst LNCaP cells also displayed tumorigenicity but did not yield evident lymph node metastases (Stephenson *et al* (1992) *J Natl Cancer Inst* **84**, 951-957).

Methodological aspects - The degenerate primer PCR screening technique enabled, initially, the determination of the VGSCαs expressed in these cells. Other techniques, including a degenerate PCR-restriction enzyme digest technique (Fjell, J *et al* (1997) *Mol. Brain Res.* **50**, 197-204), and northern blotting using common VGSCα probes (Beckh, S. (1990) *FEBS Letts.* **262**, 317-322), have similarly been employed to sample VGSCα expression. However, unlike such methods, degenerate screens also yield quantitative information. Since our degenerate PCR primers were designed to two highly conserved regions of all published VGSCαs (in D3:S5 and D3:S5/S6), it is likely that all VGSCαs of the Na_V1 subfamily were amplified with essentially the same efficiency, ie the relative proportions of the VGSCαs in the screens broadly reflect their relative abundances in the cellular mRNA. This is supported by the SQT-PCR data, which agreed closely with the screening results, particularly when comparing estimated differences in expression levels of VGSCαs between strongly and weakly metastatic cells (Table IIIa and IIIb). Thus, although the screening and SQT-PCR results cannot directly be used to determine absolute levels of VGSCα expression, information concerning the VGSCα mRNA levels relative to each other were represented by the percentage of clones of each type in the screens.

Importantly, the most noticeable difference was for SCN9A, which was expressed at least 1000-fold higher in the strongly metastatic cells. SCN9A was also the predominant VGSCα in the strongly metastatic cell lines, representing about 80% of the "functional VGSCα" mRNA population in the MAT-LyLu and PC-3 cells.

The utility of PCR for quantitative analysis is limited by the loss of quantitation at a certain stage of amplification beyond which the reaction

ceases to amplify exponentially and eventually reaches a plateau (Morrison, C. & Gannon, F. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1219**, 493-498). Consequently, most of the commonly used 'quantitative' PCR techniques (reviewed in Morrison & Gannon (1994)) require attention to this onset of non-exponential amplification. This point was readily determined with the novel SQT-PCR data analysis method introduced in the present study. Third-order polynomial data analysis was applied to a simple, time-saving SQT-PCR technique, based on kinetic observation, to determine the stage of the PCR (represented as the cycle number CN_e) at which exponential amplification ceased. CN_e could then be used as a reference value for easy, direct comparison of VGSCα mRNA levels in different cell lines, in a similar manner to CN_t comparisons. However, CN_e is likely to be a more reliable parameter than CN_t since (1) it is derived from several data points rather than the one CN_t reading; and (2) it is a continuous rather than discrete value, and hence more accurate.

In conclusion, our novel degenerate screening and SQT-PCR techniques produced a consistent quantitative profile of the VGSCα expression in these cells. The level of confidence in this analysis was further strengthened by the robustness of the $Cytb_5R$ control data obtained from the different cell lines. Both methods, especially in combination, thus represent powerful new means of rapid, reliable, qualitative/quantitative analysis of VGSCα mRNA expression, particularly useful when comparing cells of different phenotype, or the same cell type under different conditions.

TABLE III *Calculated differences in the expression levels of each VGSCα between strongly and weakly metastatic (a) rat and (b) human cell lines.*

Differences are shown for CN_t values, CN_e values (from SQT-PCR) and the screening data, and are stated as multiplication factors. Positive and negative values indicate higher and lower expression levels, respectively, in the strongly versus weakly metastatic cells. CN_t and CN_e differences were calculated assuming 80% PCR efficiency in each case (similar to that reported in Bishop *et al* (1997) *Immunol Cell BIOl* **75**, 142-147), according to the following equation: $1.8^{[MAT\text{-}Ly1a\ value\ -\ AT\text{-}2\ value]}$ (45). Degenerate screen differences were calculated assuming an equivalent level of expression of designated standards (RB1 for the rat screens; hCytb5R for the human screens), denoted "std", in the strongly and weakly metastatic cells. "ND" indicates that the difference could not be determined.

* This was the minimum expression difference between strongly and weakly metastatic cells, determined from SQT-PCR data derived from the third AT-2 cell extract.

a.

VGSCa Gene	Gene Product	CN_t	CN_e	Screen
SCN1A	RB1	- 1.5	+ 1.4	std (1)
SCN2A	RB2	- 26.9	- 18.9	- 40
SCN4A	rSkM1	- 3.1	- 3.4	- 4
SCN7A	SCL-11	+ 13.3	+ 13.3	+ 30
SCN9A	PN1	+100,000*	ND	ND
SCN11A	NaN	- 3.2	- 2.4	- 3
rCytb5R	rCytb5R	- 1.8	- 1.8	1

b.

VGSCa	Gene	CN_t	CN_e	Screen
SCN2A	HB2	+ 9.9	ND	+ 13
SCN3A	HB3	+ 28.5	ND	+ 13
SCN8A	hNa6	+ 11.8	+ 18.9	+ 11
SCN9A	hNe-Na	+ 1150	ND	ND
hCytb5R	hCytb5R	+ 1.2	+ 1.2	std (1)

The screen results were consistent with the total level of VGSCα mRNAs being very different between the strongly and weakly metastatic cells. The SQT-PCR data suggested that the levels of expression of $Cytb_5R$ in cells of differing metastatic potential (both rat and human) were very similar. Accordingly, the increased incidence of this non-VGSCα clone in the degenerate screens of the weakly metastatic LNCaP and AT-2 cells (Table I) indicated a lower VGSCα target to noise ratio in these cells compared to their strongly metastatic counterpart (hence a lower level of VGSCα expression).

The results of this study show, therefore, that a basal level of VGSCα mRNA expression occurs in the weakly metastatic cells and that this is considerably upregulated in the strongly metastatic phenotype. Such a basal level of VGSCα mRNA expression in weakly metastatic cells concurs with previous flow cytometry results (38) which revealed a low level of VGSCα protein in LNCaP and AT-2 cells, despite the absence of electro-physiologically detectable VGS currents. VGSCα expression in non-cancerous prostate epithelial cells has not been investigated in this Example. Further work is required to determine whether basal VGSCα

expression is associated with neoplasm or is characteristic of epithelial cells of normal prostate.

The screening and SQT-PCR results cannot directly be used to determine absolute levels of VGSCα expression. However, degenerate screen PCRs would amplify all VGSCαs of a given subfamily (e.g. Na_V1s) with approximately the same PCR efficiency, thus retaining information of the levels of expression of the VGSCαs relative to each other in the cellular mRNA. Thus, it should be possible to compare relative abundances of these in the screens and relate these abundances to relative proportions of particular VGSCαs in the cells' mRNA. The available data are consistent with the relative expression profiles of VGSCαs shown in Figure 5. In this estimation, the SCN9A gene products represent some 80% of the "functional VGSCα" mRNA population in the MAT-LyLu and PC-3 cells.

Multiplicity of VGSCα expression Although the level of expression of VGSCα mRNA was much higher in the strongly metastatic MAT-LyLu cells, and most VGSCα types were expressed at greater levels in strongly *vs* weakly metastatic cells, three lowly expressed VGSCα genes (SCN2A, SCN4A and SCN11A) were found to be present at slightly higher levels in the weakly metastatic AT-2 cells. This strongly indicates that these VGSCαs do not normally contribute to the VGS currents detected in the MAT-LyLu cells but the physiological significance, if any, and the mechanism(s) controlling this down-regulation of expression have yet to be determined. In contrast, in the human cell lines, all VGSCαs detected were expressed at higher levels in the strongly metastatic PC-3 cells.

Multiple VGSCα expression has previously been demonstrated in adult rat DRG cells (14), PC12 cells (49) and cultured spinal cord astrocytes (12). The prostate cancer epithelial cell lines studied here represent yet another cell type in which simultaneous expression of multiple VGSCαs has been shown to occur. In most of these instances, a wide range of VGSCα mRNA expression levels were found to exist within the cells. At present, the functional consequence(s) of this multiple expression within a single cell type is unclear. VGSCα expression in these cells may be dramatically and quickly up- or down-regulated in response to numerous stimuli, such as growth factors and axotomy (14, 17, 49), in a subtype-specific manner. This would strongly imply that different VGSCαs posess different functions, the relative importance of which can change quickly under different conditions. Fine-tuning of expression may occur rapidly in order to match the VGSCα expression profile of the cell to the required functional response. It is highly likely that such changes in the functional VGSC profile can only be achieved by the regulation of different VGSCαs already being expressed and not by the slower process of "switching on" VGSCα genes. Thus, multiple, low level VGSCα expression could enable cells to meet functional requirements necessitated by dynamic changes in their micro-environment.

VGSCs have been detected in numerous "non-excitable" tissues, including epithelial types such as retinal pigment, lens and corneal epithelium, where their functional role is mostly unknown (42, 50, 51). A functional role for VGSCs that does not involve the production of action potentials has been determined in spinal cord astrocytes *in vitro* (52). In these cells, VGSCs instead provide a return pathway for Na^+, maintaining Na^+/K^+-ATPase activity. Other roles for VGSCs in non-excitable cells may

include the production of graded potentials involved in intercellular Ca^{2+} homeostasis or activation of various intracellular signalling pathways (52).

High expression levels of "non-functional VGSCαs" in prostate cancer cells The ability of the SCN7A and SCN8A mRNA transcripts found in the MAT-LyLu and PC-3 cells to create functional VGSCs is doubtful. SCN7A codes for an Na_v2 VGSCα with no proven channel-forming capability. Although the SCN8A gene is known to be able to produce functional VGSC proteins, whether the specific SCN8A gene products expressed in the human prostate cancer cells can function as viable channels in these cells is questionable. hNa6N codes for a highly truncated VGSCα protein possessing only D1 and D2 (44). This variant was found in non-neuronal and neonate tissues and proposed to be incapable of forming functional VGSCs, acting instead as a "fail-safe" mechanism to prevent the synthesis of full-length, adult hNa6 VGSCα protein (44). Indeed, a highly truncated voltage-gated K^+ channel α-subunit has been successfully used to artificially suppress endogenous K^+ currents in rat anterior pituitary cells (53). The adult isoform of hNa6 was also found to be expressed in both strongly and weakly metastatic human cells at a very low level, but it is likely that the presence of the neonatal isoform prevents hNa6A functional expression. The ΔhNa6 variant, which has effectively lost the voltage-sensing S4 segment in D3, is similar to the ΔhNe-Na, ΔPN1, ΔHB2 and ΔRB2 splice forms found in the specific PCR tests. These transcripts are likely to represent mis-spliced, non-viable forms of SCN8A, SCN9A and SCN2A VGSCα genes (48). The occurrence of apparently non-functional VGSCαs could be an additional means of regulating effective VGSC expression in the prostate cancer cells.

