

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4733644号
(P4733644)

(45) 発行日 平成23年7月27日(2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
請求項の数 37 (全 115 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2006-541469 (P2006-541469)	(73) 特許権者	399052796
(86) (22) 出願日	平成16年11月24日(2004.11.24)		ダナーファーバー キャンサー インステ イテュート インク.
(65) 公表番号	特表2007-523631 (P2007-523631A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン ビニー ストリート 44
(43) 公表日	平成19年8月23日(2007.8.23)	(73) 特許権者	504074710
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/039756		ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー シティ オブ ペンシルバニア
(87) 国際公開番号	W02005/053512		アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191 04-6283, フィラデルフィア, チェスナット ストリート 3160, スイート 200
(87) 国際公開日	平成17年6月16日(2005.6.16)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成19年11月22日(2007.11.22)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/525,464		
(32) 優先日	平成15年11月26日(2003.11.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 膵臓腺癌の動物モデルおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

膵臓特異的プロモーターの制御下で発現されるリコンビナーゼと、該リコンビナーゼの制御下での転写ストッパーエレメントの切り出しにより発現される K R A S の活性化突然変異と、該リコンビナーゼの制御下で誤発現される1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座とを含む、膵臓腺癌の非ヒト動物モデル。

【請求項2】

前記1以上の前記腫瘍サプレッサー遺伝子が条件付で誤発現される、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項3】

K R A S の前記活性化突然変異が、K r a s ^{G 1 2 D} ノックイン対立遺伝子 (L S L - K r a s) である、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項4】

K R A S の活性化突然変異が、K r a s ^{G 1 2 D} ノックイン対立遺伝子 (L S L - K r a s) であって、前記腫瘍サプレッサー遺伝子が I N K 4 a / A r f である、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項5】

前記動物が P d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} ; I n k 4 a / A r f ^{1 o x / 1 o x} を含む、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項6】

10

20

前記誤発現が、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座の減少した発現をもたらす、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項7】

前記腫瘍サプレッサー遺伝子が、*Ink4a*/*ARF*である、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項8】

前記腫瘍サプレッサー遺伝子が、*Ink4a*/*ARF*、*Ink4a*、*Arf*、*p53*、*Smad4*/*Dpc*、*Lkb1*、*Brc a2*、および*Mlh1*よりなる群から選択される、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項9】

前記腫瘍サプレッサー遺伝子が、*Ink4a*/*ARF*および*p53*である、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項10】

前記1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座が、該腫瘍サプレッサー蛋白質の全てまたは一部をコードするDNAの除去によって破壊される、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項11】

前記動物が、1以上の破壊された遺伝子または遺伝子座についてホモ接合性である、請求項10に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項12】

前記動物が、1以上の破壊された遺伝子または遺伝子座についてヘテロ接合性である、請求項10に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項13】

前記動物が、前記1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座のトランスジェニック破壊を有するトランスジェニック動物である、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項14】

膵臓および十二指腸ホメオボックス遺伝子1 (*Pdx1*) - *Cre*が、前記リコンビナーゼを発現するために使用される、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項15】

前記動物がげっ歯類である、請求項1に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項16】

前記げっ歯類がマウスである、請求項15に記載の非ヒト動物モデル。

【請求項17】

膵臓腺癌に関連するマーカーについて同定するための方法であって、該方法は、対照非ヒト野生型動物からの試料中の遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、非存在またはレベルに対して、請求項1～16のいずれか1項に記載の膵臓腺癌の動物モデルからの試料における遺伝子または蛋白質の量、構造、および／または活性を比較する工程を包含し、

ここで、該遺伝子または蛋白質の量、構造、および／または活性の差は、該遺伝子または蛋白質が、膵臓腺癌に関連するバイオマーカーであることを示す、方法。

【請求項18】

同定された前記バイオマーカーが診断バイオマーカーである請求項17記載の方法。

【請求項19】

同定された前記バイオマーカーが予後バイオマーカーである請求項17記載の方法。

【請求項20】

治療レジメンと組み合わせて発現される薬理ゲノミクスバイオマーカーを同定する方法であって、該方法は、以下：

対照非ヒト野生型動物由来の試料における遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、非存在、またはレベルに対して、請求項1～16のいずれか1項に記載の膵臓腺癌の動物モデル由来の試料における遺伝子または蛋白質の量、構造、および／または活性を比較

