

(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2006-518182

(P2006-518182A)

(43) 公表日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B O 5 0
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 3
C O 7 K 14/82 (2006.01)	C O 7 K 14/82	4 B O 6 4
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 111 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-502932 (P2004-502932)	(71) 出願人	502101973
(86) (22) 出願日	平成15年5月7日 (2003.5.7)		フィラデルフィア・ヘルス・アンド・エデュケーション・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月8日 (2004.11.8)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1910
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/014098		2フィラデルフィア・ブロードアンドバイ
(87) 国際公開番号	W02003/094844		ンストリート
(87) 国際公開日	平成15年11月20日 (2003.11.20)	(74) 代理人	100060782
(31) 優先権主張番号	10/140,602		弁理士 小田島 平吉
(32) 優先日	平成14年5月7日 (2002.5.7)	(72) 発明者	スターンズ, マーク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1908
		(72) 発明者	5ピラノバ・ショーモントドライブ503
			フー, ユージ
			アメリカ合衆国ペンシルベニア州1904
			6ガルフミルズ・ランターンレーン161
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 DNAマクロアレイプロテオミクスプラットフォームに基づく前立腺癌関連組成物、方法およびキット

(57) 【要約】

本発明は、前立腺癌が包含されるがそれに限定されるものではない、ある種の疾患、疾病もしくは症状においてその発現が増加される、哺乳類PCADM-1遺伝子をコードする新規な核酸およびそれによりコードされるタンパク質に関する。本発明はさらに、PCADM-1発現ならびに／もしくはPCADM-1ポリペプチドの生産および活性を調節することもしくは検出することを含んでなる、前立腺癌を検出しそして処置する方法に関する。さらに、本発明は、DNA結合タンパク質およびそれらと特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチド配列の同定のための新規なアッセイに関する。最後に、本発明は、PCADM-1遺伝子発現を阻害するようにPCADM-1 mRNAに特異的に結合しそしてそれにより腫瘍細胞および腫瘍組織を破壊するDNAzymもしくはDNA酵素に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 (PCADM-1) もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸。

【請求項 2】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 ならびにそのホモログ、バリエーション、突然変異体およびフラグメントをコードする単離された核酸。

【請求項 3】

該核酸が、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1 (配列番号: 1) をコードする核酸と 99% より大きい配列同一性を共有する請求項 1 の単離された核酸。

10

【請求項 4】

該単離された核酸が、配列番号: 1 に対してヌクレオチド番号 190 でアデニン、ヌクレオチド番号 191 でシトシン、ヌクレオチド番号 465 でシトシン、ヌクレオチド番号 475 でグアニン、ヌクレオチド番号 488 でグアニン、そしてヌクレオチド番号 505 でシトシンを含んでなる請求項 3 の単離された核酸。

【請求項 5】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする単離された核酸 (ここで、該核酸の配列は配列番号: 1 の配列からなる)。

【請求項 6】

該核酸が、それに共有結合しているタグポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる請求項 1 の単離された核酸。

20

【請求項 7】

該タグポリペプチドが、myc タグポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグポリペプチド、緑色蛍光タンパク質タグポリペプチド、myc-ピルビン酸キナーゼタグポリペプチド、His6 タグポリペプチド、インフルエンザウイルス赤血球凝集素タグポリペプチド、フラグタグポリペプチド、およびマルトース結合タンパク質タグポリペプチドよりなる群から選択される請求項 6 の単離された核酸。

【請求項 8】

該核酸が、それに操作可能に連結されたプロモーター/調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる請求項 1 の単離された核酸。

30

【請求項 9】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を含んでなるベクター。

【請求項 10】

該ベクターが、哺乳類癌診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする該単離された核酸に操作可能に連結されたプロモーター/調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる請求項 9 のベクター。

【請求項 11】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする該単離された核酸が、細胞に導入した場合に発現される請求項 10 のベクター。

40

【請求項 12】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を含んでなる組み換え細胞。

【請求項 13】

請求項 9 のベクターを含んでなる組み換え細胞。

【請求項 14】

請求項 10 のベクターを含んでなる組み換え細胞。

【請求項 15】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸 (該相補的な核酸はアンチセンスの向きである)。

50

【請求項 16】

該単離された核酸が、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99%より大きい同一性を共有する請求項 15 の単離された核酸。

【請求項 17】

該単離された核酸が、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる請求項 15 の単離された核酸。

【請求項 18】

該単離された核酸が、細胞に導入した場合に発現される請求項 17 の単離された核酸。

【請求項 19】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクター（該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、ここで、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする該単離された核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99%より大きい同一性を共有する）。

10

【請求項 20】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクター（該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなり、さらにここで、該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される）。

20

【請求項 21】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなる組み換え細胞（該相補的な核酸はアンチセンスの向きである）。

【請求項 22】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなる組み換え細胞（該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、ここで、該単離された核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99%より大きい同一性を共有する）。

30

【請求項 23】

請求項 19 のベクターを含んでなる組み換え細胞。

【請求項 24】

請求項 20 のベクターを含んでなる組み換え細胞。

【請求項 25】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする単離された核酸（ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー 1 のアミノ酸配列は、配列番号：2 のアミノ酸配列と 99%より大きい配列同一性を共有する）。

【請求項 26】

該前立腺癌抗原診断マーカー 1 の該アミノ酸配列が、配列番号：2 のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号 64 でトレオニン（T）、アミノ酸残基番号 155 でアスパラギン（N）、残基番号 159 でアラニン（A）、残基番号 163 でアルギニン（R）、そして残基番号 169 でアルギニン（R）を含んでなる請求項 25 の単離された核酸。

40

【請求項 27】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする単離された核酸（ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー 1 のアミノ酸配列は、配列番号：2 の配列からなる）。

【請求項 28】

該核酸が、それに共有結合しているタグポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる請求項 27 の核酸。

【請求項 29】

50

該タグポリペプチドが、m y c タグポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグポリペプチド、緑色蛍光タンパク質タグポリペプチド、m y c-ピルビン酸キナーゼタグポリペプチド、H i s 6 タグポリペプチド、インフルエンザウイルス赤血球凝集素タグポリペプチド、フラグタグポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質タグポリペプチドよりなる群から選択される請求項 28 の核酸。

【請求項 30】

該核酸が、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列をコードする核酸をさらに含んでなる請求項 29 の核酸。

【請求項 31】

請求項 26 の核酸を含んでなるベクター。

10

【請求項 32】

該ベクターが、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる請求項 31 のベクター。

【請求項 33】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする該単離された核酸が、細胞に導入した場合に発現される請求項 32 のベクター。

【請求項 34】

請求項 25 の単離された核酸を含んでなる組み換え細胞。

【請求項 35】

請求項 26 の単離された核酸を含んでなる組み換え細胞。

20

【請求項 36】

請求項 30 のベクターを含んでなる組み換え細胞。

【請求項 37】

請求項 31 のベクターを含んでなる組み換え細胞。

【請求項 38】

該ベクターが、該細胞に導入した場合に発現される請求項 36 の組み換え細胞。

【請求項 39】

請求項 25 の核酸に相補的な単離された核酸（該相補的な核酸はアンチセンスの向きである）。

【請求項 40】

該相補的な核酸が、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる請求項 39 の単離された核酸。

30

【請求項 41】

請求項 39 の単離された核酸を含んでなるベクター。

【請求項 42】

該単離された核酸が、細胞に導入した場合に発現される請求項 40 の単離された核酸を含んでなるベクター。

【請求項 43】

該核酸が、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99%より大きい同一性を共有する請求項 39 の単離された核酸。

40

【請求項 44】

該単離された核酸が、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる請求項 43 の単離された核酸。

【請求項 45】

請求項 43 の単離された核酸を含んでなるベクター。

【請求項 46】

請求項 44 の単離された核酸を含んでなるベクター。

【請求項 47】

該単離された核酸が、細胞に導入した場合に発現される請求項 46 のベクター。

【請求項 48】

50

請求項 4 3 の単離された核酸を含んでなる組み換え細胞。

【請求項 4 9】

請求項 4 4 の単離された核酸を含んでなる組み換え細胞。

【請求項 5 0】

該単離された核酸が、該細胞において発現される請求項 4 9 の組み換え細胞。

【請求項 5 1】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項 5 2】

該哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 が、配列番号：2 のアミノ酸と少なくとも 9 9 % の配列同一性を共有する請求項 5 1 の単離されたポリペプチド。

10

【請求項 5 3】

該ポリペプチドが、配列番号：2 のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号 6 4 でトレオニン、アミノ酸残基番号 1 5 5 でアスパラギン、残基番号 1 5 9 でアラニン、残基番号 1 6 3 でアルギニン、そして残基番号 1 6 9 でアルギニンを含んでなる請求項 5 2 の単離されたポリペプチド。

【請求項 5 4】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 を含んでなる単離されたポリペプチド（ここで、該単離されたポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号：2 からなる）。

【請求項 5 5】

前立腺癌抗原診断マーカー 1 ポリペプチドと特異的に結合する単離された核酸。

20

【請求項 5 6】

該核酸が二本鎖 DNA である請求項 5 5 の単離された核酸。

【請求項 5 7】

該単離された核酸が、核酸配列 C A C G G A T G（配列番号：5）、核酸配列 C A C A A T G A（配列番号：6）、核酸配列 C A C A A T G（配列番号：7）および核酸配列 C A C A A T G T T T T T G T（配列番号：8）よりなる群から選択される核酸配列を含んでなる請求項 5 6 の単離された核酸。

【請求項 5 8】

哺乳類白血病細胞切断点クラスター領域結合タンパク質と特異的に結合する単離された核酸。

30

【請求項 5 9】

該白血病切断点クラスター領域結合タンパク質が、R a g 1 タンパク質および R a g 2 タンパク質よりなる群から選択される請求項 5 8 の核酸。

【請求項 6 0】

該単離された核酸が二本鎖 DNA を含んでなり、該 DNA が核酸配列 C A C G G A T G（配列番号：5）および核酸配列 C A C A A T G A（配列番号：6）よりなる群から選択される核酸配列を含んでなる請求項 5 9 の単離された核酸。

【請求項 6 1】

原核生物の切断点クラスター領域結合タンパク質と特異的に結合する単離された核酸。

【請求項 6 2】

該原核生物の切断点クラスター領域結合タンパク質が、R e c A タンパク質および R e c B タンパク質よりなる群から選択される請求項 6 1 の核酸。

40

【請求項 6 3】

該ポリペプチドが、配列 C A C G G A T G（配列番号：5）からなる核酸、配列 C A C A A T G A（配列番号：6）からなる核酸、配列 C A C A A T G（配列番号：7）からなる核酸および配列 C A C A A T G T T T T T G T（配列番号：8）からなる核酸よりなる群から選択される核酸の少なくとも一つと特異的に結合する請求項 5 2 のポリペプチド。

【請求項 6 4】

単離された酵素核酸（ここで、該核酸は、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される mRNA を特異的に切断する）。

50

【請求項 6 5】

該単離された酵素核酸の核酸配列が、配列番号：9の配列（G A T C T T C A G G C T A G C T A C A A C G A G T C C T T G A）および配列番号：10の配列（G T T C C C C A G G C T A G C T A C A A C G A C C C A G G G C）よりなる群から選択される請求項 6 4 の単離された酵素核酸。

【請求項 6 6】

単離された酵素核酸（ここで、該核酸は、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される m R N A を特異的に切断し、そしてさらにここで、該単離された酵素核酸の配列は、配列番号：9の配列および配列番号：10の配列よりなる群から選択される）。

10

【請求項 6 7】

単離された酵素核酸（ここで、該核酸は、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される m R N A を特異的に切断し、そしてさらにここで、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする該核酸は、配列番号：1の配列もしくはその一部を有する核酸を含んでなる）。

【請求項 6 8】

該酵素核酸が少なくとも一つの結合アームを含んでなり、そしてさらに該結合アームが配列番号：1もしくはその一部に相補的な配列を含んでなる請求項 6 4 の単離された酵素核酸。

【請求項 6 9】

該核酸が、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる請求項 6 4 の単離された酵素核酸。

20

【請求項 7 0】

該核酸が「10～23」モチーフ構造を含んでなる触媒ドメインを含んでなる請求項 6 4 の単離された酵素核酸。

【請求項 7 1】

該酵素核酸が触媒コアドメインを含んでなり、そして該ドメインの側面に位置する少なくとも一つの結合アームをさらに含んでなる（ここで、該結合アームは約 6 ～ 10 個のヌクレオチドを含んでなる）請求項 6 4 の単離された酵素核酸。

【請求項 7 2】

該側面に位置するヌクレオチドが、配列番号：1もしくはその一部に相補的な配列を含んでなる請求項 7 1 の単離された酵素核酸。

30

【請求項 7 3】

前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される m R N A を特異的に切断する単離された酵素核酸（ここで、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする該核酸によりコードされる前立腺癌抗原診断マーカー 1 のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と 99 % より大きい配列同一性を共有する）。

【請求項 7 4】

前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される m R N A を特異的に切断する酵素核酸（ここで、該酵素核酸は、配列 G A T C T T C A G G C T A G C T A C A A C G A G T C C T T G A （配列番号：9）および配列 G T T C C C C A G G C T A G C T A C A A C G A C C C A G G G C （配列番号：10）を含んでなる）。

40

【請求項 7 5】

前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される m R N A を特異的に切断する単離された酵素核酸（ここで、該酵素核酸の核酸配列は、配列番号：9の配列および配列番号：10の配列よりなる群から選択される）。

【請求項 7 6】

該酵素核酸が結合アームを含んでなる（ここで、該結合アームは、配列番号：1もしくはその一部に相補的な配列を含んでなる）請求項 7 2 の酵素核酸。

【請求項 7 7】

50

該結合アームが約 6 ～ 10 個のヌクレオチドを含んでなる請求項 76 の酵素核酸。

【請求項 78】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 ポリペプチドもしくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体。

【請求項 79】

該抗体がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体および合成抗体よりなる群から選択される請求項 78 の抗体。

【請求項 80】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 ポリペプチドもしくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物。

10

【請求項 81】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物。

【請求項 82】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 を含んでなる単離されたポリペプチドおよび製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物。

【請求項 83】

前立腺癌抗原診断マーカー 1 ポリペプチドと特異的に結合する単離された核酸および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物。

【請求項 84】

20

単離された酵素核酸（ここで、該単離された酵素核酸は、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される mRNA を特異的に切断する）および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物。

【請求項 85】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 ポリペプチドもしくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物。

【請求項 86】

哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を含んでなるトランスジェニック非ヒト哺乳類。

【請求項 87】

30

前立腺癌抗原診断マーカー 1 の異常発現により媒介される疾患にかかっているヒトに哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される mRNA を特異的に切断する単離された酵素核酸、および哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する抗体よりなる群から選択される少なくとも一つの物質の発現阻害量を投与することを含んでなる、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー 1 の異常発現により媒介される疾患を処置する方法。

【請求項 88】

該疾患が前立腺癌である請求項 87 の方法。

【請求項 89】

40

該哺乳類がヒトおよびイヌよりなる群から選択される請求項 88 の方法。

【請求項 90】

血管上皮増殖因子 1（VEGF-1）およびメタロプロテイナーゼ 2（MMP-2）よりなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸から転写される mRNA を特異的に切断する酵素核酸を投与することをさらに含んでなる請求項 88 の方法。

【請求項 91】

哺乳類から生体サンプルを得ること、該生体サンプルにおける PCADM-1 のレベルを評価すること、および該生体サンプルにおける PCADM-1 のレベルを前立腺癌にかかっていない類似哺乳類から得られる生体サンプルにおける PCADM-1 のレベルと比較すること（ここで、該類似哺乳類からの該生体サンプルにおける PCADM-1 のレベ

50

ルと比較して該哺乳類からの該生体サンプルにおけるPCADM-1のより高いレベルは、該哺乳類が前立腺癌にかかっていることの指標となる）、それにより該哺乳類における前立腺癌を診断することを含んでなる、哺乳類における前立腺癌を診断する方法。

【請求項 9 2】

該哺乳類がヒトおよびイヌよりなる群から選択される請求項 9 1 の方法。

【請求項 9 3】

該生体サンプルが、前立腺組織サンプル、血液サンプル、尿サンプル、痰サンプル、腹腔腔液サンプル、会陰腔液サンプル、胸膜腔液サンプル、精液サンプル、前立腺液サンプル、便サンプルおよび骨髓サンプルよりなる群から選択される請求項 9 1 の方法。

【請求項 9 4】

哺乳類から生体サンプルを得ること、該生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する抗体のレベルを評価すること、および該生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する抗体のレベルを前立腺癌にかかっている類似哺乳類から得られる生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する抗体のレベルと比較すること（ここで、該類似哺乳類からの該生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する抗体のレベルと比較して該哺乳類からの該生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する抗体のより高いレベルは、該哺乳類が前立腺癌にかかっていることの指標となる）、それにより哺乳類における前立腺癌を診断することを含んでなる、哺乳類における前立腺癌を診断する方法。

10

20

【請求項 9 5】

該哺乳類がヒトおよびイヌよりなる群から選択される請求項 9 4 の方法。

【請求項 9 6】

該生体サンプルが、前立腺組織サンプル、血液サンプル、尿サンプル、痰サンプル、腹腔腔液サンプル、会陰腔液サンプル、胸膜腔液サンプル、精液サンプル、前立腺液サンプル、便サンプルおよび骨髓サンプルよりなる群から選択される請求項 9 4 の方法。

【請求項 9 7】

細胞を試験化合物と接触させることおよび該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のレベルを該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のレベルと比較すること（ここで、該試験化合物と接触していない該そのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のより高いかもしくはより低いレベルは、該試験化合物が細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 の発現に影響を及ぼすことの指標となる）を含んでなる、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 の発現に影響を及ぼす試験化合物を同定する方法。

30

【請求項 9 8】

請求項 9 7 の方法により同定される化合物。

【請求項 9 9】

細胞を試験化合物と接触させることおよび該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のレベルを該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のレベルと比較すること（ここで、該試験化合物と接触していない該そのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 発現のより低いレベルは、該試験化合物が細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 の発現を減少することの指標となる）を含んでなる、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 の発現を減少する化合物を同定する方法。

40

【請求項 1 0 0】

請求項 9 9 の方法により同定される化合物。

【請求項 1 0 1】

細胞を試験化合物と接触させることおよび該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1

50

発現のレベルを該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較すること（ここで、該試験化合物と接触していない該そのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のより高いレベルは、該試験化合物が細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現を増加することの指標となる）を含んでなる、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現を増加する化合物を同定する方法。

【請求項１０２】

請求項１０１の方法により同定される化合物。

【請求項１０３】

化合物の存在下での前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合のレベルを該化合物がない場合の前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合のレベルと比較すること（ここで、該化合物がない場合の前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合のレベルと比較して該化合物の存在下での前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合のより高いかもしくはより低いレベルは、該化合物が前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸と前立腺癌抗原診断マーカー１との結合に影響を及ぼすことの指標となる）、それにより前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸と前立腺癌抗原診断マーカー１との結合に影響を及ぼす化合物を同定することを含んでなる、前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸と前立腺癌抗原診断マーカー１との結合に影響を及ぼす化合物を同定する方法。

【請求項１０４】

前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸が、配列 C A C G G A T G（配列番号：５）、配列 C A C A A T G A（配列番号：６）、配列 C A C A A T G（配列番号：７）および配列 C A C A A T G T T T T T G T（配列番号：８）よりなる群から選択される配列を有する請求項１０３の方法。

【請求項１０５】

該前立腺癌抗原診断マーカー１が、配列番号：２の配列と９９％より大きいアミノ酸相同性を共有する配列を有する請求項１０３の方法。

【請求項１０６】

請求項１０５の方法により同定される化合物。

【請求項１０７】

（ａ）前立腺癌抗原診断マーカー１の初期レベルを決定するためにヒトから得られる第一の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルを評価すること；
（ｂ）該ヒトに抗前立腺癌治療を施すこと；
（ｃ）該治療の間もしくは後に該ヒトから得られる第二のそのほかの点では同一の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルを評価すること；
（ｄ）該第一の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１の該レベルを該第二の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１の該レベルと比較すること；および
（ｅ）前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルの任意の減少を該抗前立腺癌治療の効果と相関させること、

それにより前立腺癌にかかっているヒトの処置をモニターすることを含んでなる前立腺癌にかかっているヒトの処置をモニターする方法。

【請求項１０８】

該方法が、該前立腺癌の存続期間、該ヒトの寿命および該抗前立腺癌治療の期間よりなる群から選択される期間の間（ｂ）～（ｅ）を繰り返すことをさらに含んでなる請求項１０３の方法。

【請求項１０９】

前立腺癌抗原診断マーカー１の該レベルが、前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする

10

20

30

40

50

核酸を検出する方法および前立腺癌抗原診断マーカー1を検出する方法よりなる群から選択される方法を用いて評価される請求項103の方法。

【請求項110】

前立腺癌抗原診断マーカー1を検出する該方法が、前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する抗体を検出する方法および前立腺癌マーカー1と特異的に結合する二本鎖核酸の結合を検出する方法（ここで、該核酸は、配列番号：5の配列を有する核酸、配列番号：6の配列を有する核酸、配列番号：7の配列を有する核酸および配列番号：8の配列を有する核酸よりなる群から選択される）よりなる群から選択される請求項103の方法。

【請求項111】

前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する抗体、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸に相補的な単離された核酸（該相補的な核酸はアンチセンスの向きである）、および前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるRNAを特異的に切断する単離された酵素核酸よりなる群から選択される少なくとも一つの分子の前立腺癌抗原診断マーカー1発現阻害量を含んでなり、アプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー1の異常発現により媒介される疾患を軽減するためのキット。

【請求項112】

該疾患が前立腺癌である請求項111のキット。

【請求項113】

前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるRNAを特異的に切断する該単離された酵素核酸が、配列番号：9の配列および配列番号：10の配列よりなる群から選択される配列を含んでなる請求項111のキット。

【請求項114】

血管上皮増殖因子1（VEGF-1）およびメタロプロテイナーゼ2（MMP-2）よりなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する酵素核酸をさらに含んでなる請求項111のキット。

【請求項115】

前立腺癌抗原診断マーカー1に特異的に結合する抗体、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸に相補的な単離された核酸（該相補的な核酸はアンチセンスの向きである）、および前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する単離された酵素核酸よりなる群から選択される少なくとも一つの分子の前立腺癌抗原診断マーカー1発現阻害量を含んでなり、アプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー1の異常発現により媒介される疾患を処置するためのキット。

【請求項116】

前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する分子を含んでなり、アプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる、サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー1のレベルを評価するためのキット。

【請求項117】

前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する該分子が、前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する抗体および前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する二本鎖核酸よりなる群から選択される請求項116のキット。

【請求項118】

前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする該核酸が、配列番号：1の配列を有する核酸と99%より大きい配列同一性を共有する請求項116のキット。

【請求項119】

該前立腺癌抗原診断マーカー1ポリペプチドが、配列番号：2の配列と99%より大きいアミノ酸配列同一性を共有する請求項118のキット。

【請求項120】

10

20

30

40

50

前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸が、配列 C A C G G A T G（配列番号：５）、配列 C A C A A T G A（配列番号：６）、配列 C A C A A T G（配列番号：７）および配列 C A C A A T G T T T T T G T（配列番号：８）よりなる群から選択される配列を含んでなる請求項 １ １ ６ のキット。

【請求項 １ ２ １】

前立腺癌抗原診断マーカー１ポリペプチドともしくは前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする核酸と特異的に結合する分子を含んでなり、アプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー１を検出するためのキット。

【請求項 １ ２ ２】

10

該哺乳類がイヌおよびヒトよりなる群から選択される請求項 １ ２ １ のキット。

【請求項 １ ２ ３】

前立腺癌抗原診断マーカー１ポリペプチドと特異的に結合する該分子が、前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体および前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸よりなる群から選択される請求項 １ ２ １ のキット。

【請求項 １ ２ ４】

前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸が、配列 C A C G G A T G（配列番号：５）、配列 C A C A A T G A（配列番号：６）、配列 C A C A A T G（配列番号：７）および配列 C A C A A T G T T T T T G T（配列番号：８）よりなる群から選択される配列を含んでなる請求項 １ ２ ３ のキット。

20

【請求項 １ ２ ５】

前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする核酸と特異的に結合する該分子が、配列番号：１の配列と ９ ９ % より大きい配列同一性を共有する核酸と相補的な核酸よりなる群から選択される請求項 １ ２ １ のキット。

【請求項 １ ２ ６】

（ａ）半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも ２ 塩基対を含んでなる既知の配列が側面に位置するランダムコアヌクレオチド配列を含んでなる）；および

（ｂ）DNA 結合タンパク質と特異的に結合する該組のオリゴヌクレオチドメンバーを検出し、それにより DNA 結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを

30

同定すること
を含んでなる DNA 結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの同定のためのモンテカルロ様スクリーニングアッセイ。

【請求項 １ ２ ７】

（ｂ）の該検出が、電気泳動移動度シフトアッセイおよびポリペプチドと結合している二本鎖オリゴヌクレオチドを検出する方法よりなる群から選択される方法を含んでなる請求項 １ ２ ６ のアッセイ。

【請求項 １ ２ ８】

該ランダムコアヌクレオチド配列が、約 ３ ～ １ ２ 塩基対を含んでなる請求項 １ ２ ６ のアッセイ。

40

【請求項 １ ２ ９】

該二本鎖オリゴヌクレオチドが、約 ７ ～ １ ６ 塩基対の長さの間である請求項 １ ２ ６ のアッセイ。

【請求項 １ ３ ０】

該ランダムコアヌクレオチド配列が、７塩基対、８塩基対および９塩基対よりなる群から選択される長さを含んでなる請求項 １ ２ ８ のアッセイ。

【請求項 １ ３ １】

該アッセイが

（ｃ）DNA 結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を同定すること；

50

(d) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、(c)において同定される既知の側面に位置する配列からなり、該オリゴヌクレオチドは、未知のランダムコア配列が(c)において同定される配列より1個少ない未知の塩基対からなるように追加の既知の塩基対をさらに含んでなる）、および二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を検出しそして同定するアッセイ段階を繰り返すことをさらに含んでなる請求項126のアッセイ。

【請求項132】

該アッセイが、DNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの全配列が同定されるまで(a)～(d)を繰り返すことをさらに含んでなる請求項131のアッセイ。

【請求項133】

請求項126のアッセイにより同定されるDNA結合タンパク質と特異的に結合する単離された二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項134】

(a) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも2塩基対を含んでなる既知の配列が側面に位置するランダムコアヌクレオチド配列を含んでなる）；

(b) 該組における該二本鎖オリゴヌクレオチドの1つもしくはそれ以上がDNA結合タンパク質に特異的に結合する条件下で、該組の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを腫瘍細胞もしくは組織から調製されたDNA結合タンパク質を含んでなる混合物を含有するサンプルと混合すること；

(c) 該組における該二本鎖オリゴヌクレオチドの1つもしくはそれ以上がDNA結合タンパク質と特異的に結合する条件下で、該組の同一の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを腫瘍を含んでならないそのほかの点では同一の細胞もしくは組織から調製されたDNA結合タンパク質を含んでなる混合物を含有するそのほかの点では同一のサンプルと混合すること；

(d) (a) および (b) において特異的オリゴヌクレオチド-タンパク質結合を検出すること；および

(e) (b) においてDNA結合タンパク質と特異的に結合するが(c)においてDNA結合タンパク質と特異的に結合しない二本鎖オリゴヌクレオチドを同定し、それにより腫瘍と関連するDNA結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを同定すること

を含んでなる腫瘍と関連するDNA結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを同定する方法。

【請求項135】

請求項134の方法により同定される単離された二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項136】

(d) の該検出が、電気泳動移動度シフトアッセイおよびポリペプチドと結合している標識した二本鎖オリゴヌクレオチドを検出する方法よりなる群から選択される方法を含んでなる請求項134の方法。

【請求項137】

該ランダムコアヌクレオチド配列が、約3～12塩基対を含んでなる請求項134の方法。

【請求項138】

該二本鎖オリゴヌクレオチドが、約7～16塩基対の長さの間である請求項134の方法。

【請求項139】

該ランダムコアヌクレオチド配列が、7塩基対、8塩基対および9塩基対よりなる群から選択される長さを含んでなる請求項137の方法。

【請求項140】

10

20

30

40

50

該方法が

(f) (e)においてDNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を同定すること；

(g) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、(f)において同定される既知の側面に位置する配列からなり、該オリゴヌクレオチドは、該未知のランダムコア配列が(f)において同定される配列より1個少ない未知の塩基対からなるように該未知のランダムコア配列に隣接する追加の既知の塩基対をさらに含んでなる）；ならびに

(h) (b)および(e)を繰り返すこと

をさらに含んでなる請求項134の方法。

10

【請求項141】

該方法が、DNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの全配列が同定されるまで(b)～(h)を繰り返すことをさらに含んでなる請求項140の方法。

【請求項142】

(a) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも2塩基対を含んでなる既知の配列が側面に位置するランダムコアヌクレオチド配列を含んでなる）；および

(b) 該組のオリゴヌクレオチドメンバーと特異的に結合するDNA結合タンパク質を検出し、それにより二本鎖DNA結合タンパク質を同定すること

を含んでなる二本鎖DNA結合タンパク質の同定のためのモンテカルロ様スクリーニングアッセイ。

20

【請求項143】

(b)の該検出が、電気泳動移動度シフトアッセイおよびポリペプチドと結合している二本鎖オリゴヌクレオチドを検出する方法よりなる群から選択される方法を含んでなる請求項141のアッセイ。

【請求項144】

該ランダムコアヌクレオチド配列が、約3～12塩基対を含んでなる請求項142のアッセイ。

【請求項145】

該二本鎖オリゴヌクレオチドが、約7～16塩基対の長さの間である請求項142のアッセイ。

30

【請求項146】

該ランダムコアヌクレオチド配列が、7塩基対、8塩基対および9塩基対よりなる群から選択される長さを含んでなる請求項145のアッセイ。

【請求項147】

該アッセイが

(c) DNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を同定すること；

(d) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、(c)において同定される該既知の側面に位置する配列からなり、該オリゴヌクレオチドは、未知のランダムコア配列が(c)において同定される配列より1個少ない未知の塩基対からなるように追加の既知の塩基対をさらに含んでなる）、および二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を検出しそして同定するアッセイ段階を繰り返すことをさらに含んでなる請求項142のアッセイ。

40

【請求項148】

該アッセイが、DNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの全配列が同定されるまでアッセイの段階を繰り返すことをさらに含んでなる請求項147のアッセイ。

【請求項149】

50

請求項 1 4 2 のアッセイにより同定される単離された二本鎖 DNA 結合タンパク質。

【請求項 1 5 0】

(a) 触媒コアドメインを含んでなる試験核酸を合成すること（ここで、該コアドメインは、相補的アームを含んでなる核酸が側面に位置し、そしてここで、該相補的アームの配列は、配列番号：1 の配列を含んでなる配列と相補的な配列から選択され、そしてさらにここで、該相補的アーム配列は約 8 ～ 1 0 ヌクレオチドの長さである）、および (b) 該試験核酸が、PCADM-1 をコードする mRNA を特異的に切断するかどうかを評価すること、それにより PCADM-1 をコードする mRNA を特異的に切断する DNA 酵素を設計することを含んでなる、PCADM-1 をコードする mRNA を特異的に切断する DNA 酵素を設計する方法。

10

【請求項 1 5 1】

請求項 1 5 0 の方法により設計される DNA 酵素。

【請求項 1 5 2】

(a) 結合アームを含んでなる核酸が側面に位置する触媒コアドメインを含んでなる試験核酸を合成すること（ここで、該結合アームの配列は、翻訳開始部位に対して配列番号：1 の約ヌクレオチド - 9 ～ 約ヌクレオチド + 4 5 0 を含んでなる配列に相補的であり、そしてさらにここで、該結合アーム配列は約 8 ～ 1 0 ヌクレオチドの長さである）、および (b) 該試験核酸が、PCADM-1 をコードするリボ核酸を特異的に切断するかどうかを評価すること、それにより PCADM-1 をコードするリボ核酸を特異的に切断する DNA 酵素を同定することを含んでなる、PCADM-1 をコードする mRNA を特異的に切断する DNA 酵素を同定する方法。

20

【請求項 1 5 3】

該結合アームの該配列が、該翻訳開始部位に対して配列番号：1 の約ヌクレオチド + 1 5 5 ～ 約ヌクレオチド + 1 7 1 を含んでなる配列に相補的である請求項 1 5 2 の方法。

【請求項 1 5 4】

該結合アームの該配列が、該翻訳開始部位に対して配列番号：1 の約ヌクレオチド - 7 ～ 約ヌクレオチド + 9 を含んでなる配列に相補的である請求項 1 5 2 の方法。

【請求項 1 5 5】

請求項 1 5 3 の方法により同定される DNA 酵素。

【請求項 1 5 6】

前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写される mRNA を特異的に切断する単離された酵素核酸を細胞に投与すること、それにより該細胞における該前立腺癌抗原診断マーカー 1 の発現を阻害することを含んでなる、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー 1 の発現を阻害する方法。

30

【請求項 1 5 7】

該単離された酵素核酸が、配列番号：9 の配列を有する酵素核酸および配列番号：1 0 の配列を有する酵素核酸よりなる群から選択される請求項 1 5 6 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

40

関連出願へのクロスリファレンス

本願は、1 9 9 9 年 9 月 2 4 日に提出された米国仮出願第 6 0 / 1 5 5 , 8 6 5 号に、3 5 U. S. C. § 1 1 9 (e) の下で優先権が与えられている、2 0 0 0 年 9 月 2 4 日に提出された P C T 出願第 P C T / U S 0 0 / 2 5 9 8 1 号の継続である、2 0 0 2 年 3 月 1 5 日に提出された米国出願第 1 0 / 0 9 8 , 9 9 2 号の一部継続である、2 0 0 2 年 3 月 2 1 日に提出された P C T 出願第 P C T / U S 0 2 / 0 8 6 7 3 号の一部継続である、2 0 0 1 年 3 月 2 1 日に提出された米国出願第 0 9 / 8 1 3 , 3 8 0 号の一部継続である、2 0 0 2 年 5 月 7 日に提出された米国出願第 1 0 / 1 4 0 , 6 0 2 号に基づき、これらの全ては、本明細書にそれらの全部が引用することにより本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

50

【0002】

先行技術は、リボソームタンパク質がある種の疾患、疾病もしくは症状において重要な役割を果たす可能性があることを示唆する。さらに特に、リボソームタンパク質をコードする遺伝子のmRNAの過剰発現と癌との間の関連を示す多数の報告がある（非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；および非特許文献9）。例えば、Chiao et al.（非特許文献1）は、S2リボソームタンパク質mRNAの発現が頭頸部癌において上昇しているが、S2 mRNAは正常組織ではほとんど検出可能でないと決定した。これらの研究に基いて、いくつかのリボソームmRNAの過剰発現は、従って、癌の発症と関連する可能性があると考えられている。例えば、いくつかのリボソームタンパク質（例えば、エ
10
シェリキア・コリ（E. coli）L7、ラットS27およびS29）に特徴的な特定のジンクフィンガー、ロイシンジッパーモチーフ、bZIPエレメント、ヘリックスターナーヘリックスモチーフもしくは他のモチーフは、核酸に結合し得ることが提示されている（非特許文献10；非特許文献4；非特許文献7；非特許文献11）。ラットリボソームタンパク質S3aは、ラットv-fostランスフォーメーションエフェクタータンパク質と同一であることが見出されている（非特許文献5）。S3aは、通常、タンパク質合成の開始に関与し、そしてまた増殖の調節および細胞周期に関与するタンパク質にも関係している（非特許文献5）。同様に、ラットリボソームタンパク質L10は、推定上のウィルス腫瘍サプレッサー遺伝子に相同である（非特許文献6）。悪性細胞は、突然変異体「リボソーム様」タンパク質を発現する可能性がある。しかしながら、現在、これら
20
のリボソームタンパク質のいずれかが過剰発現されるかもしくはこれらのタンパク質が悪性細胞においてDNA結合活性を獲得する証拠はない。

【0003】

リンパ系腫瘍における染色体異常の存在は確立している。T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）と関連する染色体転座は、いくつかの潜在的癌遺伝子の同定に至っている（非特許文献12）。T-ALLと関連する染色体転座の多くは、T細胞受容体（TCR）遺伝子に位置が特定されている。免疫グロブリン遺伝子の組み換えは、Bリンパ球分化の初期に起こる。部位特異的組み換えにより2もしくは3つの生殖細胞系セグメント（すなわち、可変-V；多様性-D；および連結-Jセグメント）を可変遺伝子エキソンに連結するV-（D）-J組み換えは、V領域多様性の増幅に寄与する。V、DおよびJセ
30
グメントの側面に位置する領域のヌクレオチド配列の比較により、12もしくは23塩基のいずれかのスペーサー配列で隔てられている、ヘプタマーCACCTGTGおよびトリッ
チノナマーGGTTTGTを包含する、ヌクレオチド配列の2つの共通ブロックが保存されていることが示されている（非特許文献13）。T細胞受容体および免疫グロブリン遺伝子のヘプタマー-スペーサー-ヘプタマー-ノナマー配列間の相同性は、切断点クラスター領域もしくはBPCRと一般に呼ばれるこれらの要素がV-（D）-J組み換えにおいて重要な役割を果たすことを示唆する。

【0004】

先行技術は、保存されている組み換えシグナル配列（RS）を認識するDNA結合タンパク質（1つもしくは複数）が、シグナルとコーディング領域配列との間の連結点でDNA
40
Aを切断しそして切断末端を連結する組み換え機構に関与し得ることを示唆する。最も初期の報告は、RSタンパク質をリンパ系細胞に位置すると開示した（非特許文献14；非特許文献15；非特許文献16；および非特許文献17）。さらに最近では、異なるRSタンパク質が同定されている。例えば、V（D）J組み換えシグナル配列のカップB結合および認識成分のDNA結合タンパク質が同定されている。転写因子のこのファミリーの活性化は、カップBにより制御される遺伝子調節要素を有する遺伝子を発癌性チロシンキナーゼが調節するメカニズムを提供すると考えられる。

【0005】

T細胞異常に関する研究は、特に染色体バンド11p13内の切断点に関して、組み換え酵素の関与に関して特に情報を提供している。両方の相互転座染色体は、組み換え酵素
50

活性の特質であるN-領域ヌクレオチド付加を有することが多いので、組み換え酵素は異常な染色体結合に関与すると思われる（非特許文献18）。これらの転座は、正常な染色体連結プロセスの突然変異と見なされる。

【0006】

要約すると、遺伝子を再編成することと関連する染色体異常が起こるメカニズム（1つもしくは複数）および正常な抗原受容体遺伝子再編成に関与するDNA結合酵素（すなわち、組み換え酵素）の役割（非特許文献19）は、よく研究されているにもかかわらず、依然としてほとんど理解されていない。従って、特に非リンパ系タイプ疾患および固形癌発症を理解するために、新規なBPCRおよび新規な組み換え酵素の同定が必要とされる。

10

【0007】

さらに、先行する研究は、DNA結合タンパク質がある種の疾患、疾病もしくは症状と関連しそして／もしくはそれらを媒介することを示唆するが、これらのタンパク質はほとんど同定されておらず（例えば、現在まで；固形癌において何も同定されていない）、そして疾患プロセスにおけるそれらの役割（1つもしくは複数）はほとんど理解されていない。DNA結合タンパク質の同定のための様々な先行技術アッセイがある（例えば、特許文献1；特許文献2；特許文献3；特許文献4）という事実にもかかわらずこれはそうである。従って、DNA結合タンパク質およびそれらのコグネート二本鎖DNA配列結合部位の同定のための簡単で有効なアッセイの長い間の切実な必要性がある。

【0008】

さらに、診断および治療法の開発におけるDNA結合タンパク質の潜在的有用性にもかかわらず、DNA結合タンパク質もしくはそれらのコグネート結合DNA二本鎖に基づく診断および治療法は、たとえあるとしても、少数である。

20

【0009】

前立腺癌は男性における癌関連死亡率および罹患率の主要原因の一つであるが、この疾患の有効な診断および治療法はほとんどなく、そしてBPCRに結合するタンパク質を包含するDNA結合タンパク質の検出にいずれも基づかない。現在まで、科学文献において同定された約450の部分的に特性化された組織マーカーがあるが、1個のみがFDAにより認可された臨床マーカーとして開発されている（すなわち、前立腺特異抗原（PSA）およびその誘導体）。前立腺癌が包含されるがこれに限定されるものではない癌の診断および検出に有用なマーカーの不足にもかかわらず、癌の早期発見のためのマーカーの開発は、癌の改善された処置にとって必須である。

30

【0010】

前立腺癌に関して、血清前立腺特異抗原（PSA）レベルは、前立腺癌の患者の同定に対して高感度でも特異的でもないと一般に考えられている（非特許文献20）。前立腺癌の男性の40%ほどは正常なPSAレベルを有し（すなわち、偽陰性）そして逆に、高いPSAレベルを有する男性の30%はPCAをもたないと概算されている。従って、前立腺癌を包含する癌のより高感度で且つ特異的なアッセイの開発が不可欠である。さらに、集団地域検診プログラムによるかもしくは日常的な臨床検査における広範な実施を可能にする、非侵襲的で且つ安価な尿に基づくスクリーニングアッセイは、前立腺癌を包含する癌の診断および処置に特に有用である。

40

【0011】

要約すると、特にDNA結合タンパク質の改変された発現と関連する疾患、疾病もしくは症状の診断および治療法の開発のために、DNA結合タンパク質およびそれらが特異的に結合するコグネート二本鎖DNA分子の同定および特性化の長い間の切実なそして深刻な必要性がある。さらに、前立腺癌を包含する癌に関連する改善された診断および治療法の長い間の切実なそして深刻な必要性がある。本発明は、これらの必要性を満たす。