Predominant expression of PN1/hNe-Na in strongly metastatic cells The results of the degenerate screens and the SQT-PCR demonstrated consistently that PN1/hNe-Na was the predominant VGSCα expressed in the strongly metastatic cells. Furthermore, sequence data indicated that most of the SCN9A transcripts were in the neonatal form. In fact, the adult splice form has only been found to date at very low levels in neonate rabbit Schwann cells (21), so it is presently unclear whether the D1:S3 alternative splicing of the SCN9A gene is developmentally regulated. It may be notable that all of the VGSCαs found to be alternatively spliced at D1:S3 in the prostate cancer cells, except for RB2, were also mainly expressed in the neonatal form.

The present study provides an example of the expression of the SCN9A gene in carcinoma, indicating that up-regulation of SCN9A gene expression could be a common carcinoma-associated phenomenon. hNe-Na was originally cloned and sequenced from the clonal C-cell line of a human medullary thyroid carcinoma (hMTC cells) and found to be expressed in human C-cell carcinoma tissue (54). The PN1 clone was obtained from PC12 cells, derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla (49). There is no suggestion of a link between hNe-Na or PN1 expression and carcinoma in these studies.

SCN9A products were previously found at high levels in the peripheral nervous system and at much lower levels in brain, spinal cord, Schwann cells, heart, and adrenal and thyroid glands (49, 54-56), particularly in neuroendocrine cells (54, 55). Neuroendocrine cells are also present in the prostate. Recent studies suggest that their proliferation and differentiation may predict prostate cancer progression (Cohen *et al* (1994) *Cancer* **74**, 1899-1903; Anthony di Sant'Agnese, P. (1998) *Prostate Suppl.* **8**, 74-79;

Bonkhoff, H. (1998) *Prostate Suppl.* **8**, 18-22). Prostatic neuroendocrine cells lack detectable nuclear androgen receptors (Bonkhoff, H *et al* (1993) *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.* **423**, 291-294; Krijnen, J *et al* (1993) *Histochemistry* **100**, 393-398), suggesting that they are androgen-insensitive. This neuroendocrine insensitivity may play a role in the mechanisms responsible for the progression of prostatic adenocarcinomas to androgen insensitivity. Intriguingly, androgens can inhibit the activity of VGSCs (Tabb, J.S *et al* (1994) *J. Neurosci.* **14**, 763-773) and may also decrease VGSCα mRNA expression as other steroid hormones have been found to do (Rich, M.M., Kraner, S.D. and Barchi, R.L. (1999) Neurobiol. Dis. **6**, 515-522). Thus, it may be that a high level of VGSCα mRNA expression occurs in prostatic epithelial cells with the change to androgen-insensitivity.

Where comparisons can be made, the electro-physiological and pharmacological characteristics of PN1 and hNe-Na type VGSCs are very similar to those of the VGS currents observed in the strongly metastatic rat and human prostate cancer cells, (36, 37, 39, 49, 54, 56). This is consistent with the SCN9A products specifically being the source of the VGS currents recorded in these cells. Since this VGSCα has been shown to potentiate the invasion process (36-38), it may be expected to have a particular subcellular distribution pattern, interaction with the cytoskeleton and/or specialised electro-physiological properties which facilitate this activity. Indeed, a recent electro-physiological study has highlighted one apparently unique property of hNe-Na, a very slow rate of closed-state inactivation. This permits the production of "ramp currents" in response to slow but gradually increasing sub-threshold stimuli (Cummins *et al* (1998) *J. Neurosci.* **18**, 9607-9619); VGSCαs with faster closed-state inactivation rates are incapable of responding to such stimuli.

PN1 protein also has a specific subcellular localization in nerve growth factor (NGF) -differentiated PC12 cells and cultured rat DRG neurons, being present specifically in neurite terminals and at the leading edges of growth cones (49). NGF upregulates PN1 expression in PC12 cells and this is followed by morphological differentiation from a round to a highly branched shape, indicating a role for this VGSCα in enhancing cellular morphology (57). Consistent with this, TTX treatment had the opposite effect on the morphology of the MAT-LyLu cells, causing them to retract their processes and become compact (58).

Determination of SCN9A gene products specifically as the origin of VGSC functional expression in strongly metastatic prostate cancer cells, in both rat and human models of the disease, now permits the use of more specific experiments to further elucidate all aspects of the metastatic mechanism: (1) elements up-stream of the SCN9A gene, which effect the increase in expression of this gene specifically, for example hormones, growth factors and transcription factors/repressors; (2) down-stream elements which allow SCN9A expression to potentiate invasion/metastasis.

Possible expression of other VGSC subunits in prostate cancer cells The present study only attempted to characterise VGSCα mRNA expression in the strongly and weakly metastatic cells, since VGSCαs alone are sufficient to encode functional VGSCs. The multiplicity of VGSC expression determined for the prostate cells may be further complicated by the possible expression at even lower levels of transcripts of other VGSCαs and by the expression of VGSCβs. SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A and SCN8A gene products have been found to commonly

associate with one or more VGSCβs and so it is likely that some VGSCβ expression occurs in these cells. However, SCN9A gene products do not appear to associate with VGSCβs (54, 55), so it is unlikely that these auxillary subunits would make a significant contribution to the mechanism(s) responsible for the high level of functional VGSC expression in the metastatic cells.

It is not certain that all the VGSCα genes found to be expressed in these cells are actually translated into proteins. If all expressed VGSCα genes can potentially be translated, such multiplicity in cells could enable rapid upregulation or downregulation of VGSCαs (potentially faster than "switching on" transcription of VGSCα genes), in a subtype-specific manner, in cells' response to various stimuli, such as growth factors and damage (Fjell *et al* (1999) *Molec Brain Res* **67**, 267-282; Dib-Hajj *et al* (1996) *PNAS* **93**, 14950-14954; Toledo-Aral *et al* (1997) *PNAS* **94**, 1527-1532). This would imply that different VGSCαs subserve different functions, the relative importance of which can quickly change under diverse conditions. Thus, multiple, low level VGSCα expression could enable cells to meet functional requirements necessitated by dynamic changes in their microenvironment.

Concluding remarks

The present study has two broad implications. First, the characterisation of the functionally distinct prostatic epithelial cells' VGSCα mRNA expression profiles now establishes these cells as a convenient model in which to study the patterns, regulation and functional consequences of (i) VGSC expression in non-excitable cells and (ii) the emerging concept of

the multiplicity of VGSC expression, i.e. the expression of multiple VGSC *subunits* and multiple splice forms of these subunits in a single cell type. Second, as regards prostate cancer itself, a serious limitation in the current management methods is that the available markers for the metastatic phenotype (such as prostate specific antigen) are not reliable (59, 60). Thus, clinically important cancers cannot readily be distinguished from those which are clinically unimportant and do not require aggressive treatment (which is associated with high patient morbidity). The identification of SCN9A gene products as the predominant VGSCαs in both rat and human models of prostate cancer highlights the conservation of VGSCα expression in strongly metastatic prostate cancer cell lines. Consequently, the present study further supports the potential value of these ion channels in the possible diagnosis and therapy of the disease.

References

1. Catterall, W.A. (1986) Ann. Rev. Biochem. **55**, 953-985
2. Goldin, A. L *et al* (1986). Proc. Natl. Acad. Sci USA **83**, 7503-7507
3. Isom, L.L., *et al* (1995) Cell **83**, 433-442
4. Isom, L.L., *et al* (1992) Science **256**, 839-842
5. Cannon, S.C., *et al* (1993) Pflugers Arch. **423**, 155-157
6. Bonhaus, D.W., *et al* (1996) Neuropharmacol. **35**, 605-613
7. Plummer, N.W. and Meisler, M.H. (1998) Genomics **57**, 323-331
8. George, A.L., *et al* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 4893-4897
9. Akopian, A.N., *et al* (1997) FEBS Letts. **400**, 183-187
10. Schlief, T., *et al* (1996) Eur. Biophys. J. **25**, 75-91

11. Dib-Hajj, S.D, *et al* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 8963-8968
12. Black, J.A., *et al* (1994) Mol. Brain Res. **23**, 235-245
13. Dib-Hajj, S.D., *et al* (1996) FEBS Letts. **384**, 78-82
14. Fjell, J., *et al* (1999) Mol. Brain Res. **67**, 267-282
15. Black, J.A., *et al* (1996) Molec. Brain Res. **43**, 117-131
16. Sangameswaren, L., *et al* (1997) J. Biol. Chem. **272**, 14805-14809
17. Dib-Hajj, S., *et al* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14950-14954
18. Dib-Hajj, S.D., *et al* (1998) J. Neurophysiology **79**, 2668-2676
19. Sarao, R., *et al* (1991) Nucleic Acids Res. **19**, 5673-5679
20. Gustafson, T. A., *et al* (1993) J. Biol. Chem. **268**, 18648-18653
21. Belcher, S.M *et al* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 11034-11038
22. Plummer, N.W., *et al* (1998) Genomics **54**, 287-296
23. George, A.L., *et al* (1993) Genomics **15**, 598-606
24. Wang, D.W., *et al* (1996) Biophys. J. **70**, 238-245
25. Souslova, V.A., *et al* (1997) Genomics **41**, 201-209
26. Dib-Hajj, S.D., *et al* (1999) Genomics **59**, 309-318
27. Kallen, R.G., *et al* (1990) Neuron **4**, 233-242
28. Catalano, S.M. and Shatz, C.J. (1998) Science **281**, 559-562
29. Penn, A.A., *et al* (1998) Science **279**, 2108-2112
30. Shatz, C.J. (1990) Neuron **5**, 745-756
31. Zhou, J. and Hoffman, E.P. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 18563-18571.
32. Tanaka, M., *et al* (1998) NeuroReport **9**, 967-972
33. Bartolomei, F., *et al* (1997) J.Neurocytol. **26**, 667-678
34. Skaper, S.D., *et al* (1998) FASEB J. **12**, 725-731