10

20

30

40

50

する工程を包含し、該動物モデルは治療レジメンを施されており；

ここで、該動物モデルの試料と該対照試料との間の遺伝子または蛋白質の量、構造、および／または活性の差が、該遺伝子または蛋白質が膵臓腺癌に関連する薬理ゲノミクスバイオマーカーであることを示す、方法。

【請求項 2 1】

前記試料は血液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有する請求項 1 7 または 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

前記動物モデルが転移性膵臓腫瘍を表示する請求項 1 7 または 2 0 記載の方法。

【請求項 2 3】

前記動物モデルが膵臓腺癌に対して無兆候である請求項 1 7 または 2 0 記載の方法。

【請求項 2 4】

膵臓腺癌に関連するバイオマーカーを同定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 癌細胞のゲノムのプロファイリングを行う工程であって、該細胞は請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の膵臓腺癌の動物モデル由来のものである、工程；

b) 工程 a) で同定されたプロファイルのセグメント化分析を行う工程；

c) 遺伝子座を同定する工程；

d) 該同定された遺伝子座を順位付けする工程；および、

e) 該同定された遺伝子座における遺伝子を問い合わせる工程、

を包含し、これらにより、膵臓腺癌に関連するバイオマーカーを同定する、方法。

【請求項 2 5】

膵臓腺癌に関連する遺伝子座を同定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 癌細胞のゲノムのプロファイリングを行う工程であって、該細胞は請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の膵臓腺癌の動物モデル由来のものである、工程；

b) 工程 a) で同定されたプロファイルのセグメント化分析を行う工程；

c) 遺伝子座を同定する工程；および、

d) 該同定された遺伝子座を順位付けする工程、

を包含し、これらにより、膵臓腺癌に関連する遺伝子座を同定する、方法。

【請求項 2 6】

同定された遺伝子座における遺伝子の前記問い合わせ工程が、遺伝子発現データに基づく、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

同定された遺伝子座における遺伝子の前記問い合わせが、インビトロでのスクリーニングアッセイに基づく、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記プロファイリングが比較ゲノミックハイブリダイゼーション (C G H) を用いて行われる、請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記癌細胞が、膵臓腺癌細胞株または膵臓腺癌腫瘍に由来する、請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 0】

腫瘍－間質共生を変調する化合物を同定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の膵臓腺癌の動物モデルにテスト化合物を投与する工程；および、

(b) 該動物モデルにおける膵臓腺癌の開始、維持、または進行に対するテスト化合物の効果を測定し、それにより、腫瘍－間質共生を変調する化合物を同定する工程、を包含する、方法。

【請求項 3 1】

膵臓腺癌の発生、進行、および／または維持を変調する化合物を同定する方法であって、該方法は、以下：

10

20

30

40

50

(a) 請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の膵臓腺癌の動物モデルにテスト化合物を投与する工程、ならびに、

(b) 該動物モデルにおける膵臓腺癌の開始、維持、または進行に対するテスト化合物の効果を決定して、それにより、膵臓腺癌の発生、進行、および／または維持を変調する化合物を同定する、方法。

【請求項 3 2】

膵臓腺癌の治療または予防のための潜在的治療剤を評価する方法であって、該方法は、以下：

a) 請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の膵臓腺癌の動物モデルにテスト化合物を投与する工程、ならびに、

b) 該動物モデルにおける膵臓腺癌の開始、維持、または進行に対するテスト化合物の効果を測定し、それにより、膵臓腺癌の治療または予防のための潜在的治療剤を評価する、方法。

【請求項 3 3】

請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の膵臓腺癌の動物モデル由来の単離された細胞、または該膵臓腺癌の動物モデル由来の細胞の精製された調製物。