【特許文献1】Weissman et al., 2000, 米国特許第6,066,452号明細書

【特許文献2】Edwards et al., 2000, 米国特許第6,010,84

50

9号明細書

【特許文献3】Edwards et al., 1999, 米国特許第5, 869, 241号明細書

【特許文献4】Sukhatme, 1999, 米国特許第5, 866, 325号明細書

【非特許文献1】Chiao et al., 1992, Mol. Carcinog. 5: 219-231

【非特許文献2】Fernandez-Pol et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 21198-211204

【非特許文献3】Fernandez-Pol et al., 1994, Cell Growth & Differentiation 5: 821-825

【非特許文献4】Fernandez-Pol, 1996, Anticancer Res. 16: 2177-2186

【非特許文献5】Chan et al., 1996, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 228: 141-147

【非特許文献6】Chan et al., 1996, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 225: 952-956

【非特許文献7】Wool, 1996, Trends in Biochemical Sciences 21: 164-165

【非特許文献8】Wool et al., 1995, Biochem. Cell Biol. 73: 933-947

【非特許文献9】Vaarala et al., 1998, Int. J. Cancer 78: 27-32

【非特許文献10】Chan et al. Nucleic Acids Res. 1993; 21: 649-655

【非特許文献11】Wool, 1997, The ribosomal RNA and Group I introns, pp. 153-178, Green and Schroeder, eds., R. G. Landes Co., Austin, TX

【非特許文献12】Rabbitts, 1991, Cell 67: 641-644

【非特許文献13】Early et al., 1980, Cell 19: 981-992

【非特許文献14】Aguilera et al., 1987, Cell 51: 909-917

【非特許文献15】Halligan and Desiderio, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7019-7023

【非特許文献16】Hamaguchi et al., 1989, Nucleic Acid Res. 17: 9015-9026

【非特許文献17】Mak, 1994, Nucleic Acid Res. 22: 383-390

【非特許文献18】Alt and Baltimore, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4118-4123

【非特許文献19】Croce, 1987, Cell 49: 155-169

【非特許文献20】Garnick and Fair, 1998, Scientific Amer. December: 75-83

【発明の開示】

【0012】

[発明の要約]

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1（PCADM-1）もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸が包含される。

【0013】

本発明にはまた、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1ならびにそのホモログ、バリアン

10

20

30

40

50

ト、突然変異体およびフラグメントをコードする単離された核酸も包含される。

【0014】

一つの態様として、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1（PCADM-1）もしくはそのフラグメントをコードする該単離された核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー1（配列番号：1）をコードする核酸と99%より大きい配列同一性を共有する。

【0015】

別の態様として、該単離された核酸は、配列番号：1に対してヌクレオチド番号190でアデニン、ヌクレオチド番号191でシトシン、ヌクレオチド番号465でシトシン、ヌクレオチド番号475でグアニン、ヌクレオチド番号488でグアニン、そしてヌクレオチド番号505でシトシンを含んでなる。

10

【0016】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸が包含され、ここで、該核酸の配列は配列番号：1の配列からなる。

【0017】

別の態様として、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1（PCADM-1）もしくはそのフラグメントをコードする該単離された核酸は、それに共有結合しているタグポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる。

【0018】

さらに別の態様として、該タグポリペプチドは、mycタグポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグポリペプチド、緑色蛍光タンパク質タグポリペプチド、myc-ビルビン酸キナーゼタグポリペプチド、His6タグポリペプチド、インフルエンザウイルス赤血球凝集素タグポリペプチド、フラグ（flag）タグポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質タグポリペプチドよりなる群から選択される。

20

【0019】

一つの態様として、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1（PCADM-1）もしくはそのフラグメントをコードする該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0020】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を含んでなるベクターが包含される。一つの態様として、本発明には該ベクターを含んでなる組み換え細胞が包含される。

30

【0021】

別の態様として、該ベクターは、哺乳類癌診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0022】

さらに別の態様として、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される。

【0023】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を含んでなる組み換え細胞が包含される。

40

【0024】

本発明にはまた、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を含んでなるベクターを含んでなる組み換え細胞も包含され、ここで、該ベクターは、哺乳類癌診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0025】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸が包含され、該相補的な核酸はアンチセンス

50

の向きである。

【0026】

一つの態様として、該単離された核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と99%より大きい同一性を共有する。

【0027】

別の態様として、該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0028】

さらに別の態様として、該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される。

【0029】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクターが包含され、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、ここで、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする該単離された核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と99%より大きい同一性を共有する。

10

【0030】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクターが包含され、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなり、さらにここで、該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される。

20

【0031】

本発明にはさらに、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなる組み換え細胞が包含され、該相補的な核酸はアンチセンスの向きである。

【0032】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなる組み換え細胞が包含され、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、ここで、該単離された核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と99%より大きい同一性を共有する。

30

【0033】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクターを含んでなる組み換え細胞が包含され、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、ここで、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする該単離された核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と99%より大きい同一性を共有する。

【0034】

本発明には、ベクターを含んでなる組み換え細胞が包含され、該ベクターは、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなり、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなり、さらにここで、該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される。

40

【0035】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有する。

50

【0036】

一つの態様として、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号64でトレオニン（T）、アミノ酸残基番号155でアスパラギン（N）、残基番号159でアラニン（A）、残基番号163でアルギニン（R）、そして残基番号169でアルギニン（R）を含んでなる。

【0037】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2の配列からなる。

【0038】

一つの態様として、該核酸は、それに共有結合しているタグポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる。

【0039】

別の態様として、該タグポリペプチドは、mycタグポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグポリペプチド、緑色蛍光タンパク質タグポリペプチド、myc-ピルビン酸キナーゼタグポリペプチド、His6タグポリペプチド、インフルエンザウイルス赤血球凝集素タグポリペプチド、フラグタグポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質タグポリペプチドよりなる群から選択される。

【0040】

さらに別の態様として、該核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列をコードする核酸をさらに含んでなる。

【0041】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸を含んでなるベクターが包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有し、そしてここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号64でトレオニン（T）、アミノ酸残基番号155でアスパラギン（N）、残基番号159でアラニン（A）、残基番号163でアルギニン（R）、そして残基番号169でアルギニン（R）を含んでなる。

【0042】

一つの態様として、該ベクターは、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0043】

別の態様として、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される。

【0044】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸を含んでなる組み換え細胞が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有する。

【0045】

本発明にはまた、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸を含んでなる組み換え細胞も包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有し、そしてここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号64でトレオニン（T）、アミノ酸残基番号155でアスパラギン（N）、残基番号159でアラニン（A）、残基番号163でアルギニン（R）、そして残基番号169でアルギニン（R）を含んでなる。

【0046】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸を含んでなる組み換え細胞が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は

10

20

30

40

50

配列番号：2の配列からなり、該核酸は、それに共有結合しているタグポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなり、ここで、該タグポリペプチドは、m y cタグポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグポリペプチド、緑色蛍光タンパク質タグポリペプチド、m y c-ピルビン酸キナーゼタグポリペプチド、H i s 6タグポリペプチド、インフルエンザウイルス赤血球凝集素タグポリペプチド、フラグタグポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質タグポリペプチドよりなる群から選択され、そして該核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列をコードする核酸をさらに含んでなる。

【0047】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸を含んでなるベクターを含んでなる組み換え細胞が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有し、そしてここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1の該アミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号64でトレオニン（T）、アミノ酸残基番号155でアスパラギン（N）、残基番号159でアラニン（A）、残基番号163でアルギニン（R）、そして残基番号169でアルギニン（R）を含んでなる。 10

【0048】

一つの態様として、ベクターは細胞に導入した場合に発現される。

【0049】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きである。 20

【0050】

一つの態様として、該相補的な配列は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0051】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクターが包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きである。 30

【0052】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクターが包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、ここで、該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される。

【0053】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、そしてここで、該核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー1（配列番号：1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と99%より大きい同一性を共有する。 40

【0054】

一つの態様として、該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0055】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクターが包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー 50

ー 1 のアミノ酸配列は、配列番号： 2 のアミノ酸配列と 99 % より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、そしてここで、該核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号： 1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99 % より大きい同一性を共有する。

【 0 0 5 6 】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなるベクターが包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー 1 のアミノ酸配列は、配列番号： 2 のアミノ酸配列と 99 % より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、そしてここで、該核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号： 1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99 % より大きい同一性を共有し、そして該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

10

【 0 0 5 7 】

一つの態様として、該単離された核酸は、細胞に導入した場合に発現される。

【 0 0 5 8 】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなる組み換え細胞が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー 1 のアミノ酸配列は、配列番号： 2 のアミノ酸配列と 99 % より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、そしてここで、該核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号： 1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99 % より大きい同一性を共有する。

20

【 0 0 5 9 】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸を含んでなる組み換え細胞が包含され、ここで、該前立腺癌抗原診断マーカー 1 のアミノ酸配列は、配列番号： 2 のアミノ酸配列と 99 % より大きい配列同一性を共有し、該相補的な核酸はアンチセンスの向きであり、そしてここで、該核酸は、ヒト前立腺癌抗原診断マーカー 1（配列番号： 1）の配列を有する核酸と相補的な核酸と 99 % より大きい同一性を共有し、そして該単離された核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【 0 0 6 0 】

一つの態様として、該核酸は該細胞において発現される。

30

【 0 0 6 1 】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 を含んでなる単離されたポリペプチドが包含される。

【 0 0 6 2 】

一つの態様として、該哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 は、配列番号： 2 のアミノ酸と少なくとも 99 % の配列同一性を共有する。

【 0 0 6 3 】

別の態様として、該ポリペプチドは、配列番号： 2 のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号 64 でトレオニン、アミノ酸残基番号 155 でアスパラギン、残基番号 159 でアラニン、残基番号 163 でアルギニン、そして残基番号 169 でアルギニンを含んでなる。

40

【 0 0 6 4 】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー 1 を含んでなる単離されたポリペプチドが包含され、ここで、該単離されたポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号： 2 からなる。

【 0 0 6 5 】

本発明には、前立腺癌抗原診断マーカー 1 ポリペプチドと特異的に結合する単離された核酸が包含される。

【 0 0 6 6 】

50

一つの態様として、該核酸は二本鎖DNAである。

【0067】

別の態様として、該単離された核酸は、核酸配列CACGGATG（配列番号：5）、核酸配列CACAA TGA（配列番号：6）、核酸配列CACAA T G（配列番号：7）および核酸配列CACAA T G T T T T T G T（配列番号：8）よりなる群から選択される核酸配列を含んでなる。

【0068】

本発明には、哺乳類白血病細胞切断点クラスター領域結合タンパク質と特異的に結合する単離された核酸が包含される。

【0069】

10

一つの態様として、該白血病切断点クラスター領域結合タンパク質は、Rag1タンパク質およびRag2タンパク質よりなる群から選択される。

【0070】

さらに別の態様として、該単離された核酸は二本鎖DNAを含んでなり、該DNAは、核酸配列CACGGATG（配列番号：5）および核酸配列CACAA TGA（配列番号：6）よりなる群から選択される核酸配列を含んでなる。

【0071】

本発明には、原核生物の切断点クラスター領域結合タンパク質と特異的に結合する単離された核酸が包含される。

【0072】

20

一つの態様として、該原核生物の切断点クラスター領域結合タンパク質は、RecAタンパク質およびRecBタンパク質よりなる群から選択される。

【0073】

別の態様として、該ポリペプチドは、配列CACGGATG（配列番号：5）からなる核酸、配列CACAA TGA（配列番号：6）からなる核酸、配列CACAA T G（配列番号：7）からなる核酸および配列CACAA T G T T T T T G T（配列番号：8）からなる核酸よりなる群から選択される核酸の少なくとも一つと特異的に結合する。

【0074】

本発明には単離された酵素核酸（enzymatic nucleic acid）が包含され、ここで、該核酸は、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する。

30

【0075】

一つの態様として、該単離された酵素核酸の核酸配列は、配列番号：9の配列（GATCTTCAGGCTAGCTACAAACGAGTCCCTTGA）および配列番号：10の配列（GTTCCCCAGGCTAGCTACAAACGACCCAGGGC）よりなる群から選択される。

【0076】

本発明には単離された酵素核酸が包含され、ここで、該核酸は、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断し、そしてさらにここで、該単離された酵素核酸の配列は、配列番号：9の配列および配列番号：10の配列よりなる群から選択される。

40

【0077】

本発明にはまた、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断し、そしてさらに、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸が配列番号：1の配列もしくはその一部を有する核酸を含んでなる、単離された酵素核酸も包含される。

【0078】

一つの態様として、該酵素核酸は少なくとも一つの結合アームを含んでなり、そしてさらにここで、該結合アームは配列番号：1もしくはその一部に相補的な配列を含んでなる。

50

【0079】

別の態様として、該核酸は、それに操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を特定する核酸をさらに含んでなる。

【0080】

さらに別の態様として、該核酸は「10～23」モチーフ構造を含んでなる触媒ドメインを含んでなる。

【0081】

さらなる態様として、該酵素核酸は触媒コアドメインを含んでなり、そして該ドメインの側面に位置する少なくとも一つの結合アームをさらに含んでなり、ここで、該結合アームは約6～10個のヌクレオチドを含んでなる。

10

【0082】

別の態様として、該側面に位置するヌクレオチドは、配列番号：1もしくはその一部に相補的な配列を含んでなる。

【0083】

本発明には、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する単離された酵素核酸が包含され、ここで、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする該核酸によりコードされる前立腺癌抗原診断マーカー1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と99%より大きい配列同一性を共有する。

【0084】

本発明には、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する酵素核酸が包含され、該酵素核酸は、配列GATCTTCAGGCTAGCTACAAACGAGTCCCTTGA（配列番号：9）および配列GTTCCCCAGGCTAGCTACAAACGACCCAGGGC（配列番号：10）を含んでなる。

20

【0085】

本発明には、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する単離された酵素核酸が包含され、ここで、該酵素核酸の核酸配列は、配列番号：9の配列および配列番号：10の配列よりなる群から選択される。

【0086】

一つの態様として、該酵素核酸は結合アームを含んでなり、ここで、該結合アームは配列番号：1もしくはその一部に相補的な配列を含んでなる。

30

【0087】

別の態様として、該結合アームは約6～10個のヌクレオチドを含んでなる。

【0088】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1ポリペプチドもしくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体が包含される。

【0089】

一つの態様として、該抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体および合成抗体よりなる群から選択される。

【0090】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1ポリペプチドもしくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物が包含される。

40

【0091】

本発明にはまた、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物も包含される。

【0092】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー1を含んでなる単離されたポリペプチドおよび製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物が包含される。

【0093】

50

本発明には、前立腺癌抗原診断マーカー１ポリペプチドと特異的に結合する単離された核酸および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物が包含される。

【００９４】

本発明にはまた、単離された酵素核酸（ここで、該単離された酵素核酸は、前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する）および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物も包含される。

【００９５】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー１ポリペプチドもしくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体および製薬学的に許容しうる担体を含んでなる組成物が包含される。

10

【００９６】

本発明には、哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー１もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を含んでなるトランスジェニック非ヒト哺乳類が包含される。

【００９７】

本発明には、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー１の異常発現（mal-expression）により媒介される疾患を処置する方法が包含される。該方法は、前立腺癌抗原診断マーカー１の異常発現により媒介される疾患にかかっているヒトに哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー１もしくはそのフラグメントをコードする単離された核酸に相補的な単離された核酸、前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する単離された酵素核酸、および哺乳類前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体よりなる群から選択される少なくとも一つの物質の発現阻害量を投与することを含んでなる。

20

【００９８】

一つの態様として、該疾患は前立腺癌である。

【００９９】

別の態様として、該哺乳類はヒトおよびイヌよりなる群から選択される

さらに別の態様として、該方法は、血管上皮増殖因子１（VEGF-1）およびメタロプロテイナーゼ２（MMP-2）よりなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する酵素核酸を投与することをさらに含んでなる。

30

【０１００】

本発明には、哺乳類における前立腺癌を診断する方法が包含される。該方法は、哺乳類から生体サンプルを得ること、該生体サンプルにおけるPCADM-1のレベルを評価すること、および該生体サンプルにおけるPCADM-1のレベルを前立腺癌にかかっている類似哺乳類から得られる生体サンプルにおけるPCADM-1のレベルと比較すること（ここで、該類似哺乳類からの生体サンプルにおけるPCADM-1のレベルと比較して該哺乳類からの生体サンプルにおけるPCADM-1の高いレベルは、該哺乳類が前立腺癌にかかっている指標である）、それにより該哺乳類における前立腺癌を診断することを含んでなる。

【０１０１】

一つの態様として、該哺乳類はヒトおよびイヌよりなる群から選択される。

40

【０１０２】

別の態様として、該生体サンプルは、前立腺組織サンプル、血液サンプル、尿サンプル、痰サンプル、腹腔腔液サンプル、会陰腔液サンプル、胸膜腔液サンプル、精液サンプル、前立腺液サンプル、便サンプルおよび骨髓サンプルよりなる群から選択される。

【０１０３】

本発明には、哺乳類における前立腺癌を診断する方法が包含される。該方法は、哺乳類から生体サンプルを得ること、該生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体のレベルを評価すること、および該生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体のレベルを前立腺癌にかかっている類似哺乳

50

類から得られる生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体のレベルと比較すること（ここで、該類似哺乳類からの生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体のレベルと比較して該哺乳類からの生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体の高いレベルは、該哺乳類が前立腺癌にかかっている指標である）、それにより該哺乳類における前立腺癌を診断することを含んでなる。

【０１０４】

一つの態様として、該哺乳類はヒトおよびイヌよりなる群から選択される。

【０１０５】

別の態様として、該生体サンプルは前立腺組織サンプル、血液サンプル、尿サンプル、痰サンプル、腹膜腔液サンプル、会陰腔液サンプル、胸膜腔液サンプル、精液サンプル、前立腺液サンプル、便サンプルおよび骨髄サンプルよりなる群から選択される。

【０１０６】

本発明には、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現に影響を及ぼす試験化合物を同定する方法が包含される。該方法は、細胞を試験化合物と接触させることおよび該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルを該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較することを含んでなり、ここで、該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のいかもしくは低いレベルは、該試験化合物が細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現に影響を及ぼす指標である。一つの態様として、本発明には、該方法により同定される化合物が包含される。

【０１０７】

本発明には、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現を減少する化合物を同定する方法が包含される。該方法は、細胞を試験化合物と接触させることおよび該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルを該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較することを含んでなり、ここで、該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現の低いレベルは、該試験化合物が細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現を減少する指標である。一つの態様として、本発明には、該方法により同定される化合物が包含される。

【０１０８】

本発明には、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現を増加する化合物を同定する方法が包含される。該方法は、細胞を試験化合物と接触させることおよび該細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルを該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較することを含んでなり、ここで、該試験化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１発現の高いレベルは、該試験化合物が細胞における前立腺癌抗原診断マーカー１の発現を増加する指標である。一つの態様として、本発明には、該方法により同定される化合物が包含される。

【０１０９】

本発明には、前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸と前立腺癌抗原診断マーカー１との結合に影響を及ぼす化合物を同定する方法が包含される。該方法は、化合物の存在下での前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合のレベルを該化合物がない場合の前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合のレベルと比較すること（ここで、該化合物がない場合の前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合のレベルと比較して該化合物の存在下

での前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸との前立腺癌抗原診断マーカー１結合の high かもしくは低いレベルは、該化合物が前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸と前立腺癌抗原診断マーカー１との結合に影響を及ぼす指標である）、それにより前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸と前立腺癌抗原診断マーカー１との結合に影響を及ぼす化合物を同定することを含んでなる。

【０１１０】

一つの態様として、前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する該二本鎖核酸は、配列 C A C G G A T G（配列番号：５）、配列 C A C A A T G A（配列番号：６）、配列 C A C A A T G（配列番号：７）および配列 C A C A A T G T T T T T G T（配列番号：８）よりなる群から選択される配列を有する。

10

【０１１１】

別の態様として、該前立腺癌抗原診断マーカー１は、配列番号：２の配列と ９９％より大きいアミノ酸相同性を共有する配列を有する。さらに別の態様として、本発明には、該方法により同定される化合物が包含される。

【０１１２】

本発明には、前立腺癌にかかっているヒトの処置をモニターする方法が包含される。該方法は：

- （ａ）前立腺癌抗原診断マーカー１の初期レベルを決定するためにヒトから得られる第一の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルを評価すること；
- （ｂ）該ヒトに抗前立腺癌治療を施すこと；
- （ｃ）該治療の間もしくは後に該ヒトから得られる第二のそのほかの点では同一の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルを評価すること；
- （ｄ）該第一の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルを該第二の生体サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルと比較すること；および
- （ｅ）前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルの任意の減少を該抗前立腺癌治療の効果と関連させること、

20

それにより、前立腺癌にかかっているヒトの処置をモニターすることを含んでなる。

【０１１３】

一つの態様として、該方法は、該前立腺癌の存続期間、該ヒトの寿命および該抗前立腺癌治療の期間よりなる群から選択される期間の間に（ｂ）～（ｅ）を繰り返すことをさらに含んでなる。

30

【０１１４】

別の態様として、前立腺癌抗原診断マーカー１のレベルは、前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする核酸を検出する方法および前立腺癌抗原診断マーカー１を検出する方法よりなる群から選択される方法を用いて評価される。

【０１１５】

さらに別の態様として、前立腺癌抗原診断マーカー１を検出する方法は、前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体を検出する方法および前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する二本鎖核酸の結合を検出する方法（ここで、該核酸は、配列番号：５の配列を有する核酸、配列番号：６の配列を有する核酸、配列番号：７の配列を有する核酸および配列番号：８の配列を有する核酸よりなる群から選択される）よりなる群から選択される。

40

【０１１６】

本発明には、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー１の異常発現により媒介される疾患を軽減するためのキットが包含される。該キットは、前立腺癌抗原診断マーカー１と特異的に結合する抗体、前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする核酸に相補的な単離された核酸（該相補的な核酸はアンチセンスの向きである）、および前立腺癌抗原診断マーカー１をコードする核酸から転写される R N A を特異的に切断する単離された酵素核酸よりなる群から選択される少なくとも一つの分子の前立腺癌抗原診断マーカー１発現阻害量

50

を含んでなり、該キットはアプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる。

【0117】

一つの態様として、該疾患は前立腺癌である。

【0118】

別の態様として、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるRNAを特異的に切断する該単離された酵素核酸は、配列番号：9の配列および配列番号：10の配列よりなる群から選択される配列を含んでなる。

【0119】

なおさらなる態様として、該キットは血管上皮増殖因子1 (VEGF-1) およびマトロプロテイナーゼ2 (MMP-2) よりなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する酵素核酸をさらに含んでなる。

【0120】

本発明には、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー1の異常発現により媒介される疾患を処置するためのキットが包含され、該キットは、前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する抗体、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸に相補的な単離された核酸（該相補的な核酸はアンチセンスの向きである）、および前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸から転写されるmRNAを特異的に切断する単離された酵素核酸よりなる群から選択される少なくとも一つの分子の前立腺癌抗原診断マーカー1発現阻害量を含んでなり、該キットはアプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる。

【0121】

本発明には、サンプルにおける前立腺癌抗原診断マーカー1のレベルを評価するためのキットが包含される。該キットは、前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する分子を含んでなり、該キットはアプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる。

【0122】

一つの態様として、前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する該分子は、前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する抗体および前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する二本鎖核酸よりなる群から選択される。

【0123】

一つの態様として、前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする該核酸は、配列番号：1の配列を有する核酸と99%より大きい配列同一性を共有する。

【0124】

別の態様として、該前立腺癌抗原診断マーカー1ポリペプチドは、配列番号：2の配列と99%より大きいアミノ酸配列同一性を共有する。

【0125】

さらなる態様として、前立腺癌抗原診断マーカー1と特異的に結合する該二本鎖核酸は、配列C A C G G A T G（配列番号：5）、配列C A C A A T G A（配列番号：6）、配列C A C A A T G（配列番号：7）および配列C A C A A T G T T T T T G T（配列番号：8）よりなる群から選択される配列を含んでなる。

【0126】

本発明には、哺乳類における前立腺癌抗原診断マーカー1を検出するためのキットが包含される。該キットは、前立腺癌抗原診断マーカー1ポリペプチドともしくは前立腺癌抗原診断マーカー1をコードする核酸と特異的に結合する分子を含んでなり、該キットはアプリケーション、およびその使用のための説明用資料をさらに含んでなる。

【0127】

一つの態様として、該哺乳類はイヌおよびヒトよりなる群から選択される。

【0128】

別の態様として、前立腺癌抗原診断マーカー1ポリペプチドと特異的に結合する該分子

は、前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する抗体および前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する二本鎖核酸よりなる群から選択される。

【0129】

さらに別の態様として、前立腺癌抗原診断マーカー 1 と特異的に結合する該二本鎖核酸は、配列 C A C G G A T G (配列番号：5)、配列 C A C A A T G A (配列番号：6)、配列 C A C A A T G (配列番号：7) および配列 C A C A A T G T T T T T G T (配列番号：8) よりなる群から選択される配列を有する。

【0130】

さらなる態様として、前立腺癌抗原診断マーカー 1 をコードする核酸と特異的に結合する該分子は、配列番号：1 の配列と 99% より大きい配列同一性を共有する核酸と相補的な核酸よりなる群から選択される。 10

【0131】

本発明には、DNA 結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの同定のためのモンテカルロ様スクリーニングアッセイが包含される。該アッセイは：

(a) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること (ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 塩基対を含んでなる既知の配列が側面に位置するランダムコアヌクレオチド配列を含んでなる) ; および

(b) DNA 結合タンパク質と特異的に結合する該組の任意のオリゴヌクレオチドメンバーを検出すること、それにより DNA 結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを同定すること 20
を含んでなる。

【0132】

一つの態様として、本発明には、該アッセイにより同定される DNA 結合タンパク質と特異的に結合する単離された二本鎖オリゴヌクレオチドが包含される。

【0133】

一つの態様として、(b) の検出することは、電気泳動移動度シフトアッセイおよびポリペプチドと結合している二本鎖オリゴヌクレオチドを検出する方法よりなる群から選択される方法を含んでなる。

【0134】

別の態様として、該ランダムコアヌクレオチド配列は、約 3 ~ 12 塩基対を含んでなる 30
。

【0135】

さらに別の態様として、該二本鎖オリゴヌクレオチドは、約 7 ~ 16 塩基対の長さの間である。

【0136】

さらなる態様として、該ランダムコアヌクレオチド配列は、7 塩基対、8 塩基対および 9 塩基対よりなる群から選択される長さを含んでなる。

【0137】

なおさらなる態様として、該アッセイは：

(c) DNA 結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの配列 40
を同定すること ; ならびに

(d) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること (ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、(c) において同定される既知の側面に位置する配列からなり、該オリゴヌクレオチドは、未知のランダムコア配列が (c) において同定される配列より 1 個少ない未知の塩基対からなるように追加の既知のものをさらに含んでなる)、および二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を検出しそして同定するアッセイ段階を繰り返すことをさらに含んでなる。

【0138】

別の態様として、該アッセイは、DNA 結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの全配列が同定されるまで (a) ~ (d) を繰り返すことをさらに 50

含んでなる。

【0139】

本発明には、腫瘍と関連するDNA結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを同定する方法が包含され、該方法は：

(a) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも2塩基対を含んでなる既知の配列が側面に位置するランダムコアヌクレオチド配列を含んでなる）；

(b) 該組における二本鎖オリゴヌクレオチドの1つもしくはそれ以上がDNA結合タンパク質と特異的に結合する条件下で、該組の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを腫瘍細胞もしくは組織から調製されたDNA結合タンパク質を含んでなる混合物を含有するサンプルと混合すること；

(c) 該組における二本鎖オリゴヌクレオチドの1つもしくはそれ以上がDNA結合タンパク質と特異的に結合する条件下で、該組の同一の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを腫瘍を含んでならないそのほかの点では同一の細胞もしくは組織から調製されたDNA結合タンパク質を含んでなる混合物を含有するそのほかの点では同一のサンプルと混合すること；

(d) (a) および (b) において任意の特異的オリゴヌクレオチド-タンパク質結合を検出すること；および

(e) (b) においてDNA結合タンパク質と特異的に結合するが (c) においてDNA結合タンパク質と特異的に結合しない任意の二本鎖オリゴヌクレオチドを同定すること、それにより腫瘍と関連するDNA結合タンパク質と特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを同定すること

を含んでなる。

【0140】

一つの態様として、本発明には、この方法により同定される単離された二本鎖オリゴヌクレオチドが包含される。

【0141】

別の態様として、(d) の検出することは、電気泳動移動度シフトアッセイおよびポリペプチドと結合している標識した二本鎖オリゴヌクレオチドを検出する方法よりなる群から選択される方法を含んでなる。

【0142】

さらに別の態様として、該ランダムコアヌクレオチド配列は、約3～12塩基対を含んでなる。

【0143】

さらなる態様として、該二本鎖オリゴヌクレオチドは、約7～16塩基対の長さの間である。

【0144】

なおさらなる態様として、該ランダムコアヌクレオチド配列は、7塩基対、8塩基対および9塩基対よりなる群から選択される長さを含んでなる。

【0145】

別の態様として、該方法は：

(f) (e) においてDNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を同定すること；

(g) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、(f) において同定される既知の側面に位置する配列からなり、該オリゴヌクレオチドは、未知のランダムコア配列が(f) において同定される配列より1個少ない未知の塩基対からなるように該未知のランダムコア配列に隣接する追加の既知の塩基対をさらに含んでなる）；ならびに

(h) (b) および (e) を繰り返すこと
をさらに含んでなる。

10

20

30

40

50

【0146】

一つの態様として、該方法は、DNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの全配列が同定されるまで(b)～(h)を繰り返すことをさらに含んでなる。

【0147】

本発明には、二本鎖DNA結合タンパク質の同定のためのモンテカルロ様スクリーニングアッセイが包含される。該アッセイは：

(a) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも2塩基対を含んでなる既知の配列が側面に位置するランダムコアヌクレオチド配列を含んでなる）；および

(b) 該組のオリゴヌクレオチドメンバーと特異的に結合する任意のDNA結合タンパク質を検出すること、それにより二本鎖DNA結合タンパク質を同定することを含んでなる。

【0148】

一つの態様として、(b)の検出することは、電気泳動移動度シフトアッセイおよびポリペプチドと結合している二本鎖オリゴヌクレオチドを検出する方法よりなる群から選択される方法を含んでなる。

【0149】

別の態様として、該ランダムコアヌクレオチド配列は、約3～12塩基対を含んでなる。

【0150】

さらに別の態様として、該二本鎖オリゴヌクレオチドは、約7～16塩基対の長さの間である。

【0151】

さらなる態様として、該ランダムコアヌクレオチド配列は、7塩基対、8塩基対および9塩基対よりなる群から選択される長さを含んでなる。

【0152】

別の態様として、該アッセイは：

(c) DNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を同定すること；

(g) 半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組を作製すること（ここで、各二本鎖オリゴヌクレオチドは、(c)において同定される既知の側面に位置する配列からなり、該オリゴヌクレオチドは、未知のランダムコア配列が(c)において同定される配列より1個少ない未知の塩基対からなるように追加の既知のものをさらに含んでなる）、および二本鎖オリゴヌクレオチドの配列を検出しそして同定するアッセイ段階を繰り返すことをさらに含んでなる。

【0153】

さらなる態様として、該アッセイは、DNA結合タンパク質と最大の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドの全配列が同定されるまでアッセイの段階を繰り返すことをさらに含んでなる。

【0154】

別の態様として、本発明には、該アッセイにより同定される単離された二本鎖DNA結合タンパク質が包含される。

【0155】

本発明には、PCADM-1をコードするmRNAを特異的に切断するDNA酵素を設計する方法が包含される。該方法は、(a) 触媒コアドメインを含んでなる試験核酸を合成すること（ここで、該コアドメインは、相補的アームを含んでなる核酸が側面に位置し、そしてここで、該相補的アームの配列は、配列番号：1の配列を含んでなる配列と相補的な配列から選択され、そしてさらにここで、該相補的アーム配列は約8～10ヌクレオチドの長さである）；および(b) 該試験核酸がPCADM-1をコードするmRNAを

10

20

30

40

50

特異的に切断するかどうかを評価すること、それにより P C A D M-1 をコードする m R N A を特異的に切断する D N A 酵素を設計することを含んでなる。

【0156】

一つの態様として、本発明には、該方法により設計される D N A 酵素が包含される。

【0157】

本発明には、P C A D M-1 をコードする m R N A を特異的に切断する D N A 酵素を同定する方法が包含される。該方法は：(a) 結合アームを含んでなる核酸が側面に位置する触媒コアドメインを含んでなる試験核酸を合成すること（ここで、該結合アームの配列は、翻訳開始部位に対して配列番号：1 の約ヌクレオチド-9 ～約ヌクレオチド+450 を含んでなる配列に相補的であり、そしてさらにここで、該結合アーム配列は約8～10ヌクレオチドの長さである）；および(b) 該試験核酸が P C A D M-1 をコードするリボ核酸を特異的に切断するかどうかを評価すること、それにより P C A D M-1 をコードするリボ核酸を特異的に切断する D N A 酵素を同定することを含んでなる。

【0158】

一つの態様として、該結合アームの配列は、該翻訳開始部位に対して配列番号：1 の約ヌクレオチド+155 ～約ヌクレオチド+171 を含んでなる配列に相補的である。さらなる態様として、本発明には該方法により同定される D N A 酵素が包含される。

【0159】

別の態様として、該結合アームの配列は、該翻訳開始部位に対して配列番号：1 の約ヌクレオチド-7 ～約ヌクレオチド+9 を含んでなる配列に相補的である。

【0160】

本発明には、細胞における前立腺癌抗原診断マーカー1 の発現を阻害する方法が包含される。該方法は、該前立腺癌抗原診断マーカー1 をコードする核酸から転写される m R N A を特異的に切断する単離された酵素核酸を細胞に投与すること、それにより該細胞における該前立腺癌抗原診断マーカー1 の発現を阻害することを含んでなる、

一つの態様として、該単離された酵素核酸は、配列番号：9 の配列を有する酵素核酸および配列番号：10 の配列を有する酵素核酸よりなる群から選択される。

[発明の詳細な記述]

本発明は、D N A 結合タンパク質およびそれらのコグネイト D N A 分子結合相手の同定のための新規な「モンテカルロ様」アッセイに関する。さらに、本発明は、新規な D N A 結合タンパク質およびそれらと特異的に結合するコグネイト D N A 配列の同定に関する。すなわち、本発明は、P C A D M-1（前立腺癌抗原診断マーカー1、以前は P S T F-1 と呼ばれた）と称する、新規な D N A 結合タンパク質の核酸およびアミノ酸配列を提供する。本発明はさらに、P C A D M-1 を切断する、P C A D M-1 に相補的な核酸酵素（P C A D M-1 D N A Z Y M と称する）、およびそれらを用いて癌を処置する方法に関する。

【0161】

本発明は、前立腺癌にかかっていないことが既知であるヒトから得られるそのほかの点では同一の生体サンプルにおける P C A D M-1 のレベルと比較して生体サンプルにおける P C A D M-1 のレベルを評価することにより患者における前立腺癌の有無を容易に且つ効率よく評価する P C A D M-1 に基づくアッセイに関する。国際出願第 P C T / U S 0 0 / 2 5 9 8 1 号の開示は、本明細書に引用することによりその全部が本明細書に組み込まれる。

【0162】

本明細書に開示するように、P C A D M-1 の発現は、前立腺癌組織においてそして前立腺癌患者の尿において増加されていることもまた見出された。さらに、P C A D M-1 の発現は、整合する精囊（S V）、良性前立腺過形成（B P H）もしくは高悪性度前立腺上皮内新生物（H G P I N）病巣における P C A D M-1 のレベルと比較して前立腺癌腫瘍からの核タンパク質抽出物において特に増加されている。さらに、本明細書に開示するデータは、生体サンプルにおける P C A D M-1 タンパク質のレベルと調べた前立腺癌の

グリーソンスコア（GS）との間の相関関係を示し、従って、PCADM-1は、前立腺癌の正確な病期診断に有用なステージ特異的前立腺癌マーカーであり得ることを示す。

【0163】

さらに、本発明は、PCADM-1発現の調節およびそれにより媒介される前立腺癌を包含する癌を処置する方法に関する。本明細書に開示するデータは、PCADM-1の発現が前立腺癌と関連することを示唆し、そして本発明は、前立腺癌を包含する、PCADM-1の改変された発現と関連する疾患、疾病もしくは症状を処置することおよび診断することに有用な診断の方法ならびに治療法の開発の方法を提供する。

定義

本明細書において用いる場合、以下の用語の各々は、本節におけるそれと関連する意味を有する。 10

【0164】

冠詞「a」および「an」は、該冠詞の文法的対象の1つもしくは1つより多く（すなわち、少なくとも1つ）をさすために本明細書において用いる。一例として、「要素（an element）」は、1つの要素もしくは1つより多くの要素を意味する。

【0165】

本明細書において用いる場合、「隣接する」という用語は、介在するヌクレオチドがない、相互に直接結合しているヌクレオチド配列をさすために用いる。一例として、ペンタヌクレオチド5'-AAAAA-3'はトリヌクレオチド5'-TTT-3'に、これら2つがこのように：5'-AAAAATT-3'もしくは5'-TTTAAAAA-3' 20
'連結されている場合には隣接しているが、これら2つがこのように：5'-AAAAACATT-3'連結されている場合には隣接していない。

【0166】

本明細書において用いる場合、アミノ酸は、以下の表に示すように、そのフルネームで、それに対応する3文字コードで、もしくはそれに対応する1文字コードで表される。

フルネーム	3文字コード	1文字コード
アスパラギン酸	Asp	D
グルタミン酸	Glu	E
リシン	Lys	K
アルギニン	Arg	R
ヒスチジン	His	H
チロシン	Tyr	Y
システイン	Cys	C
アスパラギン	Asn	N
グルタミン	Gln	Q
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
グリシン	Gly	G
アラニン	Ala	A
バリン	Val	V
ロイシン	Leu	L
イソロイシン	Ile	I
メチオニン	Met	M
プロリン	Pro	P
フェニルアラニン	Phe	F
トリプトファン	Trp	W

本明細書に用いる場合、癌を「軽減する」ことは、前立腺癌の一つもしくはそれ以上の症状の重さを軽減することを意味する。これには、処置の方法の前のもしくはそれがない場合の患者におけるPCADM-1のレベルと比較して、患者において、細胞もしくは組織において発現されるPCADM-1のレベルを減少すること、細胞増殖のレベルを減少 50

すること、血流におけるまたは尿もしくは他の体液における P C A D M-1 のレベルを減少することもしくは増加することなどを包含することができるが、これらに限定されるものではない。

【0167】

「P C A D M-1 の改変された発現」という用語は、本明細書において用いる場合、細胞、組織、器官もしくは体液における P C A D M-1 の発現のレベルが、そのほかの点では同一の細胞、組織、器官もしくは体液（ここで、そのほかの点では同一の細胞、組織、器官もしくは体液は、前立腺癌、他の癌および骨粗鬆症のような変性疾患、免疫抑制疾患もしくは炎症性疾患のような、しかしこれらに限定されるものではない、P C A D M-1 の発現と関連するかもしくはそれにより媒介される任意の検出可能な疾患、疾病もしくは症状を示さない正常患者から得られる）における P C A D M-1 の発現のレベルより検出可能に高いかもしくは低いことを意味する。

10

【0168】

「アンチセンス」は、特に、タンパク質をコードする二本鎖 D N A 分子の非コーディング鎖の核酸配列もしくは非コーディング鎖に実質的に相同な配列をさす。本明細書に定義するように、アンチセンス配列は、タンパク質をコードする二本鎖 D N A 分子の配列に相補的である。アンチセンス配列は、D N A 分子のコーディング鎖のコーディング部分にのみ相補的である必要はない。アンチセンス配列は、タンパク質をコードする D N A 分子のコーディング鎖上に特定される調節配列に相補的であることができ、これらの調節配列は、コーディング配列の発現を制御する。

20

【0169】

「アプリケーションター」という用語は、該用語を本明細書において用いる場合、哺乳類に本発明の P C A D M-1 核酸、タンパク質および／もしくは組成物を投与するための、皮下注射器、ピペットなどが包含されるがこれらに限定されるものではない任意の装置を意味する。

【0170】

「生体サンプル」は、該用語を本明細書において用いる場合、P C A D M-1 の発現のレベル、存在する P C A D M-1 タンパク質のレベル、もしくは両方を評価するために用いることができる動物から得られるサンプルを意味する。そのようなサンプルには、血液サンプル、前立腺生検、尿サンプル、前立腺液、精液、リンパ液、会陰腔液サンプル、腹腔腔液サンプル、胸膜腔液サンプル、骨髓サンプル、唾液腺液および精囊組織サンプルが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0171】

「切断点クラスター領域」は、本明細書において用いる場合、白血病に関する研究において同定されるもののような、しかしこれらに限定されるものではない、染色体転座部位と関連する核酸配列をさす。

【0172】

「候補抗 P C A D M-1 薬」は、該用語を本明細書において用いる場合、細胞と接触させた時に、細胞を化合物と接触させる前の該細胞における P C A D M-1 発現のレベルと比較して該細胞における P C A D M-1 をコードする核酸の発現のレベルを減少する化合物を意味し、もしくは該化合物は、該化合物と接触していないそのほかの点では同一の細胞における P C A D M-1 発現のレベルと比較して該細胞における発現のレベルを減少する。

40

【0173】

「P C A D M-1 をコードする核酸の一部もしくは全部に相補的な」は、P C A D M-1 タンパク質をコードしない核酸の配列を意味する。むしろ、細胞において発現されている該配列は、P C A D M-1 タンパク質をコードする核酸の非コーディング鎖と同一であり、従って、P C A D M-1 タンパク質をコードしない。