35. Kanazirska, M., *et al* (1997) Biochem. Biophys. Res. Commu. **232**, 84-87
36. Grimes, J.A., *et al* (1995) FEBS Letts. **369**, 290-294
37. Laniado, M., *et al* (1997) Am. J. Pathol. **150**, 1213-1221
38. Smith, P., *et al* (1998) FEBS Letts **423**, 19-24
39. Grimes, J.A. and Djamgoz, M.B.A. (1998) J. Cell. Physiol. **175**, 50-58
40. Diss, J.K.J., *et al* (1998) FEBS Letts **427**, 5-10
41. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Ann. Biochem. **162**, 156-159
42. Dawes, H., *et al* (1995) Vis. Neurosci. **12**, 1001-1005
43. Okamura, Y., *et al* (1994) Neuron **13**, 937-948
44. Plummer, N.W., *et al* (1997) J. Biol. Chem. **272**, 24008-24015
45. Kohler, T. (1995).*Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction*, pp 3-14, eds. Kohler, T., Lassner, D., Rost, A.-K., Thamm, B., Pustowoit, B. and Remke, H. (Springer, Heidelberg).
46. Fitzsimmons, S.A., *et al* (1996) J. Natl. Cancer Inst. **88**, 259-269
47. Marin, A., *et al* (1997) Br. J. Cancer **76**, 923-929
48. Oh, Y. and Waxman, S.G. (1998) NeuroReport **9**,1267-1272
49. Toledo-Aral, J.J., *et al* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 1527-1532
50. Watsky, M.A., *et al* (1991) Pflugers Arch. **419**, 454-459
51. Cooper, K., *et al* (1990) J. Memb. Biol. **117**, 285-298
52. Sontheimer, H., *et al* (1994) J. Neurosci. **14**, 2464-2475
53. Tu, L.W., *et al* (1995) Biophys. J. **68**, 147-156
54. Klugbauer, N., *et al* (1995) EMBO J. **14**, 1084-1090
55. Sangameswaren, L., *et al* (1996) J. Biol. Chem. **272**, 14805-14809
56. Safo, P., *et al* (1998) Soc. Neurosci. Abstr. **24**, 1324
57. Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 2424-2428

58. Fraser, S.P., *et al* (1999) Cell Tissue Res. **295**, 505- 512

59. Mandelson, M.T., *et al* (1995) Ann. Rev. Public Health **16**, 283-306

60. Chan, E.C. and Sulmasy, D.P. (1998) Am. J. Med. **105**, 266-274

5

Table 1. PCR primers used in degenerate VGSCa primer screening of rat and human prostate cancer cell lines.

Primer annealing temperatures and primer annealing positions on published sequences are indicated in brackets. Sequence accession numbers are: hNe-Na (X82835), H82 (M90955), H83 (AF035685), R81 (X03638), R82 (X08639), SCL-11 (Y09164), PN1 (U79568), rSkM1 (Y17153), NaN (AF059030).

Degenerate VGSCa Primers			
Yd1	- 5' GCGAAAGCTT(C/T)TGG(C/T)TIATITT(C/T)(A/G/T)AT(A/T/C)ATGGG 3'	YJ2C	- 5' ATAGGATCCACICCIA/C/G/T)II(A/G)AAIGC)A/C/G/T)AC(C/T)TG 3'
YJ1/YJ2C Specific Primers			
MPH1	- 5' ACGTTAGTGGAAATGTGCCA 3' (Tm = 58 °C)	MRB1	- 5' ATTTCTTTCTATTAGTTTTA 3' (Tm = 46 °C)
M8CL1	- 5' ATTTAATGAATCAATGCCAT 3' (Tm = 50 °C)	NA29	- 5' TGTATACAGGCCAGGTCCGC 3' (Tm = 64 °C)
MhNa	- 5' ATGTTAGTCAAAATGTGCGA 3' (Tm = 54 °C)	MH56	- 5' AACAATACAGAGATCAGATG 3' (Tm = 54 °C)
MH82	- 5' ATTGCTCTCAATGAGAGCTT 3' (Tm = 56 °C)		
Specific Primer PCR Tests			
HNE1	- 5' TATGAGCATGAATAACCGC 3' (474-493)	SPH1	- 5' TTCATGACCTTGAGCAACCC 3' (424-443)
HNE3	- 5' TCAGGTTTCCCATGAACAGC 3' (843-862)	SPH4	- 5' GAGTCCCATGATCCTGCTCC 3' (1355-1374)
2HB1	- 5' TGTGCAGGATTCTTACCAAC 3' (512-531)	NAH1	- 5' GTATCTCTGTCCATTCAGTC 3' (423-442)
2HB3	- 5' AAGTATGTACCATTCCCATCC 3' (1005-1024)	NAN2	- 5' GAACAGCTGCTGACCGAGCA 3' (849-868)
1RB	- 5' ATGACAATGAGTAACCCTCC 3' (684-703)	H3A	- 5' TTGAGCAACCCTCCTGACTG 3' (493-512)
3RB	- 5' TGTGCCGTTGTAATCCGTAG 3' (1141-1160)	H3C	- 5' GGGCCACTGCAAACATTTAT 3' (878-897)
SC1	- 5' ATTAGTGTTCTCACCCACAG 3' (398-405)	H8A	- 5' TT(T/C)GA(A/G)GA(T/C)ATI(A/T/C)TA(C/T)AT(A/T/C)GA 3'
SC3	- 5' AGAATATGGTACTGGCTTCC 3' (890-879)	H6B	- 5' CATCTGATCTCTGTATTGTT 3'
R2A	- 5' CCAACTGTGTGTTTATGAGC 3' (632-651)	H6C	- 5' TGTCAAAGTTGATCTTCACG 3'
R2C	- 5' AGGCGAGTACCATTCCAATCC 3' (1110-1129)	NA7	- 5' CTGAGGACCTTCCGTGTTGCT 3' (632-651)
		NA18	- 5' TGCACACTTGTACCACCACG 3' (1598-1618)

Example 2: Design of antisense oligonucleotides for suppressing VGSC expression in human prostate cancer

1. Alignment of all currently known VGSC types to identify potential sites for VGSC subtype-specific antisense oligonucleotide design.

Cons	agtgagtgtgaaagtcttatggagagcaacaaaactg---tccgatggaaa
hNav2.1	agtcggtgtgaaagtcttctgt---ttaacgaatcca---tgctttgggaa
hNe-Na	tccgaatgtttgcccttatgaATGTTAGTCAAAATG---TGCGAtggaaa
Human brain 1	actgattgcctaaaactaatagaaagaaatgagactg---ctcgatggaaa
Human brain 2	agtgagtgcaAAGCTCTCATTGAGAGCAATcaaactg---ccaggtggaaa
Human brain 3	agtgactgtc~aggctcttggcaagcaa-------g---ctcggtggaaa
Na6 (human)	actgaatgtgaaaagcttatggaggggAACAATACAGAGATCAGATGgaag
hSkM1	aacaagtctgagtgcgagagCCTCATGCACACAGGCCAGGtccgctggctc
Human heart 1	aacaagagccagtgtgagtcctgaacttgaccggagaattgtactggacc
PN3/SNS (rat)	aacaagtccgagtgtcacaatcaaaacagcaccggccactttctgggtc

In the above alignment the human VGSC equivalent has been used where possible. The alignment has been optimised by the introduction of sequence gaps indicated by a dash although gaps are not actually present in the real sequence or any oligonucleotide design. The most commonly occurring nucleotides are indicated in the consensus line (Cons). Potential sites for the design of 20mer antisense oligonucleotides are in bold case and underlined in the four human VGSC types that have been found in both the degenerate screens and specific PCR tests on the PC-3 and LNCaP cell lines. The most unconserved region of the fragment produced by the degenerate screen has been used to produce this line-up.

It would also be possible to design 20mer antisense oligos in the 3/4 cytoplasmic linker (where VGSC sequence is highly conserved across all types) that are individually capable of 'silencing' simultaneously a number

of VGSC types. For example, below the same 20 nucleotide sections of the 3/4 linker from three VGSC types are shown aligned. In this section, the hNe-Na and the human brain 2 sequences are identical and the hSkM1 sequence differs at only two nucleotide positions. Therefore, in this region it is possible to design two antisense oligonucleotides that will knock-out at least three of the channels (possibly four when the Na6 (human) sequence has been confirmed for this region).

hNe-Naq	TTATGACAGAAGAACAGAAG
Human brain 2	TTATGACAGAAGAACAGAAG
hSkM1	TTATGACgGAgGAACAGAAG

Table 2. VGSCα degenerate primer screen results for (a) the rat-derived MAT-LyLu and AT-2, and (b) the human-derived PC-3 and LNCaP cell lines, expressed as percentage of clines tested.

(a)

VGSCα Gene	Gene Product	MLL (1) n=50	MLL (2) n=50	MLL (3) n=50	AT-2 (1) n=50	AT-2 (3) n=50	AT-2 (4) n=50
SCN1A	RB 1	6	6	4	12	58	32
SCN2A	RB 2	0	0	0	2	2	0
SCN4A	rSkM 1	0	0	0	58	22	22
SCN7A	SCL-11	70	48	48	2	4	26
SCN9A	PN 1	20	44	48	0	0	0
SCN11A	NaN	0	0	0	12	6	6
Non VGSCα	Identified	4	2	0	4	2	12
Non VGSCα	Unknown	0	0	0	10	6	2

(b)

VGSCα Gene	Gene Product	PC-3 (1) n=50	PC-3 (2) n=50	LNCaP (1) n=50	LNCaP (2) n=50
SCN2A	HB 2	6	6	4	18
SCN3A	HB 3	0	2	0	2
SCN8A	hNa6	46	50	62	32
SCN9A	hNe-Na	48	30	0	0
Non VGSCα	Identified	0	12	22	40
Non CGSCα	Unknown	0	0	12	8

Table 3. VGSCα splice variants found in the highly and lowly metastatic prostate cancer cell lines to date. Where adult and neonatal forms of the VGSCα type have been described, the form found in the prostate cancer cells is specified. Δ denotes splice variants with missing exons coding for the S4 segment of D1 or D3 (see section 4.3).