【請求項 3 4】

前記細胞が前記膵臓腺癌の動物モデル由来の膵臓組織から単離されたものである、請求項 3 3 に記載の単離された細胞。

【請求項 3 5】

前記細胞が、上皮、間質、腺房、または管細胞である、請求項 3 4 に記載の単離された細胞。

【請求項 3 6】

前記細胞がトランスジェニック細胞である、請求項 3 3 に記載の細胞。

【請求項 3 7】

前記トランスジェニック細胞がマウス細胞である、請求項 3 6 に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願)

本願は、2003年11月26日に出願された米国仮特許出願第60／525,464号の利益を主張する。米国仮特許出願第60／525,464号は、本明細書中に参考として援用される。

【0 0 0 2】

(政府の基金)

本発明はNational Institutes of Health (NIH) によって与えられた補助金番号_____下で少なくとも部分的には政府の支援によりなされた。政府は本発明においてある種の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

(発明の背景)

膵管腺癌は5%未満の6ヶ月および5年生存のメジアン生存を有し、それを最も致死性のヒト癌の1つとしている(非特許文献1)。この貧弱な予後は、診断の時点における均一に進行した病期、および現存の療法に対するそのかなりの抵抗性に関する。多数の鍵となるこの疾患の細胞起源をより明確に理解する必要性を含めた、患者予後における改善を可能とし、腫瘍細胞および間質成分の生物学的相互作用を解明し、特異的な遺伝的病巣の役割、腫瘍の開始および進行における特異的な遺伝的病巣およびそれらのシグナリング代理の役割を決定し、およびこれらの癌の強い治療的抵抗性についての基礎を明らかにするためには、多数の鍵となる挑戦に取り組まなければならない(非特許文献2)。

【0 0 0 4】

この悪性疾患は、この細胞型に対するその組織学的および免疫組織化学的關係に基づいて膵管から生起すると考えられる（非特許文献3）。管起源と合致し、より小さな膵管から生起すると考えられる膵臓上皮内新生物（PanINs）として知られたプレ悪性病巣が、進行した悪性腫瘍と物理的に密接に近接して見出される（非特許文献4；非特許文献5）。PanINsは、ますます非典型的な組織学的段階に向けて進行し、クローン遺伝的変化の蓄積を呈するよう見え、これはそれらが管腺癌の前駆体であることを示唆する（非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9）。起源の細胞の問題は、細胞系統の間のトランス分化を可能とする膵臓の発生可塑性によって複雑となる（非特許文献10；非特許文献11；非特許文献12）。腺房細胞は、培養において、およびイン・ビボでの種々のストレス下の双方において、管一様細胞への化生変換を受けることが示されている（非特許文献13；非特許文献14；非特許文献15；非特許文献16）。腺房においてTGF- α を発現するトランスジェニックマウスでの腺房管化生のプロセスに続く管特徴を伴う膵臓腫瘍の発生は、この悪性疾患における腺房細胞に対する先祖役割を示唆した（非特許文献11；非特許文献17）。他の実験研究は、島細胞または推定膵臓幹細胞集団もまた膵臓腺癌を生起させることを示唆している（非特許文献18；非特許文献19）。最後に、膵臓腺癌はこれらの分化した細胞型のいずれか1つから、または組織幹細胞から生じ、むしろ、特異的遺伝的病巣が生じている細胞区画にかかわらず腫瘍の表現型終点を指令する可能性が依然としてある。この範例は悪性神経膠腫において以前提唱されている（非特許文献20；非特許文献21）。

【0005】

膵臓管腺癌を特徴付ける一連の遺伝子突然変異および経路が同定されているが、そのような突然変異または正確なモデルへの経路改変を適切に作成する手段は依然として理解しにくいままである。理想的な動物モデルはヒト疾患におけるのと同じの組織学的特徴（すなわち、PanINsとして知られた進行性異常管病巣に向けての正常な膵臓細胞からの暫時の出現、管細胞形態および免疫表現型の表示、侵入的成長および転移）を有するであろう（非特許文献22；非特許文献23）。そのようなモデルの創製は長い間求められてきた目的であった。

【非特許文献1】Warshaw, A. L. およびC. Fernandez-del Castillo N Engl J Med (1992) 326:455-65

【非特許文献2】Kern, S., ら Cancer Res (2001) 61:4923-32

【非特許文献3】Solcia, E., ら Tumors of the Pancreas. (1995) Armed Forces Institute for Pathology, Washington, D. C.