【0174】

「相補的な」および「アンチセンス」という用語は、本明細書において用いる場合、全

50

く同意語というわけではない。「アンチセンス」は、特に、タンパク質をコードする二本鎖DNA分子の非コーディング鎖の核酸配列もしくは非コーディング鎖に実質的に相同な配列をさす。「相補的な」は、本明細書において用いる場合、2つの核酸、例えば2つのDNA分子間で相補的なサブユニット配列の広範な概念をさす。該分子の両方のあるヌクレオチド位置が、通常は相互に塩基対合することができるヌクレオチドで占められている場合、該核酸はこの位置で相互に相補的であると考えられる。従って、2つの核酸は、分子の各々の対応する位置の十分な数（少なくとも50%）が、通常は相互に塩基対合するヌクレオチド（例えば、A:TおよびG:Cヌクレオチド対）で占められる場合に相互に相補的である。

【0175】

10

遺伝子の「コーディング領域」は、遺伝子の転写により生産されるmRNA分子のコーディング領域とそれぞれ相同であるかもしくは相補的である、遺伝子（すなわち、エキソン）のコーディング鎖のヌクレオチド残基および遺伝子の非コーディング鎖のヌクレオチドからなる。

【0176】

mRNA分子の「コーディング領域」はまた、mRNA分子の翻訳中にトランスファーRNA分子のアンチコドン領域とマッチするかもしくは終止コドンにコードするmRNA分子のヌクレオチド残基からなる。従って、コーディング領域は、mRNA分子によりコードされる成熟タンパク質に存在しないアミノ酸残基（例えば、タンパク質移行シグナル配列におけるアミノ酸残基）に対応するヌクレオチド残基を含むことができる。

20

【0177】

「コンセンサス」という用語は、本明細書において用いる場合、未解読（uncalled）塩基を解明するために再シーケンスされているか、またはRT-PCR伸長キット（例えば、Perkin Elmer, Norwalk, CTから入手可能であるもののような）を用いて5'および/もしくは3'方向に伸長されそして再シーケンスされているか、または一つより多くの得られるクローンの重複配列から組み立てられている（もしくは伸長され且つ組み立てられている）核酸配列を意味する。

【0178】

遺伝子の「非コーディング」領域は、タンパク質へのmRNA翻訳に関与するリボソームタンパク質へのmRNA結合に重要である「リーダー配列」を包含する遺伝子（すなわち、イントロン）のヌクレオチド残基からなる。

30

【0179】

「PCADM-1 DNAZYM-1」は、該用語を本明細書において用いる場合、PCADM-1 mRNAを特異的に標的とする、配列番号：9を含んでなるDNAZYMを意味する。

【0180】

「PCADM-1 DNAZYM-2」は、本明細書において用いる場合、PCADM-1 mRNAを特異的に標的とする、配列番号：10を含んでなるDNAZYMを意味する。

【0181】

40

「DNA-タンパク質ハイブリダイゼーションアッセイ」は、本明細書において用いる場合、特定のDNA配列と結合するタンパク質（1つもしくは複数）の同定のための、そしてDNAへのタンパク質結合の量を評価するための結合アッセイをさす。

【0182】

「基質相補的アーム」は、DNAZYMのその基質の部分に相補的な（すなわち、塩基対合することができる）部分を意味する。一般に、そのような相補的配列は8塩基対配列で100%であるが、必要に応じてさらに少ないかもしくはさらに多いことができる。例えば、8~10のうちわずか4塩基が塩基対合することができる。

【0183】

「電気泳動移動度シフトアッセイ」もしくは「EMSA」は、これらの用語を本明細書

50

において用いる場合、特定のDNA配列に結合するタンパク質（1つもしくは複数）の同定のための、そしてDNAへのタンパク質結合の量を評価するためのゲルに基づくアッセイをさす。

「コードすること」は、ヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）の特定の配列もしくはアミノ酸の特定の配列のいずれかを有する生物学的プロセスにおいて他のポリマーおよび高分子の合成の鋳型として働く、遺伝子、cDNAもしくはmRNAのようなポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの特定の配列の固有の特性およびそれに起因する生物学的特性をさす。従って、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が細胞もしくは他の生物系においてタンパク質を生産する場合に該タンパク質をコードする。コーディング鎖（そのヌクレオチド配列はmRNA配列と同一であり、そして通常、配列表に提供される）および非コーディング鎖（遺伝子もしくはcDNAの転写の鋳型として用いられる）は両方とも、タンパク質またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードすると言うことができる。

10

【0184】

他に特定しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、相互の縮重バージョンでありそして同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列が包含される。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含むことができる。

【0185】

「高い酵素活性」には、細胞においてそして／もしくはインビボ（*in vivo*）において測定される活性が包含されるものとし、ここで、該活性は、触媒活性およびPCADM-1 DNAZYME安定性の両方を反映したものである。

20

【0186】

本明細書において用いる場合、「固相酵素免疫サンドイッチアッセイ」は、タンパク質の同定のためのそして細胞もしくは組織調製物におけるタンパク質レベルの測定のための抗体に基づくアッセイである。

【0187】

「触媒もしくは酵素ドメイン」は、RNA基質の切断にとって必須であるDNA酵素の部分を意味する。

【0188】

PCADM-1に「同等な」RNAには、ヒトを包含する様々な動物における癌と関連する天然に存在するRNA分子が包含されるものとする。「相補的な」は、伝統的なワトソン-クリックもしくは他の非伝統的なタイプの塩基対合相互作用のいずれかにより別のRNA配列と水素結合（1つもしくは複数）を形成することができる核酸を意味する。

30

【0189】

「発現ベクター」は、発現されるヌクレオチド配列に操作可能に連結された発現制御配列を含んでなる組み換えポリヌクレオチドを含んでなるベクターをさす。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用要素を含んでなり；発現のための他の要素は、宿主細胞によりもしくはインビトロ（*in vitro*）発現系において供給されることができる。発現ベクターには、組み換えポリヌクレオチドを組み込む、コスミド、プラスミド（例えば、裸のもしくはリポソームに含有される）およびウイルス（例えば、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）のような、当該技術分野において既知である全てのものが包含される。

40

【0190】

オリゴヌクレオチドの第一の領域は、オリゴヌクレオチドの第二の領域に対して、これら2つの領域が相互に隣接する場合にもしくはこれら2つの領域が約100ヌクレオチド以下、そして好ましくは約50ヌクレオチド以下、より好ましくは約40ヌクレオチド以下、さらにより好ましくは約30ヌクレオチド以下、さらにより好ましくは約20ヌクレオチド以下、好ましくは約10ヌクレオチド以下で、そしてさらにより好ましくは約5ヌクレオチド以下で隔てられている場合に「側面に位置する」。

50

【0191】

本明細書において用いる場合、「フラグメント」という用語は、核酸に適用する場合、通常、少なくとも20ヌクレオチドの長さ、典型的には少なくとも約30ヌクレオチド、さらに典型的には約50～約100ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約100～約200ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも約200ヌクレオチド～約300ヌクレオチド、なおさらにより好ましくは少なくとも約300～約350、さらにより好ましくは少なくとも約350ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、なおさらにより好ましくは少なくとも約500～約600、さらにより好ましくは少なくとも約600ヌクレオチド～約620ヌクレオチド、なおさらにより好ましくは少なくとも約620～約650であることができ、そして最も好ましくは、核酸フラグメントは約650ヌクレオチドより大きい長さである。 10

【0192】

タンパク質に適用する場合、PCADM-1の「フラグメント」は約20アミノ酸の長さである。より好ましくは、PCADM-1のフラグメントは約30アミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも約40、さらにより好ましくは少なくとも約60、さらにより好ましくは少なくとも約80、さらにより好ましくは少なくとも約100、さらにより好ましくは約100、そしてより好ましくは110アミノ酸より大きい長さである。

【0193】

「ゲノムDNA」は、遺伝子と相同なヌクレオチド配列を有するDNA鎖である。一例として、染色体のフラグメントおよび哺乳類mRNAの逆転写により得られるcDNAは両方ともゲノムDNAである。 20

【0194】

二本鎖オリゴヌクレオチドは、該二本鎖オリゴヌクレオチドがメンバーである半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチド組の任意の他のメンバーによって生成される任意のシグナルと比較して該二本鎖オリゴヌクレオチドがタンパク質/DNA結合を示す最も高い検出可能なシグナルを生成する場合に「最大の親和性」で結合する（該用語を本明細書において用いる場合）。

【0195】

「相同な」は、本明細書において用いる場合、2つのポリマー分子間、例えば2つの核酸分子間、例えば2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子間、または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列類似性をさす。2つの分子の両方のあるサブユニット位置が同じモノマーサブユニットで占められる場合、例えば、2つのDNA分子の各々のある位置がアデニンで占められる場合、それらはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、マッチするかもしくは相同な位置の数の直接関数であり、例えば、2つの化合物配列における半分の位置（例えば、10個のサブユニットの長さのポリマーの5個の位置）が相同である場合、それら2つの配列は50%相同であり、90%の位置、例えば10個のうち9個がマッチするかもしくは相同である場合、それら2つの配列は90%の相同性を共有する。一例として、DNA配列3'-ATTGCC-5'および3'-TATGGC-5'は75%の相同性を共有する。 30

【0196】

本明細書において用いる場合、「相同性」は「同一性」と同義的に用いる。 40

【0197】

さらに、「相同性」もしくは「同一性」という用語を核酸およびタンパク質をさすために本明細書において用いる場合、核酸およびアミノ酸配列レベルの両方での相同性もしくは同一性に適用されると解釈されるべきである。

【0198】

第一のオリゴヌクレオチドは第二のオリゴヌクレオチドと、少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約65%、さらにより好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%、そして好ましくは少なくとも約90%、もしくはより好ましくは少なくとも約95%相補的であるオリゴヌクレオチドのみが相互にアニーリング 50

する条件下でこれら2つのオリゴヌクレオチドがアニーリングする場合に「高いストリンジエンシー」でもしくは「高いストリンジエンシー条件下」でアニーリングする。2つのオリゴヌクレオチドをアニーリングさせるために用いる条件のストリンジエンシーは、他の因子の中でも、温度、アニーリング媒質のイオン強度、インキュベーション期間、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドのG-C含有量、および既知である場合、2つのオリゴヌクレオチド間の非相同性の予想される程度の関数である。アニーリング条件のストリンジエンシーを調整する方法は既知である（例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New Yorkを参照）。

10

【0199】

2つのヌクレオチドもしくはアミノ酸配列間の同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを用いて成し遂げることができる。例えば、2つの配列を比較するのに有用な数学アルゴリズムは、KarlinおよびAltschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877) におけるように改変した、KarlinおよびAltschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268) のアルゴリズムである。このアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) のNBLASTおよびXBLASTプログラムに導入され、そして例えばURL (universal resource locator) “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>” を有する全米バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) ワールドワイドウェブサイトでアクセスすることができる。BLASTヌクレオチド検索は、本明細書に記述する核酸に相同なヌクレオチド配列を得るために以下のパラメーター：ギャップペナルティー=5；ギャップエクステンションペナルティー=2；ミスマッチペナルティー=3；マッチリワード=1；期待値10.0；およびワードサイズ=11を用いてNBLASTプログラム (NCBI ウェブサイトで「blastn」と表される) で行うことができる。BLASTタンパク質検索は、本明細書に記述するタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために以下のパラメーター：期待値10.0、BLOSUM62スコアリングマトリックスを用いて、XBLASTプログラム (NCBI ウェブサイトで「blastp」と表される) もしくはNCBI

20

30

【0200】

比較目的用にギャップを考慮したアラインメントを得るためには、Gapped BLASTをAltschul et al. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) に記述されているように利用することができる。あるいはまた、PSI-BlastもしくはPHI-Blastは、分子間の遠い関係 (同文献 (id.)) および共通のパターンを共有する分子間の関係を検出する、反復検索を行うために用いることができる。BLAST、Gapped BLAST、PSI-BlastおよびPHI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム (例えば、XBLASTおよびNBLAST) のデフォルトパラメーターを用いることができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照。

40

【0201】

2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを考慮に入れてもしくは入れずに、上記のものと同様の技術を用いて決定することができる。同一性パーセントを計算する際には、典型的に、正確なマッチを計数する。

【0202】

「PCADM-1を阻害する」は、PCADM-1の活性もしくはPCADM-1によりコードされるmRNAのレベルが、核酸のない場合に検出されるものより下に減少されることを意味する。より好ましくは、DNA ZYMもしくはDNA酵素での阻害は、mR

50

N A上の同じ部位に結合することができるが該R N Aを切断することができない不活性R N A分子の存在下で認められるレベルより下である。

【0203】

本明細書において用いる場合、「グリーンスコア」という用語は、G l e a s o n e t a l. (1993, J. U r o l. 149:1568-1576)により開発された病理学的スコアリングシステムをさす。

【0204】

本明細書において用いる場合、「遺伝子」および「組み換え遺伝子」という用語は、本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含んでなる核酸分子をさす。そのような天然の対立遺伝子バリエーションは、典型的には、既定の遺伝子のヌクレオチド配列における1～5%の相違をもたらすことができる。代替りの対立遺伝子は、多数の異なる個体において興味のある遺伝子をシーケンスすることにより同定することができる。これは、様々な個体における同じ遺伝子座を同定するためのハイブリダイゼーションプロブを用いることにより容易に実施することができる。天然の対立遺伝子バリエーションの結果でありそして機能活性を改変しないありとあらゆるそのようなヌクレオチドバリエーションおよび得られるアミノ酸多型もしくはバリエーションは、本発明の範囲内であるものとする。

10

【0205】

さらに、本明細書に記述するヒトタンパク質のものと異なるヌクレオチド配列を有する、他の種からの本発明のタンパク質をコードする核酸分子（ホモログ）は、本発明の範囲内である。本発明のc D N Aの天然の対立遺伝子バリエーションおよびホモログに対応する核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標準的なハイブリダイゼーション技術に従ってハイブリダイゼーションプロブとしてヒトc D N Aもしくはその一部を用いてヒト核酸分子に対するそれらの同一性に基づいて単離することができる。例えば、本発明のヒトP C A D M-1タンパク質のホモログは、高いストリンジェンシー条件下でヒトP C A D M-1の全部もしくは一部をコードする核酸分子とのそのハイブリダイゼーションに基づいて単離することができる。

20

【0206】

本明細書において用いる場合、「説明用資料」には、本明細書に列挙する様々な疾患もしくは疾病の軽減をもたらすためのキットにおいて本発明の核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物の有用性を伝えるために用いることができる、出版物、記録、図もしくは任意の他の表現媒体が包含される。場合により、あるいはまた、説明用資料は、哺乳類の細胞もしくは組織における疾患もしくは疾病の軽減の一つもしくはそれ以上の方法を記述することができる。本発明のキットの説明用資料は、例えば、本発明の核酸、ペプチド、D N A Z Y Mおよび／もしくは組成物を含有する容器に添付することができ、または核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含有する容器と一緒に発送することができる。あるいはまた、説明用資料は、説明用資料および化合物が受取人によって協調的に用いられることを意図して容器と別個に発送することができる。

30

【0207】

「単離された核酸」は、天然に存在する状態においてその側面に位置する配列から分離されている核酸セグメントもしくはフラグメント、例えば、該フラグメントに通常は隣接する配列、例えばそれが天然で存在するゲノムにおいて該フラグメントに隣接する配列から取り除かれているD N Aフラグメントをさす。該用語はまた、核酸に生来付随する他の成分、例えば細胞においてそれに生来付随するR N AもしくはD N Aもしくはタンパク質から実質的に精製されている核酸にも適用する。従って、該用語には、例えば、ベクターに、自律複製するプラスミドもしくはウイルスに、または原核生物もしくは真核生物のゲノムD N Aに導入されるか、あるいは他の配列から独立して別個の分子として（例えば、c D N AまたはP C Rもしくは制限酵素消化により生成されるゲノムもしくはc D N Aフラグメントとして）存在する組み換えD N Aが包含される。それにはまた、追加のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組み換えD N Aが包含される

40

50

。

【0208】

本発明の文脈では、一般に存在する核酸塩基の以下の略語を用いる。「A」はアデノシンをさし、「C」はシチジンをさし、「G」はグアノシンをさし、「T」はチミジンをさし、そして「U」はウリジンをさす。

【0209】

「PCADM-1分子の異常発現」という用語は、本明細書において用いる場合、異常発現が疾患、疾病もしくは症状と関連するかもしれないもしくはそれを媒介するように、細胞におけるPCADM-1の発現のレベルが、そのほかの点では同一の細胞（ここで、該そのほかの点では同一の細胞は、前立腺癌、他の癌および骨粗鬆症のような変性疾患、免疫抑制疾患もしくは炎症性疾患などのような、しかしこれらに限定されるものではない、PCADM-1の発現と関連するかもしれないもしくはそれにより媒介される任意の検出可能な疾患、疾病もしくは症状を示さない正常組織から得られる）におけるPCADM-1の発現のレベルより検出可能に高いかもしれないもしくは低いことを意味する。 10

【0210】

「モンテカルロ様」スクリーニングアッセイは、本明細書において用いる場合、ランダム7塩基対（bp）、8bpおよび9bp DNA配列の作製ならびに腫瘍組織により生産されるDNA結合タンパク質（1つもしくは複数）（ここで、該DNA結合タンパク質は、そのほかの点では同一の非腫瘍組織において生産されないか、もしくは低レベルで生産されるか、もしくはそうでなければ検出されないいずれかである）に結合する7bp、8bpおよび／もしくは9bp配列を同定するために用いるタンパク質結合アッセイをさす。 20

【0211】

2つのポリヌクレオチドを「操作可能に連結された」と記述することは、2つのポリヌクレオチドの少なくとも一方が、もう一方に対して、それが特徴とする生理学的影響を及ぼすことができるように核酸部分内で配置されている2つのポリヌクレオチドを一本鎖もしくは二本鎖核酸部分が含まんでなることを意味する。一例として、遺伝子のコーディング領域に操作可能に連結されたプロモーターは、該コーディング領域の転写を促進することができる。 30

【0212】

好ましくは、所望のタンパク質をコードする核酸がプロモーター／調節配列をさらに含んでなる場合、該プロモーター／調節配列は、それが細胞において所望のタンパク質の発現を導くように所望のタンパク質をコードする配列の5'末端に位置する。所望のタンパク質をコードする核酸およびそのプロモーター／調節配列は、一緒に、「導入遺伝子」を含んでなる。 30

【0213】

「患者」は、外移植細胞のドナーもしくはレシピエントである生物体または細胞自体を意味する。「患者」はまた、酵素核酸分子を投与することができる生物体もさす。好ましくは、患者は哺乳類もしくは哺乳類細胞である。より好ましくは、患者はヒトもしくはヒト細胞もしくはヒト腫瘍である。 40

【0214】

「PCADM-1」は、本明細書において用いる場合、任意の種もしくは組織もしくは細胞からまたは組み換え、合成もしくは半合成源から得られる精製された組み換えのもしくは天然の「PCADM-1」タンパク質のアミノ酸配列をさす。好ましくは、PCADM-1は、ストリンジェントな条件下で配列番号：1の配列を有する核酸とハイブリダイズする核酸によりコードされる。さらに、PCADM-1は、配列番号：2のアミノ酸配列と少なくとも99%の配列同一性を共有する。さらに、PCADM-1は過剰発現され、すなわち、疾患、疾病もしくは症状のないことが既知である細胞もしくは組織に存在するレベルより高いレベルで発現される。 50

【0215】

また、「PCADM-1」は、ヒトS2遺伝子に対して6個のヌクレオチド置換を有する約32kDaの細胞質および核タンパク質である。さらに特に、PCADM-1をコードする核酸は、ヌクレオチド番号190でT→Aの変異、ヌクレオチド番号191でA→C、ヌクレオチド番号465でG→C、ヌクレオチド番号475でC→Gの変異、ヌクレオチド番号488でC→Gの変異、そしてヌクレオチド番号505でT→Cを含んでなる（ここで、該ヌクレオチド番号は配列番号：1に対する）。従って、PCADM-1は、ATG翻訳開始部位に対してnt190でA、nt191でC、nt465でC、nt475でG、nt488でG、nt505でCを含んでなると理解される。より好ましくは、PCADM-1をコードするmRNAは、本明細書に開示するPCADM-1 DNA ZYM、例えば、配列GATCTTTCAGGCTAGCTACAAACGAGTCCCTTG A（配列番号：9）、GTTCCCCAGGCTAGCTACAAACGACCCAGGG C（配列番号：10）などを有するDNA酵素により切断される。

【0216】

他に示さない限り、「PCADM-1」および「前立腺癌抗原診断マーカー1」は代替的に用いられ、そしてPCADM-1をコードする核酸によりコードされるポリペプチドをさす。好ましくは、PCADM-1をコードする核酸は、配列番号：1の配列と99%より大きい同一性を共有するか、PCADM-1は配列番号：2のアミノ酸配列を有するタンパク質と98%より大きい同一性を共有するか、もしくは両方である。さらに、該ポリペプチドは、好ましくは、PCADM-1と特異的に結合する少なくとも一つの二本鎖核酸オリゴマー、例えば、配列番号3～6の配列を有するオリゴヌクレオチドに結合する。さらに、PCADM-1のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列と少なくとも約98%の配列同一性を共有する

さらに、ヒトS2のアミノ酸配列に対して、PCADM-1は、配列番号：2のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号64、155、159、163および169で5個のアミノ酸置換を含んでなる。なおさらに特に、PCADM-1は、配列番号：2のアミノ酸配列に対して、アミノ酸残基番号64でT（トレオニン）、アミノ酸残基番号155でN（アスパラギン）、残基番号159でA（アラニン）、残基番号163でR（アルギニン）、そして残基番号169でR（アルギニン）を含んでなると理解される。

【0217】

本明細書において用いる場合、「プロモーター／調節配列」という用語は、該プロモーター／調節配列に操作可能に連結された遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を意味する。ある場合には、この配列はコアプロモーター配列であることができ、そしてある場合には、この配列はエンハンサー配列および遺伝子産物の発現に必要とされる他の調節要素を含むこともできる。プロモーター／調節配列は、例えば、組織特異的に遺伝子産物を発現させるものであることができる。

【0218】

「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするかもしくは特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結した場合に、細胞の大部分のもしくは全ての生理的条件下で生きているヒト細胞において遺伝子産物を生産させるヌクレオチド配列である。

【0219】

「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするかもしくは特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結した場合に、プロモーターに対応する誘導因子が細胞に存在する場合にのみ実質的に生きているヒト細胞において遺伝子産物を生産させるヌクレオチド配列である。

【0220】

「組織特異的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするかもしくは特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結した場合に、細胞がプロモーターに対応する組織タイプの細胞である場合にのみ実質的に生きているヒト細胞において遺伝子産物を生産させるヌクレオチド配列である。

【0221】

「ポリアデニル化配列」は、転写されたメッセンジャーRNA配列上にポリA尾部の付加を導くポリヌクレオチド配列である。

【0222】

「ポリヌクレオチド」は、核酸の一本鎖もしくは平行および逆平行鎖を意味する。従って、ポリヌクレオチドは一本鎖もしくは二本鎖核酸のいずれかであることができる。

【0223】

「核酸」という用語は、典型的に、大きいポリヌクレオチドをさす。

【0224】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、典型的に、一般に約50ヌクレオチドより大きくない、短いポリヌクレオチドをさす。ヌクレオチド配列がDNA配列（すなわち、A、T、G、C）で表される場合、これには「U」が「T」に置き換わるRNA配列（すなわち、A、U、G、C）も包含されると理解される。

10

【0225】

ポリヌクレオチド配列を記述するために通常の表記法を本明細書において用いる：一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端は5'末端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左方向は5'方向と呼ばれる。

【0226】

新生RNA転写産物へのヌクレオチドの5'→3'付加の方向は、転写方向と呼ばれる。mRNAと同じ配列を有するDNA鎖は「コーディング鎖」と呼ばれ；DNA上の基準点に対して5'に位置するDNA鎖上の配列は「上流配列」と呼ばれ；DNA上の基準点に対して3'であるDNA鎖上の配列は「下流配列」と呼ばれる。

20

【0227】

ポリヌクレオチドの「一部」は、ポリヌクレオチドの少なくとも約20個の連続するヌクレオチド残基を意味する。ポリヌクレオチドの一部には、ポリヌクレオチドのあらゆるヌクレオチド残基を包含することができると理解される。

【0228】

「プライマー」は、指定されたポリヌクレオチド鑄型に特異的にハイブリダイズしそして相補的なポリヌクレオチドの合成の開始点を提供することができるポリヌクレオチドをさす。そのような合成は、合成が誘導される条件下に、すなわち、ヌクレオチド、相補的なポリヌクレオチド鑄型、およびDNAポリメラーゼのような重合のための作用因子の存在下にポリヌクレオチドプライマーが置かれる場合に起こる。プライマーは、典型的には一本鎖であるが、二本鎖であることもできる。プライマーは、典型的にはデオキシリボ核酸であるが、多種多様な合成のおよび天然に存在するプライマーが多数の用途に有用である。プライマーは、ハイブリダイズして合成の開始部位として働くようにそれが設計される鑄型に相補的であるが、鑄型の正確な配列を反映する必要はない。そのような場合、鑄型へのプライマーの特異的ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーにより決まる。プライマーは、例えば、発色、放射性もしくは蛍光部分で標識し、そして検出可能な部分として用いることができる。

30

【0229】

「プローブ」は、別のポリヌクレオチドの指定された配列に特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをさす。プローブは標的の相補的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするが、鑄型の正確な相補的配列を反映する必要はない。そのような場合、標的へのプローブの特異的ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーにより決まる。プローブは、例えば、発色、放射性もしくは蛍光部分で標識し、そして検出可能な部分として用いることができる。

40

【0230】

「組み換えポリヌクレオチド」は、生来一緒に連結されない配列を有するポリヌクレオチドをさす。増幅されたもしくは組み立てられた組み換えポリヌクレオチドは、適当なベクターに含むことができ、そして適当な宿主細胞を形質転換するために該ベクターを用いることができる。

50

【0231】

組み換えポリヌクレオチドはまた、非コーディング機能（例えば、プロモーター、複製起点、リボソーム結合部位など）を供給することもできる。

【0232】

「組み換えポリペプチド」は、組み換えポリヌクレオチドの発現の際に生産されるものである。

【0233】

「ポリペプチド」は、アミノ酸残基、関連する天然に存在する構造バリエーション、およびペプチド結合によって連結されるその合成の天然に存在しないアナログからなるポリマー、関連する天然に存在する構造バリエーション、およびその合成の天然に存在しないアナログをさす。合成ポリペプチドは、例えば自動ポリペプチド合成機を用いて、合成することができる。

【0234】

「タンパク質」という用語は、典型的に、大きいポリペプチドをさす。

【0235】

「ペプチド」という用語は、典型的に、短いポリペプチドをさす。

【0236】

ポリペプチド配列を表すために通常表記法を本明細書において用いる：ポリペプチド配列の左端はアミノ末端であり；ポリペプチド配列の右端はカルボキシル末端である。

【0237】

本明細書において用いる場合、「レポーター遺伝子」という用語は、既知の方法を用いてその発現を検出することができる遺伝子を意味する。一例として、エシェリキア・コリ lacZ 遺伝子は、培地に発色基質 o-ニトロフェニル-β-ガラクトシドを加えることにより既知の方法を用いて lacZ 遺伝子の発現を検出することができるので培地中のレポーター遺伝子として用いることができる (Gerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 574)。

【0238】

「PCADM-1 阻害量」は、本明細書において用いる場合、物質もしくは分子がない場合の PCADM-1 発現、量および／もしくは活性のレベルと比較して PCADM-1 発現、量および／もしくは活性のレベルを検出可能に減少する物質もしくは分子の任意の量を意味する。従って、存在する PCADM-1 の量および／または PCADM-1 mRNA もしくはタンパク質発現のレベルの検出可能な減少をもたらす任意の量は、本発明に包含される。これらの条件を調べるアッセイは当該技術分野において周知であり、そしていくつかを本明細書に例示する。

【0239】

「PCADM-1 活性」という用語は、本明細書において用いる場合、細胞の生存および増殖を保証する、前立腺癌組織において検出されるが非癌組織では検出されないなどの分子もしくは化合物の能力をさす。さらに、PCADM-1 活性には、本明細書のほかの場所でさらに十分に説明するように配列番号：5～8 の少なくとも一つの配列を有する核酸と特異的に結合するポリペプチドの能力が包含される。

【0240】

「PCADM-1 DNAZYM」は、特定の遺伝子標的に対して基質結合領域中に相補的配列を有し、そしてまたその標的において RNA を特異的に切断することに有効である、酵素もしくは触媒活性も有する核酸分子を意味する。すなわち、酵素核酸分子は RNA を分子間的に切断し、そしてそれにより標的 RNA 分子を不活性化することができる。配列のこの相補的マッチングは、切断を起こさせるために標的 RNA への酵素核酸分子の十分なハイブリダイゼーションを与える働きをする。「DNAZYM」、「DNA 酵素」もしくは「酵素核酸」もしくは「PCADM-1 DNAZYM」という用語は、特に、

P C A D M-1 m R N A 配列に相補的なもしくは部分的に相補的な D N A 配列をさし、そして該用語は本明細書において代替可能に用いる。しかしながら、それらは共通の機能能力を共有するので、「D N A Z Y M」という用語は、当該技術分野において用いるように、リボザイム、触媒 R N A、酵素 R N A、触媒 D N A、ヌクレオザイム (n u c l e o z y m e)、R N A 酵素、エンドリボヌクレアーゼ、ミニザイム (m i n i - z y m e)、もしくはリードザイム (l e a d z y m e)、オリゴザイムのような語句と代替可能に用いる。これらの専門用語は全て、酵素活性を有する核酸分子を表す。

【0241】

P C A D M-1 「異常発現」と関連しそして／もしくはそれにより媒介される疾患、疾病もしくは症状の文脈において用いる「関連する」および「媒介される」は、P C A D M-1 R N A の阻害、従ってそれぞれのタンパク質活性レベルの減少が、該疾患、疾病もしくは症状の徴候をある程度軽減することを意味する。 10

【0242】

「制限部位」は、制限エンドヌクレアーゼにより認識される二本鎖核酸の部分である。

【0243】

二本鎖核酸の部分は、核酸およびエンドヌクレアーゼを接触させた時にエンドヌクレアーゼが該部分で核酸の両方の鎖を切断することができる場合、制限エンドヌクレアーゼにより「認識される」。

【0244】

「特異的に結合する」という用語は、本明細書において用いる場合、特定の分子を認識しそして結合するが、サンプル中の他の分子を実質的に認識もしくは結合しない化合物、例えば、タンパク質、核酸、もしくは抗体、酵素、D N A Z Y Mなどを意味する。 20

【0245】

第一のオリゴヌクレオチドは第二のオリゴヌクレオチドと、触媒コアの側面に位置する 2 ～ 10 b p の相補的領域を有するオリゴヌクレオチドのみが相互にアニーリングすることができる条件下でこれら 2 つのオリゴヌクレオチドがアニーリングする場合に「高いストリンジェンシーで」アニーリングする。2 つのオリゴヌクレオチドをアニーリングさせるのに用いる条件のストリンジェンシーは、他の因子の中でも、温度、イオン条件、アニーリング媒質のイオン強度、インキュベーション期間、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの G - C 含有量、および既知である場合、2 つのオリゴヌクレオチド間の 30 非相同性の予想される程度の関数である。アニーリング条件のストリンジェンシーを調整する方法は既知である (例えば、S a m b r o o k e t a l . , 1989, M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , N e w Y o r k を参照)。

【0246】

本明細書において用いる場合、「導入遺伝子」という用語は、トランスジェニック細胞もしくは哺乳類によりコードされる外来核酸配列を意味する。

【0247】

「組み換え細胞」は、導入遺伝子を含んでなる細胞である。そのような細胞は、真核細胞もしくは原核細胞であることができる。また、トランスジェニック細胞には、導入遺伝子を含んでなる胚性幹細胞、細胞が導入遺伝子を含んでなるトランスジェニック E S 細胞から生じるキメラ哺乳類から得られる細胞、トランスジェニック哺乳類またはその胎児もしくは胎盤組織から得られる細胞、および導入遺伝子を含んでなる原核細胞が包含されるが、これらに限定されるものではない。 40

【0248】

「外来核酸」という用語は、細胞もしくは動物への核酸の導入を促進する目的のために開発されている技術を用いて核酸が細胞もしくは動物に導入されていることを意味する。

【0249】

「側面に位置する基質領域 (s u b s t r a t e f l a n k i n g r e g i o n)」は、触媒コアの両側に位置しそしてその基質の部分に相補的である (すなわち、塩基対 50

合することができる) DNA ZYMの部分を意味する。一般に、そのような相補的配列は100%である。例えば、8~10のうちわずか2塩基が塩基対合することができる。

【0250】

「タグ」ポリペプチドは、興味のあるタンパク質にペプチド結合により連結した場合に、タンパク質の位置を特定するために、それを細胞抽出物から精製するために、結合アクセシ用にそれを固定するために、またはそうでなければその生物学的特性および／もしくは機能を研究するために用いることができる任意のタンパク質を意味する。

【0251】

本明細書において用いる場合、「トランスジェニック哺乳類」は、その生殖細胞が外来核酸を含んでなる哺乳類を意味する。

【0252】

本明細書において用いる場合、「処置する」ことは、前立腺癌の症状を患者が経験する頻度を減らすことを意味する。

【0253】

「ベクター」という用語は、本明細書において用いる場合、外来核酸をコードする任意のプラスミドもしくはウイルスを意味する。該用語にはまた、例えばポリリシン化合物などのような、ビリオンもしくは細胞への核酸の導入を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物も包含されると解釈されるべきである。ベクターは、患者へのPCADM-1タンパク質もしくは哺乳類PCADM-1をコードする核酸、もしくはPCADM-1をコードする核酸に相補的なDNA ZYM、もしくはその一部の送達ための送達媒体として適当なウイルスベクターであることができ、またはベクターは該目的のために適当な非ウイルスベクターであることができる。細胞および組織へのDNAの送達のためのウイルスおよび非ウイルスベクターの例は当該技術分野において周知であり、そして例えばMa et al. (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 12744-12746) に記述されている。ウイルスベクターの例には、組み換えワクシニアウイルス、組み換えアデノウイルス、組み換えレトロウイルス、組み換えアデノ随伴ウイルス、組み換えトリボックスウイルスなどが包含されるが、これらに限定されるものではない(Cranage et al., 1986, EMBO J. 5: 3057-3063; 1994年8月18日に公開された国際特許出願第WO94/17810号; 1994年10月27日に公開された国際特許出願第WO94/23744号)。非ウイルスベクターの例には、リポソーム、DNAのポリアミン誘導体などが包含されるが、これらに限定されるものではない。

【0254】

「ノックアウトターゲッティングベクター」は、該用語を本明細書において用いる場合、取り除かれそして／もしくは別の核酸配列で置換される興味のある標的配列の側面に位置する核酸領域にその各々が相補的である2つの核酸配列を含んでなるベクターを意味する。従って、これら2つの核酸配列は、相同的組み換えのプロセスによって取り除かれる標的配列の側面に位置する。

[説明]

I. 単離された核酸

A. センス核酸

本発明は、哺乳動物PCADM-1、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸に関し、ここで、該核酸は配列番号1の配列を有する核酸と少なくとも98%一致を共有する。好ましくは、該核酸は、配列番号1と約99%ホモログス(homologous)である。さらに好ましくは、該核酸は配列番号1である。

【0255】

好ましくは、PCADM-1をコードする核酸は、ヌクレオチド番号190においてTからAへの変化、ヌクレオチド番号191においてAからCへの変化、ヌクレオチド番号465においてGからCへの変化、ヌクレオチド番号475においてCからGへの変化、ヌクレオチド番号488においてCからGへの変化、およびヌクレオチド番号505にお

10

20

30

40

50

いてTからCへの変化を含んでなり、ここでヌクレオチド番号は配列番号1に対するものである。従って、PCADM-1はATG翻訳開始部位に関してヌクレオチド190におけるA、ヌクレオチド191におけるC、ヌクレオチド465におけるC、ヌクレオチド475におけるG、ヌクレオチド488におけるG、ヌクレオチド505におけるCを含んでなると理解される。

【0256】

さらに好ましくは、PCADM-1をコードするmRNAは、本明細書中に開示されるPCADM-1 DNAZYMヌクレアーゼ、例えば配列GATCTTCAAGGCTAGCTACAAACGAGTCCCTTGA（配列番号9）、および配列GTTCCCAAGGCTAGCTACAAACGACCCAGGGC（配列番号10）を有するPCADM-1 DNAZYMにより切断される。

【0257】

別の局面では、本発明は、哺乳動物PCADM-1、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸に関し、ここで、核酸によりコードされるタンパク質は配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも98%ホモロジーを共有する。好ましくは、該タンパク質は、配列番号2と約99%ホモログスであり、そして最も好ましくは約100%ホモログスである。より一層好ましくは、該核酸によりコードされるPCADM-1タンパク質は配列番号2である。

【0258】

さらに、配列番号1を有する核酸によりコードされるポリペプチドは、PCADM-1、例えば配列番号5～8を有するオリゴヌクレオチドと特異的に結合する少なくとも1つの二本鎖核酸オリゴマーを優先的に結合する。

【0259】

さらに、PCADM-1のアミノ酸配列は、好ましくは配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも約98%の配列一致を共有し、そして配列番号2のPCADM-1タンパク質のアミノ酸残基番号64、155、159、163および169におけるアミノ酸置換を含んでなり、そしてヒトS2のアミノ酸と比較される。より一層好ましくは、PCADM-1は、配列番号2のアミノ酸配列に対して、アミノ酸残基番号64におけるT（トレオニン）残基、アミノ酸残基番号155におけるN（アスパラギン）残基、残基番号159におけるA（アラニン）、残基番号163におけるR（アルギニン）、および残基番号169におけるR（アルギニン）を含んでなると理解される。

【0260】

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、哺乳動物PCADM-1ホモログが存在すると考えられそして本明細書中に開示される配列データを用いて本明細書中に記載される方法を用いて容易に同定および単離できることを認めるであろう。従って、本発明は、ヒトアイソフォームおよび本明細書中に提供される開示に基づいて容易に同定できる他の種よりのPCADM-1ホモログの双方である別のPCADM-1類も包含する。

【0261】

本発明の単離された核酸は、本発明のPCADM-1タンパク質をコードするRNAまたはDNA配列、およびそれが細胞を含まない場合または細胞と関連する場合にヌクレオチド配列にさらに安定性を与えるDNAまたはRNAの化学修飾を含むそのいずれの修飾形も含むと解釈されるべきである。ヌクレオチドの化学修飾は、ヌクレオチド配列が細胞により取り上げられる場合の効率または細胞内でそれが発現される効率を増大するために使用されてもよい。ヌクレオチド配列の修飾のいずれかまたはすべての組み合わせが本発明に入ると考えられる。

【0262】

本発明は、本明細書中に開示される核酸およびアミノ酸配列のみに限定されると解釈されるべきではない。一旦本発明を武器とすると、当該技術分野の熟練者にとって、PCA 50

DM-1 タンパク質、例えば哺乳動物の他の種（例えばサル、テナガザル、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコなど）内に存在するものをコードする他の核酸は、本明細書中に開示される PCADM-1 ポリペプチドをコードするヒト PCADM-1 核酸の単離のための実験の詳細部分中に本明細書中で記載された方法（例えばゲノムまたは cDNA ライブラリーのスクリーニング）、および当該技術分野で周知（例えば mRNA 試料を用いる逆転写 PCR および抗体に基づく方法）または今後開発される方法に従って得られることは容易に分かる。

【0263】

さらに、例えばサムブルックら「分子クローニング：実験マニュアル」（Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）およびオースベルら「分子生物学における最近のプロトコル」（Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, New York）中に記載の方法を用いる PCADM-1 の変異体、誘導体または変種の生成のためにいかなる数の方法を用いてもよい。 10

【0264】

ポリペプチドをコードする DNA 配列を改変することによるタンパク質またはポリペプチド内のアミノ酸変化の導入のための方法は、当該技術分野で周知でありそしてサムブルックら（1989、上記）およびオースベルら（1997、上記）中にも記載されている 20

【0265】

本発明は、タグ（tag）ポリペプチドをコードする核酸が共有結合によりそれに連結している哺乳動物 PCADM-1 をコードする核酸を含む。すなわち、本発明は、タグポリペプチドをコードする核酸配列がヒト PCADM-1 をコードする核酸に共有結合により連結されているキメラ核酸を包含する。このようなタグポリペプチドは、当該技術分野で周知でありそして例えば、緑色蛍光タンパク質、myc、myc-ピリビン酸キナーゼ、（myc-PK）、His6、マルトース結合タンパク質（MBP）、インフルエンザウイルス血球凝集素タグポリペプチド、フラッグ（flag）タグポリペプチド、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）タグポリペプチドを含む。しかし、本 30

【0266】

タグポリペプチドをコードする核酸を含んでなる核酸は、細胞、組織、および／または生物体全体（例えば哺乳動物胚）内で PCADM-1 を定位（localize）し、細胞から分泌される PCADM-1 を検出し、そして細胞内の PCADM-1 の役割を研究するために使用できる。さらに、タグポリペプチドの付加は、本発明のタンパク質が産生されそして容易に精製できるように「タグ付された」タンパク質の単離および精製を容易にする。 40