VGSCα Type	Highly metastatic cells	Lowly metastatic cells
PN1	Full-length	To be determined
SCL-11	Full-length	To be determined
RB1	Adult	Adult
RB2	To be determined	To be determined
rSkM1	Full-length	Full-length
NaN	To be determined	To be determined
hNe-Na	Full-length ΔhNe-Na Neonatal	Full-length
hNa6	ΔnHa6 Full-length	ΔnHa6 Full-length
HB2	ΔHB2	ΔHB2
HB3	Neonatal	Adult

Example 3: Voltage-gated Na+ channel expression correlates with pathological progression in human prostate cancer

Previous electrophysiological studies have shown that functional voltage gated Na^+ channels (VGSCs) are expressed selectively by highly metastatic cell lines of rat (MAT-LyLu) and human (PC-3) prostate

cancer. Furthermore, blockage of these channels with tetrodotoxin significantly reduced the cells' invasion *in vitro* (Grimes *et al.* (1995) *FEBS Letts.* **369,** 290-294; Laniado *et al* (1997) *Am. J. Pathol.* **150** 1213-1221. Direct, positive correlation between invasiveness and Na^+ channel protein expression by several different rat and human prostate cancer cell lines was subsequently demonstrated by Smith *et al.* (1998) *FEBS Lens.* 423,19-24. However, it is not known whether VGSC expression occurs in human prostate cancer *in vivo,* and if so, whether the levels of expression relate to the metastatic profile of the constituent malignant epithelial cells.

Immunohistochemical localization of VGSC protein in tissue-sections of human prostate containing epithelial ducts of varying metastatic character, including *in situ* and invasive cancer cells, is illustrated in Fig. 6. A strong incremental increase in the intensity of staining was observed as the pathological character of the epithelial cells progressed from normal towards invasive neoplasia (Fig. 6A to E). In benign prostatic hyperplasia (BPH), the level of VGSC expression by constituent epithelial cells was very low and predominantly restricted to basal cells (Fig. 6A). In low-grade prostate intraepithelial neoplasia (low-grade PIN), the overall level of expression was increased with immunohistochemical staining of basal cells appearing slightly more intense (Fig. 6B). For both BPH and low-grade PIN taken together, the apical:basal optical density ratio was 0.74 ± 0.05 ($n = 450$ ducts; 30 sections; 10 patients). A marked, step-wise increase in VGSC expression was associated with appearance of high-grade PIN recognised by the characteristic architecture and cytological features of multilayering, severe dyskaryosis and nucleolar enlargement (Fig. 6C). This trend was maintained both in ducts and acini containing *in situ* malignancy (InsM) where basal cells were absent (Fig.

6D), as well as in invasive cancer (InvC) cells (Fig. 6E). VGSC expression was prominent along the apical plasma membranes of luminal epithelial cells at the InsM stage (Fig. 6D). In InvC, staining was also intense along the plasma membranes of the cells (Fig. 6E). For high-grade PIN and InsM epithelial cells taken together, the apical:basal optical density ratio of VGSC staining was 1.57 ± 0.19 (n = 750 ducts; 30 sections; 10 patients). This ratio was significantly higher when compared to that for low-grade PIN ducts ($P < 0.01$).

In conclusion, the enhanced level of VGSC expression we have previously identified as being associated with the metastatic phenotype of prostate cancer cells *in vitro* now has been confirmed to occur *in vivo*. Thus, it would appear that upregulation of functional VGSC expression occurs as an integral component of increased metastatic potential. VGSC activity could contribute to metastasis by enhancing cellular process extension (Fraser *et al* (1999) *Cell Tissue Res.* **295.** 505-512), motility (Fraser *et al* (1998) *J. Physiol.* **513.P,** 131P), invasiveness (Grimes *et al*, 1995; Laniado *et al*, 1997; Smith *et al*, 1998) or intracellular homeostasis (Foster *et al* (1999) *Br. J. Urol.* **83,** 171-194). The cytological polarity of VGSC upregulation (apical *vs.* basal) could, in turn, enable directional invasion of adjacent tissues. The present observations translate fundamental information obtained previously in model systems of clonally-derived cell lines *in vitro* to unselected and non-clonal primary human tissues. These results suggest that VGSC expression might be a phenotypic requirement of metastatic prostate cancer cells and hence represent a valuable novel marker to identify potentially metastatic disease at the time of primary tissue diagnosis.

Example 4: Regulation of VGSC function in prostate cancer cell lines

VGSC functional expression in rodent MAT-LyLu cells was investigated. Epidermal growth factor (EGF) upregulates VGSC functional expression. As shown in Figure 9, exogenous EGF potentiates the functional VGSC expression. This effect is blocked by co-application of EGF receptor kinase inhibitor (AG1478; Calbiochem, San Diego, CA, USA). Application of EGF receptor antibody (Oncogene, Cambridge, MA, USA) also reduces the basal VGSC current implying that the phenomenon occurs endogenously.

Other growth factors (for example nerve growth factor) and hormones (including androgens) may have similar effects.

CLAIMS

1. A method of determining the susceptibility of a human patient to cancer comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer.

2. A method of diagnosing cancer in a human patient comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer.

3. A method of predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer in a human patient comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer.

4. A method according to any one of Claims 1 to 3 wherein the cancer is prostate cancer.

5. A method according to any one of the preceding claims wherein the cancer is metastatic.

6. A method according to any of the preceding claims wherein the sample contains nucleic acid and the level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid is measured by contacting the said nucleic acid with a

nucleic acid which hybridises selectively to hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid.

7. A method according to Claim 6 wherein the sample contains mRNA and the nucleic acid as said selectively hybridises to hNe-Na voltage-gated Na^+ channel mRNA.

8. A method according to Claim 6 or 7 wherein the nucleic acid which hybridises as said is detectably labelled.

9. A method according to any one of Claims 6 to 8 wherein the nucleic acid which selectively hybridises as said is single stranded.

10. A method according to any one of Claims 6 to 9 wherein the nucleic acid which selectively hybridises as said is suitable for use in a nucleic acid amplification reaction.

11. A method according to any one of Claims 1 to 5 wherein the sample contains protein and the level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel protein is measured.

12. A method according to Claim 11 wherein the level of said protein is measured by contacting the protein with a molecule which selectively binds to hNe-Na voltage-gated Na^+ channel protein.

13. A method according to Claim 11 wherein the selective binding molecule is an antibody or fragment or derivative thereof or an antibody-like molecule.

14. A method according to Claim 12 or 13 wherein the selective binding molecule comprises a detectable label.

15. A method according to any one of the preceding claims wherein the sample is a sample of the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found, or contains cells from said tissue.

16. A method according to Claim 15 wherein the tissue is prostate and the cancer is prostate cancer.

17. A method according to Claim 15 wherein the sample is any one of urine, semen, blood or lymphatic circulation and the cancer is prostate cancer.

18. Use of an agent which is capable of use in determining the level of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel protein or nucleic acid in a sample in the manufacture of a reagent for diagnosing cancer.

19. Use according to Claim 18 wherein the agent is a nucleic acid which selectively hybridises to hNe-Na voltage-gated Na^+ channel nucleic acid.

20. Use according to Claim 18 wherein the agent is a molecule which selectively binds to hNe-Na voltage-gated Na^+ channel protein.

21. Use of an agent as defined in any one of Claim 18 to 20 in a method of diagnosing cancer.

22. Use of an agent as defined in any one of Claim 18 to 20 for diagnosing cancer.

23. A kit of parts useful for diagnosing cancer comprising an agent which is capable of use in determining the level of hNe-Na VGSC protein or nucleic acid in a sample.

24. A kit of parts according to Claim 23 further comprising a negative control and/or a positive control.

25. A kit of parts according to any one of Claims 23 or 24 further comprising means for separating prostatic epithelial cells from a sample.

26. A method of treating cancer comprising the step of administering to the patient an agent which selectively prevents the function of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel.

27. A method according to Claim 26 wherein the agent prevents the expression of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel.

28. A method according to Claim 26 wherein the agent inhibits the activity of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel.

29. A method according to Claim 27 wherein the agent is an antisense molecule.

30. A method according to Claim 27 wherein the agent is a ribozyme.

31. Use of an agent which selectively prevents the function of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel in the manufacture of a medicament for treating cancer.

32. A genetic construct comprising a nucleic acid encoding a molecule capable of preventing the function of hNe-Na voltage-gated Na^+ channel expressed in a cell.

33. A genetic construct according to Claim 32 adapted for delivery to a human cell.

34. A genetic construct according to Claim 33 wherein the adaptation allows delivery to a cancer cell.

35. A genetic construct according to Claim 33 or 34 comprising means to selectively deliver the nucleic acid to a cancer cell.

36. A genetic construct according to any one of Claims 32 to 35 comprising means to selectively express the nucleic acid encoding a molecule as said in a cancer cell.

37. A genetic construct according to any one of Claims 32 to 36 for use in medicine.

38. A pharmaceutical composition comprising a genetic construct according to any one of Claims 32 to 36 and a pharmaceutically acceptable carrier.

39. A method of identifying a compound which selectively inhibits a hNe-Na voltage-gated Na^+ channel, the method comprising (a) contacting a test compound with any one of the said voltage-gated Na^+ channels and determining whether said compound is inhibitory; (b) contacting the test compound with other voltage-gated Na^+ channels and determining whether said compound is inhibitory; and (c) selecting a compound which is substantially inhibitory in (a) but is not substantially inhibitory in (b).

40. A compound comprising a moiety which selectively binds hNe-Na voltage-gated Na^+channel protein and a further moiety.

41. A compound according to claim 40 wherein the further moiety is a directly or indirectly cytotoxic moiety.

42. A compound according to claim 40 wherein the further moiety is a readily detectable moiety.

43. A compound according to Claim 40 wherein the moiety which selectively binds hNe-Na voltage-gated Na^+channel protein and the further moiety are polypeptides which are fused.

44. A nucleic acid molecule encoding a compound according to Claim 43.

45. A host cell comprising a nucleic acid molecule according to Claim 44.

46. A compound according to any one of Claims 40 to 43 for use in medicine.

47. A pharmaceutical composition comprising a compound according to any one of Claims 40 to 43 and a pharmaceutically acceptable carrier.

48. Use of a compound according to any one of Claims 40 to 43 in the manufacture of a medicament for the treatment and/or diagnosis of a human patient with or at risk of cancer.

49. A method of treating cancer, the method comprising administering to the human patient an effective amount of a compound according to any one of Claims 40, 41 or 43 wherein the further moiety of the compound is one which either directly or indirectly is of therapeutic benefit to the patient.