【非特許文献4】Cubilla, A. L. およびP. J. Fitzgerald Cancer Res (1976) 36:2690-8

【非特許文献5】Hruban, R. H., ら Am J Surg Pathol (2001) 25:579-86

【非特許文献6】Moskaluk, C. A., ら Cancer Res (1997) 57:2140-3

【非特許文献7】Yamano, M., ら Am J Pathol (2000) 156:2123-33

【非特許文献8】Luttges, J., H. ら Am J Pathol (2001) 158:1677-83

【非特許文献9】Klein, W. M., ら Mod Pathol (2002) 15:441-7

【非特許文献10】Sharma, A., ら Diabetes (1999) 48:507-13

【非特許文献11】Meszoely, I. M., ら Cancer J (2001) 7:242-50

10

20

30

40

50

【非特許文献12】Bardeesy, N. および R. A. DePinho Nat Rev Cancer (2002) 2: 897-909

【非特許文献13】Jhappan, C., ら Cell (1990) 61: 1137-46

【非特許文献14】Sandgren, E. P., ら Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88: 93-7

【非特許文献15】Hall, P. A. および N. R. Lemoine J Pathol (1992) 166: 97-103

【非特許文献16】Rooman, I., ら Diabetologia (2000) 43: 907-14

10

【非特許文献17】Wagner, M., ら Genes Dev (2001) 15: 286-93

【非特許文献18】Yoshida, T. および D. Hanahan Am J Pathol (1994) 145: 671-84

【非特許文献19】Pour, P. M., ら Mol Cancer (2003) 2: 13

【非特許文献20】Holland, E. C., ら Genes Dev (1998) 12: 3675-85

【非特許文献21】Bachoo, R. M., ら Cancer Cell (2002) 1: 269-77

20

【非特許文献22】Solcia, ら Tumors of the Pancreas, (1995) 分冊第20巻 (Washington, D. C.: Armed Forces Institute for Pathology)

【非特許文献23】Hruban, et al. (2000) Am J Pathol 156: 1821

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、多数の従前のモデリングの試みは、全てのレベルにおいてヒト疾患を発生反復するのに失敗している (Wei, et al. (2003) Int J Gastrointest Cancer 33: 43; Kern, et al. (2001) Cancer Res 61: 4923; Hotz, et al. (2000) Int J Colorectal Dis 15: 136; Bardeesy, et al. (2002) Nat Rev Cancer 2: 897; Standop, et al. (2001) Dig Dis 19: 24)。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、疾患の開始、維持、および進行を含めた、ヒト疾患の遺伝的および組織学的特徴を発生反復する膵管腺癌の非ヒト動物モデルの発生に少なくとも部分的には基づく。本発明は癌、例えば、膵管腺癌の動物モデル、例えば、Krasの活性化突然変異が導入され、いずれかの1以上の既知または未知の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座、例えば、Ink4a/Arf、Ink4a、Arf、p53、Smad4/Dpc、Lkb1、Brca2、またはMlh1が誤発現され、例えば、腫瘍サプレッサー遺伝子をコードする1以上の遺伝子の全てまたは一部の欠失による減少した発現または発現の欠如を有する動物モデルを含む。

40

【0008】

従って、1つの態様において、本発明は、KRASの活性化突然変異を含み、ここに、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座が誤発現され、例えば、条件的に誤発現され、その結果、減少した発現または非発現がもたらされることを特徴とする、膵臓腺