【0267】

本発明は、哺乳動物 PCADM-1 ポリペプチドと特異的に結合するデュプレックス（すなわち二本鎖）核酸も含む。当該技術分野の熟練者は、本明細書内に提供される開示に基づいて、このような二本鎖核酸が、PCADM-1 プローブ1（5'-CACGGATG-3'（配列番号5））および PCADM-1 プローブ2（5'-CACCAATGA-3'（配列番号6））、5'-CACCAATG（配列番号7）、および 5'-CACCAATGTTTGT-3'（配列番号8）を含むことを理解するであろう。熟練者は、本明細書中の別の部分でさらに十分考察されるように、PCADM-1 と特異的に結合する核酸は、充実組織または流体より誘導されたタンパク質試料中の PCADM-1 の存在または不在を検出するため、およびその中の PCADM-1 のレベルを評価するために使用 50

できることを認めるであろう。従って、デュプレックス（すなわち二本鎖、これらは本明細書中では相互交換可能に使用される）核酸は、前立腺ガンを含み、それに限定はされないが、PCADM-1の不良発現と関連するいかなる疾患、障害、または症状の検出のために有用な強力なプローブである。

B. アンチセンス核酸

ある状況中では、PCADM-1の発現を阻害することが望ましく、従って本発明はPCADM-1発現の阻害のために有用な組成物を含む。従って、本発明は、哺乳動物PCADM-1をコードする核酸の一部分または全体に相補的な単離された核酸を特徴とし、該核酸は転写に関してアンチセンス方向にある。好ましくは、アンチセンス核酸は、配列番号1と少なくとも約95%ホモロジーを有する核酸と相補的である。好ましくは、該核酸は、転写に関してアンチセンス方向である配列番号1の配列を有する哺乳動物PCADM-1、またはそのフラグメントをコードする核酸の一部分または全体に相補的な核酸に対して、約90%ホモガス、さらに好ましくは約97%ホモガス、さらに好ましくは約98%ホモガス、そして最も好ましくは約99%ホモガスである。最も好ましくは、核酸は、配列番号1、またはそのフラグメントを有する核酸の一部分または全体に対して相補的である。このようなアンチセンス核酸は、PCADM-1の発現、機能または双方を阻害するために役立つ。

【0268】

あるいは、本発明のアンチセンス分子は合成により作製され次いで細胞に提供されてもよい。約10～約30、そしてさらに好ましくは約15ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーは、それらが容易に合成されそして標的細胞内に導入されるので好ましい。本発明で考慮される合成アンチセンス分子は、非修飾オリゴヌクレオチドと比較して改善された生物学的活性を有する、当該技術分野で公知のオリゴヌクレオチド誘導体を含む（コーエン、上記、タリス（Tullis、1991、米国特許第5,023,243号（その全体を本明細書に編入する）参照）。

II. 単離されたポリペプチド

本発明は、哺乳動物PCADM-1分子を含んでなる単離されたポリペプチドも含む。好ましくは、単離されたポリペプチドは、配列番号2に約98%ホモガス、そしてさらに好ましくは99%ホモガスである。さらに好ましくは、哺乳動物PCADM-1を含んでなる単離されたポリペプチドは、ヒトPCADM-1である。最も好ましくは、哺乳動物PCADM-1を含んでなる単離されたポリペプチドは配列番号2である。

【0269】

さらに、ヒトS2のアミノ酸配列に関して、PCADM-1は、配列番号2のアミノ酸配列に対してアミノ酸残基番号64、155、159、163および169でアミノ酸置換を含んでなる。さらに特定すると、PCADM-1は、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列に対して、アミノ酸残基番号64におけるT（トレオニン）、アミノ酸残基番号155におけるN（アスパラギン）、残基番号159におけるA（アラニン）、残基番号163におけるR（アルギニン）、および残基169におけるR（アルギニン）を含んでなると理解される。

【0270】

PCADM-1タンパク質の生物学的性質は、CACGGATG（PCADM-1プローブ1、配列番号5）およびCACAAATGA（PCADM-1プローブ2、配列番号6）、CACAAATG（配列番号7）、およびCACAAATGTTTTTG（配列番号8）などの少なくとも1種の配列を有する核酸配列と特異的に結合する能力を含むと解釈されるべきであるが、しかし限定はされない。

【0271】

本発明は、本明細書に開示されるように、PCADM-1を含んでなるタンパク質またはペプチドの類似体も提供する。類似体は、天然に存在するタンパク質またはペプチドと、保存アミノ酸配列の相違によりまたは配列に影響しない修飾により、または双方により異なってもよい。例えば、保存アミノ酸変化は、タンパク質またはペプチドの一次配列を

10

20

30

40

50

改変するけれどもその機能は通常改変しないように作製されてもよい。保存アミノ酸置換は、典型的には、下記の基内での置換を含む。

【0272】

グリシン、アラニン；
バリン、イソロイシン、ロイシン；
アスパラギン酸、グルタミン酸；
アスパラギン、グルタミン；
セリン、トレオニン；
リシン、アルギニン；
フェニルアラニン、チロシン。

10

修飾（通常は一次配列を改変しない）は、生体内（*in vivo*）または実験室内（*in vitro*）におけるポリペプチドの化学的誘導体化、例えばアセチル化、またはカルボキシル化を含む。さらにグリコシル化のまま、例えば合成およびプロセッシングまたはその後のプロセッシング工程の間のポリペプチドのグリコシル化パターンを変更することにより、例えばグリコシル化に影響する酵素、例えば哺乳動物グリコシル化酵素または脱グリコシル化酵素にポリペプチドを暴露することにより行われるものを含む。リン酸化されたアミノ酸残基を有する配列、例えばホスホトリシン、ホスホセリン、またはホスホトレオニンも包含される。

【0273】

タンパク質分解劣化に対する抵抗を改善するためまたは溶解特性を最適化するためまたは治療剤としてさらに適するようにするために通常の分子生物学的技術を用いて修飾されたポリペプチドも含まれる。このようなポリペプチドの類似体には、天然に存在するL-アミノ酸以外、例えばD-アミノ酸または天然に存在しない合成アミノ酸の残基を含むものが含まれる。本発明のペプチドは、本明細書に表示した特定の例示プロセスのいずれの生成物にも限定されない。

20

【0274】

本発明は、変異体、誘導体および変種が、得られたペプチド（またはDNA）が本明細書中に記載の配列と一致せず、反対に本明細書中に開示されたペプチドと同様の生物学的性質を有し、ペプチドが本発明のPCADM-1ペプチドの生物学／生化学的性質を有するような1種またはそれ以上のアミノ酸（またはそれらをコードするヌクレオチド配列に言及する場合には、1個またはそれ以上の塩基対で改変されている）内で改変されるPCADM-1ペプチドである、本発明のペプチド（またはそれをコードするDNA）の「変異体」、「誘導体」および「変種」を包含するとも解釈されるべきである。

30

【0275】

さらに、本発明は、PCADM-1配列の天然に存在する変種または組換え誘導された変異体を含むと解釈されるべきであり、その変種または変異体は、本発明の全長クローンと比較して、それ以上、以下または同等のいずれかの生物学的活性であるようにそれらによりコードされるタンパク質を与える。

【0276】

核酸、およびそれらによりコードされるペプチドは、細胞内のPCADM-1の機能を解明するために有用な道具である。さらに、哺乳動物PCADM-1を含んでなる核酸およびアミノ酸は、例えば、PCADM-1発現に影響しそして有望な前立腺抗ガン抗細胞増殖剤候補である化合物を同定するために使用できる有用な診断剤である。核酸、それによりコードされるタンパク質、または双方は、哺乳動物内のPCADM-1の発現を増加または減少するために哺乳動物に投与できる。これは、健康な哺乳動物内のPCADM-1の正常な発現と比較して、哺乳動物内のPCADM-1の過少または過大発現が、PCADM-1の改変された発現に関連する疾患または病状を媒介する状況下で、哺乳動物に対して有用であり得る。

40

【0277】

その上、本発明の核酸およびアミノ酸は、PCADM-1作用の研究、新規診断剤の同

50

定および前立腺ガンおよび多分その他のガンの治療のための治療剤のために、そしてなかでもPCADM-1の細胞での役割を解明するために有用な道具である、組換え細胞およびトランスジェニックの非ヒト(non-human)哺乳動物を作製するために使用できる。

【0278】

さらに、本発明の核酸およびアミノ酸は、遺伝子発現もしくはタンパク質発現のいずれかのレベルを評価することにより、前立腺ガンなどの重症度、段階および予後を評価するために診断的に使用できる。本発明の核酸およびタンパク質は、前立腺ガンの治療の有効性を評価するためのアッセイの開発にも有用である。すなわち、本発明の核酸およびポリペプチドは、PCADM-1発現に対する種々の治療方法の効果を検出しそれにより治療方法の有効性を確認するために使用できる。 10

I I I . ベクター

別の関連する局面で、本発明は、核酸が好ましくは核酸によりコードされるタンパク質の発現を指令できるようなプロモーター／調節配列を含んでなる核酸に操作可能に連結される哺乳動物PCADM-1をコードする単離された核酸を含む。従って、本発明は、細胞内の外因性DNAの同時的発現および転写を伴う細胞内への外因性DNAの導入のための発現ベクターおよび方法を包含し、これは例えばサムブルックら(1989、上記)およびオースベルら(1997、上記)中に記載されている。

【0279】

ベクターを用いてPCADM-1を発現すると、大量の組換え産生タンパク質の単離を可能とする。さらに、PCADM-1発現の欠失または低下したレベルがこのような発現と関連する疾患、障害または病状を起こす場合に、プロモーター／調節配列により推進されるPCADM-1の発現は、PCADM-1が提供される遺伝子治療を含み、それに限定はされない有用な治療剤を提供できる。PCADM-1の投与が有用であり得る発現の低下したレベル、タンパク質のレベル、またはタンパク質の低下した活性と関連する疾患、障害または病状には、前立腺ガン、およびその他のガンなどを含むことができるが、それらに限定はされない。従って、本発明は、PCADM-1発現、翻訳、および／または活性を阻害する方法だけではなく、PCADM-1発現、タンパク質レベル、および／または活性を上昇させることに関連する方法も含み、それはPCADM-1発現および／または活性の低下および上昇の双方が、有効な治療剤を提供する際に有用であり得るからである。 20 30

【0280】

いずれの特定のプラスミドベクターまたはその他のDNAベクターの選択も本発明の限定因子ではなく、広範な多数のベクターが当該技術分野で周知である。さらに、特定のプロモーター／調節配列を選定しそして所望のポリペプチドをコードするDNA配列にそれらのプロモーター／調節配列を操作可能に連結することは、熟練者の技術の中に十分に入る。このような技術は当該技術分野で周知であり、例えばサムブルックら「分子クローニング：実験マニュアル」(Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)およびオースベルら「分子生物学における最近のプロトコル」(Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, New York)中に記載されている。 40

【0281】

このように本発明は哺乳動物PCADM-1をコードする単離された核酸を含んでなるベクターを含む。ベクター内への所望の核酸の組込みおよびベクターの選定は、例えばサムブルックら(上記)およびオースベルら(上記)中に記載されているように当該技術分野では周知である。

【0282】

本発明は、このようなベクターを含む細胞、ウイルス、プロウイルス等も含む。ベクタ 50

ーおよび／または外因性核酸を含んでなる細胞を産生するための方法は、当該技術分野では周知である。例えばサムブルックら（上記）およびオースベルら（上記）を参照のこと。

【0283】

P C A D M-1 をコードする核酸は、さまざまなプラスミドベクター内にクローニングされてもよい。しかし、本発明はプラスミドまたはいかなる特定のベクターに限定されると解釈されるべきではない。反対に、本発明は容易に利用できるかおよび／または当該技術分野で周知の広範囲で多数のベクターを包含すると解釈されるべきである。

I V. アンチセンス分子、リボザイム、および D N A 酵素

さらに、本発明は、細胞が細胞プロセスにおける P C A D M-1 の役割を解明するために有用なモデルであるアンチセンス核酸を含んでなる組換え細胞を含む。すなわち、いかなる特定の理論に限定されることも望まないが、前立腺ガン組織内にはあるがしかし良性前立腺ガン内または正常な前立腺組織内にはない P C A D M-1 の増加した発現は、P C A D M-1 がガン増殖と関連する細胞生存および細胞増殖に参与することを示す。従って、P C A D M-1 に相補的なアンチセンス核酸を含んでなるトランスジェニック細胞は、細胞内の P C A D M-1 の作用の機構およびその役割の研究のためおよび P C A D M-1 過剰発現の影響を軽減する治療剤の同定のために有用な道具である。さらに、細胞内の P C A D M-1 発現および／または活性を低下させる方法は、上昇した P C A D M-1 発現、細胞内の P C A D M-1 タンパク質またはそれよりの分泌の上昇したレベル、および／または上昇した P C A D M-1 活性により媒介またはそれらと関連する疾患、障害または病状のための有用な診断剤または治療剤を提供できる。このような疾患、障害または病状には、前立腺ガンなどが含まれるが、それらに限定はされない。

【0284】

当該技術分野の熟練者は、細胞内の P C A D M-1 m R N A および／またはタンパク質のレベルを低下させるための一つの方法が、タンパク質をコードする核酸の発現を阻害することであることを認めるであろう。P C A D M-1 の発現は、例えばアンチセンス分子を用いることにより、そしてまた例えばウィアニおよびケルニカーゲッツ (W i a n n y and K e r n i c k a - G o e t z, 2000, N a t u r e C e l l B i o l. 2: 70-75) に記載のようにリボザイムまたは二本鎖 R N A を用いることにより阻害してもよい。

A. アンチセンス分子

遺伝子発現を阻害するためのアンチセンス分子およびそれらの使用は、当該技術分野では周知である（例えばコーエン「オリゴデオキシリボヌクレオチド、遺伝子発現のアンチセンス阻害剤」(C o h e n, 1989, O l i g o d e o x y r i b o n u c l e o t i d e s, A n t i s e n s e I n h i b i t o r s o f G e n e E x p r e s s i o n, C R C P r e s s) 参照)。アンチセンス核酸は、特定の m R N A 分子の少なくとも一部分に対して相補性（用語は本明細書の別の部分で定義される）である D N A または R N A 分子である（ワイントラウブ (W e i n t r a u b, 1990, S c i t i f i c A m e r i c a n 262: 40)）。細胞内で、アンチセンス核酸は相当する m R N A にハイブリダイズして二本鎖分子を形成しこれにより遺伝子の翻訳を阻害する。

【0285】

遺伝子の翻訳を阻害するためのアンチセンス法の使用は当該技術分野で公知であり、そして例えばマーカスーサクラ (M a r c u s - S a k u r a, 1988, A n a l. B i o c h e m. 172: 289) に記載されている。このようなアンチセンス分子は、アンチセンス分子をコードする D N A を用いる遺伝子発現を介して細胞に提供されてもよく、これはイノウエ (I n o u e, 1993、米国特許第 5, 190, 931 号) により教示されている。

【0286】

あるいは、本発明のアンチセンス分子は合成的に作製され次いで細胞に提供されてもよい。約 10～約 100、そしてさらに好ましくは約 15～約 50 スクレオチドの間のアン

チセンスオリゴマーが好ましく、それはそれらが容易に合成されそして標的細胞内に導入されるからである。本発明により考慮される合成アンチセンス分子には、非修飾オリゴヌクレオチドと比較して改善された生物学的活性を有する、当該技術分野では公知のオリゴヌクレオチド誘導体が含まれる（コーエン（上記）、タリス（Tullis, 1991）米国特許第5,023,243号（引用することによりその全体が本明細書に編入される）参照）。

B. リボザイム

遺伝子発現を阻害するためのリボザイムおよびそれらの使用も当該技術分野で周知である（例えばチェックら（Cech et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:17479-17482）、ハンペルら（Hampel et al., 1989, Biochemistry 28:4929-4933）、エクステインら（Eckstein et al.）国際特許出願番号WO92/07065号、アルトマンら（Altman et al., ）米国特許第5,168,053号、引用することによりそれらの全体が本明細書に編入される）。リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼに類似した様式で他の一本鎖RNAを特異的に切断する能力を有するRNA分子である。それらのRNAをコードするヌクレオチド配列の修飾を介して、分子は、RNA分子内の特定のヌクレオチド配列を認識しそしてそれを切断するように操作できる（チェック（Cech, 1988, J. Amer. Med. Assn. 260:3030））。この方法の主要な長所は、それらが配列特異性のために特定の配列を有するmRNAのみが不活性化されることにある。

【0287】

リボザイムの二種の基本形、すなわち、テトラヒメナ型（ハッセルホフ（Hasselhoff, 1988, Nature 334:585）およびハンマーヘッド型がある。テトラヒメナ型リボザイムは、長さが塩基4個である配列を認識し、反対にハンマーヘッド型リボザイムは長さが塩基11～18個である塩基配列を認識する。配列が長くなるほど、配列が標的mRNA種内に独占的に存在する可能性が増加する。その結果、特定のmRNA種を不活性化するためにはハンマーヘッド型リボザイムはテトラヒメナ型リボザイムより好ましく、そして18塩基認識配列は、種々の無関係なmRNA分子内にランダムに存在するような短い配列より好ましい。

【0288】

PCADM-1の発現を阻害するために有用なリボザイムは、PCADM-1によりコードされるPCADM-1のmRNA配列に相補的であるかまたは配列番号1の少なくとも一つに少なくとも約80%ホモロジーを有する基本リボザイム構造内に標的配列を組み込むことにより設計してもよい。PCADM-1を標的とするリボザイムは、市場で入手できる試薬（Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA）を用いて合成しても、またはそれらをコードするDNAから遺伝子的に発現させてもよい。

C. DNA酵素

本発明は、細胞増殖応答のために要求されるRNA種を切断するように指定されたDNA酵素、または酵素核酸分子を包含する。具体的には、本発明は、PCADM-1遺伝子によりコードされるRNAを切断できるDNA ZYM（DNA酵素）の選定および特性決定を含んでなる。このようなDNA酵素は、なかでも、1種またはそれ以上のガン内の腫瘍細胞の生存を阻害するために使用できる。

【0289】

本発明において、PCADM-1 RNAを切断するDNA ZYMの例は、図2および図3に記載されている（すなわちPCADM-1 DNA ZYM-1（配列番号9）およびPCADM-1 DNA ZYM-2（配列番号10））。当該技術分野の通常の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、記載の実施例より、細胞増殖に必要な標的RNAを切断する他のDNA ZYMが、例えばフィンケル（Finckel, 1999, Science 286:2441-2442）中に記載の教示に従って容易に設計でき

、そしてこのようなDNA ZYMが本発明に包含されることを理解するであろう。

【0290】

本明細書中でDNA酵素とも呼ばれるDNA ZYMは、それらが簡単な構造を有する短いDNA分子であり、ヌクレアーゼに対してさらに抵抗性であるので、重要なことが最近証明された。DNA酵素として特定された一つの触媒モチーフは、15bp'10-23'触媒モチーフ（ここで、'10-23'はクローンの名称である）、GGCTAGCTACAA CGA（フィンケル（Finckel, 1999, Science 286:2441-2442）、スリラムら（Sriram et al., 2000, Biochem J. 15:667-673）、サンら（Sun et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:17236-17241））である。'10-23'触媒モチーフを含んでなるDNA酵素のいくつかの例には、HIV-1 gag RNA（スリラムら（Sriram et al., 2000, Biochem J. 15:667-673））およびc-myc RNA（サンら（Sun et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:17236-17241））、およびegr-1 mRNA（サンチアゴら（Santiago et al., 1999, Nature Med. 11:1264-1269））を標的とするDNA酵素が含まれる。このようなDNA酵素は、約15bpの触媒ドメインを含んでなり、さらに触媒ドメインの両側に6~10bpのフランキング（flanking）領域を含んでなることができる。フランキング領域は、ヒトPCADM-1（配列番号1）と約100%ホモロジーを共有することができる（図2および3参照）。従って、当該技術分野に熟練しそして本明細書内で提供される開示を武器とする者は、活性PCADM-1 DNA ZYMすなわちDNA酵素が触媒コアとも呼ばれる触媒中心を含んでなり、これは本明細書の別の部分で例示されおよび／または当該技術分野で公知のものに類似し、そして標的部位での切断が起きるようにPCADM-1 mRNAを結合できる結合アームをさらに含んでなることを認めるであろう。本発明のDNA ZYMは、このような切断を妨害しない追加の配列を含んでなることができ、これは本明細書内で提供される開示に基づいて熟練者により理解されるであろう。

【0291】

一般に、酵素核酸は先ず標的RNAと特異的に結合することにより作用する。結合は、酵素核酸酵素コアドメインが標的RNAに近い近接位置に保持され次いで切断が起きるように、酵素核酸の標的結合部分（すなわちフランキング結合領域または「アーム」）により媒介される。従って、酵素核酸は、先ず認識し次いで相補的塩基対形成を介して標的RNAを結合し、そして正しい部位に結合した場合には、標的RNAを切断するように酵素的に作用する。このような標的RNAの戦略的切断は、コードされたタンパク質の直接合成のためのその能力を破壊できる。酵素的核酸が結合しそしてそのRNA標的を切断した後、それはそのRNAから開放されて他の標的を探索しそして反復して結合して新しい標的を切断でき、一つのDNA ZYM分子が1個を越えるRNA分子を切断できる。

【0292】

DNA ZYMがリン酸化（phosphoriate）修飾を要求せずそしてヌクレアーゼに対して比較的安定なので、DNA ZYMの酵素特性は、他の技術よりも有利である。DNA ZYMの別の長所は、in vivoでのDNA ZYMの「半減期」がリボザイムについて報告された数時間ではなくて数日であることにある。単一のDNA ZYM分子は、標的RNAの多数の分子を切断できる。それに加えて、DNA ZYMは高度に特異性の阻害剤であり、標的RNAに結合するフランキング配列の塩基対形成機構に依存するだけでなく、標的RNA切断の機構にも依存する阻害の特異性を有する。切断の部位近くの単一ミスマッチ、すなわち塩基置換は、DNA ZYMの触媒活性を完全に排除するように選択され、そして実験的研究における陰性対照オリゴヌクレオチドを提供できる。

【0293】

エンドヌクレアーゼ酵素活性を有する核酸分子は、ヌクレオチド塩基配列特異性様式で他の別々のRNA分子を反復して切断できる。このような酵素DNAまたはRNA分子は、実際的にいかなるRNA転写物も標的とすることができ、そして効率的な切断が in

*vitro*で達成される（ザウグら（Zaug et al., 1986, Nature 324:429）、ウーレンベック（Hellenbeck, 1987, Nature 328:596）、キムら（Kim et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8788）、ドレイフュス（Dreyfus, 1988, Einstein Quart. J. Bio. Med. 6:92）、ハゼロフおよびゲルラッハ（Haseloff and Gerlach, 1988, Nature 334:585）、チェック（Cech, 1988, J. Amer. Med. Assn. 260:3030）、およびジェフェリーズら（Jefferies et al., Nucleic Acids Res. 17:1371））。

【0294】

それらの配列特異性のために、トランスー切断性DNA ZYMはヒト疾患のための重要な潜在的治療剤である。DNA ZYMは、細胞RNAの背景内で、特定のRNA標的を切断するように設計できる。このような切断イベントは、RNAに非機能性を与えそしてそのRNAからのタンパク質発現を妨げる。この様式において、疾患状態と関連するタンパク質の合成が選択的に阻害できる。

【0295】

PCADM-1 mRNA内の特異性部位を切断するDNA ZYM（すなわちPCADM-1 DNA ZYM-1 配列番号9および配列番号10）は、疾患、例えばガンおよびその他の病状を治療するための新規の治療方法を代表する。本明細書中の別の部分に開示されるデータは、PCADM-1 DNA ZYMがPCADM-1の活性を阻害することおよびPCADM-1 DNA ZYMの触媒活性が阻害効果のために必要であることを証明する。当該技術分野の通常の熟練者は、本明細書内で提供される開示より、PCADM-1 RNAを切断する別のPCADM-1 DNA ZYMが、本明細書内で提供される開示に基づいて容易に設計できることおよびこのようなDNA ZYMが本発明の範囲内であることが明らかであることを見いだすであろう。

【0296】

本明細書中の本発明の好ましい態様の一つで、酵素核酸分子は、'10-23'モチーフ、すなわちハンマーヘッドモチーフまたはヘアピンモチーフを含んでなる。'10-23'触媒モチーフ（GGCTAGCTACAAACGA）を有するDNA ZYMは、HIV-1 gag RNA（スリラムおよびバネルジア（Sriram and Banerjee, 2000, Biochem J. 15:667-673））、およびc-myc RNA（サンら（Sun et al., 1999, Biol. Chem. 274:17236-17241））、およびegr-1 mRNA（サンチアゴら（Santiago et al., 1999, Nature Med. 11:1264-1269））を標的とするDNA ZYMを含む。ハンマーヘッドモチーフの例は、ドレイフュス（上記）、ロッシら（Rossi et al., 1992, AIDS Research and Human Retroviruses 8:183）に記載されている。ヘアピンモチーフの例は、例えばハンペルら（Hampel et al.）欧州特許（EP）第0360257号、ハンペルら（Hampel et al., 1997, Methods Mol. Biol. 74:171-177）、フェルトステインら（Feldstein et al., 1989, Gene 82:53-61）、ハゼロフおよびゲルラッハ（Haseloff and Gerlach, 1989, Nature 334:585-591）およびハンペルら（Hampel et al., 2001, Methods Enzymol. 341:566-580）に記載されている。

【0297】

本明細書の別の部分で考察される特定のモチーフは、本発明を限定するものではなくそして当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、本発明の酵素核酸分子（またはこのような分子の多重フラグメント）中で重要なすべてのものは、結合アームが標的RNA配列の1個またはそれ以上に相補的である触媒ドメインにフランキングする特定の基質結合部位またはアームをDNA ZYMが含んでなること、および分子への

10

20

30

40

50

R N A 切断活性を与える基質結合部位内またはその周囲のヌクレオチド配列（すなわち酵素部分）を D N A Z Y M がさらに含んでなることを認めるであろう。

【0298】

D N A Z Y M の触媒コアにフランキングするこのようなアームは本明細書中で例示され（例えば配列番号 9 および配列番号 10）そしてそれぞれ図 2 および 3 に図示されている。すなわち、それらのアームは、相補塩基対形成相互作用を介して互いに十分な近接位置に D N A Z Y M と標的 P C A D M-1 R N A とをもたらしように意図されている、D N A Z Y M の 5' および 3' 末端での配列を含んでなり、例えば D N A Z Y M 配列の配列番号 9 および配列番号 10 は、D N A 酵素の触媒ドメインにフランキングする結合アーム（すなわち 8～10 塩基対）を含んでなり、これにより基質結合ドメインを含んでなる。

10

【0299】

一つの局面で、本発明は所望の標的の R N A に高度の特異性を示す酵素切断剤（すなわち P C A D M-1 D N A Z Y M または D N A 酵素）すなわちそれは P C A D M-1 R N A を特異的に切断するが試料中に含まれるであろう他の m R N A は切断しないものを設計および／または作製するための方法を包含する。従って、本明細書中で提供される教示、なかでも P C A D M-1 の配列、P C A D M-1 が前立腺ガンに関連しおよび／またはその治療剤であるという驚くべき発見、および本明細書中で例示する 2 種の P C A D M-1 D N A Z Y M（すなわち、P C A D M-1 D N A Z Y M-1（配列番号 9）および P C A D M-1 D N A Z Y M-2（配列番号 10））を実行に移すことを武器とすると、熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、P C A D M-1 m R N A を特異的に切断する D N A 酵素を産生および／または設計できる。

20

【0300】

酵素核酸分子は、P C A D M-1 タンパク質をコードする標的 m R N A の高度に保存された配列領域（すなわち、A U G 翻訳開始部位からほぼヌクレオチド-9～ほぼヌクレオチド+450 までを含んでなる 5' m R N A 領域）を優先的に標的とする。これは、D N A 酵素を作製する技術の熟練者が、本明細書中に提供される開示に基づいて、P C A D M-1 m R N A を特異的に切断する D N A Z Y M が、m R N A の 5' 末端を優先的に標的とする P C A D M-1 D N A Z Y M を選択することにより産生できることを認めるであろうからであり、それは、末端短縮された P C A D M-1 タンパク質が、不変の P C A D M-1 タンパク質と同様の生物学的活性または性質を含んでなることができるからである。さらに加えて、P C A D M-1 m R N A 配列の 5' 末端から 5' 翻訳開始部位より約 450 塩基までの間にある領域（重複領域を含む）を標的とする P C A D M-1 D N A Z Y M が特に価値がある。すなわち、いかなる特定の理論に限定されることも望まないが、残存 m R N A（すなわち P C A D M-1 D N A Z Y M 処理の後）により発現されるであろういずれの短いペプチドも下流のロイシンジッパー様ドメインを含まず、そのドメインは、P C A D M-1 変異部位および推定 D N A 結合ドメインを含むものである。この観点より、P C A D M-1-D N A Z Y M-1 は P C A D M-1 m R N A の配列 155～171 を標的とし、そして P C A D M-1-D N A Z Y-2 M は P C A D M-1 m R N A の配列-7～+9 を標的とする（すなわち、P C A D M-1 m R N A の A U G 翻訳開始部位より）。

30

40

【0301】

従って、P C A D M-1 m R N A のそれらの領域に相補的な配列を含んでなる結合アームは、リボ核酸を切断できる触媒ドメインを含んでなる核酸に共有結合的に連結されるように合成、またはその他の方法で作製できる。このようにして作製された分子の D N A 酵素活性は、当該技術分野で周知の他のアッセイのなかでも、本発明の D N A 酵素を同定するために P C A D M-1 m R N A を切断するための分子の能力を評価することにより評価できる。それら分子を合成し、そしてそれらの D N A 酵素活性を評価するための方法は、当該技術分野で周知であるかおよび／または本明細書中の別の部分に記載されている。

【0302】

50

本明細書中に提供される教示を武器とする熟練者は、本発明が、少なくとも1種の酵素核酸を用いる疾患または病状の治療を包含することを理解するであろう。すなわち、当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、DNAZYMまたは酵素核酸を互いに組み合わせ、そして化学治療剤、小分子、ペプチド擬似体、アンチセンス、リボザイム、抗体などを含み、それらに限定はされない他の化合物と組み合わせて使用できることを認めるであろう。従って、本発明は、単一の酵素核酸のみの使用には限定されず、むしろ、本発明はPCADM-1 mRNAを特異的に切断する少なくとも1種のDNAZYMと組み合わせた他のDNAZYM、例えばMMP-2およびVEGF-1などに対するDNA酵素を用いることを包含する。酵素核酸分子は、所要の場合には特定の細胞または組織に外因的に供給されることができる。本発明のPCADM-1 DNAZYMは、上記に考察した疾患および病状（例えば前立腺ガン）、および、疾患または病状に悩まされない細胞または組織内のPCADM-1活性のレベルと比較して細胞または組織内で高いPCADM-1レベルに関連するいかなる他の疾患または病状の治療、予防、または双方のために有用である。

【0303】

PCADM-1 DNAZYMは、細胞に直接投与しても、またはカチオン脂質と錯体化、リボソーム内にパッケージング、またはその他の方法で細胞に送達できる。核酸または核酸錯体は、注入、輸液ポンプまたはステントを介して、バイオポリマー内に組み込みまたは組み込まずに、*ex vivo*（生体外）、または*in vivo*で関連組織に局所投与できる。好ましい態様では、PCADM-1 DNAZYMは、図1Aに図示するように配列番号1の配列と相補的な結合アーム（8～10bp）を含んでなる。

【0304】

従って、一つの局面では、本発明はPCADM-1をコードする核酸から発現されたRNAの切断を介して遺伝子発現および／または細胞増殖を阻害するPCADM-1 DNAZYMを含む。それらの化学的または酵素的に合成されたDNA分子は、それらの標的mRNAの接近可能領域と結合する結合領域、すなわち「結合アーム」を含んでなる。

【0305】

DNA分子は、mRNAの切断を触媒作用する触媒コアまたはドメインをさらに含んでなる。DNA分子は、好ましくは'10-23'モチーフ触媒コアを含んでなる。結合すると、PCADM-1 DNAZYMは標的mRNAを切断し、翻訳、タンパク質蓄積、またはその双方を防止する。標的mRNAの発現がないと、細胞増殖および／または生存が阻害される。

【0306】

一つの態様では、PCADM-1 DNAZYMはPCADM-1 mRNAを切断しそして細胞増殖および／または生存を阻害する。このようなPCADM-1 DNAZYMは、ガンまたはその他の疾患の予防および／または治療のために有用である。PCADM-1 DNAZYMは、直接添加するか、またはカチオン脂質と錯体化、リボソーム内にパッケージング、またはその他の方法を用いて平滑筋細胞に送達できる。DNAまたはDNA錯体は、カテーテル、輸液ポンプまたはステントの使用を介して、バイオポリマー内に組み込みまたは組み込まれずに関連組織に局所的に投与できる。同様に送達されたPCADM-1 DNAZYMは、PCADM-1の上昇したレベルと関連するある種のガン、特に前立腺ガンの増殖および／または生存を阻害するためにも有用である。本明細書中に記載された方法を用いて、PCADM-1 mRNAを切断しそれにより腫瘍細胞の増殖および／または生存を阻害する種々のPCADM-1 DNAZYMを、本明細書内の別の部分に記載のように産生、同定、および使用できる。

【0307】

それらのPCADM-1 DNAZYMは、個別に、または他の薬剤と組み合わせまたは関連させて、本明細書内の別の部分に開示のように疾患または病状を治療するために使用できる。例えば、DNAZYMは、PCADM-1レベルと関連する疾患もしくは病状を治療するために使用でき、患者を治療でき、または他の適当な細胞を処理してもよく、

それらは、本明細書中に提供される開示に基づいて当該技術分野の熟練者には明らかなものである。

【0308】

別の態様では、記載の PCADM-1 DNAZYM は、以上に考察した病状または疾患を治療するために他の公知の治療または外科的方法（例えば冷凍アブレーション法）と組み合わせて使用できる。例えば、記載の PCADM-1 DNAZYM は、ガンを治療するための 1 種またはそれ以上の公知治療剤と組み合わせて使用できるであろう。

標的 mRNA

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、PCADM-1 DNAZYM が PCADM-1 mRNA を特異的に標的とするように設計できることを認めるであろう。結合アームと触媒コアとの間の好ましくない分子内相互作用を有するそれらの PCADM-1 DNAZYM は、本明細書中に例示した種々のアッセイまたは当該技術分野で周知のアッセイを用いて考慮対象から除外される。

【0309】

熟練者は、本明細書中に提供される教示に基づいて、結合アームの長さを mRNA 切断活性を最適化するように選定できることを理解するであろう。一般に、それぞれのアーム上で少なくとも約 6～8 塩基が標的 mRNA と結合あるいはその他の相互作用をするために十分である。本明細書中で例示する PCADM-1 DNAZYM は、化学的に合成された。使用した合成方法は、ユスマンら (Usman et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 7845)、スカリンジら (Scarlinge et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5433)、およびウインコットら (Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23: 2677-2684) 中に記載のように通常のオリゴヌクレオチド合成のための方法に従い、そして通常の核酸保護およびカプリング基、例えば 5' 末端におけるジメトキシトリチルおよび 3' 末端におけるホスホロアミダイトを利用する。しかし、本発明は、本発明の DNAZYM を産生するためのいかなる特定の方法にも限定されない。

【0310】

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、一旦 PCADM-1 をコードする核酸の配列（例えば配列番号 1 と約 98% を越える配列一致を共有する核酸）を武器とすると、PCADM-1 ポリペプチドをコードする mRNA を特異的に切断する種々の DNAZYM を産生することが熟練者にとって日常的なこととなることを理解するであろう。すなわち、mRNA 配列に沿って種々の 6～10 塩基対「アーム」ヌクレオチド配列を選定しそして本明細書中の開示のようにして、または当該技術分野で公知であるかまたは将来開発されるようにして PCADM-1 mRNA 切断活性に対する推定 DNAZYM を評価することにより、種々の PCADM-1 特異性酵素核酸が同定および産生できる。従って、PCADM-1 mRNA を特異的に切断するこのような酵素核酸は、本発明内に包含される。好ましくは、PCADM-1 mRNA を特異的に切断する酵素核酸は、長さが約 6～10 ヌクレオチドのサイズ範囲の少なくとも 1 個の結合アームを含んでなる。さらに好ましくは、酵素核酸は、配列番号 1 に記載の AUG 翻訳開始部位に対して約 -9～約 +450 の PCADM-1 mRNA の配列に相補的な少なくとも 1 個の結合アームを含んでなる。それより一層好ましくは、翻訳開始部位に対して、結合アームは配列番号 1 の約 -7～約 +9、および配列番号 1 の約 +155～+171 の配列に相補的である。このような酵素は、配列

GATCTTCAGGCTAGCTACAAACGAGTCCCTTGA（配列番号 9）、および

GTTCCTCCAGGCTAGCTACAAACGACCCAGGGC（配列番号 10）

を有する本明細書中で例示するものを含むが、それらに限定はされない。

【0311】

PCADM-1 DNAZYM は、一般的方法を用いるゲル電気泳動により精製または

高圧液体クロマトグラフィー（HPLC、ウインコットら（上記）参照、それは引用することにより本明細書中に編入される）により精製され、そして水中に再懸濁できる。

PCADM-1 DNAZYM活性を最適化する

DNAZYM活性は、ドレーパーら（上記）による記載のようにして最適化できる。その詳細はここで繰り返さないが、しかしDNA酵素結合アームの長さを改変すること（約6から10塩基対に）または血清Dnaseによるそれらの分解を防止および／またはそれらの酵素活性を増強する修飾（塩基、糖類および／またはリン酸）を用いるPCADM-1 DNAZYMの化学合成を含む（例えばエクステインら（Eckstein et al.）国際特許出願番号WO92/07065号、ペローら（Perrault et al., 1990, Nature 344:565）、ピーケンら（Pieken et al., 1991, Science 253:314）、ユスマンおよびシーダーグレン（Usman and Cedergren, 1992, Trends in Biochem. Sci. 17:334）、ユスマンら（Usman et al., ）国際特許出願番号WO93/15187号、およびロッシら（Rossi et al.）国際特許出願番号WO91/03162号、スプロート（Sproat）米国特許第5, 334, 711号、およびバージンら（Burginet al.、上記）参照）。 10

【0312】

PCADM-1 DNAZYMは、リポソーム内のカプセル化、イオン泳動により、または他のビヒクル、例えばヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルまたはポリマーマトリックス中への混入により、および生物接着性細粒を含み、それらの限定はされない当該技術分野の専門家には公知の種々の方法により細胞に投与されてもよい。いくらかの指摘として、PCADM-1 DNAZYMは、上記のビヒクルを用いるかまたは用いないで細胞または組織にex vivoで直接送達できる。あるいは、DNA/ビヒクルの組み合わせは、直接注入によりまたはカテーテル、輸液ポンプまたはステントの使用により局所送達される。送達の他の経路には、静脈内、筋肉内または関節注入、エーロゾル吸入、経口（錠剤または丸薬形）、局所、全身、眼経由、腹腔内および／または髄腔内送達を含みそれらの限定されない方法を含む。DNAZYM送達および投与のさらに詳細な記載は、サリバンら（Sullivan et al., 上記）およびドレーパーら（Draper et al., 上記）で提供され、それらは引用することにより本明細書に編入される。 20 30

V. 組換え細胞およびトランスジェニック非ヒト哺乳動物

本発明は、なかでもPCADM-1をコードする単離された核酸を含んでなる組換え細胞を含む。一つの局面では、哺乳動物PCADM-1をコードする単離された核酸を含んでなる組換え細胞は、トランスジェニック非ヒト哺乳動物を産生するために使用される。すなわち、本発明の外因性核酸、または本明細書中で呼ばれる導入遺伝子を細胞内に導入し、次いで細胞を非ヒトトランスジェニック哺乳動物を生成するために使用する。導入遺伝子が導入される細胞は、好ましくは胚幹（ES）細胞である。しかし、本発明は、本発明の導入遺伝子を含んでなるES細胞、またはトランスジェニック動物を産生するために使用される細胞にみには限定されないと解釈されるべきである。むしろ、本発明のトランスジェニック細胞は、導入遺伝子を含んでなるトランスジェニック動物より誘導されたいずれかの細胞、トランスジェニックES細胞より誘導されたキメラ動物より誘導された導入遺伝子を含んでなる細胞、および非ヒトトランスジェニック動物を生成するための使用してもよいかまたはよくない導入遺伝子を含んでなるいずれかのその他のものを含むが、しかしそれらに限定はされない。 40

【0313】

さらに、導入遺伝子を含んでなる細胞、すなわち組換え細胞の目的が、トランスジェニック動物の生成に限定されると解釈されるべきではないことに注意することは重要である。むしろ、本発明は、哺乳動物PCADM-1をコードする単離された核酸を含んでなる原核細胞および真核細胞を限定されずを含む、哺乳動物PCADM-1をコードする核酸が導入されたいずれかの細胞タイプを含むと解釈されるべきである。 50

【0314】

細胞が真核細胞である場合、細胞は、本発明の導入遺伝子がある中に導入され、そして所望の遺伝子によりコードされるタンパク質がもはやそれより発現されない場合に利益が得られるいずれかの真核細胞であってもよい。このような利益は、細胞が存在する研究室内または哺乳動物内で *in vitro* で所望の遺伝子の発現の欠失を研究できる系、導入された遺伝子欠失を含んでなる細胞が研究、診断および治療の道具として使用できる系、および例えば前立腺ガンなどを含む哺乳動物内の選択された疾患状態のための新規の診断および治療道具の開発のために有用である動物モデルを生成する系が提供されるという事実を含んでもよい。

【0315】

10

あるいは、本発明は、本発明の導入遺伝子がある中に導入され、そして所望の遺伝子によりコードされるタンパク質が、それが以前に存在しなかったかもしくは細胞内で発現された場所で発現される場合、または以前に導入遺伝子が導入された場合とは異なるレベルでもしくは環境下で今回発現される場合に、利益が得られるような真核細胞を含む。このような利益は、細胞が存在する研究室内または哺乳動物内で所望の遺伝子の発現が *in vitro* で研究できる系、導入された遺伝子を含んでなる細胞が研究、診断および治療の道具として使用できる系、および哺乳動物内の選択された疾患状態のための新規の診断および治療の道具の開発のために有用である動物モデルが生成される系が提供されたという事実を含んでもよい。