50. A method of imaging cancer in a human patient, comprising administering to the patient an effective amount of a compound according to Claim 42.

51. A kit of parts comprising (1) a compound according to Claim 41 wherein the further moiety is a cytotoxic moiety which is able to convert a relatively non-toxic prodrug into a cytotoxic drug and (2) a relatively non-toxic prodrug.

52. A kit of parts comprising (1) a compound according to Claim 40 wherein the further moiety is able to bind selectively to a directly or indirectly cytotoxic moiety or to a readily detectable moiety and (2) any one of a directly or indirectly cytotoxic moiety or a readily detectable moiety to which the further moiety of the compound is able to bind.

53. Any novel method of treating or diagnosing cancer as herein disclosed.

54. Any novel compound or composition for use in treating or diagnosing cancer as herein disclosed.

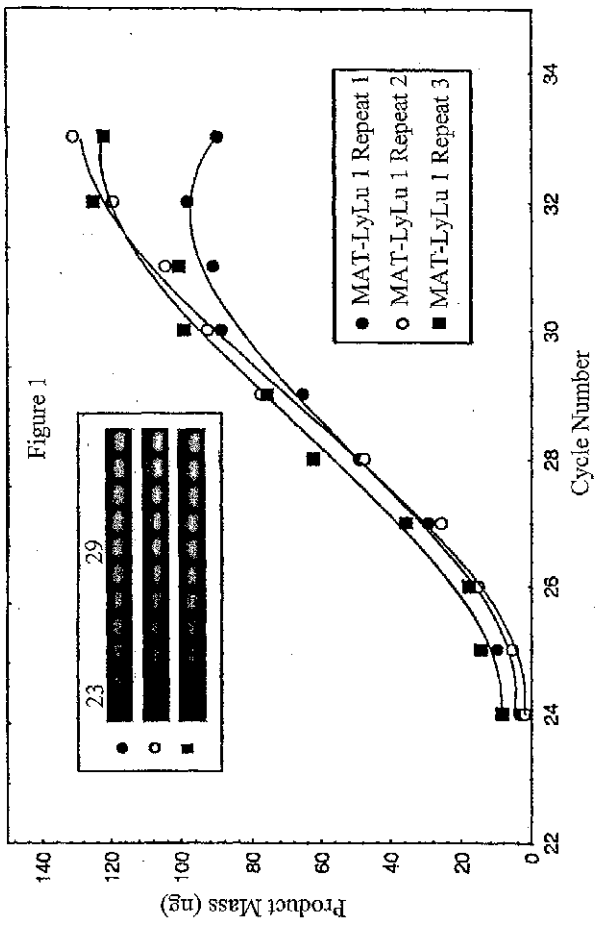

MAT-LyLu 1 Repeat 1
MAT-LyLu 1 Repeat 2
MAT-LyLu 1 Repeat 3
Product Mass (ng)
Cycle Number
0
20
40
60
80
100
120
140
22
24
26
28
30
32
34
23
29

Figure 1

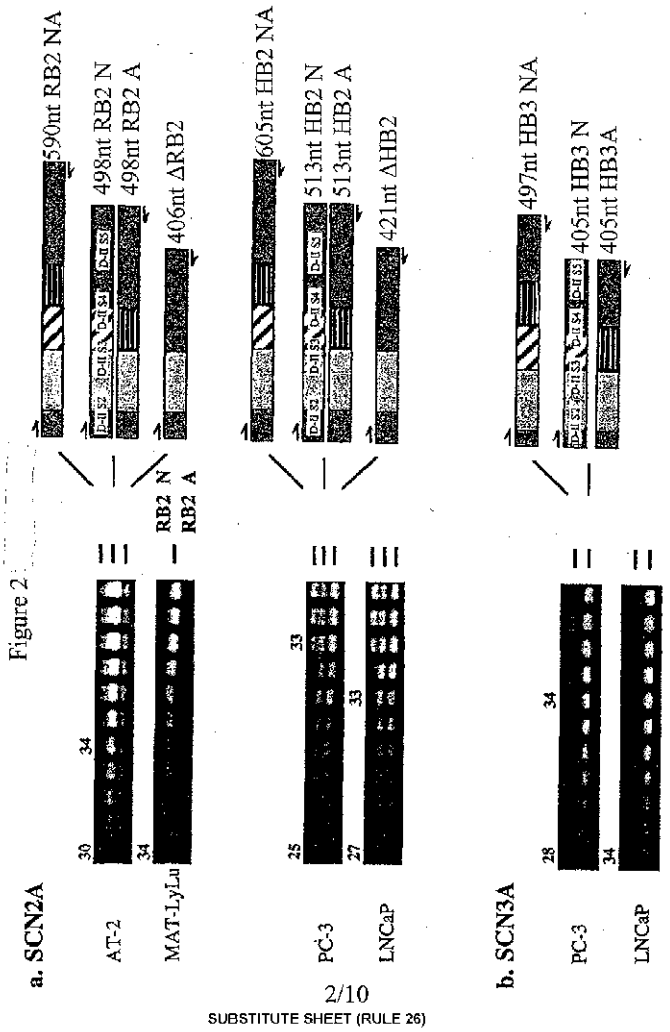

590nt RB2 NA
498nt RB2 N
498nt RB2 A
406nt ΔRB2
605nt HB2 NA
513nt HB2 N
513nt HB2 A
421nt ΔHB2
497nt HB3 NA
405nt HB3 N
405nt HB3A
RB2 N
RB2 A
a. SCN2A
AT-2
MAT-LyLu
PC-3
LNCaP
b. SCN3A
PC-3
LNCaP

Figure 2

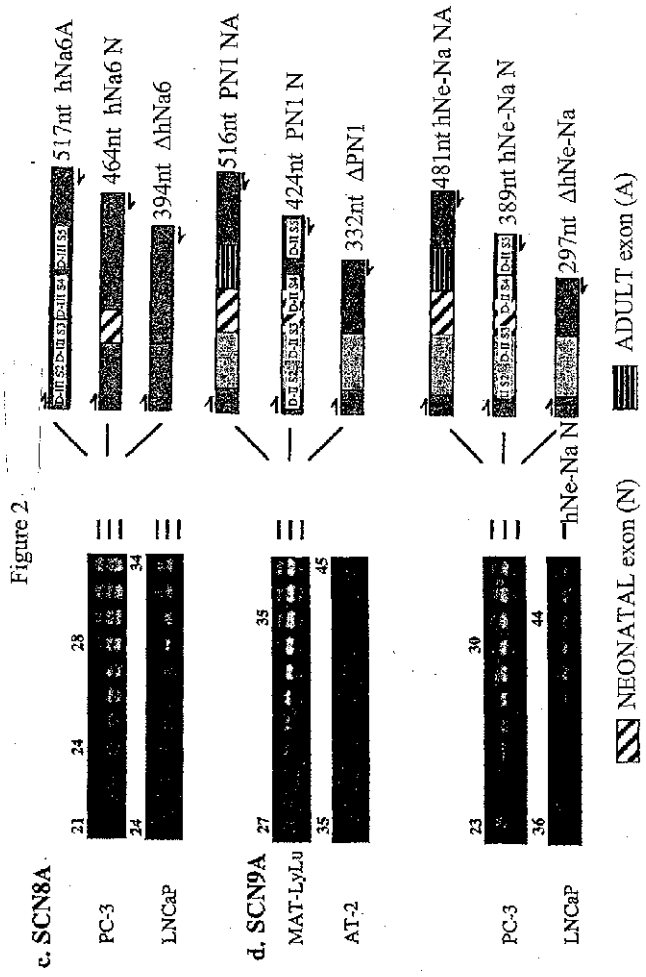

517nt hNa6A
464nt hNa6 N
394nt ΔhNa6
516nt PN1 NA
424nt PN1 N
332nt ΔPN1
481nt hNe-Na NA
389nt hNe-Na N
297nt ΔhNe-Na
hNe-Na N
NEONATAL exon (N)
ADULT exon (A)
c. SCN8A
PC-3
LNCaP
d. SCN9A
MAT-LyLu
AT-2
PC-3
LNCaP

Figure 2

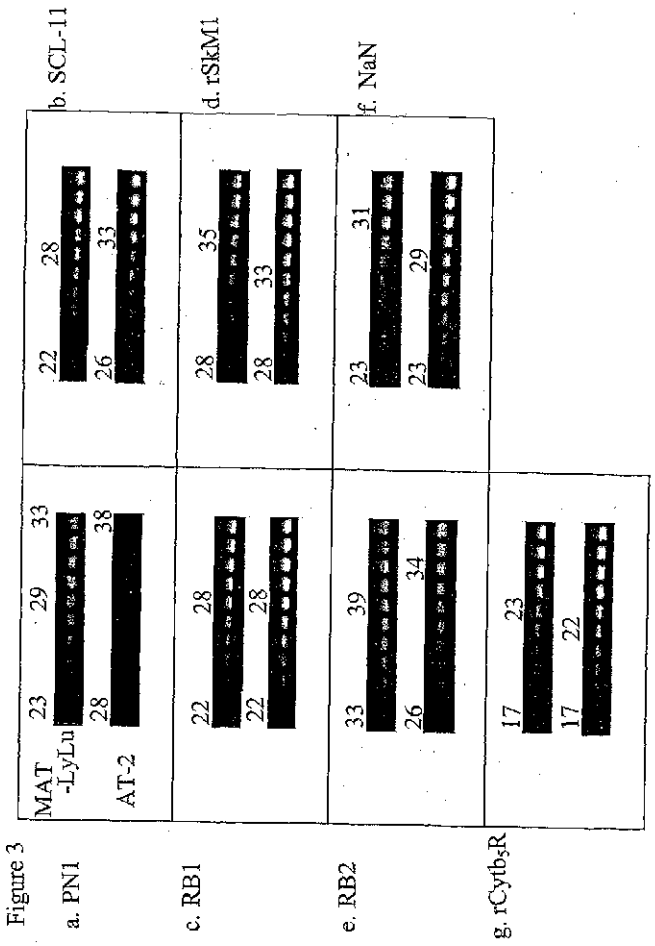


Figure 3

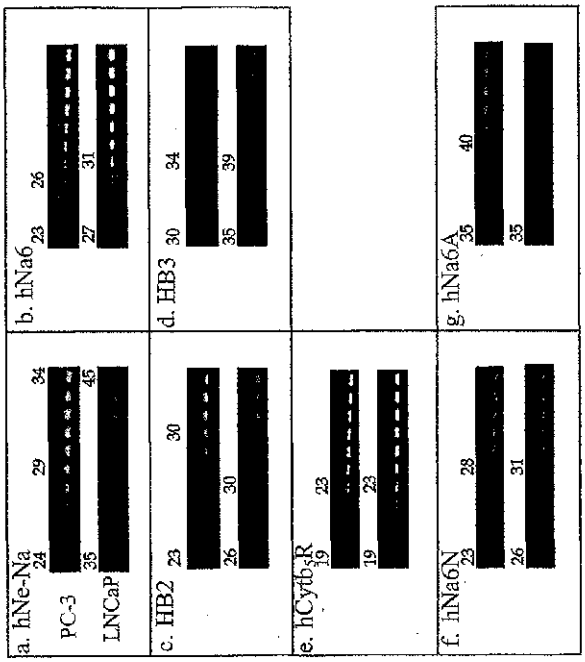

a. hNe-Na
PC-3
LNCaP
24
29
34
35
45
b. hNa6
23
26
27
31
c. HB2
23
30
26
30
d. HB3
30
34
35
39
e. hCytb5R
19
23
19
23
f. hNa6N
23
28
26
31
g. hNa6A
35
40
35
35