【0316】

20

P C A D M-1 をコードする単離された核酸を発現するこのような細胞は、より高いレベルの P C A D M-1 が、低いレベルの P C A D M-1 発現および／または活性に関連する疾患、障害または病状を治療または軽減するために有用であり得る場合に、細胞、組織、または動物全身に P C A D M-1 を提供するために使用できる。このような疾患、障害または病状は、前立腺ガン、および可能性としてその他の充実性ガンまたは白血病、エイズ、H I V 感染、免疫障害および炎症または退行性障害などを含むことができるが、それらに限定はされない。従って、本発明は、P C A D M-1 発現、翻訳、および／または活性を増加または誘発するために P C A D M-1 を発現する細胞を含み、ここで増加した P C A D M-1 発現、タンパク質レベル、および／または活性は疾患、障害または病状を治療または軽減するために有用であり得る。

30

【0317】

通常の熟練者は、本明細書内に提供される開示に基づいて、本発明の「ノックアウト」または「ノックイン」ベクターが、それぞれ置換または欠失されるべき核酸の2個の部分にホモログな少なくとも2個の配列を含んでなることを認めるであろう。2個の配列は、遺伝子に隣接する配列とホモログであり、すなわち、一つの配列は P C A D M-1 をコードする核酸のコーディング配列の5'部分またはその近傍とホモログでありそして他の配列は第一のものよりさらに下流にある。当該技術分野の熟練者は、本明細書内に提供される開示に基づいて、本発明がいかなる特定のランキング核酸配列にも限定されないことを認めるであろう。反対に、ターゲティングベクターは、それぞれ哺乳動物ゲノムよりもしくはそれらの中に、P C A D M-1、もしくはそのフラグメントをコードする核酸の一部または全体を除去する（すなわち「ノックアウト」ベクター）または挿入する（すなわち「ノックイン」ベクター）の2個の配列を含んでなってもよい。ターゲティングベクターの重要な特徴は、それが、「ノックアウト」ベクターの場合に P C A D M-1 オープンリーディングフレーム (O R F) の反対側すなわち5'および3'末端に向かって位置する2個の配列の十分な部分を含んでなっていることであり、P C A D M-1 をコードする核酸の全体または一部分が哺乳動物染色体上の位置から欠失またはその中への挿入が起きるようにホモログ組換えにより欠失／挿入が可能とする。

40

【0318】

導入遺伝子およびノックインおよびノックアウトターゲティングベクターの設計は、当該技術分野で周知でありそして標準的論文、例えばサムブルックら「分子クローニング、

50

実験マニュアル」(Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) およびオースベルら「分子生物学における最近のプロトコル」(Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)などに記載されている。ターゲティングベクター内に使用されるPCADM-1コーディング領域にフランキングまたはその中の上流および下流部分は、公知方法に基づきそしてマウスおよびヒトPCADM-1の両者の核酸およびアミノ酸配列を含み本明細書内で提供される開示に基づく本明細書内で開示される教示に従って容易に選択されるであろう。それらの配列を武器とすると、当該技術分野の通常の熟練者は、本発明の導入遺伝子およびノックアウトベクターを構築できるであろう。 10

【0319】

本発明は、選択可能なマーカーをコードする核酸、例えばneo^R 遺伝子をコードする核酸を含んでなるノックアウトターゲティングベクターをさらに含み、これによりPCADM-1、またはそのフラグメントをコードする核酸が欠失されそしてG418の存在下で増殖する細胞の能力によりネオマイシン耐性遺伝子で置換された導入遺伝子の選択を可能とする。しかし、本発明は、選択可能マーカーとしてネオマイシン耐性に制限されると解釈されてはならない。むしろ、当該技術分野で周知の他の選択可能マーカーをノックアウトターゲティングベクター内に使用して、PCADM-1遺伝子が欠失および／または不活性化されそして選択した選択可能なマーカーをコードする核酸により置換された組換え細胞の選択を可能とするように使用されてもよい。選択可能マーカーを選択しそしてベクター内に組み込む方法は、当該技術分野で周知であり、そして例えばサンプルックら「分子クローニング、実験マニュアル」(Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) およびオースベルら「分子生物学における最近のプロトコル」(Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)などに記載されている。 20 30

【0320】

本明細書中に記載のように、本発明は、そのゲノム内の所望の部位内に挿入されそれにより所望の外因性標的遺伝子のコーディング領域を欠失する外因性核酸を含んでなる非ヒトトランスジェニック哺乳動物、すなわちノックアウトトランスジェニック哺乳動物を含む。さらに、本発明は、PCADM-1をコードする外因性核酸がゲノムの部位内に挿入されたトランスジェニック非ヒト哺乳動物、すなわち「ノックイン」トランスジェニック哺乳動物を含む。挿入されたノックイン導入遺伝子は、例えばポリペプチド、および細胞内に通常は存在しないかまたは典型的にはPCADM-1に操作可能に連結していない、PCADM-1をコードする核酸に操作可能に連結するプロモーター／調節領域をコードする種々の核酸を含んでなってもよい。 40

【0321】

本発明の非ヒトトランスジェニック哺乳動物の生成は、好ましくはここで記載する方法を用いて達成される。しかし、本発明は、他の方法が所望のノックアウト哺乳動物を生成するために使用できる場合に、本方法の使用にのみ限定されると決して解釈されるべきではない。

【0322】

非ヒトトランスジェニック哺乳動物を生成する好ましい方法において、ES細胞が本発明の導入遺伝子を含んでなって生成され、次いでナジおよびロッサント「遺伝子ターゲティング、実際的方法」(Nagy and Rossant, 1993, Gene Targeting, A Practical Approach, 146-179ページ, 50

Joyner編集, IRL Press)に記載されているものと本質的に同様にして、ノックアウト動物を生成するために細胞が使用される。ES細胞は、もしそれらが宿主胚盤胞内に注入されるかまたは割球段階胚と凝集されて胚環境に返還される場合に、正常な胚細胞として挙動する。そのように返還された場合に、細胞は胚のすべての成分と同時に発達する完全な能力を有する。従って、ES細胞を取得し、その中に所望のDNAを導入し、次いで成熟哺乳動物細胞に発達させるために細胞を胚環境に返還することが可能であり、ここで所望のDNAが発現されてもよい。

【0323】

トランスジェニックマウスの生成のための正確なプロトコールは、ナジおよびロッサント「遺伝子ターゲティング、実際的方法」(Nagy and Rossant, 1993, Gene Targeting, A Practical Approach, Joyner編集, IRL Press, 146-179ページ)中に開示されており、従って本明細書では繰り返さない。その中に所望のDNAを導入するためのES細胞のトランスフェクションまたは形質導入は、例えばサムブルックら「分子クローニング、実験マニュアル」(Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)およびオースベルら「分子生物学における最近のプロトコール」(Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)などに記載されているような標準プロトコールを用いて達成される。好ましくは、本発明の導入遺伝子内に含まれる所望のDNAはES細胞内へ電気泳動され、そして細胞はソリアーノら(Soriano et al., 1991, Cell 64: 693-702)に記載のようにして繁殖される。

【0324】

哺乳動物の受精した卵内への単離された核酸の導入は、トランスジェニック技術の標準技術(ホーガンら「マウス胚の操作: 実験マニュアル」(Hogan et al., 1986, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY))のいずれのものによってでも達成される。最も一般的には、核酸はマイクロインジェクションの方法により胚内に導入される。

【0325】

一旦核酸が卵内に導入されると、卵は短時間インキュベーションされ次いで同じ種の擬妊娠哺乳動物内に転移され、これから例えばホーガンら「マウス胚の操作: 実験マニュアル」(Hogan et al., 1986, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY)に記載のようにして卵が得られる。典型的には、実験あたりに多数の卵に注入され、そして卵の約3分の2がこの手順で生き残る。次いで約20個の卵を擬妊娠哺乳動物内に転移し、そして通常このようにして転移された生存可能な卵の4個~10個を生きた子(pup)に生育させる。

【0326】

いかなる哺乳動物PCADM-1遺伝子でも、その哺乳動物PCADM-1遺伝子の全体または一部分の欠失を含んでなる導入遺伝子を内包するトランスジェニック哺乳動物またはトランスジェニック細胞を産生するために本明細書中に記載の方法中に使用してもよい。好ましくは、げっ歯類PCADM-1が使用される。

【0327】

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、哺乳動物のいかなる種であることもできる。従って、本発明は、キメラ核酸をコードするトランスジェニック哺乳動物の生成を含むと解釈されるべきであり、その哺乳動物には、マウス、ハムスター、ラット、ウサギ、ブタ、ヒツジおよびウシなどが含まれる。トランスジェニックマウスの生成のために本明細書中に記載の方法は、いかなる哺乳動物種にも使用して同様に適用できる。好ましくは、本

発明のトランスジェニック哺乳動物はげっ歯類でありそしてさらに一層好ましくは本発明のトランスジェニック動物はマウスである。例示として、ルッカリネンら (L u k k a r i n e n e t a l . , 1 9 9 7 , S t r o k e 2 8 : 6 3 9 - 6 4 5) は、トランスジェニックマウスの生成を可能とし、またラットを含む他のトランスジェニックげっ歯類動物の生成も可能とする遺伝子構築物を教示している。同様に、一つの種の動物の遺伝子座内の零変異 (n u l l i z y g o u s m u t a t i o n) は、最初の種に高度にホモロガスな遺伝子座を有する他の種の動物内で複製できる。

【0328】

本発明のトランスジェニック動物を同定するために、子を標準技術、例えばサザンブロットハイブリダイゼーション、PCR、および／またはRT-PCRを用いて単離された核酸の存在について検査する。哺乳動物の細胞内および組織内の核酸の発現も本明細書内に記載の通常の技術を用いて評価できる。さらに、トランスジェニック動物の循環血液内のPCADM-1の存在または不在は、例えば本明細書中に開示 (例えばウエスタンブロット分析) のようにするか、または当該技術分野で周知のタンパク質検出のための標準方法を用いて決定できる。

【0329】

本明細書中で使用される用語として「トランスジェニック細胞」とも考えられる本発明のトランスジェニック哺乳動物より得られた細胞は、本明細書の別の部分に記載のPCADM-1 (+/-) および (-/-) トランスジェニック非ヒト哺乳動物より得られた細胞も包含し、PCADM-1発現の改変されたレベルと関連すると信じられている哺乳動物の疾患および症状、例えば前立腺ガン、およびPCADM-1発現の改変されたレベルと関連するあらゆる他の疾患、障害または病状のモデル化のための有用な系である。

【0330】

さらに、このような前立腺の腫瘍増殖およびその他の異常と関連する経路のマーカーとして、PCADM-1発現レベルは、このような疾患、障害または病状の評価における有用なインジケータでもある。

【0331】

特に適するものは、本明細書中に記載の非ヒトのノックアウトまたはノックイントランスジェニック哺乳動物の組織より誘導された細胞であり、ここでPCADM-1遺伝子を含んでなる導入遺伝子は、種々の組織中でPCADM-1を発現されるかまたは発現を阻害される。例示として、このような細胞が誘導される細胞タイプには、(1) PCADM-1 (+/+), (+/-) および (-/-) 非ヒトトランスジェニック生産哺乳動物児、(2) PCADM-1 (+/+), (-/-) または (+/-) 動物胎児、および (3) PCADM-1 (+/+), (-/-) および (+/-) 胎児および哺乳動物生産児より得られた胎盤細胞系統の繊維芽細胞、内皮、脂肪細胞、および筋芽細胞が含まれる。

【0332】

当該技術分野の熟練者は、この開示に基づいて、PCADM-1タンパク質の低下したレベル、PCADM-1活性の低下したレベル、または両者を含んでなる細胞が、PCADM-1発現の細胞発現阻害剤 (例えばDNAzym、アンチセンスまたはリボザイム分子) を発現する細胞を含むが、しかしそれらに限定はされないことを認めるであろう。

【0333】

カルチャー内で哺乳動物細胞を維持するために有用な方法および組成物は、当該技術分野では周知であり、ここで哺乳動物細胞は、本明細書中に記載のトランスジェニックマウスのようなマウスより得られた細胞、または霊長類および非霊長類哺乳動物より得られた細胞を含むが、それらに限定はされない哺乳動物より得られる。

【0334】

本発明の組換え細胞は、治療および／または診断目的のための使用のためにPCADM-1を産生するために使用できる。すなわち、PCADM-1を発現する組換え細胞は、PCADM-1の低下したレベルと関連またはそれから起きる疾患、障害または病状を治療または軽減するために投与できる精製されそして単離された大量のPCADM-1を産

生するために使用できる。

【0335】

あるいは、PCADM-1を発現する組換え細胞は、*ex vivo*および*in vivo*治療において投与でき、ここでそれによる組換え細胞の投与は、細胞、組織、および／または動物へタンパク質を投与する。さらに、組換え細胞はPCADM-1受容体およびPCADM-1シグナル伝達経路の発見のために有用である。

【0336】

本発明の組換え細胞は、細胞ホメオスタシスおよび細胞増殖に基づく上昇または低下したPCADM-1レベルの影響を研究するために使用されてもよいが、それはPCADM-1が前立腺ガンなどにおいてある役割を有すると仮定されるからである。

10

【0337】

細胞がPCADM-1を発現しないか、または生物学的活性を欠失した低下または改変されたPCADM-1を発現するように操作された本発明の組換え細胞は、動物自身の細胞（例えば内皮細胞、繊維芽細胞、平滑筋細胞、白血球、樹状細胞など）または同系の対応（*matched*）ドナーの細胞どちらかが本明細書の他の部分に記載のようにして操作（例えば、PCADM-1発現および／またはタンパク質レベルが組換え細胞中でそれにより低下するようなアンチセンス核酸またはノックアウトベクターの挿入による）された組換え体であり、そして組換え細胞がレシピエント動物に投与される*ex vivo*および*in vivo*細胞治療にも使用できる。この方法で、低下したレベルでPCADM-1を発現する組換え細胞は、動物自身の細胞がPCADM-1の上昇したレベルを発現する動物に投与でき、それにより本明細書の他の部分の開示のようにして上昇したPCADM-1発現に関連またはそれにより媒介される疾患、障害または病状を治療または軽減する。

20

【0338】

前立腺ガンと疑われる本発明のトランスジェニック動物は、前立腺ガンの病原発生およびその中のPCADM-1の可能な役割を研究するために使用できる。

【0339】

さらに本発明のトランスジェニック動物および／または細胞は、PCADM-1の細胞内定位を研究するために使用されてもよい。

【0340】

また、トランスジェニック動物（+／-および-/-生産児および胎児の双方）および／または本発明の細胞は、グルコース代謝におけるPCADM-1の役割を研究するためおよびPCADM-1作用の標的ならびに細胞内のその効果を媒介するためにPCADM-1と結合するいずれかの受容体を解明するために使用してもよい。

30

VI. 抗体

本発明は、PCADM-1、またはそのフラグメントに特異的に結合する抗体も含む。

【0341】

一つの態様では、抗体は配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるヒトPCADM-1、またはその免疫原性部分に向けられる。

【0342】

ポリクローナル抗体は、当該技術分野で周知の標準免疫学的技術に従ってウサギを免疫化して産生される（例えばハーロウ「抗体：実験マニュアル」（*Harlow et al.*, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY））。本明細書中で例示される抗体は、標準技術を用いて産生され、これにより、動物は組換え的に産生された抗原で免疫化されそして標準の当該技術分野で認められた方法に従って抗原を用いて反復してブーストされた。しかし、本発明は、本方法またはいかなるその他の方法にも限定されずそして抗体は、他のタンパク質、例えばマルトース結合タンパク質の部分またはグルタチオン（GSH）タグポリペプチド部分、および／またはPCADM-1部分が免疫原性を与えられる領域（例えばキーホールリンベットヘモシアニン（KLH）と共役するPCADM-1）およ

40

50

びそれぞれげっ歯類および／またはヒトPCADM-1アミノ酸残基を含んでなる部分を含んでなるキメラタンパク質を用いて動物を免疫化する方法により、しかしそれに限定はされないが、産生できると理解されるべきである。該キメラタンパク質は、PCADM-1をコードする適当な核酸（例えば配列番号1）をこの目的に適するプラスミドベクター、例えば、これらに限定はされないが、pBK-CMV、pMAL-2またはpCMX内にクローニングして産生される。

【0343】

しかし、本発明は、それらの抗体、またはタンパク質抗原のそれらの部分にのみ限定されると解釈されてはならない。むしろ、本発明は、マウスおよびヒトPCADM-1と特異的に結合する他の抗体（この用語は本明細書の他の部分で定義される）、またはその部分を含むと解釈されるべきである。さらに、本発明は、なかでもPCADM-1に結合する抗体を包含すると解釈されるべきでありそしてそれらはウエスタンブロット上、酵素結合免疫アッセイにおける溶液中、蛍光表示細胞分別化（FACS）アッセイ中、それにより組織中のPCADM-1を定位する組織の免疫組織化学染色中、およびPCADM-1の少なくとも一部分をコードする核酸を用いて一時的にトランスフェクションされた細胞の免疫蛍光顕微鏡において存在するPCADM-1に結合できる。

【0344】

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、抗体がタンパク質のいずれの部分とも特異的に結合できそして全長タンパク質がそれに特異性の抗体を生成するために使用できることを認めるであろう。しかし、本発明は、免疫原として全長タンパク質を用いることに限定はされない。むしろ、本発明は、哺乳動物PCADM-1と特異的に結合する抗体を産生するためのタンパク質の免疫原部分を用いることを含む。すなわち、本発明は、PCADM-1タンパク質の免疫原性部分、または抗原決定因子を用いる動物の免疫化を含む。

【0345】

該抗体は、動物、例えば、これらに限定はされないが、ウサギまたはマウスを、本発明のタンパク質またはその一部分を用いて免疫化し、またはPCADM-1の少なくとも一部分を含んでなるタンパク質、または例えば、適当なPCADM-1アミノ酸残基を含んでなる部分と共有結合的に結合したマルトース結合タンパク質タグポリペプチド部分を含んでなるタグポリペプチド部分を含む融合タンパク質を用いて動物を免疫化することにより産生できる。当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、それらタンパク質のさらに小さいフラグメントもPCADM-1を特異的に結合する抗体を産生するために使用できることを認めるであろう。

【0346】

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、単離されたPCADM-1ポリペプチドの種々の部分が、PCADM-1の高度保存領域に対し、または変異を含む領域を含むポリペプチドの非保存領域のいずれかに対する抗体を産生するために使用できることを認めるであろう。

【0347】

PCADM-1の配列およびタンパク質の種々の保存および非保存ドメインを定位する詳細分析を武器とすると、熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、当該技術分野で周知であるかまたは今後開発される方法を用いて哺乳動物PCADM-1ポリペプチドの種々の部分に対して特異的な抗体をどのようにして得るかを理解するであろう。

【0348】

さらに、熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、関係するタンパク質の非保存領域が、種々の生物体の間で保存される高度保存領域よりもさらに免疫原性であり得ることを認めるであろう。さらに、非保存免疫原性部分を用いる免疫化は、非保存領域に特異性の抗体を産生し、それにより、1種またはそれ以上の保存部分を共有することがある他のタンパク質との交差反応をしない抗体を産生できる。従って、当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、PCADM-1分子の非保存領域が、そ

のPCADM-1に対してのみ特異性でありそして他のPCADM-1とまたは他のタンパク質、例えばヒトS2と非特異的に交差反応しない抗体を産生できることを認めるであろう。さらに具体的には、当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、PCADM-1がS2の同じ残基とは異なる5個のアミノ酸を含んでなる、すなわち配列2のアミノ酸配列に対してPCADM-1はアミノ酸残基番号64においてT（トレオニン）、アミノ酸残基番号155においてN（アスパラギン）、残基番号159においてA（アラニン）、残基番号163においてR（アルギニン）、および残基番号169においてR（アルギニン）を含んでなり、それらすべては、ヒトS2のアミノ酸配列の同じ位置のアミノ酸残基とは異なる点においてPCADM-1をS2が異なることを認めるであろう（例えばジーンバンクアクセッション番号（GenBank Accession No）XM045032、ヒトS2 40Sリボソームタンパク質）。 10

【0349】

あるいは、熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、1個またはそれ以上のPCADM-1分子間に保存されている領域を用いて発生された抗体が、1種またはそれ以上のPCADM-1分子とおよびPCADM-1と約98%アミノ酸ホモロジーを共有するヒトS2と特異的に反応する抗体を産生するために使用できることも理解するであろう。すなわち、熟練者は、アミノ酸置換（すなわちアミノ酸残基番号64、155、159、163および169）の領域を含んでないS2およびPCADM-1の部分が、S2およびPCADM-1と特異的に結合する抗体を産生するために使用できそしてそれらの抗体が本発明の方法にも使用できることを理解するであろう。S2の配列は、当該技術分野で周知でありそして、ジーンバンクアクセッション番号XM045032などの配列を含むがそれらに限定はされない。 20

【0350】

さもないとタンパク質の他の部分よりも免疫原性が低いであろう保存タンパク質ドメインと特異的に結合する抗体を産生する方法は当該技術分野で周知であり、そして関係するタンパク質フラグメントを分子（例えばキーホールインペットヘモシアニンなど）に共役し、それによりタンパク質ドメインに免疫原性を与えるか、またはアジュバント（例えばフロイントの完全および／または不完全アジュバントなど）の使用により与え、または双方を含むが、それらに限定はされない。従って、本発明は、少なくとも1種のPCADM-1を認識する抗体および1種を越えるPCADM-1と特異的に結合する抗体を包含し、すべてのPCADM-1とおよび／またはS2と特異的に結合する抗体も含む。 30

【0351】

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、PCADM-1のどの部分が保存ドメインを共有する他のタンパク質とホモロジー性が低いかを認めるであろう。しかし、本発明は、いかなる特定のドメインにも限定されない。反対に熟練者は、本発明のPCADM-1タンパク質の他の非保存領域が、本明細書中で開示される本発明の抗体を産生するために使用できることを理解するであろう。

【0352】

従って、熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、本発明が、PCADM-1活性（例えば必要なPCADM-1/DNA結合相互作用などによる）を中和および／または阻害する抗体を包含し、その抗体は1種またはそれ以上のPCADM-1を認識できることを認めるであろう。 40

【0353】

本発明は、本明細書中で開示される抗体のみまたは本発明のタンパク質のいずれか特定の免疫原性部分のみに限定されると解釈されてはならない。むしろ、本発明は、PCADM-1またはその部分に対して、または配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと少なくとも約98%ホモロジーを共有するタンパク質に対する他の抗体（用語は本明細書の他の部分で定義される）を含むと解釈されるべきである。好ましくは、ポリペプチドはヒトPCADM-1（配列番号2）に99%ホモログスである。さらに好ましくは、哺乳動物PCADM-1に特異性の抗体と特異的に結合するポリペプチドがヒトPCADM 50

－1である。最も好ましくは、哺乳動物PCADM－1と特異的に結合する抗体と特異的に結合するポリペプチドが配列番号2である。

【0354】

本発明は、ポリクローナル、モノクローナル、合成抗体などを包含する。当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、本発明の抗体の重要な特徴は、抗体がPCADM－1と特異的に結合することにあることを理解するであろう。すなわち、本発明の抗体は、ウエスタンブロット上、細胞の免疫染色において、PCADM－1またはそのフラグメント（例えばその免疫原性部分または抗原決定因子）を認識し、そして当該技術分野で周知の標準方法を用いてPCADM－1を免疫沈降させる。

【0355】

当該技術分野の熟練者は、PCADM－1と40SリボソームS2タンパク質との間の高度の類似性のために、S2への抗体は、PCADM－1と交差反応できることを認めるであろう。このようなS2抗体は、それらがPCADM－1を検出するために使用できるので、本開示中に記載される方法のためにも有用である。従って、当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、S2と特異的に結合し、そしてPCADM－1とも結合する抗体が、本明細書の別の部分にさらに詳しく記載するように本発明の方法に使用できることを理解するであろう。

【0356】

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、抗体が、細胞内の関係があるタンパク質を定位するためおよび細胞プロセス中でそれらにより認識される抗原の役割を研究するために使用できることを認めるであろう。さらに、抗体は、周知の方法、これらに限定はされないが、ウエスタンブロット法および酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などを用いて生物学的試料中に存在するタンパク質を検出またはその量を測定するために使用できる。さらに、抗体は、当該技術分野で周知の方法を用いてそれらの同族抗原を免疫沈降および／または免疫アフィニティー精製するために使用できる。それに加えて、抗体は細胞中のPCADM－1のレベルを低下させ、それにより細胞内のPCADM－1の影響を阻害するために使用できる。従って、動物の細胞もしくは組織へまたは動物自体へ抗体を投与することにより、所要のPCADM－1受容体／リガンド相互作用は、PCADM－1媒介信号伝達の影響も阻害されるように阻害される。当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、抗－PCADM－1抗体を用いるPCADM－1タンパク質／核酸結合相互作用を阻害した際の検出可能な影響が、前立腺ガン細胞などの低下した増殖を含むことができ、それらに限定はされないことを理解するであろう。

【0357】

熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、本発明が、単一PCADM－1エピトープを認識するいずれかの単一抗体の使用を含むこと、しかし本発明は単一抗体の使用で限定はされないことを認めるであろう。反対に、本発明は、抗体が同一または異なるPCADM－1エピトープに向かうことができるような少なくとも1種の抗体の使用を包含する。

【0358】

ポリクローナル抗体の生成は、例えばハーロウら「抗体：実験マニュアル」（Harlow et al., 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY）に記載されている方法のような標準抗体産生方法を用いて、所望の動物に抗原を接種しそして存在する抗原を特異的に結合する抗原を単離して達成される。

【0359】

タンパク質またはペプチドの全長またはペプチドフラグメントに対して指向されるモノクローナル抗体は、いずれかの周知のモノクローナル抗体調製方法、例えばハーロウら「抗体：実験マニュアル」（Harlow et al., 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

10

20

30

40

50

、NY) およびツシンスキら (Tuszynski et al., 1988, Blood, 72:109-115) に記載の方法を用いて調製してもよい。所望のペプチドの量は、化学合成技術を用いて合成してもよい。あるいは、所望のペプチドをコードするDNAは、大量のペプチドの生成に適する細胞内の適当なプロモーター配列にクローニングおよびそれから発現されてもよい。ペプチドを指向するモノクローナル抗体は、本明細書中に引用する標準方法を用いてペプチドで免疫化されたマウスから生成される。

【0360】

本明細書中に記載の方法を用いて得られたモノクローナル抗体をコードする核酸は、当該技術分野で利用可能でありそして例えばライトら (Wright et al., 1992, Critical Rev. Immunol. 12:125-168) およびその中に引用されている抗体を用いてクローニングおよび配列決定されてもよい。 10

【0361】

さらに、本発明の抗体は、例えばライトら (上記) 中、およびその中に引用されている引用文献、およびグら (Guet al., 1997, Thrombosis and Hematocyst 77:755-759) 中に記載の技術、およびその他の当該技術分野で周知かまたは今後開発される抗体をヒト化 (humanizing) するための方法を用いて「ヒト化」されてもよい。

【0362】

ファージ抗体ライブラリーを生成するために、ファージ表面上に発現される所望のタンパク質、例えば所望の抗体を発現する細胞、例えばハイブリドーマから単離されるmRNAからcDNAライブラリーが最初に得れる。mRNAのcDNAコピーは逆転写酵素を用いて産生される。免疫グロブリンフラグメントを特定するcDNAはPCRにより得られそして得られたDNAを適当なバクテリオファージベクター内にクローニングさせて、免疫グロブリン遺伝子を特定するDNAを含んでなるバクテリオファージDNAライブラリーを生成させる。異種DNAを含んでなるバクテリオファージライブラリーを作製するための手順は、当該技術分野で周知でありそして例えば上記のサムブルック等中に記載されている。 20

【0363】

所望の抗体をコードするバクテリオファージは、その相当する結合タンパク質、例えば抗体が指向する抗原に結合するために適するようにな様式でタンパク質をその表面にディスプレイ (display) するように操作してもよい。従って、特定の抗体を発現するバクテリオファージが相当する抗原を発現する細胞の存在下でインキュベーションされると、バクテリオファージは細胞に結合する。抗体を発現しないバクテリオファージは細胞に結合しない。このようなパンニング技術は、当該技術分野では周知でありそしてライトら (上記) 中に記載されている。 30

【0364】

以上に記載したようなプロセスは、M13バクテリオファージディスプレイを用いるヒト抗体の産生のために開発された (バートンら (Burton et al., 1994, Adv. Immunol. 57:191-280))。本質的には、cDNAライブラリーは抗体産生細胞の集団から得られたmRNAより生成される。mRNAは再構成された免疫グロブリン遺伝子をコードし従ってcDNAはそれをコードする。増幅されたcDNAは、それらの表面上にヒトFabフラグメントを発現するファージのライブラリーを創成するM13発現ベクター内にクローニングされる。関係する抗体をディスプレイするファージは、抗原結合性により選択されそして可溶性ヒトFab免疫グロブリンを産生するために細菌内で繁殖される。従って、通常のモノクローナル抗体合成とは異なり、本方法は細胞ではなくヒト免疫グロブリンをコードするDNAを不死化し、それはヒト免疫グロブリンを発現する。 40

【0365】

ここに提出した手順は、抗体分子のFab部分をコードするファージの生成を記載する。しかし、本発明は、Fab抗体をコードするファージの生成のみに限定されると解釈さ 50

れてはならない。むしろ、一本鎖抗体（s c F v / ファージ抗体ライブラリー）をコードするファージも本発明内に含まれる。F a b 分子は I g 軽鎖全体を含んでなり、すなわち、それらは軽鎖の可変および不変領域双方を含んでなるが、しかし重鎖の可変領域および第一不変領域ドメイン（C H 1）のみを含む。一本鎖抗体分子は I g F v フラグメントを含んでなるタンパク質の一本鎖を含んでなる。I g F v フラグメントは、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域のみを含み、それらの中に含まれる不変領域は持っていない。s c F v D N A を含んでなるファージライブラリーは、マークスら（M a r k s e t a l . , 1991, J. M o l . B i o l . 222: 581-597）に記載の手順に従って生成されてもよい。所望の抗体の単離のためにこのように生成されたファージのパンニングは、F a b D N A を含んでなるファージライブラリーのために記載されたものと同様の方法で行われる。

10

【0366】

本発明は、その中で重鎖および軽鎖可変領域がほとんどすべての可能な特異性を含むように合成されてもよい合成ファージディスプレイライブラリーを含むと解釈されるべきである（バーバス（B a r b a s , 1995, N a t u r e M e d i c i n e 1: 837-839）、デクルイフら（d e K r u i f e t a l . , 1995, J. M o l . B i o l . 248: 97-105））。

【0367】

当該技術分野の熟練者は、本明細書中に提供される開示に基づいて、本発明が、他の薬剤、特に細胞の増殖または細胞分裂を殺すかまたは抑制する能力を有する他の薬剤、特に細胞毒性または抗細胞薬剤に連結した P C A D M - 1 と特異的に結合する抗体成分を含んでなるイムノトキシンを包含することを認めるであろう。このようなイムノトキシン、またはイムノコンジュゲートは、当該技術分野では周知でありそしてそれらを産生するために使用できる多数の毒性薬剤があり、例えば、これらに限定はされないが、リシントキシン、ブドウ球菌エンテロトキシン（S t a p h y l o c o c c a l e n t e r o t o x i n）A（S E A）（ドールステンら（D o h l s t e n e t a l . , 1994, P r o c . N a t l . A c a d . U S A 91: 8945-8949））、植物トキシンのゲロニン（g e l o n i n）（ローゼンブルムら（R o s e n b l u m e t a l . .）米国特許第5, 624, 827号）、シュードモナス エキソトキシン（p s e u d o m o n a s e x o t o x i n , P E）などである。従って、本発明は、腫瘍細胞に対する細胞毒性薬剤を優先的に標的として P C A D M - 1 と特異的に結合し、一方、正常の細胞および組織への細胞毒性作用を最小化するための抗体の使用を包含し、それは、本明細書中に開示するように、腫瘍細胞が、正常で非腫瘍性細胞よりも高いレベルの P C A D M - 1 を発現するからである。

20

30

V I I . 組成物

本発明は哺乳動物の P C A D M - 1 をコードする核酸またはその部分に相補的な単離された核酸（これは転写に関してアンチセンス方向である）を含む。好ましくは組成物は製薬学的に許容され得る担体を含んでなる。

【0368】

本発明は、哺乳動物の P C A D M - 1 をコードする核酸またはその部分に相補的な単離された核酸（これは P C A D M - 1 を特異的に開裂する D N A Z Y M または D N A 酵素である）を含む。好ましくは組成物は製薬学的に許容され得る担体を含んでなる。好ましくは組成物は製薬学的に許容され得る担体を含んでなる。

40

【0369】

本発明は本明細書に記載する単離された哺乳動物の P C A D M - 1 ポリペプチドを含んでなる組成物を含む。好ましくは組成物は製薬学的に許容され得る担体を含んでなる。

【0370】

また本発明は P C A D M - 1 に特異的に結合する抗体を含んでなる組成物も含む。好ましくは組成物は製薬学的に許容され得る担体を含んでなる。

【0371】

50

本発明はさらに哺乳動物のPCADM-1をコードする単離された核酸を含んでなる組成物を含む。好ましくは組成物は製薬学的に許容され得る担体を含んでなる。この組成物はPCADM-1および／またはタンパク質をコードする核酸を細胞、組織または動物に投与するために、あるいは細胞、組織または動物におけるPCADM-1の発現を阻害するために使用することができる。この組成物はPCADM-1の改変された発現により媒介される疾患、障害または状態を処置するために有用であるので、細胞、組織または動物におけるPCADM-1の発現またはタンパク質レベルを減少または増加させることは動物にとって有益となる。すなわち動物の疾患、障害または状態がPCADM-1発現の改変されたレベルまたはタンパク質レベルに媒介または関係される場合、この組成物はPCADM-1のそのような発現またはタンパク質レベルを調節するために使用することができる。 10

【0372】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、PCADM-1はタンパク質自体を投与することにより、あるいはタンパク質をコードする核酸を投与することにより、細胞または組織に投与され得ると理解するだろう。いずれの方法もPCADM-1が細胞および／または組織に投与される。

【0373】

哺乳動物への投与については、ポリペプチドまたはそれをコードする核酸、ポリペプチドをコードするmRNAを特異的に開裂するリボザイム、および／またはタンパク質をコードする核酸の全部または一部に相補的なアンチセンス核酸を、製薬学的に許容され得る担体、例えば約pH7.8のHEPES緩衝化生理食塩水に懸濁することができる。 20

【0374】

さらに当業者は本明細書に提供する開示に基づき、本発明がPCADM-1をコードする核酸、単離されたPCADM-1ポリペプチド、PCADM-1をコードする核酸から転写されたmRNAを特異的に開裂する酵素的核酸(DNAzym)、およびPCADM-1に特異的に結合する抗体およびそれらの部分の少なくとも1つを含んでなる組成物を包含すると考えるだろう。

【0375】

本発明に包含される組成物は、PCADM-1ポリペプチドの種々のエピトープに特異的に結合する種々の抗体、およびPCADM-1mRNAの種々の領域および／またはPCADM-1mRNAをコードするmRNAの重複領域に特異的に結合し、そして開裂するDNAzymを含んでなるものを含んでなる。 30

【0376】

当業者は本開示に基づき、上で検討した化合物、すなわちDNAzymまたはDNA酵素、リボザイム、アンチセンス核酸、抗体、PCADM-1をコードする核酸、およびPCADM-1ポリペプチド、PCADM-1ポリペプチドに特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチド等の混合物を含んでなる組成物が本発明に包含されると理解するだろう。

【0377】

さらに組成物が限定するわけではないが、低分子、ペプチド模造物、DNAzymまたはDNA酵素、リボザイムおよび他のタンパク質に特異的なアンチセンス核酸(例えばVEGF-1およびMMP-2等)、薬剤、化学療法剤等のようなさらなる化合物を含んでなる場合も、上に挙げた少なくとも1つの化合物を含んでなる組成物は本発明に包含されることを意図する。当業者は本明細書に提供する開示に基づき、そのような組成物はPCADM-1の改変された発現に関係するかまたは媒介される疾患、障害または状態の診断および処置に有用であると考えられるだろう。 40

【0378】

有用な他の製薬学的に許容され得る担体には、限定するわけではないが、グリセロール、水、塩水、エタノールおよびリン酸塩および有機酸の塩のような他の製薬学的に許容され得る塩溶液を含む。これらおよび他の製薬学的に許容され得る担体の例は、レミングトンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Science 50

es) (1991、マック (Mac k) 出版社、ニュージャージー) に記載されている。

【0379】

製薬学的組成物は、滅菌性の注入可能な水性または油性の懸濁液または溶液の状態で調製、包装または販売され得る。この懸濁液または溶液は既知の技術に従い製剤され、そして有効成分に加えて、本明細書に記載する分散剤、加湿剤または沈殿防止剤のようなさらなる成分を含んでなることができる。そのような滅菌性の注入可能な製剤は、例えば水または1, 3-ブタンジオールのような非毒性の非経口的に許容され得る希釈剤または溶媒を使用して調製することができる。他の許容され得る希釈剤および溶媒には限定するわけではないが、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウム溶液、および合成モノーまたはジグliceridのような固定油を含む。

10

【0380】

本発明の方法に有用な製薬学的組成物は、経口、直腸、腔、非経口、局所、肺、鼻内、頬内、眼内または他の投与経路に適する製剤で投与され、調製され、包装され、かつ／または販売されることができる。他の意図する製剤には、放射放出されるナノ粒子、リポソーム調製物、有効成分を含む再封入赤血球、および免疫学に基づく製剤を含む。

【0381】

本発明の組成物は、限定するわけではないが経口、直腸、腔、非経口、局所、肺、鼻内、頬内または眼内投与経路を含む多数の経路を介して投与することができる。投与経路 (1つまたは複数) は当業者には直ちに明白であり、そして処置する疾患の種類および重篤度、処置される動物またはヒト患者の種類および年齢等を含む任意の数の因子に依存する。

20

【0382】

本発明の方法に有用な製薬学的組成物は、経口の固体製剤、眼内製剤、座薬、エーロゾル、局所または他の類似製剤で全身的に投与することができる。ヘパリン硫酸塩またはその生物学的均等物のような化合物に加えて、そのような製薬学的組成物は、製薬学的に許容され得る担体および薬剤の投与を強化し、そして促進することが知られている他の成分を含むことができる。ナノ粒子、リポソーム、再封入赤血球および免疫学的に基づく系のような他の可能性な製剤を使用して、本発明の方法によりPCADM-1および／またはそれをコードする核酸を投与するために使用することもできる。

【0383】

本明細書に記載する任意の方法を使用して同定される化合物が配合され、そして今、記載する前立腺ガンを処置するために哺乳動物に処置される。

30

【0384】

本発明は、有効成分として前立腺ガンの処置に有用な化合物を含んでなる製薬学的組成物の調製および使用を包含する。そのような製薬学的組成物は、個体への投与に適する形態の有効成分のみからなることができ、または製薬学的組成物は有効成分および1以上の製薬学的に許容され得る担体、1以上のさらなる有効成分、またはこれらの幾つかの組み合わせを含んでなることができる。有効成分は製薬学的組成物中に、当該技術分野で周知である生理学的に許容され得るカチオンもしくはアニオンとの組み合わせのような、生理学的に許容され得るエステルまたは塩の形態で存在することができる。

40

【0385】

本明細書で使用する用語「製薬学的に許容され得る担体」は、有効成分と組み合わせることができ、そして組み合わせた後、有効成分を個体に投与するために使用することができる化学的組成物を意味する。

【0386】

本明細書で使用する用語「生理学的に許容され得る」エステルまたは塩は、製薬学的組成物の他の成分と適合性であり、組成物が投与される個体に対して有害ではない有効成分のエステルまたは塩形態を意味する。

【0387】

本明細書に記載する製薬学的組成物の製剤は、薬理学の分野で既知の、または今後開発

50

される方法により調製することができる。一般にそのような調製法は、有効成分を担体または1以上の他の補助的成分と合わせるようにし、そして次いで必要または所望する場合、生成物を所望する単一もしくは多一投与単位に成形または包装する工程を含む。

【0388】

本明細書に提供する製薬学的組成物の記載は、主に認定基準に合ったヒトへの投与に適する製薬学的組成物を対象としているが、当業者にはそのような組成物が一般にすべての種の動物へ投与するためにも適すると理解するだろう。組成物を種々の動物への投与に適するようにするために、ヒトへの投与に適する製薬学的組成物の修飾は十分に理解されており、そして通常の獣医薬理学者は、もし必要ならば単に通常の実験を行って、そのような修飾を計画し、そして行うことができる。本発明の製薬学的組成物が投与される個体は、限定するわけではないがヒトおよび他の霊長類、牛、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコおよびイヌのような商業的に興味のある哺乳動物を含む哺乳動物を含む。

10

【0389】

本発明の方法に有用な製薬学的組成物は、経口、直腸、膣、非経口、局所、肺、鼻内、頬内、眼内、硬膜下腔内または他の投与経路に適する製剤で調製され、包装され、または販売することができる。他の意図する製剤には、放射放出されるナノ粒子、リポソーム調製物、有効成分を含む再封入赤血球、および免疫学に基づく製剤を含む。