Figure 4

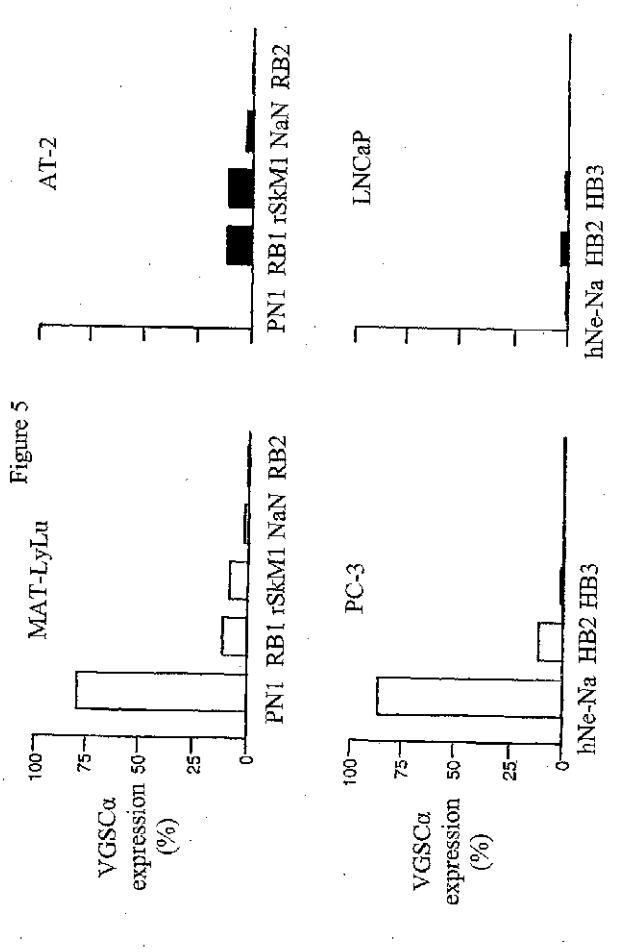
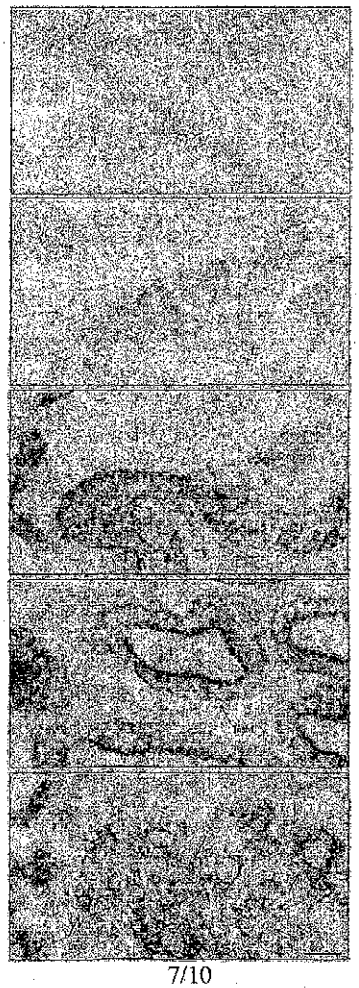

AT-2
PN1 RB1 rSkM1 NaN RB2
LNCaP
hNe-Na HB2 HB3
MAT-LyLu
PN1 RB1 rSkM1 NaN RB2
PC-3
hNe-Na HB2 HB3
VGSCα expression (%)
100
75
50
25
0

Figure 5

Figure 6



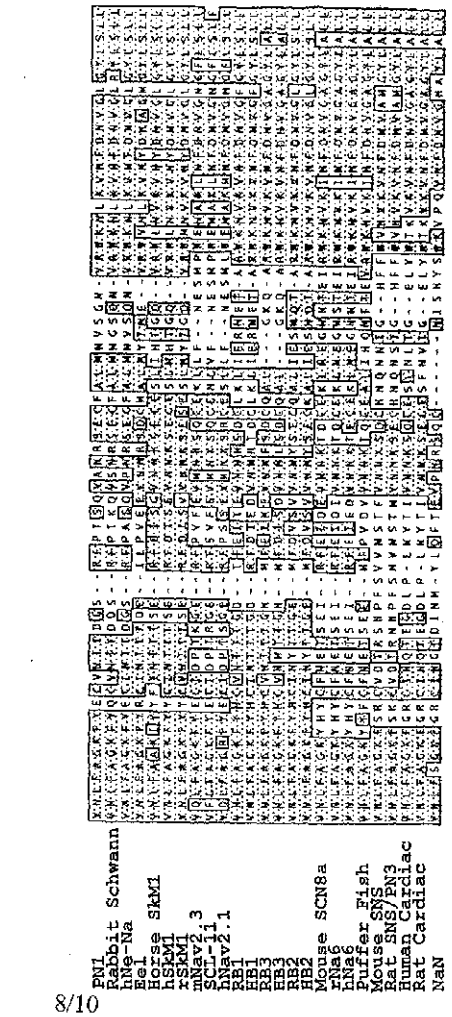

PN1
Rabbit Schwann
hNe-Na
Eel
Horse SkM1
hSkM1
rSkM1
mNav2.3
SCL-11
hNav2.1
RB1
HB1
RB3
HB3
RB2
HB2
Mouse SCN8a
rNa6
hNa6
Puffer Fish
Mouse SNS
Rat SNS/PN3
Human Cardiac
Rat Cardiac
NaN

Figure 7

Figure 8

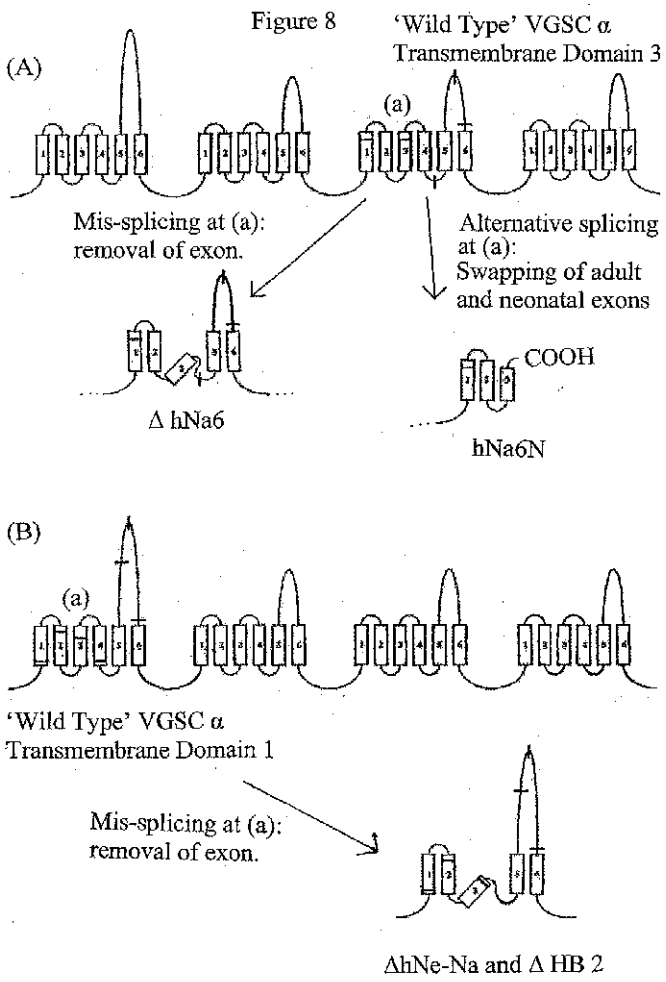
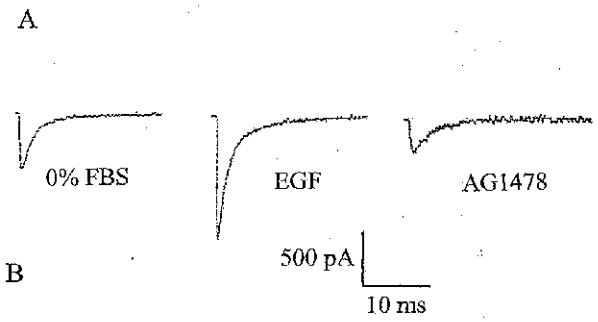
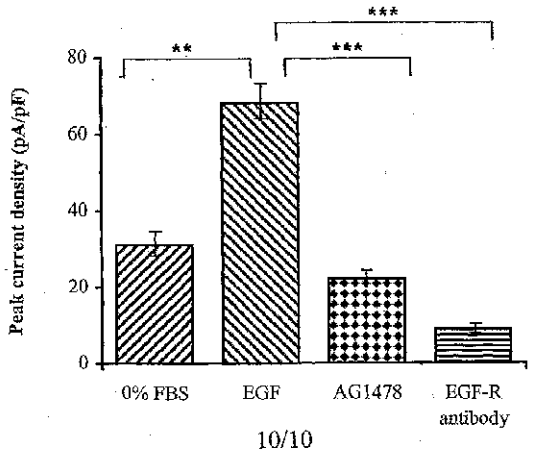