【0390】

本発明の製薬学組成物は、バルクで、単回の単位用量として、または複数の単回の単位用量として調製され、包装され、または販売されることができる。本明細書で使用する「単位用量 (unit dose)」とは、予め定めた量の有効成分を含んでなる製薬学的組成物の別個の量である。有効成分の量は一般に個体に投与される有効成分の投薬用量に等しいか、またはそのような投薬用量の例えば $1/2$ または $1/3$ のような便利な画分である。

20

【0391】

本発明の製薬学的組成物中の有効成分、製薬学的に許容され得る担体および任意のさらなる成分の相対量は、処置する個体の同一性、サイズおよび状態に依存して、さらに組成物が投与される経路に依存して変動する。例として組成物は 0.1% から 100 (重量/重量) % の有効成分を含んでなることができる。

【0392】

有効成分に加えて、本発明の製薬学的組成物はさらに1以上の製薬学的に活性な作用物質を含んでなることができる。特に意図するさらなる作用物質には、制吐剤およびシアニドおよびシアネートスカベンジャーのようなスカベンジャーを含む。

30

【0393】

本発明の製薬学的組成物の放出制御—または徐放性製剤は、通常の技術を使用して作成することができる。

【0394】

経口投与に適する本発明の製薬学的組成物の製剤は、限定するわけではないが各々が予め定めた量の有効成分を含有する錠剤、硬質もしくは軟質カプセル、小袋、トローチまたはロゼンジを含む別個の固体用量単位の状態に調製、包装または販売することができる。経口投与に適する他の製剤には限定するわけではないが、粉末化または粒状製剤、水性もしくは油性懸濁液、水性もしくは油性溶液、または乳液を含む。

40

【0395】

本明細書で使用する「油性液体」は、炭素含有液体分子を含んでなり、そして水より低い極性を表すものである。

【0396】

有効成分を含んでなる錠剤は、例えば有効成分、場合により1以上のさらなる成分を圧縮もしくは成形することにより作成することができる。圧縮錠剤は、適当なデバイス中で粉末または粒状調製物のような自由に流動する状態の有効成分を、場合により1以上の結合剤、潤滑剤、補形剤、表面活性剤および分散剤と混合して圧縮することにより調製でき

50

る。成形された錠剤は、適当なデバイス中で有効成分、製薬学的に許容され得る担体および少なくとも混合物を湿らせるために十分な液体の混合物を成形することにより調製できる。錠剤の製造に使用される製薬学的に許容され得る補形剤には、限定するわけではないが不活性な希釈剤、造粒および崩壊剤、結合剤および潤滑剤を含む。既知の分散剤には限定するわけではないが、ジャガイモ澱粉およびグリコール酸ナトリウム澱粉を含む。既知の表面活性剤には限定するわけではないが、ラウリル硫酸ナトリウムを含む。既知の希釈剤には限定するわけではないが、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、微結晶セルロース、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウムおよびリン酸ナトリウムを含む。既知の造粒および崩壊剤には限定するわけではないがトウモロコシ澱粉およびアルギン酸を含む。既知の結合剤には限定するわけではないが、ゼラチン、アラビアガム、糊化トウモロコシ澱粉、ポリビニルピロリドンおよびヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む。既知の潤滑剤には限定するわけではないが、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、シリカおよびタルクを含む。

10

【0397】

錠剤はコートされていないか、または既知の方法を使用してコートして、個体の胃腸管で遅延した崩壊を達成し、これにより有効成分の徐放性および吸収を提供することができる。例としてモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルのような物質を錠剤をコートするために使用することができる。さらに例として、錠剤は米国特許第4,256,108号；同第4,160,452号；および同第4,265,874号明細書に記載されている方法を使用してコートして、浸透圧で放出制御される錠剤に形成することができる。錠剤はさらに製薬学的に洗練され、そして味が良い調製物を提供するために、甘味料、風味剤、着色剤、保存剤またはこれらの幾つかの組み合わせを含んでなることができる。

20

【0398】

有効成分を含んでなる硬質カプセルは、ゼラチンのような生理学的に分解可能な組成物を使用して作成することができる。そのような硬質カプセルは有効成分を含んでなり、そして例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンのような不活性な固体希釈剤を含むさらなる成分をさらに含んでなることができる。

【0399】

有効成分を含んでなる軟質ゼラチンカプセルは、ゼラチンのような生理学的に分解可能な組成物を使用して作成することができる。そのような軟質カプセルは、水またはピーナツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油のような油性媒質と混合できる有効成分を含んでなる。

30

【0400】

経口投与に適する本発明の製薬学的組成物の液体製剤は、液体状態、または水もしくはは別の適当な賦形剤で使用前に再構成することを意図する乾燥生成物の状態で調製、包装、そして販売することができる。

【0401】

液体懸濁液は、水性または油性賦形剤に有効成分の懸濁液を達成する常法を使用して調製することができる。水性賦形剤には例えば、水および等張性塩水を含む。油性賦形剤には例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、落花生、オリーブ、ゴマ、またはヤシ油のような植物油、分別植物油、および液体パラフィンのような鉱物油を含む。液体懸濁液は限定するわけではないが、沈殿防止剤、分散剤または加湿剤、乳化剤、粘滑剤、保存剤、バッファー、塩、風味剤、着色剤および甘味料を含む1以上のさらなる成分をさらに含んでなることができる。油性懸濁液はさらに増粘剤を含むことができる。既知の沈殿防止剤には限定するわけではないが、ソルビトールシロップ、水素化可食脂肪、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、アラビアガム、およびカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのようなセルロース誘導体を含む。既知の分散または加湿剤には限定するわけではないが、レシチンのような自然に存在するホスファチド、アルキレンオキシドと脂

40

50

肪酸との、長鎖脂肪族アルコールとの、脂肪酸とヘキシトールに由来する部分エステルとの、または脂肪酸とヘキシトール無水物に由来する部分エステルとの（それぞれ例えばポリオキシエチレンステアレート、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレート、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレート）の縮合生成物を含む。既知の乳化剤には限定するわけではないが、レシチンおよびアラビアガムを含む。既知の保存剤には限定するわけではないが、メチル、エチルまたはn-プロピルパラヒドロキシベンゾエート、アスコルビン酸およびソルビン酸を含む。既知の甘味料には限定するわけではないが、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、シュクロースおよびサッカリンを含む。油性懸濁液用の既知の増粘剤には、例えば蜜蝋、硬質パラフィンおよびセチルアルコールを含む。

10

【0402】

水性または油性溶媒中の有効成分の液体溶液は、液体懸濁液と実質的に同じ様式で調製することができ、主要な変更は有効成分が溶媒に懸濁されるのではなく溶解される点である。本発明の製薬学的組成物の液体溶液は、液体懸濁液に関して記載した各成分を含んでなることができるが、沈殿防止剤は有効成分を溶媒に溶解することを必ずしも促進する必要はないと考えられる。水性溶媒には例えば水および等張性塩水を含む。油性溶媒には例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、落花生、オリーブ、ゴマ、またはヤシ油のような植物油、分別植物油、および液体パラフィンのような鉱物油を含む。

【0403】

本発明の製薬学的調製物の粉末および粒状製剤は、既知の方法を使用して調製することができる。そのような製剤は例えば錠剤を形成するために、カプセルに充填するために、またはそれらに水性もしくは油性賦形剤を加えることにより水性もしくは油性懸濁液もしくは溶液を形成するために使用して、個体に直接投与することができる。これらの各製剤は、さらに1以上の分散または加湿剤、沈殿防止剤および保存剤を含んでなることができる。充填剤および甘味料、風味剤、着色剤のようなさらなる補形剤もこれらの製剤に含めることができる。

20

【0404】

本発明の製薬学的組成物は、水中油型乳液または油中水型乳液の形態で調製、包装または販売することができる。油性相はオリーブまたは落花生油のような植物油、液体パラフィンのような鉱物油、またはこれらの組み合わせでよい。そのような組成物はさらに、アラビアガムまたはトラガカントガムのような自然に存在するガム、ダイズまたはレシチンホスファチドのような自然に存在するホスファチド、ソルビタンモノオレートのような脂肪酸およびヘキシトール無水物の組み合わせに由来するエステルまたは部分エステル、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレートのようなエチレンオキシドとの部分エステルのような縮合生成物のような1以上の乳化剤を含んでなることができる。これらの乳液は、例えば甘味料または風味剤を含むさらなる成分も含むことができる。

30

【0405】

本発明の製薬学的組成物は、直腸投与に適する製剤で調製、包装または販売することができる。そのような組成物は例えば座薬、滞留浣腸調製物および直腸もしくは結腸灌注用の溶液形態であることができる。

40

【0406】

座薬製剤は有効成分を、通常室温（すなわち約20℃）では固体であり、そして個体の直腸温度（すなわち健康なヒトでは約37℃）では液体である非炎症性の製薬学的に許容されうる補形剤と合わせるにより作成することができる。適当な製薬学的に許容され得る補形剤には限定するわけではないが、カカオ脂、ポリエチレングリコールおよび種々のグリセリドを含む。座薬製剤は限定するわけではないが、抗酸化物質および保存剤のような様々なさらなる成分をさらに含んでなることができる。

【0407】

直腸もしくは結腸灌注用の滞留浣腸調製物または溶液は、有効成分を製薬学的に許容され得る液体担体と合わせるにより作成することができる。当該技術分野で周知である

50

ように、浣腸調製物は個体の直腸の解剖学的構造に適合した送達デバイスを使用して投与し、そしてその中に包装することができる。浣腸調製物は限定するわけではないが、抗酸化物質および保存剤のような様々なさらなる成分をさらに含んでなることができる。

【0408】

本発明の製薬組成物は、腔投与に適当な製剤で調製、包装または販売することができる。そのような組成物は例えば座薬、タンポンのような含浸またはコートした腔に挿入可能な材料、洗浄調製物、または腔灌注用のゲルもしくはクリームもしくは溶液の形態であることができる。

【0409】

材料を化学組成物で含浸またはコートする方法は当該技術分野では知られており、そして限定するわけではないが、表面に化学組成物を沈積または結合する方法、化学組成物を材料の合成中に材料の構造に包含させる方法（すなわち、生理学的に分解可能な材料を用いるような）、および後の乾燥を含むか、または含まない、水性もしくは油性溶液または懸濁液の吸収材料への吸収法を含む。

【0410】

腔灌注用の洗浄調製物または溶液は、有効成分を製薬学的に許容され得る液体担体と合わせるにより作成することができる。当該技術分野で周知であるように、洗浄調製物は個体の腔の解剖学的構造に適合した送達デバイスを使用して投与し、そしてその中に包装することができる。洗浄調製物は限定するわけではないが、抗酸化物質、抗生物質、抗カビ・菌剤および保存剤を含む様々なさらなる成分をさらに含んでなることができる。

【0411】

本明細書で使用する製薬学的組成物の「非経口投与」には、個体の組織を物理的に裂く（breaching）ことを特徴とする投与、および組織中の裂傷（breach）を介する製薬学組成物の投与の任意の経路を含む。このように非経口投与には限定するわけではないが、組成物の注入による、外科的切開を介する組成物の適用による、組織を透過する非外科的創傷を介する組成物の適用等による製薬学的組成物の投与を含む。特に非経口投与には限定するわけではないが、皮下、腹腔内、筋肉内、胸骨内注入、および腎臓透析灌流法を含むことを意図する。

【0412】

非経口投与に適する製薬学的組成物の製剤は、滅菌水または滅菌等張性塩水のような製薬学的に許容され得る担体と合わせた有効成分を含んでなる。そのような製剤は、ボーラス投与または連続投与に適する形態で調製、包装または販売することができる。注入用製剤は、アンプルのような単位剤形または保存剤を含む多回投薬容器で調製、包装または販売することができる。非経口投与用の製剤には限定するわけではないが、懸濁液、溶液、油性もしくは水性賦形剤中の乳液、ペーストおよび移植可能な徐放性または生分解性製剤を含む。そのような製剤は、限定するわけではないが沈殿防止、安定化または分散剤を含む1以上のさらなる成分をさらに含んでなることができる。非経口投与用の製剤の1つの態様では、再構成される組成物の非経口投与前に、適当な賦形剤（例えば滅菌性の発熱物質を含まない水）で再構成するために、有効成分が乾燥（すなわち粉末または粒状）状態で提供される。

【0413】

製薬組成物は、滅菌性の注入可能な水性もしくは油性懸濁液または溶液の状態で調製、包装または販売されることができる。この懸濁液または溶液は既知の技術に従い配合されることができるが、そして有効成分に加えて、本明細書に記載する分散剤、加湿剤または沈殿防止剤のようなさらなる成分を含んでなることができる。そのような滅菌性の注入可能な製剤は、例えば水または1, 3-ブタンジオールのような非毒性の非経口的に許容され得る希釈剤または溶媒を使用して調製することができる。他の許容され得る希釈剤および溶媒には、限定するわけではないが、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウム溶液、および合成モノもしくはジグリセリドのような固定油を含む。有用な他の非経口的に投与可能な製剤には、微結晶形態で、リポソーム調製物に、または生分解性ポリマー系の成分とし

10

20

30

40

50

て有効成分を含んでなるものを含む。徐放性または移植用の組成物は、乳液、イオン交換樹脂、溶解し難いポリマーまたは溶解し難い可溶性塩のよう製薬学的に許容され得るポリマー性または疎水性材料を含んでなることができる。

【0414】

局所的投与に適する製剤は、限定するわけではないが塗布剤、ローション、クリーム、軟膏もしくはペーストのような水中油および油中水乳液のような液体または半液体調製物、および溶液または懸濁液を含む。局所的に投与可能な製剤は、例えば約1%～約10（重量／重量）%の有効成分を含んでなることができるが、有効成分の濃度は溶媒中の有効成分の溶解限界まででよい。局所投与用の製剤は、さらに本明細書に記載する1以上のさらなる成分を含んでなることができる。

10

【0415】

本発明の製薬学的組成物は、口腔前庭を介した肺投与に適する製剤で調製、包装または販売することができる。そのような製剤は有効成分を含んでなり、そして約0.5～約7ナノメートル、そして好ましくは約1～約6ナノメートルの範囲の直径を有する乾燥粒子を含んでなることができる。そのような組成物は粉末を分散するために推進薬流を向けることができる粉末リザーバーを含んでなるデバイスを使用して、または密閉容器中の低沸点推進薬に溶解もしくは懸濁された有効成分を含んでなるデバイスのような自己推進溶媒／粉末一分散容器を使用して投与するために都合がよい粉末乾燥状である。好ましくはそのような粉末は、粒子の少なくとも98重量%が0.5ナノメートルよりも大きい直径を有し、そして粒子数の少なくとも95%が7ナノメートルよりも小さい直径を有する。より好ましくは粒子の少なくとも95重量%が1ナノメートルよりも大きい直径を有し、そして粒子数の少なくとも90%が6ナノメートルよりも小さい直径を有する。乾燥粉末組成物は好ましくは糖のような固体の微細粉末希釈剤を含み、そして単位剤形で都合よく提供される。

20

【0416】

低沸点推進薬は、一般に大気圧で65°F未満の沸点を有する液体推進薬を含む。一般に推進薬は組成物の50～99.9（重量／重量）%を構成し、そして有効成分は組成物の0.1～20（重量／重量）%を構成する。推進薬はさらに液体の非イオン性または固体のアニオン性表面活性剤または固体の希釈剤（好ましくは有効成分を含んでなる粒子と同じ次元の粒子サイズを有する）のようなさらなる成分を含んでもよい。

30

【0417】

肺送達用に配合された本発明の製薬学的組成物は、溶液もしくは懸濁液の小滴状態の有効成分を提供することもできる。そのような製剤は、有効成分を含んでなる場合により滅菌性の水性または希釈されたアルコール性溶液もしくは懸濁液で調製、包装または販売されることができ、そしてネブライザーまたは噴霧化デバイスを使用して投与することができる。そのような製剤はさらに限定するわけではないがサッカリンナトリウムのような風味剤、揮発性油、緩衝剤、表面活性剤、またはメチルヒドロキシベンゾエートのような保存剤を含む1以上のさらなる成分を含んでなることができる。この投与経路により提供される小滴は、約0.1～約200ナノメートルの範囲の直径を有する。

【0418】

肺送達に有用な本明細書に記載する製剤は、本発明の製薬学的組成物の鼻内送達にも有用である。

40

【0419】

鼻内投与に適する別の製剤は、有効成分を含んでなり、そして約0.2～500マイクロメートルの平均粒子を有する粗い粉末である。そのような製剤は鼻を嗅ぐ様式で、すなわち外鼻孔付近に維持された粉末の容器から鼻孔を通す迅速な吸入により投与される。

【0420】

鼻投与に適する製剤は、例えばわずか約0.1（重量／重量）%から100（重量／重量）%もの有効成分を含んでなることができ、そしてさらに本明細書に記載する1以上のさらなる成分を含んでなることができる。

50

【0421】

本発明の製薬学的組成物は、頬内投与に適する形態で調製、包装または販売することができる。そのような製剤は例えば、常法を使用して作成された錠剤またはロゼンジの形態でよく、そして例えば0.1～20（重量／重量）%の有効成分、経口で溶解可能または分解可能な組成物を含んでなるバランス、および場合により本明細書に記載する1以上のさらなる成分でよい。あるいは頬内投与に適する製剤は、有効成分を含んでなる粉末またはエロゾル化または噴霧化溶液または懸濁液を含んでなることができる。そのような粉末化、エロゾル化またはエロゾル化製剤は、分散した時、好ましくは約0.1～約200ナノメートルの範囲の平均粒子または小滴サイズを有し、そしてさらに本明細書に記載する1以上のさらなる成分を含んでなることができる。

10

【0422】

本発明の製薬学的組成物は、眼内投与に適する製剤で調製、包装または販売することができる。そのような製剤は例えば、水性もしくは油性液体担体中の0.1～1.0（重量／重量）%の有効成分の溶液もしくは懸濁液を含む点眼薬の状態である。そのような小滴はさらに緩衝剤、塩または本明細書に記載する1以上のさらなる成分を含んでなることができる。有用な他の眼科的に投与可能な製剤は、微結晶状またはリポソーム調製物状の有効成分を含んでなるものである。

【0423】

本明細書で使用する「さらなる成分」には限定するわけではないが以下の1以上を含む；補形剤；表面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒および崩壊剤；結合剤；潤滑剤；甘味料；風味剤；着色剤；保存剤；ゼラチンのような生理学的に分解可能な組成物；水性賦形剤および溶媒；油性賦形剤および溶媒；沈殿防止剤；分散または加湿剤；乳化剤、粘滑剤；バッファー；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；抗酸化剤；抗生物質；抗カビ・菌剤；安定化剤；および製薬学的に許容され得るポリマー性または疎水性材料。本発明の製薬学的組成物に含むことができる他の「さらなる成分」は当該技術分野では知られており、そして例えば引用により本明細書に編入するGenaro編集（1985，レミングトンの製薬科学、マック出版社、イーストン、ペンシルバニア州）に記載されている。

20

【0424】

典型的には動物、好ましくはヒトに投与することができる本発明の化合物の投薬用量は、限定するわけではないが、処置する動物の種類および疾患状態の種類、動物の年齢および投与経路を含む任意の数の因子に依存して変動するだろう。

30

【0425】

化合物は、1日に数回もの頻度で投与でき、または1日に1回、1週間に1回、2週間に1回、1カ月に1回のようなより少ない頻度で、あるいは数カ月に1回またはさらに1年に1回以下のようなさらに少ない頻度で動物に投与することができる。投与の頻度は当業者には直ちに明白であり、そして限定するわけではないが、処置する疾患の種類および重篤度、動物の種類、年齢等のような任意の数の因子に依存するだろう。

V I I I . 方法A. 有用な化合物を同定する方法

本発明はさらに細胞中のPCADM-1の発現に影響を及ぼす化合物を同定する方法を含む。この方法は、細胞を試験化合物と接触させ、そしてそのように接触した細胞中のPCADM-1の発現レベルを、試験化合物と接触しないこと以外は同一である細胞中のPCADM-1の発現レベルと比較することを含んでなる。試験化合物と接触した細胞中でPCADM-1の発現レベルが、試験化合物と接触しないこと以外は同一である細胞中のPCADM-1の発現レベルと比べて高いか、または低い場合、これは試験化合物が細胞中のPCADM-1発現に影響を及ぼすことの指標である。

40

【0426】

同様に本発明はさらに細胞中のPCADM-1の発現を減少する化合物を同定する方法を含む。この方法は、細胞を試験化合物と接触させ、そして化合物に接触した細胞中のPCADM-1の発現レベルを、試験化合物と接触しないこと以外は同一である細胞中のP

50

PCADM-1の発現レベルと比較することを含んでなる。試験化合物と接触した細胞中のPCADM-1の発現レベルが、試験化合物と接触しなかった細胞中のPCADM-1の発現レベルと比べて低い場合、これは試験化合物が細胞中のPCADM-1の発現の減少に影響を及ぼすことの指標である。

【0427】

当業者は、本明細書に提供する開示に基づき、細胞中のPCADM-1の発現レベルは、PCADM-1をコードするmRNAの発現レベルを決定することにより測定することができる。あるいはPCADM-1をコードするmRNAの発現レベルは、本発明の抗PCADM-1抗体を使用したウェスタンブロット分析、FACS分析、または酵素結合免疫アッセイを使用して、本明細書に例示するmRNAからのようなPCADM-1生産を評価する免疫学的方法を使用して決定することができる。さらにノーザンブロットおよびPCRアッセイ等のような核酸に基づく検出法も使用することができる。このように当業者は本明細書に提供される実施に対する徹底的な開示および適合に基づき、本明細書に開示されるこれらの、および将来開発され得る他の方法を含め、細胞中のPCADM-1の発現レベルを評価するために使用できる当該技術分野では周知の沢山の方法があると考えらるだろう。

【0428】

さらに当業者は以下の実施例に開示されるような本明細書に提供される開示に基づき、内因性のPCADM-1発現を欠く細胞を、PCADM-1をコードする単離された核酸を含んでなるベクターでトランスフェクトすることができ、これによりPCADM-1の発現が細胞中で行われる。次いでトランスフェクトされた細胞を試験化合物と接触させ、これにより化合物がPCADM-1の発現に影響を及ぼすかどうかを決定できるようにする。したがって当業者は本発明から着手すれば、検出可能なレベルのPCADM-1を欠く細胞をPCADM-1発現ベクターを使用して選択的にトランスフェクトすることにより、PCADM-1発現に選択的に影響を及ぼす化合物を同定することができる。

【0429】

当業者は本明細書に提供される開示に基づき、本発明が本明細書のいたるところで検討する方法を使用して同定される試験化合物を包含すると理解するだろう。すなわちPCADM-1発現を阻害する化合物は、前立腺ガンのようなPCADM-1過剰発現により媒介される疾患、障害または状態の治療法および診断法を開発するために使用できる。このように当業者は、DNAzymもしくはリボザイム、またはPCADM-1を特異的に開裂するアンチセンスについて検討する本明細書のいたるところでさらに完全に説明するように、疾患、障害または状態が関連するPCADM-1発現レベルを減少させることは、疾患、障害または状態の処置のための潜在的治療法であると考えらるだろう。このように本明細書に開示する方法により同定される化合物は、中でも前立腺ガンの処置に潜在的な治療法である。

【0430】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、本発明が細胞中のPCADM-1のレベルを上げる化合物を同定する方法を包含すると考えるだろう。これらの方法は本明細書に開示するデータが、PCADM-1の上昇した発現が前立腺ガンに関連し、および／または媒介することを初めて証明する点で有用である。すなわちPCADM-1のレベルを上昇させる化合物は、潜在的な前立腺の発現物質であり、そしてそのような化合物の同定は、化合物の潜在的毒性の評価に重要であり、すなわち例えば新規化合物に付随する潜在的な有害効果の同定が最も重要な薬剤開発の分野で有用なアッセイとなる。したがって本発明は、薬剤開発の分野等において潜在的な負の効果を同定するために有用なアッセイを提供する。

【0431】

さらに当業者は本明細書に提供する開示に基づき、本発明がPCADM-1のPCADM-1に特異的に結合する二本鎖核酸への結合を阻害する化合物を同定する方法を含むと考えるだろう。この方法はPCADM-1に特異的に結合することが知られている二本鎖

核酸に結合する P C A D M-1 のレベルを評価することを含んでなる。そのような二本鎖核酸には限定するわけではないが、配列番号 5 の配列、配列番号 6 の配列、配列番号 7 および配列番号 8 を有する核酸配列を含む。すなわち化合物の存在および不存在下で P C A D M-1 に特異的に結合する二本鎖核酸へ結合する P C A D M-1 のレベルを評価および比較することにより、P C A D M-1 と核酸の結合のレベルが化合物の存在下で化合物の不存在下に比べて低い場合の化合物を同定することができる。すなわち、P C A D M-1 に特異的に結合する核酸との P C A D M-1 の結合を阻害する化合物を同定することができる。そしてそのようなアッセイは本発明に包含される。P C A D M-1 と、それに特異的に結合する核酸との間の特異的な結合の相互作用は、そのような結合の相互作用に関連または媒介される疾患、障害または疾患、例えば前立腺ガン等の処置の潜在的標的となり得るので、これらの化合物は有用な治療薬となることができる。

B. P C A D M-1 発現に関連または媒介される疾患、障害または状態を処置または緩和する方法

本発明は P C A D M-1 の異常発現により媒介される疾患、障害または状態を緩和する方法を含む。この方法は発現調節化合物、例えば D N A Z Y M、P C A D M-1 をコードする核酸に相補的なアンチセンス核酸またはリボザイムを、正常組織、すなわち処置または緩和する疾患、障害または状態に関連する検出可能な臨床的パラメーターを表さないこと以外は同一の組織中での P C A D M-1 発現のレベルに比べて、上昇した P C A D M-1 発現により媒介される疾患、障害または状態を罹患している患者に投与することを含んでなる。これは次いで、P C A D M-1 発現の減少を媒介し、これにより P C A D M-1 の異常発現により媒介される疾患、障害または状態を緩和する。そのような疾患、障害または状態には限定するわけではないが、前立腺ガン P C A D M-1 D N A Z Y M を含み、すなわち P C A D M-1 の発現を阻害するアンチセンス核酸またはリボザイムは故に疾患、障害または状態に罹患していない細胞および／または患者における P C A D M-1 の発現と比べた時、P C A D M-1 の上昇した発現に媒介される疾患、障害または状態を処置するための薬剤の製造にも使用することができる。

【0432】

加えて、本発明は細胞中の前立腺ガン抗原診断マーカー 1 の発現を阻害する方法を含む。この方法は本明細書のいたるところに開示するデータにより証明されるように、P C A D M-1 発現の阻害がガン細胞（例えば前立腺腫瘍細胞）の成長および／または生存を阻害するが正常な非腫瘍細胞は阻害しなかった点で大変有用である。このように当業者は本明細書に提供する開示に基づき、本発明が限定するわけではないが細胞中の P C A D M-1 の m R N A を開裂するために D N A Z Y M を使用し、これにより細胞中の P C A D M-1 の発現を阻害することを含む P C A D M-1 発現を阻害する方法を包含すると考えるだろう。しかし本発明は単に D N A 酵素を使用して P C A D M-1 の発現を阻害することには限定されず；むしろ本発明は当該技術分野で既知の、または将来開発される方法を使用してタンパク質、すなわち P C A D M-1 の転写または翻訳を阻害する方法を包含する。

【0433】

より詳細には、この方法は該前立腺ガン抗原診断マーカー 1 をコードする核酸から転写された m R N A を特異的に開裂する単離された核酸を細胞に投与し、これにより該細胞中の該前立腺ガン抗原診断マーカー 1 の発現を阻害することを含んでなる。

【0434】

1 つの観点では、単離された酵素的核酸は配列番号 9 の配列を有する酵素的核酸および、配列番号 10 の配列を有する酵素的核酸からなる群から選択される。しかし本明細書に提供される教示に基づき、当業者は本発明が P C A D M-1（配列番号 1）の配列に基づく他の D N A Z Y M を使用すること、および／または細胞中の P C A D M-1 の発現を阻害する他の方法を使用することも包含し、そのような方法は当該技術分野では周知である（例えばアンチセンス分子、抗体等の使用）ことを理解している。したがって本発明は P C A D M-1 D N A Z Y M-1（配列番号 9）または P C A D M-1 D N A Z Y M-1（発現番号 10）の使用に限定せず、核酸配列が知られている場合、P C A D M-1 の

配列（配列番号1）に基づく他のDNAZYMを使用することを含め、核酸の発現を阻害する当該技術分野で周知な方法を含む。

【0435】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、PCADM-1の発現の減少が前立腺ガンに罹患している患者に有益な効果を媒介できるので（細胞にPCADM-1 DNAZYMを投与することにより媒介される、正常細胞ではなく前立腺ガンの選択的阻害により証明されるように）、低下したPCADM-1発現がそのような疾患、障害または状態の処置に有用となり得ると理解するだろう。これは本明細書のいたるところに開示するように、PCADM-1の上昇した発現が前立腺ガンに関連する異常な細胞増殖および／または細胞生存および／または正味の腫瘍成長に関連しているからである。さらに本明細書中のいたるところに開示するデータにより、PCADM-1 mRNAを特異的に開裂するPCADM-1 DNAZYMによる投与によるようなPCADM-1発現の阻害が、腫瘍に有益な減少をもたらし、そして前立腺ガン治療の研究用に技術的に認識されているマウスモデルにおいて生存期間を増加させたことを証明する。すなわち当業者は本明細書に提供する開示に基づき、PCADM-1の阻害がPCADM-1異常発現の有害効果を阻害できると考えるだろう。

10

【0436】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、減少したPCADM-1発現は有益な効果を媒介できるので、PCADM-1 mRNAの発現を減少させ、細胞に存在するPCADM-1ポリペプチドのレベルを減少させ、および／または細胞中のPCADM-1の活性を減少させる方法（例えばDNAZYM、アンチセンス核酸、リボザイム、抗体等を使用して）は、より低レベルのPCADM-1が利益を提供する場合、PCADM-1の改変された発現と関連する疾患、障害または状態を処置し、そして／または緩和するために使用できると理解するだろう。

20

【0437】

細胞中の核酸の発現を阻害する技術は当該技術分野では周知であり、そして本明細書に開示するような方法（例えば抗体、DNAZYM、アンチセンス核酸、リボザイム等を使用する阻害）を包含する。PCADM-1をコードする核酸の発現を阻害するために有用な他の技術は、限定するわけではないがPCADM-1プロモーターの特異的配列を標的とするヌクレオチド試薬等を使用することを含む。

30

【0438】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、細胞中のPCADM-1のレベルまたは活性を上昇させることが有用になると考えるだろう。すなわちこれはPCADM-1を投与することによりPCADM-1の減少した発現、レベルまたは活性に関連または媒介される疾患、障害または状態を処置または緩和するために有用となり得る。そのような疾患、障害または状態には限定するわけではないが、前立腺ガンおよび恐らく他の充実性ガンまたは白血病、AIDS、HIV感染、免疫障害および炎症性もしくは変性障害等を含む。

【0439】

PCADM-1の発現、ポリペプチドのレベルまたはその活性が上昇しても減少しても、当業者は本開示に基づき、本発明のPCADM-1を減少または誘導する方法がPCADM-1を発現するか、または発現を欠く組換え細胞の投与を包含すると考えるだろう。

40

【0440】

本発明の別の態様では、改変されたPCADM-1発現に関連または媒介される疾患、障害または状態に罹患している個体は、PCADM-1発現を欠く細胞を補充、増加および／または欠損細胞と置き換えることにより処置することができる。細胞は処置する個体から得た正常な同系の適合ドナーまたは細胞から得た細胞に由来することができる。細胞はPCADM-1発現を阻害するように遺伝的に修飾することができる。

【0441】

PCADM-1発現に関連または媒介される疾患、障害または状態の例は前立腺ガン等である。欠損細胞を適合するドナーに由来する修復細胞または正常細胞に置き換えること

50

に加えて、本発明の方法は動物に分泌した時、有益な効果を有する所望のタンパク質の発現を促進するために使用することもできる。すなわち細胞は単離され、PCADM-1をコードする遺伝子が供給され、そしてドナーまたは同系の適合する受容体に導入され得る。PCADM-1の発現は、治療効果を発揮する。本発明のこの観点は治療的量のPCADM-1が個体に投与される遺伝子治療に関する。

【0442】

特にPCADM-1をコードするヘテロログスな遺伝子を含んでなる遺伝子構築物が細胞に導入される。これらの組換え細胞は、単離されたPCADM-1を精製するために使用され、これが次いで動物に投与される。当業者は本明細書に提供する開示に基づき、単離されたPCADM-1ポリペプチドを投与する代わりに、哺乳動物に組換え細胞自体を投与することにより、PCADM-1をそれが必要な哺乳動物に投与できると理解するだろう。これはタンパク質が組換え細胞により受容体の系で発現され、そして分泌される時、利益を受ける受容体個体に有益となるだろう。

10

【0443】

本発明に従い、本発明のヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子構築物は細胞に導入される。すなわち本明細書で「組換え細胞」と呼ぶ細胞は、PCADM-1をコードする核酸、または組換え細胞によるPCADM-1発現および／または分泌を阻害する核酸（例えばアンチセンス核酸、PCADM-1をコードする核酸から転写されたRNAを特異的に開裂する酵素的核酸）を導入するために遺伝的に改変され、これにより組換え細胞が投与される受容体に有益な効果を媒介する。本発明の幾つかの観点に従い、処置する個体と同じ個体から得た、または他の個体から、あるいは非ヒト動物から得た細胞を遺伝的に改変して、欠損遺伝子を置き換え、および／または発現が個体に有益な効果を有する核酸を導入するか、または阻害が個体に有益な効果を有することができるPCADM-1発現を阻害することができる。

20

【0444】

本発明の幾つかの観点では、疾患、障害または状態に罹患している個体は、PCADM-1をコードする核酸の正常な機能するコピーを含む遺伝子構築物を含有する単離された組換え細胞を提供することにより、補充、増強および／またはPCADM-1をコードする欠損または欠失核酸を置き換えることにより処置することができる。本発明のこの観点は、存在および／または機能が欠失している個体にPCADM-1をコードする核酸が提供される遺伝子治療に関する。細胞により提供されるPCADM-1をコードする単離された核酸は、核酸が個体中で発現した時、個体の疾患、障害または状態を緩和するか、または処置するために役立つタンパク質が生成されるので、個体の欠損PCADM-1発現を相補する。そのような核酸は好ましくは組換え細胞から分泌されるPCADM-1ポリペプチドをコードする。

30

【0445】

PCADM-1をコードする遺伝子構築物が細胞にトランスフェクトされるすべての場合で、核酸は組換え細胞中で核酸の発現を達成するために必要な適切なプロモーター／調節配列に操作可能に連結される。そのようなプロモーター／調節配列には限定するわけではないが、構成的および誘導性および／または組織特異的および分化特異的プロモーターを含み、そして本明細書のいたるところに記載されている。構成的プロモーターには限定するわけではないが、サイトメガロウイルス前初期プロモーターおよびラウス肉腫ウイルスプロモーターを含む。さらにハウスキーピング遺伝子の発現を制御するようなハウスキーピングプロモーターも使用することができる。他のプロモーターには、限定するわけではないがグリア繊維酸性タンパク質をコードする遺伝子に関するプロモーターのような中枢神経系の細胞で優先的に発現されるものを含む。さらにプロモーター／調節要素は遺伝子発現が誘導性となるように選択することができる。例えばテトラサイクリン誘導性プロモーターを使用してもよい（Freundlich et al., 1997, Meth. Enzymol. 283:159-173）。

40

【0446】

50

遺伝子構築物は好ましくは発現ベクターとして提供され、これはベクターが細胞にトランスフェクトされた時、コード配列が細胞により発現されるように、必須なプロモーター／調節配列に操作可能に連結された本発明の哺乳動物 P C A D M-1 のコード配列を含む。コード配列は細胞中で配列の発現に必要なプロモーター／調節要素に操作可能に連結されている。タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、c D N A、ゲノム D N A、合成 D N A またはそれらのハイブリッドまたは m R N A のような R N A 分子でよい。

【0447】

プロモーター／調節要素に操作可能に連結された P C A D M-1 をコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物は、機能するエピソード分子として細胞に存在し留まるか、または細胞の染色体 D N A に組み込まれてもよい。遺伝物質は細胞に導入され、そこでこれはプラスミドの状態では別個の遺伝物質として存在することができる。あるいは宿主細胞の染色体に組み込まれることができる直線状の D N A が細胞に導入されてもよい。D N A を細胞に導入する時、D N A の染色体への組み込みを促進する試薬を加えることができる。組み込みを促進するために有用な D N A 配列も D N A 分子に含むことができる。あるいは R N A が細胞に導入されてもよい。

10

【0448】

発現ベクター中の遺伝物質を発現させるために、プロモーター／調節要素は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されなければならない。タンパク質生産を最大とするために、所望する細胞中での遺伝子発現に十分適するプロモーター／調節要素を選択することができる。さらに細胞中で最も効率的に転写されるコドンを選択することができる。当業者は所望する細胞中で機能的な発現ベクターとして組換え遺伝物質を生成することができる。

20

【0449】

プロモーター／調節要素はタンパク質の組織特異的発現を促進するために選択することができる。すなわち例えば特異的なプロモーター／調節配列は、組換え細胞が移植された組織でのみヘテロログスな遺伝子が発現するように提供され得る。当業者は本明細書に提供する開示に基づき、P C A D M-1 の発現または発現の欠如が標的とされる好適な組織には限定するわけではないが前立腺組織を含むと理解するだろう。さらにプロモーター／調節要素は、遺伝子発現が誘導性となるように選択することができる。例えばテトラサイクリン誘導性プロモーターを使用することができる (F r e u n d l i c h e t a l . , 1997, M e t h . E n z y m o l . 283:159-173)。

30

【0450】

タンパク質が十分な量および／または機能的状態で存在しないことによる個体の遺伝的欠損を矯正するタンパク質をコードする、および／またはタンパク質に関連する特定の疾患、障害または状態の処置または防止に有益であるとして有用なタンパク質をコードする、および細胞中の P C A D M-1 の発現を阻害する (例えばノックアウト標的遺伝子、D N A Z Y M、アンチセンス核酸、リボザイム等)、細胞中の遺伝的欠損をいずれかに矯正する組換え遺伝物質を細胞に提供することに加えて、遺伝物質は本発明で使用する組換え細胞に導入されて、終結が望ましくなるべき細胞を選択的に殺すための手段を提供することができる。破壊のための標的組換え細胞のような手段を、組換え細胞に導入することができる。

40

【0451】

本発明に従い、組換え細胞に細胞を破壊に対して特異的に感受性とする遺伝物質を供給することができる。例えば組換え細胞に、細胞傷害剤で特異的に標的化され得るレポーターをコードする遺伝子を提供することができる。選択的な細胞死を誘導するために使用することができる遺伝子の発現可能な形態を、組換え細胞に導入することができる。そのような系では、遺伝子にコードされるタンパク質を発現する細胞は特異的な条件下または特異的な作用物質の存在もしくは不存在下で標的化される殺しに対して感受性である。例えばヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (ヘルペス t k) 遺伝子の発現可能な形態は、組換え細胞に導入され、そして選択的な細胞死を誘導するために使用することができる。ヘ

50

ヘルペス tk 遺伝子を含む導入される遺伝物質が個体に導入された時、ヘルペス tk が生産される。移植した組換え細胞を殺すことが望ましいか、または必要な場合、ヘルペス tk を生産する任意の細胞を選択的に殺す薬剤であるガンシクロビルを個体に投与することができる。このように移植した組換え細胞の選択的破壊を可能とする系を提供することができる。

【0452】

当業者は本明細書に提供される開示に基づき、本発明が哺乳動物において PCADM-1 を提供するか、または PCADM-1 発現を阻害するいずれかの組換え細胞の生産を包含すると理解するだろう。このように細胞は PCADM-1 を動物に投与するために、または分子（例えばノックアウト標的化遺伝子、DNA ZYM、アンチセンス核酸、リボ

10

【0453】

動物への PCADM-1 の投与は、例えば PCADM-1 / DNA 結合相互作用を阻害する効果（1つまたは複数）を評価するための PCADM-1 の作用機作を研究するためのモデル系として、および PCADM-1 発現に関連する疾患、障害または状態の診断薬および／または治療薬の開発に有用なモデル系を開発するために使用することができる。

【0454】

さらに PCADM-1 を発現し、そして分泌する組換え細胞の投与に媒介される動物への PCADM-1 の送達も、PCADM-1 のレベルの上昇が治療効果を媒介する疾患、障害または状態を処置または緩和するために使用することができる。さらに具体的には、PCADM-1 をコードする核酸を発現する組換え細胞を投与することによる動物への PCADM-1 の投与は、前立腺ガン（すなわちイヌおよびヒトにおける）前立腺ガン、および中でもヒトおよび動物も罹る恐らく他の充実性ガンまたは白血病、AIDS、HIV 感染、免疫障害および炎症もしくは変性障害の処置に有用となり得る。

20

【0455】

あるいはその発現が PCADM-1 発現、活性および／または PCADM-1 の DNA への結合を阻害または減少する核酸を含んでなる組換え細胞の投与は、PCADM-1 発現、活性および／またはタンパク質／核酸結合相互作用に関係または媒介される疾患、障害または状態に有用な診断薬および／または治療薬を開発するためのモデルとして使用

30

【0456】

動物から、または市販の、もしくはこれから開発される樹立細胞株から得た細胞、またはインビトロで培養された初代細胞であろうとも、細胞は当業者に周知な技術を使用してトランスフェクトされることができる。すなわち本発明はドナー動物から、または患者の動物自体から細胞を得ることに限定されない。むしろ本発明は、組換え細胞が PCADM-1、PCADM-1 DNA ZYM および／または PCADM-1 に特異的に結合する抗体を発現するように（細胞が工作前にはそのような分子を発現しなかったか、または細胞に核酸が導入される前とは異なるレベルで細胞が分子を生産する場合）、あるいは組換え細胞が PCADM-1、PCADM-1 DNA ZYM および／または PCADM-1 に特異的に結合する抗体を発現しないか、またはより低レベルで発現するように（細胞が以前に分子を発現したか、または細胞に核酸が導入される前とは異なるレベルで細胞が分子を発現する場合）、本発明の核酸を使用して工作することができる任意の細胞を使用することを含む。