(A)
'Wild Type' VGSC α
Transmembrane Domain 3
(a)
Mis-splicing at (a):
removal of exon.
Alternative splicing
at (a):
Swapping of adult
and neonatal exons
COOH
Δ hNa6
hNa6N
(B)
(a)
'Wild Type' VGSC α
Transmembrane Domain 1
Mis-splicing at (a):
removal of exon.
ΔhNe-Na and Δ HB 2

Figure 9





SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SEQUENCE LISTING

<110> Imperial College Innovations Limited

<120> Diagnosis and treatment of cancer

<130> ICOY/P25041PC

<140>
<141>

<160> 71

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Peptide

<400> 1
Glu Tyr Thr Ser Ile Arg Arg Ser Arg Ile Met Gly Leu Ser Glu
1 5 10 15

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Peptide

<400> 2
Phe Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Peptide

<400> 3
Gln Val Ala Thr Phe Lys Gly Trp
1 5

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 4
gcgaagctty tggytnatnt tynnnathat ggg 33

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 5
ataggatcca ncnnnnraan gcnacytg 28

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 6
acgttagtgg aaatgtgcga 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 7

atttaatgaa tcaatgccat 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8
atgttagtca aaatgtgcga 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9
attgctctca atgagagctt 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10
atttctttct attagtttta 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11
tgtatacagg ccaggtccgc 20

<210> 12
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12
aacaatacag agatcagatg 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13
tatgaccatg aataaccgc 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 14
tcaggtttcc catgaacagc 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15
tgtgcacgat tcttaccaac 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16
aagtagtacc attcccatcc 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17
atgacaatga gtaacccacc 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18
tgtgccgttg taatccgtag 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19
attagtgttc tcaccgacag 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 20
ttcatgacct tgagcaaccc 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 21
gagtcccatg atcctgctcc 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 22
gtatctctgt ccattcagtc 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 23
gaacagctgc tgaccgacca 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 24
ttgagcaacc ctcctgactg 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 25
gggccactgc aaacatttat 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 26
ttygargaya thtayathga 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 27
agaatatggt actggcttcc 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 28
ccaactgtgt gtttatgacc 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 29
aggcagtacc attccaatcc 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 30
catctgatct ctgtattgtt 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 31
tgtcaaagtt gatcttcacg 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 32
ctgaggacct tccgtgtgct 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 33
tgcacacttg taccacacag 20

<210> 34
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 34
agtgagtgtg aaagtcttat ggagagcaac aaaactgtcc gatggaaa 48

<210> 35
<211> 45
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
agtcggtgtg aaagccttat gtttaacgaa tccatgctat gggaa 45

<210> 36
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 36
tccgaatgtt ttgcccttat gaatgttagt caaaatgtgc gatggaaa 48

<210> 37
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
actgattgcc taaaactaat agaaagaaat gagactgctc gatggaaa 48

<210> 38
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 38
agtgagtgca aagctctcat tgagagcaat caaactgcca ggtggaaa 48

<210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
agtgactgtc aggctcttgg caagcaagct cggtggaaa 39

<210> 40
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 40
actgaatgtg aaaagcttat ggaggggaac aatacagaga tcagatggaa g 51

<210> 41
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
aacaagtctg agtgcgagag cctcatgcac acaggccagg tccgctggct c 51

<210> 42
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
aacaagagcc agtgtgagtc cttgaacttg accggagaat tgtactggac c 51

<210> 43
<211> 51
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 43
aacaagtccg agtgtcacaa tcaaaacagc accggccact tcttctgggt c 51

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 44
ttatgacaga agaacagaag 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
ttatgacaga agaacagaag 20

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
ttatgacgga ggaacagaag 20

<210> 47
<211> 61
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 47
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Val Asn Thr Thr Asp
1 5 10 15

Gly Ser Arg Phe Pro Thr Ser Gln Val Ala Asn Arg Ser Glu Cys Phe
20 25 30

Ala Leu Met Asn Val Ser Gly Asn Val Arg Trp Lys Asn Leu Lys Val
35 40 45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 48
<211> 61
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 48
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Gln Cys Val Asn Thr Thr Asp
1 5 10 15

Asp Ser Arg Phe Pro Thr Lys Gln Val Ser Asn Arg Ser Glu Cys Phe
20 25 30

Ala Leu Met Asn Gly Ser Gln Asn Val Arg Trp Lys Asn Leu Lys Val
35 40 45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Leu Arg Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 49
<211> 81

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Ile Asn Thr Thr Asp
1 5 10 15

Gly Ser Arg Phe Pro Ala Ser Gln Val Pro Asn Arg Ser Glu Cys Phe
20 25 30

Ala Leu Met Asn Val Ser Gln Asn Val Arg Trp Lys Asn Leu Lys Val
35 40 45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 50
<211> 60
<212> PRT
<213> Electrophorus electricus

<400> 50
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Arg Cys Ile Asn Thr Thr Thr
1 5 10 15

Asp Glu Ile Leu Pro Val Glu Glu Val Asn Asn Arg Ser Asp Cys Met
20 25 30

Ala Leu Met Tyr Thr Asn Glu Val Arg Trp Val Asn Leu Lys Val Asn
35 40 45

Tyr Asp Asn Ala Gly Met Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 51
<211> 60
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 51
Val Asn Leu Phe Ala Ala Lys Ile Tyr Tyr Phe Ile Asn Thr Thr Thr
1 5 10 15

Ser Glu Arg Phe Asp Ile Ser Gly Val Asn Asn Lys Ser Glu Cys Glu
20 25 30

Ser Leu Ile His Thr Gly Gln Val Arg Trp Leu Asn Val Lys Val Asn
35 40 45

Tyr Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 52
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Tyr Cys Ile Asn Thr Thr Thr
1 5 10 15

Ser Glu Arg Phe Asp Ile Ser Glu Val Asn Asn Lys Ser Glu Cys Glu
20 25 30

Ser Leu Asn His Thr Gly Gln Val Arg Trp Leu Asn Val Lys Val Asn
35 40 45

Tyr Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 53
<211> 60
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 53
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Tyr Cys Val Asn Thr Thr Thr
1 5 10 15

Ser Glu Arg Phe Asp Ile Ser Val Val Asn Asn Lys Ser Glu Ser Glu
20 25 30

Ser Leu Met Tyr Thr Gly Gln Val Arg Trp Met Asn Val Lys Val Asn
35 40 45

Tyr Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 54
<211> 60
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54
Val Gln Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Ile Asp Pro Thr Lys
1 5 10 15

Gly Glu Arg Phe Pro Val Phe Glu Val Met Asn Lys Ser Gln Cys Glu
20 25 30

Lys Leu Leu Phe Asn Glu Ser Met Pro Trp Glu Asn Ala Lys Leu Asn
35 40 45

Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 55
<211> 60
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 55
Val Phe Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Thr Asp Pro Thr Arg
1 5 10 15

Gly Glu Arg Phe Ser Val Phe Glu Val Met Asn Lys Ser Gln Cys Glu
20 25 30

Asn Leu Val Phe Asn Glu Ser Met Pro Trp Glu Asn Ala Lys Leu Asn
35 40 45

Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu Ser Leu Phe
50 55 60

<210> 56
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Val Asp Leu Phe Ala Gly Arg Phe Tyr Glu Cys Ile Asp Pro Thr Ser
1 5 10 15

Gly Glu Arg Phe Pro Ser Ser Glu Val Met Asn Lys Ser Arg Cys Glu
20 25 30

Ser Leu Leu Phe Asn Glu Ser Met Leu Trp Glu Asn Ala Lys Met Asn

35 40 45

Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 57
<211> 61
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 57
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr His Cys Val Asn Thr Thr Thr
1 5 10 15

Gly Asp Thr Phe Glu Ile Thr Glu Val Asn Asn His Ser Asp Cys Leu
20 25 30

Lys Leu Ile Glu Arg Asn Glu Thr Ala Arg Trp Lys Asn Val Lys Val
35 40 45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Phe Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 58
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr His Cys Ile Asn Thr Thr Thr
1 5 10 15

Gly Asp Arg Phe Asp Ile Glu Asp Val Asn Asn His Thr Asp Cys Leu
20 25 30

Lys Leu Ile Glu Arg Asn Glu Thr Ala Arg Trp Lys Asn Val Lys Val
35 40 45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Phe Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 59
<211> 58
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

15

<400> 58
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr His Cys Val Asn Thr Thr Thr
1 5 10 15

Gly Asn Met Phe Glu Ile Lys Glu Val Asn Asn Phe Ser Asp Cys Gln
20 25 30

Ala Leu Gly Lys Gln Ala Arg Trp Lys Asn Val Lys Val Asn Phe Asp
35 40 45

Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55

<210> 60
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr His Cys Val Asn Met Thr Thr
1 5 10 15

Gly Asn Met Phe Asp Ile Ser Asp Val Asn Asn Leu Ser Asp Cys Gln
20 25 30

Ala Leu Gly Lys Gln Ala Arg Trp Lys Asn Val Lys Val Asn Phe Asp
35 40 45

Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55

<210> 61
<211> 61
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 61
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr His Cys Ile Asn Tyr Thr Thr
1 5 10 15

Gly Glu Met Phe Asp Val Ser Val Val Asn Asn Tyr Ser Glu Cys Gln
20 25 30

Ala Leu Ile Glu Ser Asn Gln Thr Ala Arg Trp Lys Asn Val Lys Val
35 40 45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 62
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr His Cys Ile Asn Tyr Thr Thr
1 5 10 15

Gly Glu Met Phe Asp Val Ser Val Val Asn Asn Tyr Ser Glu Cys Lys
20 25 30

Ala Leu Ile Glu Ser Asn Gln Thr Ala Arg Trp Lys Asn Val Lys Val
35 40 45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
50 55 60

<210> 63
<211> 62
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 63
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Tyr His Tyr Cys Phe Asn Glu Tyr Ser
1 5 10 15

Glu Ile Arg Phe Glu Ile Asp Glu Val Asn Asn Lys Thr Asp Cys Glu
20 25 30

Lys Leu Met Glu Gly Asn Asn Thr Glu Ile Arg Trp Lys Asn Val Lys
35 40 45

Ile Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55 60

<210> 64
<211> 62
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 64
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Tyr His Tyr Cys Phe Asn Glu Thr Ser
1 5 10 15