40

【0457】

核酸は、遺伝子によりコードされるタンパク質を発現するか、または PCADM-1 発

50

現を阻害する分子を発現する細胞に遺伝子構築物を導入するために使用される標準法を使用して細胞に導入され得る (Sambrook et al.)。幾つかの態様では細胞はリン酸カルシウム沈殿トランスフェクション、DEAEデキストラントランスフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、リポソームが媒介する転移、化学物質が媒介する転移、リガンドが媒介する転移または組換えウイルスベクター転移によりトランスフェクトされる。

【0458】

幾つかの場合では、組換えアデノウイルスベクターを使用して、所望する配列を有するDNAを細胞に導入する。幾つかの態様では、組換えレトロウイルスベクターを使用して、所望する配列を有するDNAを細胞に導入する。幾つかの態様では、所望のDNAを分割している細胞に包含するために、標準的なリン酸カルシウム、DEAEデキストランまたは脂質担体が媒介するトランスフェクション技法が使用される。標準的な抗生物質選択技術を使用して、トランスフェクトされた細胞を同定し、そして選択することができる。幾つかの態様では、DNAはマイクロインジェクションにより細胞に直接導入される。同様に周知の電気穿孔または粒子衝撃技術も、外来DNAを細胞に導入するために使用することができる。第2遺伝子は通常、PCADM-1をコードする核酸、あるいはノックアウト標的化ベクターとコトランスフェクションされるか、かつ／またはそれに共有的に結合される。第2遺伝子は選択可能な抗生物質耐性遺伝子であることが多い。トランスフェクトされた組換え細胞は、細胞を選択可能な遺伝子を取り込まなかった細胞を殺す抗生物質中で成長させることにより選択することができる。2つの遺伝子が連結されず、そしてコトランスフェクトされるほとんどの場合で、抗生物質処理で生存する細胞は両遺伝子を含み、そして発現する。

10

20

【0459】

本発明の単離されたPCADM-1 DNA ZYM、PCADM-1 ポリペプチド、PCADM-1 に特異的に結合する抗体、および／または組換え細胞が動物に存在するPCADM-1 レベルを上昇または減少させるために動物に投与されるいずれかの場合、当業者は本明細書に提供される開示に基づき、動物に投与されるポリペプチド、核酸、抗体または細胞の量は、血液／尿／他の流体に存在するPCADM-1 および／または糖のレベルを評価することにより、あるいは動物の組織中に存在するPCADM-1 mRNAを発現レベル、またはPCADM-1 ポリペプチド、またはPCADM-1 をコードする核酸のレベルを測定することにより滴定できると理解するだろう。

30

【0460】

さらに当業者は本明細書に提供される開示に基づき、PCADM-1 の効果を阻害する任意の化合物（例えばPCADM-1 DNA ZYM、抗体、PCADM-1 に特異的に結合する二本鎖核酸、これによりPCADM-1 活性に必要なPCADM-1 / DNA 結合を破壊する）の混合物も、改変されたPCADM-1 発現に関連または媒介される疾患、障害または状態を緩和および／または処置するために使用できると考えるだろう。さらに1以上のそのような化合物を、前立腺ガンのような疾患、障害または状態を処置するために有用な他の化合物と組み合わせることができる。このように本発明はPCADM-1 DNA ZYM、抗-PCADM-1 抗体、およびPCADM-1 に特異的に結合する二本鎖核酸を単独で、または互いに組み合わせて投与することを包含し、そしてこれらの物質には限定するわけではないが、当業者が当該技術分野で周知な方法、またはそのような分子の投与に関して将来開発される方法を使用して測定できるようなDNA ZYM、または他のタンパク質に向けられた物質（例えばVEGF-1、MMP-2等）、ペプチド模造物、低分子および薬剤（例えば化学療法剤）およびそれらの様々な順列を含む。

40

【0461】

PCADM-1 のレベルを評価する方法（例えばウエスタンブロットまたはFACS分析または酵素結合免疫アッセイのような他の免疫に基づく分析において抗-PCADM-1 抗体を使用して）；細胞および／または組織中のPCADM-1 発現のレベルを評価する方法（例えばノーザンブロット分析等を使用して）；および／または二本鎖核酸（例え

50

ばPCADM-1プローブ1（配列番号5）およびPCADM-1プローブ2（配列番号6）とPCADM-1との結合の検出（例えば標識した二本鎖核酸のナイロン膜に基づく検出および／またはPCADM-1／DNAの結合を評価するために、電気泳動的移動度のシフトアッセイ（EMSA）を使用して）に基づく「モンテカルロ様」のDNA／タンパク質結合アッセイのような方法はこれから開示され、または当該技術分野では周知である。そのようなアッセイは、PCADM-1のレベルを所望するレベルに減少または上昇させるために、動物に投与されるPCADM-1、核酸、抗体、PCADM-1 DNA ZYM、アンチセンス核酸、リボザイム、組換え細胞等の「有効量または活性」を決定するために使用することができる。

C. 診断法および治療の評価

本発明はPCADM-1の改変された、かつ／または異常発現に関係または媒介される特定の疾患、障害または状態（例えば前立腺ガン）の診断法を含む。

【0462】

本発明は以前は診断されなかった哺乳動物における前立腺腫瘍を診断する方法を含む。この方法は哺乳動物から生物学的サンプルを得、そしてサンプル中のPCADM-1のレベル（発現、量、活性）を、前立腺腫瘍に罹患していないこと以外は同一の正常な哺乳動物に由来するサンプル中のレベルと比較することを含んでなる。前立腺腫瘍に罹患していないことが分かっている哺乳動物から得たサンプル中のPCADM-1のレベルに比べて、問題の哺乳動物に由来するサンプル中のPCADM-1のレベルが高いことは、その哺乳動物が前立腺腫瘍に罹患している指標である。これは本明細書のいたるところで開示するように、上昇したレベルのPCADM-1発現および／または活性が前立腺ガンの存在に関係するからである。このように哺乳動物から得たサンプル中の上昇したレベルのPCADM-1タンパク質、PCADM-1をコードする核酸、および／または上昇したレベルのPCADM-1とPCADM-1に特異的に結合する二本鎖核酸との結合は、哺乳動物が前立腺ガンに罹患している指標である。

【0463】

さらに本明細書のいたるところで開示するデータは、サンプル中のPCADM-1のレベルと種々の腫瘍組織のグリーソンスコア（Gleason Score）との間に相関があることを示し、PCADM-1のレベルがそのような腫瘍を級別するマーカーであることを示している。このように改変したレベルのPCADM-1発現の検出（抗体に基づく方法または核酸の検出に基づく方法を使用して検出されても）、あるいはPCADM-1に特異的に結合する核酸（例えば配列番号5、配列番号6、配列番号7および配列番号8の配列を有する核酸のような）への上昇したPCADM-1結合の検出は、本明細書に開示するデータがPCADM-1の発現レベルが腫瘍のグリーソンスコアに相関することを証明するので、前立腺腫瘍の段階の指標である。すなわち本発明は、前立腺ガン腫瘍ではないことが分かっている正常な、または既知の具体的段階の、かつ／または既知のグリーソンスコアを有する前立腺ガン腫瘍があることが分かっている哺乳動物から得たサンプル中のPCADM-1のレベルに比べて、哺乳動物から得たサンプル中のPCADM-1のレベルを評価することにより状態を評価する、すなわち前立腺腫瘍を「級別」する方法を含む。

【0464】

1つの観点では、生物学的サンプルは血液サンプル、前立腺生検材料、尿サンプル、前立腺液サンプル、精液サンプル、リンパ液サンプル、精嚢組織サンプル、胸膜腔液サンプル、会陰腔液サンプル、腹腔液サンプル、骨髄サンプル、唾液腺液サンプルおよび前立腺ガン腫瘍サンプルおよび他のガン組織から得たサンプル等からなる群から選択される。

【0465】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、サンプル中のPCADM-1レベルを評価する広い種々の方法があることを理解するだろう。そのような方法には限定するわけではないが、抗体に基づく検出法（例えばウエスタンブロットまたはELISA、FACSアッセイおよび酵素結合免疫ソーサンドイッチアッセイのような他の免疫に基づく分析で、

10

20

30

40

50

抗-PCADM-1または他の交差反応性抗体を使用して) ; 細胞および/または組織中のPCADM-1発現のレベルを評価する方法(例えばノーザンブロット分析等を使用して)、および/または二本鎖核酸の結合、例えばPCADM-1プローブ1(配列番号5)およびPCADM-1プローブ2(配列番号6)とPCADM-1ポリペプチドの検出(例えばナイロンメンブレンに基づく二本鎖核酸の検出、および/またはPCADM-1とPCADM-1に特異的に結合する二本鎖核酸の結合を評価するためのEMSAを使用して)に基づく「モンテカルロ様」のDNA/タンパク質結合アッセイのような方法を含む。このようにPCADM-1ポリペプチドまたはPCADM-1をコードする核酸(すなわちRNAまたはDNA)、あるいはPCADM-1ポリペプチドに特異的に結合する核酸を検出するいずれかによるPCADM-1の検出法は本明細書に開示されるか、または当業者には周知であり、そして本発明に包含される。さらに本発明は将来開発され得るようなサンプル中の特異的タンパク質または核酸の検出のための類似アッセイを包含する。

10

20

30

40

50

【0466】

本発明は、哺乳動物における前立腺ガンの処置の効力を評価する方法を含む。この方法は上昇したPCADM-1発現に媒介または関連する疾患、障害または状態(例えば前立腺ガン)の処置の特定な過程の前、最中および後に、PCADM-1発現のレベル、量、および/またはDNA結合活性を評価することを含んでなる。これは本明細書中のいたるところですでに述べたように、PCADM-1発現、量、および/または活性が特定の疾患状態と関連するか、または媒介するからである。このように処置過程がPCADM-1発現/量/DNA結合活性に及ぼす効果を評価することは、より低レベルのPCADM-1発現、量、活性が処置法の成功を示すような処置の効力を示す。

D. DNA結合タンパク質およびそれらのコグネイト二本鎖オリゴヌクレオチド結合パートナーの同定法

本発明はDNA結合タンパク質およびタンパク質により結合される二本鎖オリゴヌクレオチドの同定法を含む。この方法は、1組の半ランダム二本鎖オリゴヌクレオチドの員をDNA結合タンパク質を含有する混合物と接触させることを含んでなる。オリゴヌクレオチドは、5'および3'側の両方に隣接する、少なくとも2個の既知の塩基対を除き、未知のランダム配列を含んでなる点で半ランダムである。1つの態様では、オリゴヌクレオチドは8bp長であり、ここで第1塩基対はAであり、そして第2塩基対はそれぞれA、T、G、Cで変動するが、隣接する既知の対は相補的なワトソン-クリック塩基対であるので、位置1でのヌクレオチドがAの場合、位置8のヌクレオチドは“T”であった。同様に第2位置がAである時、第7番目のヌクレオチドはTであるといった具合であった。このように一群の半ランダムオリゴヌクレオチドが、5'末端の2塩基対および3'末端の2塩基対が既知であり、そしてそれらの間に約4塩基対の未知のコア配列を持つようにして作成された。

【0467】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、既知のランキン塩基対は2個に限定されないと考えるだろう。さらに当業者は未知のランダムなコア配列が約3~12塩基対の範囲であることができるので、二本鎖オリゴヌクレオチドは好ましくは約7~16塩基対のサイズの範囲であり、すなわち5'末端が2個の既知の塩基対を含んでなり、続いて3~7個の未知のコア塩基対、これに次いでオリゴマーの3'末端に最初の2個の既知の塩基対の鏡像である2個の既知の塩基対が続く、ここでこの分子の5'末端の2個のヌクレオチドは、ワトソン-クリック塩基対の法則に従い分子の3'末端の2個のヌクレオチドと結合することができるので、オリゴヌクレオチドの最初の2個のヌクレオチドおよび最後の2個のヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが一本鎖であるならば互いにハイブリダイズし、そして必要ではないがステム・ループ構造を形成することができる。

【0468】

この組からの各半ランダムオリゴヌクレオチドは、DNA結合タンパク質を含有する混合物と混合される。オリゴヌクレオチドおよびタンパク質は、特異的なDNA-タンパ

ク質結合が起こることができる条件下でインキュベーションされる。そのような条件は当該技術分野では周知であり、そして本明細書に例示され、そして本発明は任意の特定の組の反応条件に限定されない。むしろ本発明は本明細書に開示する当該技術分野で周知の、および当業者が本明細書の教示から着手すれば二本鎖核酸とPCADM-1の特異的結合を評価するために使用できると理解する将来開発される広い多くの反応条件を含む。

【0469】

次いでDNA結合タンパク質に最高の結合親和性を示す二本鎖オリゴヌクレオチドを、次ぎのプロープの設計に使用するために選択する。より詳細には表1に表すように、DNA結合タンパク質混合物と最高レベルの結合を示す8塩基対のオリゴヌクレオチド（*CANNNTG）を選択し、そしてコアのランダム配列が1塩基対減少して、3個のみ未知のもの（すなわちCACNNNTG、CAGNNNTG、CATNNNTGおよびCAAANNNTG）を有する半ランダムな組のオリゴヌクレオチドを生成する。もう一度、この組の各員をDNA結合タンパク質を含んでなるサンプルと結合させ、そしてタンパク質と最高の親和性で結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを同定し、そして配列を決定する（すなわちアスタリスクおよび太字により示す-CACNNNTG）。この手順を既知の塩基対を加え、そして未知のランダムなコア配列の塩基対の数を減少させながら、DNA結合タンパク質に結合する二本鎖核酸の全配列が同定されるまで各回を繰り返す。

【0470】

さらに当業者は本明細書に提供する開示に基づき、二本鎖オリゴヌクレオチドが特異的に結合するタンパク質が、このアッセイを使用しても同定できると考えるだろう。実際に本発明の「モンテカルロ様」アッセイは、新規なDNA結合タンパク質PCADM-1、およびこのタンパク質に結合する新規核酸配列（例えば配列番号5の配列を有する核酸、および配列番号6の配列を有する核酸）を同定した。したがって本発明はDNA結合タンパク質の同定法および、限定するわけではないが非腫瘍組織であること以外は同一の組織中よりは腫瘍組織中に高いレベルで存在するタンパク質を含め、そのような方法を使用して同定されるタンパク質を包含する。

【0471】

当業者は本明細書に提供する開示に基づき、約7～9塩基対長の範囲の二本鎖オリゴヌクレオチドは、本明細書中のいたるところでさらに詳細に説明されているように、これらが遺伝子発現の調節に関与する転写因子タンパク質のようなタンパク質と特異的に結合する多くの既知のDNA配列の平均長であるので使用されると考えるだろう（Sambrook et al., 1989, 同上）。故にこれらの長さが本発明の方法の使用に選択された。しかし本発明はこれらの長さに限定されず；むしろ本発明は本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドが約7～16塩基対長となるように、少なくとも2個の既知の塩基対に挟まれた約3～12塩基対の範囲の中央の未知の配列を含む。

【0472】

この方法はさらに特異的なDNA-タンパク質結合を検出することを含んでなる。当業者は本明細書に説明する教示から着手すれば、特異的なDNA-タンパク質の結合は限定するわけではないが、タンパク質をナイロンメンブレンのような固体支持体に乗せ、そして二本鎖オリゴヌクレオチドと特異的に結合するタンパク質を同定するために、メンブレンに特異的に結合した標識されたオリゴヌクレオチドを検出することを含め、本明細書に例示する技法のような当該技術分野で周知の技法を使用して検出できると理解するだろう。

【0473】

あるいはDNA-タンパク質複合体の検出は、電気泳動的移動度シフトアッセイ、または本明細書に開示し、かつ／または当該技術分野で知られているようなEMSAを使用して行うことができる。タンパク質をゲルから切り出し、そして配列決定して二本鎖オリゴヌクレオチドと特異的に結合するタンパク質のアミノ酸を決定することができる。当業者は本明細書に提供される開示に基づき、DNA-タンパク質結合の存在を評価し、そしてタンパク質の同一性（例えばアミノ酸配列）を決定する特異的な検出法が重要ではなく、

そしてDNA-タンパク質結合複合体を検出するために、そしてDNA-タンパク質およびそれらに結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを単離し、そして同定するために使用できる多くの方法があることを理解している。このように本発明の方法を使用して、DNA-結合タンパク質およびそれらが結合するコグネイト二本鎖オリゴヌクレオチドの両方を容易に同定し、そして特性決定することができる。

【0474】

本発明は、疾患、障害または状態、例えば前立腺ガンに関連しているDNA結合タンパク質およびそれらが特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチド配列の同定法も含む。この方法は、罹患した細胞または組織から調製したタンパク質抽出物中に存在するが、疾患、障害または状態が無いことが分かっている正常細胞および組織から調製された他は同一のタンパク質抽出物から調製されたタンパク質抽出物中には検出されないDNA結合タンパク質およびそれらのコグネイトオリゴヌクレオチド結合パートナーを同定することを含んでなる。すなわち当業者には本明細書に提供する開示から想定されるように、本発明の方法はDNA結合タンパク質およびそれらが結合するオリゴヌクレオチドを同定すること、および罹患した組織に由来するタンパク質抽出物中では検出できるが、DNA結合タンパク質が存在しないか、異なる比率を有するか、またはアッセイの検出限界を越えた量で存在するいずれかのために検出されないこれらのDNA検出タンパク質およびオリゴヌクレオチド結合パートナーを選択することを含んでなる。

【0475】

罹患することにより上昇するが、正常な非疾患組織では上昇しないレベルの新規DNA結合タンパク質の同定は、そのようなタンパク質およびそれらのコグネイト二本鎖オリゴヌクレオチドがそのような疾患、障害または状態の診断および処置のための潜在的な診断薬および治療薬の候補であるという点で重要である。このようにそのようなDNA結合タンパク質は、腫瘍形成に関与する特定の遺伝子の改変された発現のような細胞性プロセスを調節できる点で、疾患プロセスに関与しているか、または関連しているらしい。

【0476】

実際に本明細書に開示する方法を使用して同定される新規DNAタンパク質であるPCADM-1は、前立腺ガンに関与しているか、またはわずかでも関連しているので、組織細胞および体液中のPCADM-1の検出は、前立腺ガンの診断に効果的な手段である。加えて、腫瘍細胞(PC-3ML)および腫瘍組織(SCIDマウスにおける)中のPCADM-1発現の阻害は、腫瘍細胞の生存および腫瘍の生存を低下させた。これらの結果はPCADM-1に限定するわけではないが、それらがこれらの疾患、障害または状態を処置するための診断薬および治療薬を開発するために重要となるので、疾患、障害または状態に関連するDNA結合タンパク質、および特異的に結合するDNAを同定することの重要性を示している。

IX. キット

本発明は、PCADM-1をコードする核酸、PCADM-1に特異的に結合する抗体、PCADM-1 mRNAを特異的に開裂するPCADM-1をコードする核酸に部分的に相補的なPCADM-1 DNA ZYM (すなわちDNA ZYM) (すなわち、配列番号9の配列(PCADM-1 DNA ZYM-1)および配列番号10等の配列を有する核酸)、および/または本発明の組成物、PCADM-1ポリペプチドに特異的に結合する核酸(例えばPCADM-1プローブ1 [配列番号5] およびPCADM-1プローブ2 [配列番号6])、アプリケーションおよび本発明の方法を行うための化合物の使用を記載する使用説明書を含んでなる種々のキットを含む。以下に例示キットを記載するが、他の有用なキットの内容物は、本開示に照らして当業者には明白である。これら各キットは本発明内に含まれる。

【0477】

1つの観点では、本発明はPCADM-1の異常発現により媒介される疾患を緩和するためのキットを含む。このキットは本発明に開示する方法にしたがって使用される。簡単に説明すると、キットは細胞をPCADM-1に特異的に結合する抗体と、またはPCA

10

20

30

40

50

D M-1 mRNA を特異的に開裂する D N A Z Y M と接触させるために使用し、ここで P C A D M-1 の減少した発現、量または活性が有益な効果を媒介する。さらにキットはキットを使用するためのアプリケーションおよび使用説明書を含んでなる。これらの使用書は本明細書に提供する例を簡略に具体化する。

【0478】

キットは製薬学的に許容され得る担体を含む。組成物は本明細書のいたるところで説明する適切な量で提供される。さらに投与経路および投与頻度は、本明細書のいたるところですでに説明した通りである。

【0479】

本発明はさらに抗ガン処置の効力を評価するためのキットを含む。このキットは、サンプル中に存在する P C A D M-1 のレベルを評価できるように、P C A D M-1 に特異的に結合する化合物、または P C A D M-1 をコードする核酸を含む。本明細書のいたるところですでに開示したように、そのような P C A D M-1 検出化合物には限定するわけではないが、P C A D M-1 に特異的に結合する抗体（例えばウエスタンブロット分析、酵素結合イムノサンドイッチアッセイ、F A C S アッセイまたは E L I S A、酵素イムノアッセイまたは E I A 等のような抗体に基づく検出法を使用するために）、P C A D M-1 をコードする核酸に特異的に結合する核酸（例えばノーザンおよびサザンブロット分析で使用するために）、および P C A D M-1 ポリペプチドに特異的に結合する二本鎖核酸、例えば P C A D M-1 プローブ 1（配列番号 5）および P C A D M-1 プローブ 2（配列番号 6）、配列番号 7 および配列番号 8 の配列を有する P C A D M-1 に特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを含み、それらすべてが D N A / タンパク質結合アッセイ（例えばモンテカルロ様アッセイおよび E M S A）を使用して P C A D M-1 を検出するために使用できる。

【0480】

本発明を以下の実験的实施例を参考にしてさらに詳細に記載する。これらの実施例は具体的説明の目的のみに提供され、そして他に特定しない限り限定することを意図していない。すなわち本発明は以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ本明細書に提供する教示の結果として明らかとなるありとあらゆる変更を包含すると解釈すべきである。

【実施例】

【実施例 1】

【0481】

D N A 結合タンパク質およびそれらに特異的に結合する D N A 分子を同定するための新規アッセイ

この実施例で提示する実験は、以下のようにまとめることができる。

【0482】

本発明は同じ患者の良性または正常な組織に比べて、罹患した組織中で発現するタンパク質（1 つまたは複数）に優先的に結合する二本鎖 D N A 配列の迅速な同定のための「プロテオミクス（p r o t e o m i c s）」プラットフォームの開発に関する。基本的取り組みには、縮重配列で始まり、そして「完成された」配列で終わる 7 塩基対、8 塩基対および 9 塩基対の二本鎖 D N A 配列の系統的合成が必要である（表 2 を参照にされたい）。固体支持体（例えばナイロンメンブレン）上の定量的な「D N A-タンパク質」結合アッセイを使用して、「D N A-タンパク質」結合親和性を評価し、そして同じ患者に由来する良性または正常な組織（すなわち検出可能な疾患、障害または状態を有することが知られていないことを以外は同一の組織）に比べて、罹患した組織（すなわちガン）に由来するタンパク質（1 つまたは複数）に優先的に結合する D N A 配列（1 つまたは複数）を同定する。

【0483】

本発明の分野は、罹患した組織および／または正常もしくは良性組織中のタンパク質（1 つまたは複数）に独自に結合することができる新規 D N A 配列の同定に関する。本発明

はさらに、核酸発現の調節不順 (d i s - r e g u l a t i o n) (異常調節または異常発現とも呼ぶ) に関する疾患 (ガンを含む) の診断、防止および処置に関する。

【0484】

本明細書に開示するデータは、DNA結合タンパク質およびこのタンパク質に特異的に結合するDNA分野を同定するための新規「モンテカルロ様」アッセイの知見を示す。

【0485】

この使用する材料および方法および実施例に提示する実験の結果を、これから記載する。

【0486】

本発明は、オリゴヌクレオチドが検出可能な疾患、障害または状態 (すなわちガン) を有する組織を使用して調製されたタンパク質抽出物中のタンパク質に結合するが、このオリゴヌクレオチドは疾患、障害または状態を示さない (すなわち正常または良性組織) こと以外は同一の組織から得たタンパク質には検出可能に結合しない、約7~9塩基対長 (7~9塩基対とも呼ぶ) の範囲の新規二本鎖オリゴヌクレオチドを同定するための新規の迅速な「定量的」スクリーニングアッセイを開示する。 10

【0487】

この取り組みの理論的解釈は、これらDNA配列長が細胞および組織中で遺伝子発現の調節に関与する転写因子またはコファクターに通常結合する既知のDNA配列の平均長を表すということである (S a m b r o o k e t a l . 1989)。したがって同じ患者に由来する適合する組織中で過剰発現されたタンパク質に結合するDNA配列の「半ランダム」なスクリーニングは、正常、良性または罹患した組織に関連する遺伝子転写および遺伝子発現の調節に関与するタンパク質 (1つまたは複数) に独自に結合する新規DNA配列を同定するはずである。しかし本発明はDNA結合能について、問われる特定長のオリゴヌクレオチドに限定しない。すなわち約7~9塩基対長を有するオリゴヌクレオチドが本明細書で例示されるが、約7~16塩基対 (7~16 b p または 7~16 m e r) の長さを有するものを含む他の長さを有するオリゴヌクレオチドが本発明に包含される。 20

【0488】

本明細書に記載する取り組みの全体的な重要性は、組織の特別な病状と関連する7塩基対、8塩基対または9塩基対配列 (7、8および9塩基対のオリゴヌクレオチドまたはオリゴマー、すなわち - m e r は、本明細書で択一的に称する) の同定が、患者の状態 (すなわち、健康、良性または疾患) の診断におけるこれらDNA配列の使用を可能にするという事実にある。すなわちDNA-タンパク質結合アッセイは、患者の状態または疾患状態または正常状態を診断するために組織もしくは体液から得たタンパク質について行うことができる。 30

【0489】

本発明は、粗組織抽出物に由来するタンパク質 (1つまたは複数) に選択的に結合するいずれか7塩基対、8塩基対または9 - m e r の二本鎖DNA配列の合成に関する。DNA配列が合成され、そして (γ A T P) ³² P-放射標識され、そして S a m b r o o k e t a l . (1989) の標準法に従いカラムクロマトグラフィーにより精製される。粗タンパク質抽出物は、同じ患者の切開したヒト組織 (すなわち正常、良性およびガン、そして検出可能な疾患、障害または状態を表さない組織) から調製され、そして増加した量のタンパク質 (1、5、10および20 μ g の総タンパク質) をナイロンメンブレンフィルターに乗せた。次いでナイロンメンブレンは一定量の放射標識二本鎖DNAを使用してインキュベーションし、そしてフィルターをリン酸バッファーで洗浄して非特異的に結合したDNAおよびDNAに結合できなかったタンパク質を確立された方法に従い除去した (S a m b r o o k e t a l . 1987)。 40

【0490】

表1は、本明細書に開示する「モンテカルロ様」アレイプロトコールを使用してスクリーニングしたDNA二本鎖標準配列 (8塩基対) の例を提供する。ヒト前立腺の様々な領 50

域（すなわち前立腺ガン、良性前立腺過形成、および前立腺支質）に由来する粗タンパク質抽出物に結合する放射標識プローブの量を、各配列について比較した。ウシ血清アルブミンに対する放射標識プローブのバックグラウンドレベル（0またはゼロ）を各プローブに対して測定した。目的のプローブの日常的なスクリーニングを、最初の配列が4 Nのコア（すなわちランダム配列）を有する順次の繰り返しで行った。最高の結合レベルを持つバッチに由来する配列を使用して、ランダムな未知の3 Nのコア配列を有する4種の配列を生成し、そして結合アッセイを繰り返して目的の組織部位（すなわちこの場合ではガン）について最高の結合活性を持つ配列を同定した。同様にこのバッチからの配列を続いて選択し、そして目的の組織部位（すなわちこの場合ではガン）について最高の結合活性を有する配列を同定するために有用な2 N、1 Nおよびゼロ Nのコアをそれぞれ有する4配列を生成した。 10

【0491】

目的の配列（すなわち前立腺ガンに由来する粗タンパク質抽出物について、順次上昇したレベルの結合活性を持つ）を同定し、次いで実験的試験を行って結果を実証した。表2に開示するデータは、例えば一定量の放射標識プローブ（すなわち γ -ATP）³²P-標識化CACGGATGプローブ（100, 000 cpmで1 ng）の結合活性は、ナイロンメンブレンフィルター上にスポットした前立腺ガン組織に由来する粗タンパク質の量（10 μ g）を上昇させると増加した。しかし良性の前立腺過形成、正常支質およびウシ血清アルブミンに対して結合するプローブの量は、比較可能な実験において増加しなかった（表2）。これらの比較アッセイで対照として使用した縮重プローブ（CANNNNTG）は、ウシアルブミン血清に結合するCACGGATGのバックグラウンドレベル（非特異的結合）よりも高いレベルでタンパク質に結合できなかった。通常AP-2に結合する既知のプローブを用いた正の対照実験は、すべてのタンパク質抽出物が「良好」であり、そして結果の差異がどのようにタンパク質が調製されたか、または結合アッセイに使用した方法に起因しないことを確認した。 20

【0492】

最後に観察を実証するために、多数の患者の前立腺（n = 11）に由来する比較可能な組織抽出物について、同定したプローブの選択的結合を比較した。本明細書に開示するデータにより、スクリーニングおよび選択法が実施に適合することが確認される（表3）。 30

【0493】

同様にデータは特異的な二鎖DNAプローブが前立腺ガンに関連するタンパク質（1つまたは複数）に一定して結合することを示す（グリーソンスコア6～8）。

【0494】

同一の方法および取り組みを7塩基対および9塩基対についても行うことができる。差異はそれぞれ3 Nおよび5 Nのコア配列から始まるはずである。

【0495】

【表 1】

表1

8-mer オリゴヌクレオチド配列のスクリーニング

放射標識プローブ	前立腺ガン	良性の前立腺 過形成
AANNNNTT	0	0
ATNNNNAT	+1	0
AGNNNNCT	+1	+1
ACNNNNGT	+1	+1
TANNNNTA	0	0
TTNNNNAA	0	0
TGNNNNCA	0	0
TCNNNNGA	0	0
GANNNNTC	+2	+2
GTNNNNAC	+1	+1
GGNNNNCC	+1	+1
GCNNNNGC	+1	+1
*CANNNNTG	+3	+1
CTNNNNAG	+1	0
CGNNNNCG	+1	+1
CCNNNNGG	+1	+1
*CACNNNTG	+3	+1
CAGNNNTG	+1	+1
CATNNNTG	+1	+1
CAANNNTG	+1	0
*CACGNNTG	+4	+1
CACCNNTG	+2	+1
CACTNNTG	+1	+2
CACANNTG	+3	+1
*CACGGNTG	+5	+1
CACGCNTG	+1	+2
CACGTNTG	+2	+1
CACGANTG	+2	+1
*CACGGATG	+6	0
CACGGTTG	+3	+1
CACGGGTG	+2	+1
CACGGCTG	+2	+1
*CACGGATG	+6	0

10

20

30

40

50

【0496】

核タンパク質抽出物のアリコート（全部で3回の試験ウェルについて、5、10および20 μ g タンパク質の各タンパク質濃度）をナイロンメンブレンフィルターにドットし、そして $(\gamma\text{-ATP})^{32}\text{P}$ -標識化プローブ（1分あたり100,000カウントで1ナノグラム）とインキュベーションした。値は3回の測定について平均し、そして試験した3種のタンパク質濃度へ結合するDNAの測定から10 μ g タンパク質について標準化した。 $(\gamma\text{-ATP})^{32}\text{P}$ -標識化AP-2結合プローブ（100,000 cpmで1 ng）を用いた対照アッセイは、調製されたタンパク質抽出物の質を検証する対照測定を提供し、そして通常、100~5000 cpm（+1）カウントを生じた。数は（0）<1000；（+1）100~5000；（+2）5001~10,000；（+3）10,001~20,000；（+4）20,001~30,000；（+5）30,001

～40,000; (+6)40,001～50,000 cpmを表す。N=A、T、G、C。

【0497】

【表2】

表2

粗タンパク質抽出物へのCACGGATG 結合の測定
(それぞれ 5/10/20 μ gタンパク質*)

プローブ	前立腺 ガン	良性の前立腺 過形成
CACGGATG	+3/+6/+13	0/+1/+1
CANNNNTG	0/+1/+1	0/0/+1
AP-2 プローブ	+1/+1/+1	+1/+1/+1

10

【0498】

表1の符号については方法を参照にされたい。

【0499】

【表3】

20

表3

11種の前立腺に由来する粗タンパク質抽出物(10 μ gタンパク質) への
CACGGATG 結合の測定

前立腺 検体	プローブ	前立腺 ガン	良性の前立腺 過形成
1	CACGGATG	+5	0
1	CANNNNTG	+1	0
1	AP-2 プローブ	+1	+1
2	CACGGATG	+6	+1
2	CANNNNTG	+1	+1
2	AP-2 プローブ	+1	+1
3	CACGGATG	+5	0
3	CANNNNTG	+1	+1
3	AP-2 プローブ	+1	+1
4	CACGGATG	+5	0
4	CANNNNTG	+1	+1

30

【0500】

40

【表 4】

4	AP-2 7°□-7°	+1	+1
5	CACGGATG	+6	+1
5	CANNNNTG	0	0
5	AP-2 7°□-7°	+1	+1
6	CACGGATG	+7	+1
6	CANNNNTG	0	+1
6	AP-2 7°□-7°	+1	+1
7	CACGGATG	+6	+1
7	CANNNNTG	0	+1
7	AP-2 7°□-7°	+1	+1
8	CACGGATG	+5	+1
8	CANNNNTG	0	+1
8	AP-2 7°□-7°	+1	+1
9	CACGGATG	+6	+1
9	CANNNNTG	+1	0
9	AP-2 7°□-7°	+1	+1
10	CACGGATG	+5	0
10	CANNNNTG	+1	+1
10	AP-2 7°□-7°	+1	+1
11	CACGGATG	+6	+1
11	CANNNNTG	+1	0
11	AP-2 7°□-7°	+1	+1

10

20

【0501】

表1の符号については方法を参照にされたい。

【実施例2】

【0502】

新規なDNA結合タンパク質、PCADM-1の同定およびそれに特異的に結合するDNA分子

30

この実施例に提示する実験は、以下にまとめることができる。

【0503】

本明細書に開示するデータは、前立腺ガンマーカータンパク質をコードする新規核酸およびこのタンパク質に特異的に結合する新規核酸分子の知見を示す。これらの核酸およびアミノ酸配列は、前立腺ガンを検出するために使用することができる。

【0504】

本発明は本明細書で「PCADM-1」タンパク質と呼ぶガンに関する新規なマーカータンパク質に結合するDNAコンセンサスドメインの核酸およびアミノ酸配列に関する。本発明はさらに非調節細胞成長および増殖およびガンに関する疾患の診断、防止および処置において、PCADM-1タンパク質を特異的に認識するこれら配列およびプローブの使用に関する。

40

【0505】

実施例で提示する実験で使用する材料および方法をこれから記載する。

【0506】

切開したヒト前立腺組織に由来する核抽出物中の新規DNA結合タンパク質（すなわち染色体組換えに関与する転写因子）を同定のための新規「モンテカルロ様」型アッセイを開発した。8塩基対長のオリゴヌクレオチドを試験するために、1組の標準的DNA配列の各員（表1に表すn=4096の組み合わせ）を個別にスクリーニングして、ニトロセルロースフィルターおよび電気泳動的移動度ゲルシフトアッセイ（EMSA）でのオリゴヌクレオチドによるタンパク質結合を評価した。

50

【0507】

シンチレーション計数およびホスホイメーシングでは、前立腺ガン腺に由来する核タンパク質（1つまたは複数）が、「PCADM-1プローブ1」と命名された新規DNA配列（CACGGATG〔配列番号5〕）に結合したことが示された。このCACGGATG配列は、T-細胞およびB-細胞の染色体切断に関連する既知の切断点クラスター領域配列（Rabbits and Boehm, 1991, *Advances in Immunology* 50:119-146）に大変似ていた。

【0508】

さらに本明細書に開示するデータは、「PCADM-1プローブ2」と命名した別の二本鎖オリゴヌクレオチド（CACCAATGA〔配列番号6〕）も、PCADM-1に特異的に結合することを示す。このようにPCADM-1に特異的に結合する二本鎖オリゴヌクレオチドには以下を含む：

「PCADM-1プローブ1」（配列番号5）：

5' - C A C G G A T G - 3'

3' - G T G C C T A C - 5'

「PCADM-1プローブ2」（配列番号6）

5' - C A C A A T G A - 3'

3' - G T G T T A C T - 5'

cDNAライブラリーをスクリーニングするための二本鎖CACGGATGプローブの使用によりファージミドクローンが同定され、これは「PCADM-1」タンパク質を発現した。組換えタンパク質はEMSAで仮定のCACGGATG（配列番号5）、および他の既知の切断点クラスター領域配列（Rabbits and Boehm、同上）に結合することが分かった。EMSAおよびELISAは、尿および血清中のPCADM-1タンパク質の過剰発現が、ヒトの前立腺ガンの診断および予後徴候であることを示した。

【0509】

PCADM-1核酸配列は、S2-リボソームタンパク質の配列と少なくとも99%相同的であり、そしてS2からPCADM-1タンパク質を識別する少なくとも3個の特異的塩基対の突然変異を表す。比較するとS2は正常細胞中でリボソーム複合体の一部であり、そして細胞中でリボソーム複合体から離れた「自由な物体」としては存在しないか、またはDNA結合活性を表さない全く異なるタンパク質である。したがって本明細書に開示するデータは驚くべきことには、たとえS2およびPCADM-1がわずかに5個のアミノ酸残基が異なっている、2つのタンパク質は本明細書のいたるところで例示し、そして検討するように大きく異なる特性を示す。より重要なことには、PCADM-1は前立腺腫瘍細胞および組織中で過剰発現され、そして正常細胞および組織中には見いだされないことである。リボソームタンパク質をコードするmRNAの過剰発現とガンとの間の関連を示す幾つかの報告があることに注目すべきであり（Chiao et al., 1992, *Mol. Carcinog.* 5:219-231; Fernandez-Pol et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268:21198-211204; Fernandez-Pol et al., 1994, *Cell Growth & Differentiation* 5:821-825; Fernandez-Pol, 1996, *Anticancer Res.* 16:2177-2186; Chan et al., 1996, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 228:141-147; Chan et al., 1996, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 225:952-956; Wool, 1996, *Trends in Biochemical Sciences* 21:164-165; Wool, 1997, In: *リボソームRNAおよびグループIイントロン (The ribosomal RNA and Group I introns)*、第153-178頁、Green and Schroeder、編集、R. G. Landes社、オースチン、テキサス州; Wool et al., 1995, *Biochemstr*

10

20

30

40

50

y & Cell Biology 73:933-947; Vaarala et al., 1998, Int. J. Cancer 78:27-32)、リボゾームRNA数の増加は疾患状態と関連することを示唆している。

【0510】

例えば正常なS2mRNAを用いたノーザンブロット実験では、S2mRNAが頭部および頸部ガンで上昇するが、正常な組織ではほとんど検出できないことが明らかにされた (Chao and Tainsky, 1992, Mol. Carcinog. 5:219-231)。特定の理論に拘束されことを望まないが、広く考えられているのは、どうも特異的なリボゾームタンパク質の過剰発現がガンにおいて重要な役割を果たしているらしいということである (Chiao et al., 1992, Mol. Carcinog. 5:219-231; Fernandez-Pol et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:21198-211204; Fernandez-Pol et al., 1994, Cell Growth & Differentiation 5:821-825; Fernandez-Pol, 1996, Anticancer Res. 16:2177-2186; Chan et al., 1996, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 228:141-147; Chan et al., 1996, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 225:952-956; Wool, 1996, Trends in Biochemical Sciences 21:164-165; Wool, 1997, In: リボゾームRNAおよびグループIイントロン (The ribosomal RNA and Group I introns)、第153-178頁、Green and Schroeder、編集、R. G. Landes社、オースチン、テキサス州; Wool, 1995, Biochemistry & Cell Biology 73:933-947; Vaarala et al., 1998, Int. J. Cancer 78:27-32)。

【0511】

特定の理論に拘束されることは望まないが、別の1つの可能性は多数のリボゾームタンパク質に特徴的な「ロイシンジッパー」配列モチーフまたは変異体モチーフが突然変異するかもしれず、そして突然変異した「ロイシンジッパー」ドメインは核酸に結合することができるということであり (Fernandez-Pol, 1996, Anticancer Res. 16:2177-2186; Wool, 1996, Trends in Biochemical Sciences 21:164-165; Wool, 1997, In: リボゾームRNAおよびグループIイントロン (The ribosomal RNA and Group I introns)、第153-178頁、Green and Schroeder、編集、R. G. Landes社、オースチン、テキサス州)、そしてDNA結合タンパク質、ヌクレアーゼとしてのいずれの機能も、ガン細胞中の遺伝子転写および翻訳の連結を制御し、または調節する。例えばラットのリボゾームタンパク質S3aはラットのv-fos形質転換エフェクター遺伝子の産物と同一である (Chan et al., 1996, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 228:141-147)。S3aはタンパク質合成の開始に関与し、そしてまた成長および細胞サイクルの調節に関与しているタンパク質にも関係する (Chan et al., 1996, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 228:141-147)。同様にラットリボゾームタンパク質L10はDNA結合タンパク質および推定されるウィルムス腫のサプレッサー遺伝子と相同的である (Chan et al., 1996, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 225:952-956)。まとめると、これらの実験は変異体「リボゾーム様」タンパク質がガンの予後判定または診断となり、そして染色体DNA活性、遺伝子発現およびガン細胞の挙動を調節する重要な役割を果たすことを示唆している。

【0512】

本発明で記載するタンパク質、ヌクレオチド配列および方法は記載する特定の方法論、

10

20

30

40

50

プロトコール、細胞株、ベクター、試薬および応用に限定されないと理解すべきである。これらは変動してよい。同様に本明細書で使用する用語は、厳密に特定の態様を記載する目的のためだけであり、本発明または応用の範囲を限定することを意図していない。本発明の範囲は添付する特許請求の範囲により限定されるだけである。

【0513】

前立腺ガンのようなガンの初期検出用のマーカーの開発は、ガンの改善された処置に必須である。前立腺ガンに関しては一般に、血清の前立腺特異的抗原 (PSA) レベルは前立腺ガンを持つ患者の同定に感受性でも特異的でもないと考えられている (Garnick, M. B. and Fair W. R., 前立腺ガン (Prostate Cancer)、サイエンティフィック アメリカン (Scientific American)、1998年12月、75-83)。前立腺ガンである男性のわずか約25%で、約4 ng/mlより高く10 ng/mlまでの範囲の血清 PSA レベルが検出されると予想された (すなわち偽陰性)。同様に良性の前立腺過形成がある男性の30%もで、PSA レベルが上昇した (すなわち偽陽性)。加えてデジタル直腸検査での診断を確認する試みではわずか25%の患者で成功しただけであり、そして生検は患者の10~15%で成功しているだけである。このように前立腺ガンを含め、ガンについてより感受性で、しかもより特異性のアッセイの開発が明らかに必要である。集団検診または日常的な臨床検査を通して実施可能となる非侵襲的および廉価な尿に基づくスクリーニングアッセイは特に有用である。

10

【0514】

本発明はヒトの組織に由来する核酸抽出物中の新規 DNA 結合タンパク質を同定するためのスクリーニングアッセイに使用できる核酸配列に関する。1つの態様では、スクリーニングアッセイは前立腺組織 (すなわち腺) の核タンパク質抽出物中で過剰発現した新規な転写因子を同定するために有用である。このアッセイについて、8塩基対の二本鎖 DNA プロブ (n=4096) を設計した。次いでこの DNA は、同じ患者に由来する適合した検体において、ガン、良性、高度な前立腺上皮内新形成、および精嚢組織に由来する適合タンパク質抽出物中で、タンパク質-DNA 結合親和性における差異をスクリーニングするために使用した。タンパク質の結合はニトロセルロースフィルターおよび電気泳動的移動度ゲルシフトアッセイ (EMSA) で観察される DNA-タンパク質結合量の測定を介して決定した。

20

30

【0515】

シンチレーション計数およびホスホイメーキングでは、進行したヒト前立腺ガン組織の核抽出物から単離したタンパク質が、CACGGATGを含んでなる核酸配列に特異的に結合することが明らかとなった。調査した他の組織に由来するタンパク質抽出物は、この核酸配列に結合できなかった。この配列はT細胞およびB細胞中の染色体切断と関連する既知のBPCR配列に類似するが1塩基対異なる (Rabbitts and Boehm, 1991, Advances in Immunology 50:119-146)。

【0516】

同定された特異的 DNA 配列 (CACGGATG) は、PC-3 ML 前立腺細胞から作製された cDNA ライブラリーをスクリーニングするために使用された (Wang et al., 1998, Oncology Research 10:219-233, 1998)。このスクリーニングは PCADM-1 タンパク質を発現するファージミドクロンの同定をもたらした。PCADM-1 遺伝子のサブクロニングは、この遺伝子が染色体タンパク質 S2 および LLRep3 に約99%の相同性を表すことを示した。この PCADM-1 タンパク質をコードする核酸配列 (配列番号1) を、推定されるこのポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号2) と一緒に図1に表す。組換え PCADM-1 タンパク質は EMSA で推定上の BPCR 領域および既知の BPCR に結合することが示された。

40

【0517】

50

本明細書に開示するデータは、E M S Aまたはナイロンフィルターに基づく結合アッセイを利用した「DNA-タンパク質」結合アッセイが、生物学的サンプル中のPCADM-1の同定に開発されたことを示す。E M S Aを使用して、PCADM-1はヒト患者に由来する組織抽出物、および尿および血清中で検出された。

【0518】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体（すなわちIgG抗体）は、精製された組換えタンパク質、この場合は抗原としてPCADM-1を利用して抗体を生成する当業者に知られている標準法を使用して、それぞれウサギおよびマウスで生成された。

【0519】

抗体は、当業者に知られている標準的な方法に従い、ウェスタンドットブロット分析、E I Aおよび免疫染色技術を使用して、33kDaのPCADM-1抗原に特異的であると特性決定された。本明細書に開示する結果は、PCADM-1抗体が組換えプラスミドタンパク質抽出物、前立腺腫瘍細胞タンパク質抽出物および細胞、および前立腺ガン患者から得た尿および血清サンプル中のPCADM-1を特異的に認識することを証明する。

【0520】

さらにPCADM-1特異的抗体を用いた酵素免疫アッセイまたはE I Aは、タンパク質が前立腺ガンの高度に感受性のある組織マーカーであることを示した。表4に示すように、PCADM-1は前立腺組織抽出物において、PSAに比べて前立腺ガンの有意により良い予後判定および診断マーカーである。これらの実験では、前立腺のミクロ切開領域（調査したn=40の根治的前立腺切除）に由来する核タンパク質抽出物が、適合する精嚢（SV）、良性前立腺過形成（BPH）または高度な前立腺上皮内新形成（HGPI N）の細胞増殖巣で検出される大変低いレベルに比べて、有意に上昇したレベルのPCADM-1を発現した。

【0521】

さらに本明細書に開示するデータは、PCADM-1の量（ $\mu\text{g}/\text{mg DNA}$ ）がG l e a s o n e t a l . , 1993, J. Urol. 149:1568-1576に記載されているようにグリーンソンスコア（GS）の関数として増加することを示す。

【0522】

比較するとPSAレベル（ $\mu\text{g}/\text{mg DNA}$ ）はBPH、HGPI NおよびGS検体で上昇したが、GS6、GS7およびGS8~10巣に由来する組織抽出物では有意に減少した。表4に開示するように、組織抽出物中のPSAレベルは、前立腺切除前に検出された血清PSAレベル（ $\mu\text{g}/\text{mg DNA}$ ）に逆比例した。血清PSAレベルはグリーンソンスコア（表4）の関数として増加した。

【0523】

【表5】

表4

ミクロ切開した組織中のPCADM-1 および PSA

病状	#組織PCADM-1	#組織PSA	血清PSA
SV (n=30)	0	0	NA
SM (n=5)	0	0	NA
BPH (n=24)	0	6.2 ± 0.7	NA
HGPI N (n=6)	0.1 ± 0.03	3.1 ± 0.3	NA
GS 4 (n=8)	1.8 ± 0.31	1.8 ± 0.31	5.5 ± 0.6 (5.5-12.8)*
GS 6 (n=13)	10.5 ± 1.15	0.5 ± 0.05	13.8 ± 7.9 (6.1-18.9)*
GS 7 (n=10)	20.3 ± 2.06	0.3 ± 0.02	11.5 ± 4.6 (8.9-43.3)*
GS 8-10 (n=9)	25.2 ± 3.31	0.2 ± 0.01	15.5 ± 5.6 (9.5-87.0)*

40

50

【0524】

根治的前立腺切除（全部で $n=40$ ）の後、種々の腺の細胞増殖巣および組織を前立腺の矢状切片から切開したことに注目されたい。すべてのBPHおよびHGPIN検体はガンを表す同じ前立腺に由来した。サンプルは少なくとも3回アッセイし、そしてデータは実験したコホートのすべての患者について平均化した。＊（検出されるPSAの範囲）。#PCADM-1およびPSAレベル（ $\mu\text{g}/\text{mg DNA}$ ）。NA-適用できず。すべての血清PSA測定は、泌尿器の技術者により、そして根治的前立腺切除前に患者の検査で行われた日常的な診断試験に由来した。

【0525】

診断試験を行って、患者の尿のPCADM-1レベルを血清のPSAレベルと比較した。これらの試験からの結果を表5に開示する。 10

【0526】

【表6】

表5
PCADM-1 尿アッセイ（全部で $n=277$ ）

診断 陰性	*PCADM-1 陽性	*PCADM-1
前立腺ガン 生検陽性: (GS 4-8)	24/33(6-13 ng/ml)	9/33
根治的 前立腺切除	2/14 (5-7 ng/ml)	12/14 (<1 ng/ml)
BPH	15/96 (2-8.3 ng/ml)	81/96 (0.4-12 ng/ml)
他の前立腺疾患	1/14	13/14
勃起障害	2/13	11/13
有志 (22-53 才)	0/40	40/40
女性	1/5(神経因性膀胱)	4/5
腎臓ガン	1/1	0/1
直腸ガン	0/2	2/2
感染 / 炎症	5/9	4/9

20

30

【0527】

検出限界カットオフは：＊PCADM-1 陽性（ $>0.2 \text{ ng/ml}$ ）；＊PCADM-1 陰性（ $<0.2 \text{ ng/ml}$ ）。PCADM-1レベルは、PCADM-1 陽性患者で $0.2 \sim 93 \text{ ng/ml}$ の範囲であり；そしてPCADM-1 陰性患者で $0 \sim 0.2 \text{ ng/ml}$ の範囲であった。

【0528】

ヒトの尿に関するEIA実験は、新たに集めた尿または当業者により周知な方法に従い凍結保存した尿について行った。簡単に説明すると、尿サンプル（ $100 \sim 200 \mu\text{l}$ ）を96ウェルタイタープレートに乗せ、数時間、結合させ、プレートをバッファーで洗浄し、1次および2次抗体に乗せ、そして抗体検出試薬を加え、そしてプレートをマイクロタイタープレートELISAリーダーで読んだ（A450nmに設定）（バイオラッド（BioRad）、ヘラクレス、カリフォルニア州）。 40

【0529】

表5に示すように、尿のPCADM-1アッセイの感度は73%（すなわち $n=23/33$ ）であり、そして上昇した血清PSAレベルを有する患者および生検陽性検体（GS 4-8）に相関した。興味深いことに。アッセイの3～4年前に前立腺を切除した2名の患者において（すなわちGS 8-10、T3段階のガン）、尿のPCADM-1レベルが上昇し、そしてこれらの患者は血清レベルも高かった（すなわち約 5 ng/ml より高い）。これらの患者は現在、ガンが再発したのかどうかを決定するための観察下にある。逆 50

にこれら患者の中の12名が尿のPCADM-1について陰性であり（すなわちGS5-6、T2段階のガン）、そして彼らは大変低い血清PSA値（ $< 1 \text{ ng/ml}$ ）を有した。

【0530】

BPHと診断された（そしてガンの兆候はない）患者では、約16%（ $n = 15 / 96$ ）が上昇したPCADM-1尿を表した。数名（ $n = 3 / 96$ ）は上昇した血清PSAレベルを有した。この患者のコホートでは、BPH患者の84%（ $n = 81 / 96$ ）がPCADM-1について陰性であった。またこれらの検体では、 $n = 40 / 96$ （約42%）が低い血清PSAレベル（すなわち約 2 ng/ml 未満）であった。40名の有志の男性の中で全員がPCADM-1については陰性であり、そして低い血清PSAレベルを有した。恐らく彼らはPSAについても陰性であったろう。興味深いことに、直腸ガンの1名の患者はPCADM-1について陽性であり、そして感染または炎症がある5名の患者（ $n = 5 / 9$ ）がPCADM-1について陽性であり、感染または炎症から偽陽性が生じることを示唆している。

10

【0531】

すなわちこれらのデータは、PCADM-1尿アッセイの感度が前立腺ガンについては約73%であることを示す。全体的な特異性（すなわち陰性の総数を疾患が無い患者の総数で割った）は $167 / 194$ すなわち約86%であった。したがって本明細書に開示するデータは、PCADM-1タンパク質がガン、そして特に前立腺ガンの独立した診断的マーカーとなり得ることを証明する。

20

【0532】

本発明はスクリーニングアッセイおよびPCADM-1を検出することができる同定された8塩基対核酸配列にも関する。1つの態様では、核酸は配列番号5の核酸配列、および配列番号6の配列を含んでなるプローブである。さらに配列番号7および配列番号8の配列を有する二本鎖オリゴヌクレオチドもPCADM-1に特異的に結合し、そしてPCADM-1のレベルを検出し、そして評価するために使用することができる。

【0533】

本発明の1つの態様では、PCADM-1タンパク質をコードする核酸配列（配列番号1）、およびこれらの核酸配列にコードされるPCADM-1タンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）が提供される。PCADM-1タンパク質をコードする例示的核酸配列（配列番号1）および例示的な推定アミノ酸配列（配列番号2）は、それぞれ図1Aおよび1Bに表す。

30

【0534】

本発明は発現ベクターおよび核酸配列を含んでなる発現ベクターを含む宿主細胞にも関する。発現ベクターおよび発現ベクターでトランスフェクションされ得る宿主細胞は、当該技術分野では周知である。本発明のもののような選択した核酸配列をベクターに包含させ、そして最終的に宿主細胞に包含される方法も周知である。

【0535】

本発明の核酸およびアミノ酸配列は、生物学的サンプル中のPCADM-1タンパク質を検出するスクリーニングアッセイを開発するために有用である。本明細書で証明するように、1つの態様ではPCADM-1タンパク質に対して抗体を生成し、そしてEIAまたはELISAのような免疫アッセイで使用する、組織、痰、尿または血清のような生物学的サンプル中のPCADM-1タンパク質を検出することができる。抗体はこのタンパク質に対して、周知な手順に従い生成することができる。あるいは標識した核酸プローブを本発明の核酸配列から調製し、そしてEMSAで使用する組織生検サンプルの核抽出物中のPCADM-1を検出することができる。

40

【0536】

本発明の別の観点では、生物学的サンプル中のPCADM-1を検出するための方法およびキットに関する。本明細書で証明するように、患者の生物学的サンプル中のPCADM-1レベルの検出は、患者の診断および前立腺ガンまたは他のガンの予後の判定に有用で

50

ある。本発明の方法では、生物学的サンプルを患者から得、そして生物学的サンプル中の P C A D M-1 を検出する手段と接触させる。1つの態様ではこれはキットが組織、痰、尿および血清のような生物学的サンプル中の P C A D M-1 タンパク質を検出することができる、P C A D M-1 タンパク質に対して生成された抗体を含んでなることを意味する。別の態様ではこれはキットが組織生検材料のような生物学的サンプル中の P C A D M-1 タンパク質を検出することができる C A C G G A T G のような標識された核酸プローブを含んでなることができることを意味する。

【0537】

したがって本発明のキットには、サンプル中の P C A D M-1 タンパク質を検出するための手段および P C A D M-1 タンパク質標準が提供される。P C A D M-1 タンパク質 10
を検出するための手段は、P C A D M-1 タンパク質に対して生成された抗体またはタンパク質に結合することができる標識された核酸プローブを含んでなることができる。生物学的サンプル中の P C A D M-1 の存在は、患者が前立腺ガンを有することの指標である。本発明の方法およびキットは前立腺ガンを有する患者に使用して、経時的に患者中の P C A D M-1 レベルの変化を監視することにより、彼らの予後を評価し、そして処置を評価するためにも使用できる。P C A D M-1 レベルの経時的な上昇はガンの進行の指標であり、一方、P C A D M-1 レベルの経時的な減少はガンの退縮の指標である。

【0538】

さらに P C A D M-1 タンパク質レベルを検出するためのこれらの方法およびキットは、他の種類のガン、炎症状態、感染および遺伝的突然変異を診断および予後判定するため 20
にも有用であり得る。

【実施例3】

【0539】

酵素的核酸を使用した P C A D M-1 発現の調節および P C A D M-1 発現に関する疾患、障害または状態の処置

この実施例で提示する実験は、以下のようにまとめることができる。

【0540】

前立腺ガン抗原診断マーカー1 (P C A D M-1) は 33 k D a の細胞質タンパク質であり、これは本明細書のいたるところですにより完全に開示したように、ヒトの前立腺ガン組織で過剰に発現され、そして前立腺ガンに罹患した患者の尿で検出される。特定の 30
理論に拘束されることを望まないが、P C A D M-1 発現は腫瘍細胞に対して有利な選択的成長および／または生存を伝達し、かつ／または前立腺ガンまたは他のガンの発生を導く染色体の改変 (1つまたは複数) を引き起こすことができる。すなわち本明細書のいたるところに開示するデータは、疾患または状態が無いことが分かっている組織中での発現レベルに比べて、P C A D M-1 発現の上昇は、疾患または状態、例えば前立腺ガンに相関し、関連し、かつ／または媒介することを示唆する。したがって P C A D M-1 の異常な (すなわち上昇した) 発現を潜在的に阻害または下げることができる P C A D M-1 発現の調節に基づく治療法が、潜在的な抗ガン治療として調査された。本明細書に開示するデータは、P C A D M-1 発現を阻害するための P C A D M-1 D N A Z Y M-1 (配列番号1) と命名された P C A D M-1 に特異的な P C A D M-1 D N A Z Y M の使用 40
およびそれに関連する有意な治療効果を証明する。

【0541】

使用する材料および方法およびこの実施例で提示する実験結果をこれから記載する。

ヒト P C A D M-1 R N A 中の P C A D M-1 D N A Z Y M 開裂部位の選択

有用な D N A 酵素の標的は、D r a p e r e t a l.、国際公開第 93/23569 号パンフレット; S u l l i v a n t e t a l.、国際公開第 93/23057 号パンフレット; T h o m p s o n e t a l.、国際公開第 94/02595 号パンフレット; D r a p e r e t a l.、国際公開第 95/04758 号パンフレット; M x S w i g g e n e t a l.、米国特許第 5,525,468 号明細書に記載されているように決定することができ、そしてそれらのすべてを引用により本明細書に編入する 50

。ここでこれらの文書に提供されている手引きを繰り返すよりは、当該技術分野における方法あるいは将来開発される方法に限定されないそのような方法の具体例を以下に提供する。

【0542】

そのような標準的mRNAに対するDNAZYMはそのような応用に記載されているように設計し、そして合成して、標準的な論文において記載されているようにインビトロおよびインビボで試験した。DNAZYMもそれらに記載されているように至適化され、そして送達され得る。

【0543】

コンピューターに基づくRNAフォールディングアルゴリズムにより予想される部位がPCADM-1 mRNA中の接近可能な部位に対応するのかどうかを試験するために、PCADM-1 DNAZYM標的部位をヒトPCADM-1のcDNAを分析することにより選択し、そしてPCADM-1遺伝子の転写開始部位上の開裂部位の優先順位を決定した。

【0544】

各標的に結合するPCADM-1 DNAZYMを設計し、そしてコンピューターフォールディングにより個別に分析して(Christoffersen et al., 1994 J. Mol. Struct. Theochem. 311:273; Jaeger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7706; Jaeger et al., 1989, RNA 2:419-428)、PCADM-1 DNAZYM配列が適切な2次構造にフォールディングされるかどうかを評価した。結合アームと触媒中心との間に望ましくない分子内相互作用があるPCADM-1 DNAZYMは、考察から排除した。以下に注記するように、活性を至適化するために変動する結合アーム長を選択することができる。一般に触媒中心を挟む各アーム上の少なくとも8〜10塩基が結合には十分であるか、または標的mRNAとの相互作用に十分である。

PCADM-1 DNAZYM-1活性の至適化

PC-3MLの増殖および生存は、化学的に安定化されたDNAZYMの直接的添加により阻害される。おそらく、そして特定の理論に拘束されることは望まないが、DNAZYMの取り込みは細胞膜をわたるアニオン性核酸の受動的拡散により媒介された。この場合、効率はリガンドのDNAZYMへの直接的カップリングにより大いに強化される。DNAZYMはレセプターが媒介する取り込みにより細胞に送達されると考えることができる。そのような結合付加物を使用して、細胞性の取り込みはPCADM-1 DNAZYM開裂活性に必要なリン酸ジエステル結合を改変させることなく、数次元の規模まで上昇することができる。

【0545】

あるいはDNAZYMは当該技術分野で知られている様々な既知の方法を使用して細胞に投与することができ、それらの方法には限定するわけではないがDNAZYM送達と共役したアンテナ様(antennapae)ペプチド、リポソーム中へのカプセル化、イオノフォレスिसにより、または他の小胞への包含により、ならびにヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、および生物接着性微小球を含む。DNA/小胞の組み合わせは、直接的注射により、または針、カテーテル、注入ポンプまたはステントの使用により局所的に送達される。送達の別の経路には限定するわけではないが、筋肉内注射、エーロゾル吸入、経口(錠剤またはピル形態)、局所、全身的、眼内、腹腔内および/または硬膜下腔内の送達を含む。DNAZYM送達および投与のより詳細な記載は、Sullivan et al., 国際公開第93/23057号パンフレットおよびDraper et al., 国際公開第95/04818号パンフレットに提供され、これは引用により本明細書に編入する。

化学的修飾

本明細書に記載するPCADM-1 DNAZYM配列およびPCADM-1 DNA

10

20

30

40

50

Z Y M-1モチーフは非限定的例を意味し、そして当業者はP C A D M-1 D N A Z Y Mのヌクレアーゼ安定性を強化するために他の修飾（塩基、糖およびホスフェート修飾）を標準的技術を使用して容易に作成することができ、したがって本発明の範囲内にある。P C A D M-1を標的とするD N A Z Y Mの使用

本明細書に開示するデータは、P C A D M-1の上昇した発現が前立腺ガンに関連していることを証明する。さらに本明細書に開示するデータは、P C A D M-1発現の阻害が（例えばD N A Z Y Mを使用して）、前立腺腫瘍細胞株の細胞増殖数をインビトロおよびインビボの両方で下げること示す。さらに本明細書に開示するデータは、限定するわけではないがD N A Z Y Mを使用したP C A D M-1発現の阻害が細胞死を誘導しながら前立腺腫瘍細胞株の増殖能力（*proliferative potential*）を下げることを示す（すなわち48～72時間までに約80%より高いP C-3 M L細胞死）（図4）。 10

【0546】

触媒活性および上昇した部位特異性を持つD N A Z Y Mは、ガンの処置に有力かつ安全な治療用分子を表す。本発明では、P C A D M-1 D N A Z Y M-1（配列番号9）は平滑筋、繊維芽または正常な前立腺上皮細胞の生存または増殖を阻害しなかった。しかしV E G F-1およびM M P-2と組み合わせたP C A D M-1 D N A Z Y M-1は、S C I Dマウスにおいて局所的に投与されたD N A Z Y Mが、90%の応答率でヒトの前立腺P C-3 M L細胞腫瘍の成長をインビボで阻害し、かつ／または根絶した（2～3カ月にわたり処置したn = 45 / 50マウス腫瘍）。 20

【0547】

マウスが未処置であるか、またはランダムなオリゴヌクレオチドで処置された対照実験では、75%を越えるマウスが同じ時間枠で大きな腫瘍を成長させた。P C A D M-1 D N A Z Y M-1が1回の薬剤として尾の静脈を介してi. v. 投与された実験では、92%の応答率で（n = 12 / 13）、i. v. 注射したP C-3 M L細胞のP C-3 M L腫瘍成長を阻害した。未処置マウス（n = 9 / 9）およびランダムオリゴヌクレオチドを投与した対照マウスは（n = 5 / 5）、すべて2カ月の間隔にわたり多数の転移性小節を発生した。これらすべての実験において、マウスの生存率は処置したマウスについて2～3カ月の処置間隔にわたり0%から約80%～92%に上昇した。

【0548】

これらのデータは、P C A D M-1 D N A Z Y M-1が患者のガン細胞に類似様式で送達でき、そしてそれらの増殖および生存および転移を抑制できることを示す。このようにこれらのデータはP C A D M-1 D N A Z Y M-1が既存のガン治療および身体的処置（例えば寒冷麻酔および照射処置）と一緒に使用され、あるいはそれ自体により全体的な患者の生存率を改善できることを示す。 30

【0549】

ここでも本明細書に開示するデータは、他のタンパク質、例えばV E G F-1およびM M P-2をコードするR N Aを特異的に開裂するD N A Z Y Mを投与することが、P C A D M-1 D N A Z Y Mを局所的送達で投与する治療効果をさらに上げることを証明している。すなわち本発明は、D N A Z Y Mが増殖因子等のようなタンパク質をコードするR N Aを開裂する他のD N A酵素と同時に投与される方法を包含する。 40

診断的用途

本発明のD N A Z Y Mは罹患した細胞内の遺伝的ドリフトまたは突然変異を調査するための、あるいは細胞、組織または体液中にP C A D M-1 R N Aの存在を検出するための診断的道具を提供する。D N A Z Y M活性と標的R N Aの構造との間の緊密な関係は、標的R N Aの塩基対および3次元構造を改変する分子の任意の領域の突然変異の検出を可能とする。P C A D M-1 m R N Aを標的とする多数のD N A Z Y Mを使用することによりR N A構造およびインビトロ、ならびに細胞および組織中での機能に重要なヌクレオチドの変化をマップすることができる。標的R N AをD N A Z Y Mで開裂することは、遺伝子発現を阻害し、そして疾患の進行における特定の遺伝子産物の役割を定めるために使 50

用することができる。このように他の遺伝子標的を疾患の重要なメディエーターとして定めることができる。これらの実験は潜在的な組み合わせ治療（例えば種々の遺伝子を標的とする多くのDNA酵素、既知の低分子インヒビターと共役するDNA酵素、またはDNA酵素および／または他の化学的もしくは生物学的分子との組み合わせによる断続的処置）を提供することにより、疾患の進行のより良い処置を導くことができる。

【0550】

本発明のDNA酵素の他のインビトロ用途は当該技術分野では周知であり、そしてPCADM-1関連状態に関係するmRNAの存在の検出を含む。そのようなRNAは標準的方法を使用してPCADM-1 DNA ZYMで処置した後の開裂産物の存在を決定することにより検出される。

10

PCADM-1 mRNA発現の細胞生存の効果

培養の1～3日後の細胞生存曲線は、増加する濃度（0.5～5 μg/ml）（図4）のPCADM-1 DNA ZYM-1（配列番号9）で一晩の一過性トランスフェクションが、PC-3ML細胞の成長を阻害したことを示した（図4）。ランダムオリゴヌクレオチドを用いた対照実験は、PC-3ML細胞の成長に検出可能な影響を与えることができなかった（図4）。対照の非特異的PCADM-1 DNA ZYM（すなわちDNA ZYM-11）で処理したNPTX-1532細胞を使用した類似実験は、細胞成長または細胞生存を阻害することができなかった。これらのデータは、PCADM-1 DNA ZYMが前立腺ガン細胞の成長および生存の阻害のための有力な治療薬であることを証明し、そしてPCADM-1発現が中でも前立腺ガン、ならびに／またはガン細胞の増殖および／または成長に関連および／または媒介することを明らかに証明している。

20

【実施例4】

【0551】

PCADM-1関連タンパク質用抗体の診断的用途

本明細書に開示するデータは、本発明のPCADMタンパク質がリボゾームS2タンパク質と高度な相同性、すなわち約98%のアミノ酸配列相同性を共有することを示す。したがって抗-S2抗体は本発明による抗体に基づくアッセイにおいて、前立腺ガンの診断薬として使用することができる。本明細書に記載するS2タンパク質に対する抗体は、当業者に周知な方法に従い生成され得る。

【0552】

30

本発明のさらなる態様において、抗-S2抗体は前立腺ガンの抗体に基づく尿アッセイに使用することができ、ここで抗-S2抗体は本明細書のいたるところでさらに詳細に記載するようにPCADM-1を検出するために使用される。

【0553】

本明細書に引用した各々の、そしていずれの特許、特許出願および刊行物の開示も参照により全部、本明細書に編入する。

【0554】

本発明を具体的態様に関して開示してきたが、当業者には本発明の他の態様および変更も本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく考案することができることは明白である。添付する特許請求の範囲はすべてのそのような態様および均等な変更も含むと解釈されることを意図している。

40

【図面の簡単な説明】

【0555】

前述の要約ならびに以下の発明の詳細な記述は、添付の図面と併せて読むとより良く理解される。本発明を説明する目的のために、これらは現在好ましい図面態様（1つもしくは複数）として示される。しかしながら、本発明は示される厳密な配置および手段に限定されないと理解されるべきである。

【図1A】前立腺癌抗原診断マーカー1（PCADM-1）の核酸配列（配列番号：1）を示す。ATG翻訳開始部位に対するヌクレオチド位置190、191、465、475、488および505での塩基置換は、ヒトS2リボソーム遺伝子をコードする核酸の核

50

酸配列に対する置換を表し、そしてボールド体および下線で示される。

【図 1 B】PCADM-1 のアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。ヒト S2 リボソームタンパク質のアミノ酸配列に対する PCADM-1 配列におけるアミノ酸置換を表す、位置 64（T）、155（N）、159（A）、163（R）および 169（R）の 5 個のアミノ酸残基は、ボールド体および下線で示される。

【図 2】酵素分子の PCADM-1 mRNA とマッチする相補的（すなわち、結合）アームおよび 15 bp の触媒ドメインを示す PCADM-1 DNA ZYM-1（配列番号：9）を示す図である。

【図 3】酵素分子の PCADM-1 mRNA とマッチする相補的アームおよび 15 bp の触媒ドメインを示す PCADM-1 DNA ZYM-2（配列番号：10）の図である 10。

【図 4】PC-3 ML 細胞の 1～3 日後の細胞生存曲線を示すグラフである。Y 軸（左端）上の説明文は、それぞれ、未処理の細胞、ランダムオリゴヌクレオチド（ $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で、もしくは 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 および $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の PCADM-1 DNA ZYM-1 で処理した細胞の細胞増殖への影響を示す曲線（上から下に対応する）。

【配列表】

053844-5011-01.txt
SEQUENCE LISTING

<110> PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION CORPORATION
STEARNS, Mark
HU, Youji
WANG, Min

<120> PROSTATE CANCER-RELATED COMPOSITIONS, METHODS, AND KITS BASED ON DNA
MACROARRAY PROTEOMICS PLATFORMS

<130> 053844-5011-01

<140> 10/140,602

<141> 2002-05-07

10

<150> US 09/813,380

<151> 2001-03-23

<150> PCT/US02/08673

<151> 2002-03-21

<150> US 10/098,992

<151> 2002-03-15

<150> PCT/US00/25981

<151> 2000-09-24

<150> US 60/155,865

<151> 1999-09-24

<160> 10

20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 914

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
gcacgagggg tgacgccggg gcagcggggg ggcccggggg ccctgggtggc cctgggatgg 60
ggaaccgcgg tggcttcgcg ggaggtttcg gcagtggcat ccggggcccg ggtcgcggcc 120
gtggacgggg ccggggccga ggccgcggag ctgcggagg caaggccgag gataaggagt 180
ggatgcccggt caccaagttg ggccgcttgg tcaaggacat gaagatcaag tccctggagg 240
agatcactct cttctccctg cccattaagg aatcagagat cattgatttc ttcctggggg 300
cctctctcaa ggatgagggt ttgaagatta tgccagtga gaagcagacc cgtgccggcc 360
agcgcaccag gttcaaggca ttgttgcta tcggggacta caatggccac gtcggtctgg 420
gtgttaagtg ctccaaggag gtggccaccg ccatccgtgg ggccatcatc ctggccaagc 480
tctccatcgt ccccgctgcg agaggctact gggggaacaa catcggcaag gccacactg 540
tccgttgcaa ggtgacaggc cgctgcggct ctgtgctggt acgcctcatc cctgcacca 600
ggggcactgg catcgtctcc gcacctgtgc ctaagaagct gctcatgatg gctggtatcg 660
atgactgcta cacctcagcc cggggctgca ctgccaccct gggcaacttc accaaggcca 720

30

40

053844-5011-01.txt

cctttgatgc catttctaag acctacagct acctgacccc cgacctctgg aaggagactg 780
 tattcaccaa gtctccctat caggagttca ctgaccacct cgtcaagacc cacaccagag 840
 tctccgtgca gcggactcag gctccagctg tggctacaac atagggtttt tatacccaag 900
 aaaagaaaaa taaa 914

<210> 2
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 2

Met Gly Asn Arg Gly Gly Phe Arg Gly Gly Phe Gly Ser Gly Ile Arg
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Ala
 20 25 30

Arg Gly Gly Lys Ala Glu Asp Lys Glu Trp Met Pro Val Thr Lys Leu
 35 40 45

Gly Arg Leu Val Lys Asp Met Lys Ile Lys Ser Leu Glu Glu Ile Thr
 50 55 60

20

Leu Phe Ser Leu Pro Ile Lys Glu Ser Glu Ile Ile Asp Phe Phe Leu
 65 70 75 80

Gly Ala Ser Leu Lys Asp Glu Val Leu Lys Ile Met Pro Val Gln Lys
 85 90 95

Gln Thr Arg Ala Gly Gln Arg Thr Arg Phe Lys Ala Phe Val Ala Ile
 100 105 110

Gly Asp Tyr Asn Gly His Val Gly Leu Gly Val Lys Cys Ser Lys Glu
 115 120 125

Val Ala Thr Ala Ile Arg Gly Ala Ile Ile Leu Ala Lys Leu Ser Ile
 130 135 140

30

Val Pro Val Arg Arg Gly Tyr Trp Gly Asn Asn Ile Gly Lys Ala His
 145 150 155 160

Thr Val Arg Cys Lys Val Thr Gly Arg Cys Gly Ser Val Leu Val Arg
 165 170 175

Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Thr Gly Ile Val Ser Ala Pro Val Pro
 180 185 190

40

053844-5011-01.txt

Lys Lys Leu Leu Met Met Ala Gly Ile Asp Asp Cys Tyr Thr Ser Ala
 195 200 205

Arg Gly Cys Thr Ala Thr Leu Gly Asn Phe Thr Lys Ala Thr Phe Asp
 210 215 220

Ala Ile Ser Lys Thr Tyr Ser Tyr Leu Thr Pro Asp Leu Trp Lys Glu
 225 230 235 240

Thr Val Phe Thr Lys Ser Pro Tyr Gln Glu Phe Thr Asp His Leu Val
 245 250 255

10

Lys Thr His Thr Arg Val Ser Val Gln Arg Thr Gln Ala Pro Ala Val
 260 265 270

Ala Thr Thr
 275

<210> 3
 <211> 0
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Intentionally skipped sequence

20

<400> 3
 000

<210> 4
 <211> 0
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Intentionally skipped sequence

<400> 4
 000

<210> 5
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Double-stranded PCAM-1 binding oligonucleotide

<400> 5
 cacggatg

8

<210> 6
 <211> 8
 <212> DNA

053844-5011-01.txt

<213> Artificial

<220>

<223> Double-stranded PCAM-1 binding oligonucleotide

<400> 6

cacaatga

8

<210> 7

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Double-stranded PCAM-1 binding oligonucleotide

<400> 7

cacaatg

7

<210> 8

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Double Stranded PCAM-1 Binding Oligonucleotide

<400> 8

cacaatgttt ttgt

14

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Enzymatic nucleic acid (PCAM-1) ribozyme)

<400> 9

gatcttcagg ctagctacaa cgagtccttg a

31

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Enzymatic nucleic acid (PCAM-1) ribozyme)

<400> 10

gttccccagg ctagctacaa cgacccaggg c

31

10

20

30

【図 1 A】

5'-GCACGAGGGATGACGCCGGTGACGCGGGGGGCCCGG
GGCCCTGGTGGCCCTGGG
ATG GGG AAC CGC GGT GGC TTC CGC GGA GGT TTC GGC AGT GGC ATC
CGG GGC CGG GGT CGC GGC CGT GGA CGG GGC CGG GGC CGA GGC CGC
GGA GCT CGC GGA GGC AAG GCC GAG GAT AAG GAG TGG ATG CCC GTC
ACC AAG TTG GGC CGC TTG GTC AAG GAC ATG AAG ATC AAG TCC CTG
GAG GAG ATC ACT CTC TTC TCC CTG CCC ATT AAG GAA TCA GAG ATC
ATT GAT TTC TTC CTG GGG GCC TCT CTC AAG GAT GAG GTT TTG AAG ATT
ATG CCA GTG CAG AAG CAG ACC CGT GCC GGC CAG CGC ACC AGG TTC
AAG GCA TTT GTT GCT ATC GGG GAC TAC AAT GGC CAC GTC GGT CTG
GGT GTT AAG TGC TCC AAG GAG GTG GCC ACC GCC ATC CGT GGG GCC
ATC ATC CTG GCC AAG CTC TCC ATC GTC CCC GTG CGC AGA GGC TAC
TGG GGG AAC AAC ATC GGC AAG GCC CAC ACT GTC CGT TGC AAG GTG
ACA GGC CGC TGC GGC TCT GTG CTG GTA CGC CTC ATC CCT GCA CCC
AGG GGC ACT GGC ATC GTC TCC GCA CCT GTG CCT AAG AAG CTG CTC
ATG ATG GCT GGT ATC GAT GAC TGC TAC ACC TCA GCC CGG GGC TGC
ACT GCC ACC CTG GGC AAC TTC ACC AAG GCC ACC TTT GAT GCC ATT
TCT AAG ACC TAC AGC TAC CTG ACC CCC GAG CTC TGG AAG GAG ACT
GTA TTC ACC AAG TCT CCC TAT CAG GAG TTC ACT GAC CAC CTC GTC
AAG ACC CAC ACC AGA GTC TCC GTG CAG CGG ACT CAG GCT CCA GCT
CTG GCT ACA ACA *
TAG GGT TTT TAT ACC CAA GAA AAG AAA AAT AAA - 3'

914 bp

Figure 1A

【図 2】

PCADM-1 DNA ZYM-1 および PCADM-1 の標的配列を結合アームと
のアラインメントを示す図

5'-GATCTTCAGGCTAGCTACAACGAGTCCTTG (配列番号 : 9)

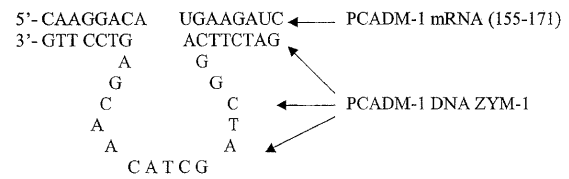


Figure 2

【図 1 B】

MGNRGGFRGGFGSGIRGRGRGRGRGRGRGARGGKAED
KEWMPVTKLGRVLKDMKIKSLEETLFLSPIKESEIDFFLGA
SLKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTFRKAFVAIGDYNHGVGLG
VKCSKEVATAIRGAHLAKLSIVPVRRGYWGNIGKAHTVTR
CKVTGRGCSVLVRLIPAPRGTVISAPVPKLLMMAGIDDC
YTSARGCTATLGNFTKATFDISKTYSTYSLTPDLWKETVFTK
SPYQEFTHDLVKTHTRVSVQRTQAPAVATT

275 AA

Figure 1B

【図 3】

PCADM-1 DNA ZYM-2 および PCADM-1 の標的配列を結合アームと
のアラインメントを示す図

5'-GTTCCCCAGGCTAGCTACAACGACCCAGGGC (配列番号 : 10)

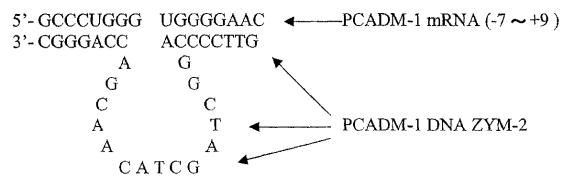


Figure 3

【図 4】

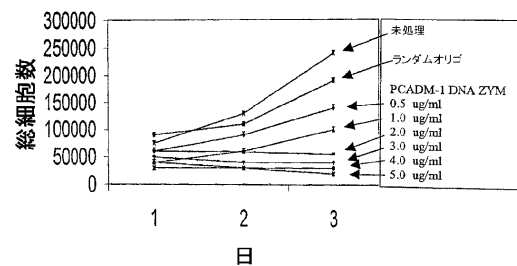


Figure 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/14098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C07H 1/00, 5/00, 5/06, 21/04; C08B 37/00; A61K 35/14, 38/00; C07K 1/00, 2/00, 4/00
 US CL : 536/1.11, 18.7, 22.1, 23.1, 23.5; 530/300, 350, 385, 386, 387.1, 387.3, 388.1; 435/4, 6, 7.2, 320.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/1.11, 18.7, 22.1, 23.1, 23.5; 530/300, 350, 385, 386, 387.1, 387.3, 388.1; 435/4, 6, 7.2, 320.1

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	Database GenCore on STN, Accession number AA026472. STERNS et al. 'Novel mammalian prostate cancer marker 1 polypeptide useful for diagnosing prostate cancer in mammal, as tools for elucidating the functions of the polypeptide in cell, and as therapeutics for treating prostate cancer'. Philadelphia Health & Education Corp. 07 February 2003 (07.02.2003). See sequence alignment and abstract.	1-157

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	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
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

10 June 2004 (10.06.2004)

Date of mailing of the international search report

02 JUL 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
 Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized Officer

Alana M. Harris

Telephone No. 571*272*1600

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	C 0 7 K 16/32	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 5 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	A
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,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,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ワング, ミン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19046 ガルフミルズ・ランタートドライブ161

Fターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB03 BB20 CA25 CB02 CB03 CB14 DA12 DA13
 DA14 DA36 DA78 FB01 FB03
 4B024 AA01 AA11 AA12 CA03 CA09 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11
 HA12 HA17
 4B050 CC10 DD11 LL01 LL03
 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ58 QR32 QR55 QR77 QS32
 4B064 AG26 AG27 CA01 CA19 CC24
 4B065 AA90X AA90Y AA91X AB01 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C057 MM04 MM09
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA41 DA75 DA76 DA86 EA28 EA51