Glu Ile Arg Phe Glu Ile Asp Ile Val Asn Asn Lys Thr Asp Cys Glu
20 25 30

Lys Leu Met Glu Gly Asn Ser Thr Glu Ile Arg Trp Lys Asn Val Lys
35 40 45

Ile Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55 60

<210> 65
<211> 62
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Tyr His Tyr Cys Phe Asn Glu Thr Ser
1 5 10 15

Glu Ile Arg Phe Glu Ile Glu Asp Val Asn Asn Lys Thr Glu Cys Glu
20 25 30

Lys Leu Met Glu Gly Asn Asn Thr Glu Ile Arg Trp Lys Asn Val Lys
35 40 45

Ile Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55 60

<210> 66
<211> 62
<212> PRT
<213> Fugu rubripes

<400> 66
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Tyr Tyr Phe Cys Phe Asn Glu Thr Ser
1 5 10 15

Glu Glu Met Phe Pro Val Asp Val Val Asn Asn Lys Thr Gln Cys Glu
20 25 30

Ala Leu Ile His Gln Asn Phe Thr Glu Val Arg Trp Lys Asn Val Lys
35 40 45

Ile Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55 60

<210> 67
<211> 62
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 67
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Ser Arg Cys Val Asp Thr Arg Ser
1 5 10 15

Asn Pro Phe Ser Val Val Asn Ser Thr Phe Val Asn Asn Lys Ser Asp
20 25 30

Cys His Asn Gln Asn Asn Thr Gly His Phe Phe Trp Val Asn Val Lys
35 40 45

Val Asn Phe Asp Asn Val Ala Met Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55 60

<210> 68
<211> 62
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 68
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Ser Lys Cys Val Asp Thr Arg Asn
1 5 10 15

Asn Pro Phe Ser Asn Val Asn Ser Thr Met Val Asn Asn Lys Ser Glu
20 25 30

Cys His Asn Gln Asn Ser Thr Gly His Phe Phe Trp Val Asn Val Lys
35 40 45

Val Asn Phe Asp Asn Val Ala Met Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
50 55 60

<210> 69
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

```
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu
  1               5                  10                  15

Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr Ile Val Asn Asn Lys Ser Gln Cys
             20                  25                  30

Glu Ser Leu Asn Leu Thr Gly Glu Leu Tyr Trp Thr Lys Val Lys Val
         35                  40                  45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
     50                  55                  60


<210> 70
<211> 61
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 70
Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu
  1               5                  10                  15

Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr Ile Val Asn Asn Lys Ser Glu Cys
             20                  25                  30

Glu Ser Phe Asn Val Thr Gly Glu Leu Tyr Trp Thr Lys Val Lys Val
         35                  40                  45

Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
     50                  55                  60


<210> 71
<211> 57
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 71
Val Asn Leu Phe Ser Gly Lys Phe Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Asp
  1               5                  10                  15

Ile Asn Met Tyr Leu Asp Phe Thr Glu Val Pro Asn Arg Ser Gln Cys
             20                  25                  30

Asn Ile Ser Asn Tyr Ser Trp Lys Val Pro Gln Val Asn Phe Asp Asn
         35                  40                  45

Val Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Leu
   50                  55
```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/018637 A3

(51) International Patent Classification[7]: C12Q 1/68, G01N 33/53, C07K 14/705, A61K 39/00, C12N 15/11, 9/00, 15/87

(21) International Application Number: PCT/GB01/03940

(22) International Filing Date:
3 September 2001 (03.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0021617.6 2 September 2000 (02.09.2000) GB

(71) Applicant (*for all designated States except US*): IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED [GB/GB]; Sherfield Building, Imperial College, London SW7 2AZ (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): DJAMGOZ, Mustafa, Bilgin, Ali [GB/GB]; Department of Biology, Neurobiology Group, Imperial College of Science, Technology & Medicine, Imperial College Road, London SW7 2AZ (GB). FRASER, Scott, Paton [GB/GB]; Department of Biology, Neurobiology Group, Imperial College of Science, Technology & Medicine, Imperial College Road, London SW7 2AZ (GB). DISS, James, Kenneth, Joseph [GB/GB]; Department of Biology, Neurobiology Group, Imperial College of Science, Technology & Medicine, Imperial College Road, London SW7 2AZ (GB).

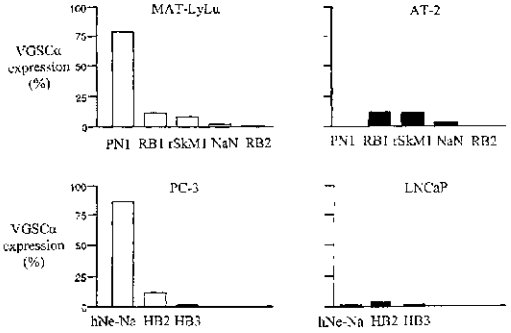
(74) Agent: MILES, John, S.; Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham, NG1 5DD (GB).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROSTATE CANCER



(57) Abstract: A method of diagnosing cancer in a human patient comprising the steps of (i) obtaining a sample containing nucleic acid and/or protein from the patient; and (ii) determining whether the sample contains a level of hNeNa voltage-gated Na^+ channel nucleic acid or protein associated with cancer. A method of treating cancer comprising the step of administering to the patient an agent which selectively prevents the function of hNe Na voltage gated Na^+ channel. A genetic construct comprising a nucleic acid encoding a molecule capable of preventing the function of hNeNa voltage-gated Na^+ channel expressed in a cell. The methods and compositions are particularly suited to prostate cancer.

WO 02/018637 A3

WO 02/018637 A3

patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
21 November 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/03940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 G01N33/53 C07K14/705 A61K39/00 C12N15/11
C12N9/00 C12N15/87

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)
IPC 7 C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANIADO MARC E ET AL: "Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer cells lines and their contribution to invasion in vitro." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 150, no. 4, 1997, pages 1213-1221, XP008002039 ISSN: 0002-9440 page 1219, paragraph 2 -page 1220; figure 3; table 1 --- -/--	1-22,53, 54

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [ ] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 April 2002	10. 07. 2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Botz, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/03940

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMITH P ET AL: "Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 423, no. 1, 13 February 1998 (1998-02-13), pages 19-24, XP004261853 ISSN: 0014-5793 page 21, paragraphs 3.2,4 -page 23; tables 1,2 ---	1-22,53, 54
X	DISS J K J ET AL: "Expression of skeletal muscle-type voltage-gated Nachannel in rat and human prostate cancer cell lines" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 427, no. 1, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 5-10, XP004259019 ISSN: 0014-5793 page 8 -page 9 ---	1-22,53, 54
Y	GRIMES J A ET AL: "Differential expression of voltage-activated Na+ currents in two prostatic tumour cell lines: Contribution to invasiveness in vitro." FEBS LETTERS, vol. 369, no. 2-3, 1995, pages 290-294, XP002194656 ISSN: 0014-5793 the whole document ---	1-22,53, 54
Y	ISAACS J T ET AL: "ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF SEVEN DUNNING RAT PROSTATIC CANCER CELL LINES AND THEIR USE IN DEVELOPING METHODS FOR PREDICTING METASTATIC ABILITIES OF PROSTATIC CANCERS" PROSTATE, vol. 9, no. 3, 1986, pages 261-282, XP008002046 ISSN: 0270-4137 the whole document -----	1-22,53, 54

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 01/03940

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-17 are directed to diagnostic methods and to methods of treatment practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.: 23-25
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:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] 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.:

1-25, 53, 54 (completely)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/GB 01/03940

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-25, 53, 54 (completely)

Invention 1:

A method for (1) determining the susceptibility of a human patient to cancer, (2) diagnosing cancer in a human patient, (3) predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer in a human patient, use of an agent which is capable of use in determining the level of hNe-Na voltage-gated Na+ channel protein or nucleic acid in a sample and a kit comprising said agent.

2. Claims: 26-52 (completely)

Invention 2:

A method of treating cancer comprising administering an agent which is capable of preventing the function of hNe-Na voltage-gated Na+ channel, a genetic construct encoding said AGENT, a PHARMACEUTICAL COMPOSITION containing it, and a METHOD identifying it, its use, a compound selectively binding the hNe-Na voltage-gated Na+ channel protein, nucleic acid encoding it, host cell comprising it, use of said compound in the manufacture of a medicament, method of treating and imaging cancer administering said compound and kits containing it.

International Application No. PCT/GB 01/03940

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 23-25

Claims 23 to 25 relate to a kit comprising an agent defined as an effect to be achieved. Claims 23 to 25 remain unsupported by the description in terms of disclosure of said agent. Present claims 23 - 25 therefore relate to an extremely large number of possible compounds that a lack of clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has not been carried out for claims 23 - 25.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 48/00	Ｃ０７Ｋ 14/47		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 35/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/574	Ａ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/574	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
Ｇ０１Ｎ 33/574	Ａ６１Ｋ 37/48		
	Ａ６１Ｋ 37/02		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100094400
弁理士 鈴木 三義
(74)代理人 100107836
弁理士 西 和哉
(74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(72)発明者 ムスタファ・ビルギン・アリ・ジャムゴズ
イギリス・ロンドン・ＳＷ７・２ＡＺ・インペリアル・カレッジ・ロード・（番地なし）・インペリアル・カレッジ・オブ・サイエンス・テクノロジー・アンド・メディスン・デパートメント・オブ・バイオロジー・ニューロバイオロジー・グループ
(72)発明者 スコット・ペイトン・フレイサー
イギリス・ロンドン・ＳＷ７・２ＡＺ・インペリアル・カレッジ・ロード・（番地なし）・インペリアル・カレッジ・オブ・サイエンス・テクノロジー・アンド・メディスン・デパートメント・オブ・バイオロジー・ニューロバイオロジー・グループ
(72)発明者 ジェイムズ・ケネス・ジョゼフ・ディス
イギリス・ロンドン・ＳＷ７・２ＡＺ・インペリアル・カレッジ・ロード・（番地なし）・インペリアル・カレッジ・オブ・サイエンス・テクノロジー・アンド・メディスン・デパートメント・オブ・バイオロジー・ニューロバイオロジー・グループ

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36
DA37 DA78 FB02 FB03
4B024 AA01 AA12 BA80 CA04 CA07 CA11 CA12 DA06 EA02 EA04
GA11 HA12 HA17
4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ03 QQ43 QQ53 QR32 QR55 QS34
4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 AA13 AA17 DC50 NA14 ZB261
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA03 MA05 NA14 ZB26
4H045 AA10 BA41 CA40 EA28 FA73 FA74