50

癌の非一ヒト、例えば、げっ歯類、例えば、マウスの動物モデルを提供する。1つの実施形態において、誤発現される腫瘍抑制遺伝子は *Ink4a*/*ARF* である。もう1つの実施形態において、誤発現される腫瘍抑制遺伝子は組み合わされた *Ink4a*/*ARF* および *p53* である。もう1つの実施形態において、誤発現される腫瘍抑制遺伝子は *Ink4a*/*Arf*、*Ink4a*、*Arf*、*p53*、*Smad4*/*Dpc*、*Lkb1*、*Brcal*、および *Mlk1* よりなる群から選択される。動物は1以上の破壊された遺伝子または遺伝子座につきホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。もう1つの実施形態において、1以上の腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座は、腫瘍抑制蛋白質の全てまたは一部をコードするDNAの除去によって破壊することができる。

10

【0009】

1つの実施形態において、*KRAS* の活性化突然変異は *Kras*^{G12D} ノックイン対立遺伝子 (*LSL-Kras*) である。もう1つの実施形態において、*KRAS* の活性化突然変異は *Kras*^{G12D} ノックイン対立遺伝子 (*LSL-Kras*) であって、腫瘍抑制遺伝子は *INK4a*/*Arf* である。なおもう1つの実施形態において、非一ヒト動物は *Pdx1-Cre* ; *LSL-Kras*^{G12D} ; *Ink4a*/*Arf*^{lox} / *lox* を含む。

【0010】

もう1つの実施形態において、非一ヒト動物モデルは、該1以上の腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座のトランスジェニック破壊を持つトランスジェニック動物である。1つの実施形態において、膵臓および十二指腸ホメオボックス遺伝子1 (*Pdx1*) - *Cre* 導入遺伝子を用いて、膵臓における1以上の腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座を検出する。

20

【0011】

もう1つの態様において、本発明は、対照野生型動物からの試料、例えば、血液、例えば、血清、尿、糞、胆汁、膵液、膵臓組織または膵臓細胞における遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、不存在またはレベルに対して、膵臓腺癌の動物モデルからの試料中の遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、不存在またはレベルを比較することを含み、例えば、該試料は組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有し、ここに、動物モデルは *KRAS* の活性化突然変異を含み、ここに、1以上の腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座が誤発現され、ここに、遺伝子または蛋白質の存在、不存在、または発現または活性レベルの差は、遺伝子または蛋白質が膵臓腺癌に関連するバイオマーカーであることを示すことを特徴とする、膵臓腺癌に関連するバイオマーカーを同定する方法を提供する。同定されたバイオマーカーは診断バイオマーカー、予後バイオマーカー、または薬理ゲノクスバイオマーカーであり得る。

30

【0012】

従って、1つの態様において、本発明は、対照野生型動物からの試料、例えば、血液、例えば、血清、尿、糞、胆汁、膵液、膵臓組織または膵臓細胞における遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、不存在、またはレベルに対して、膵臓腺癌の動物モデルからの試料、例えば、血液、例えば、血清、尿、糞、胆汁、膵液、膵臓組織または膵臓細胞における遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、不存在、またはレベルを比較することを含み、ここに、動物モデルは *KRAS* の活性化突然変異を含み、ここに、1以上の腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座が誤発現され、ここに、該動物モデルには療法が投与され；およびここに、遺伝子または蛋白質の存在、不存在、または発現または活性レベルの差は、該遺伝子または蛋白質が膵臓腺癌に関連する薬理ゲノクスバイオマーカーであることを示すことを特徴とする、療法と組み合わせて発現される薬理ゲノクスバイオマーカーを同定する方法を提供する。1つの実施形態において、動物モデルは転移性膵臓腫瘍を提示する。もう1つの実施形態において、動物モデルは膵臓腺癌に対して無症状である。1つの実施形態において、バイオマーカーは配列番号23および24よりなる群から選択される。

40

50

【0013】

1つの実施形態において、本発明は、a) 癌細胞のゲノムのプロファイリングを行い、ここに、該細胞は膵臓腺癌の動物モデルからのものであり、ここに、該動物モデルはKRASの活性化突然変異を含み、およびここに、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座が誤発現され；b) 工程a) で同定されたプロファイルのセグメント化分析を行い；c) 遺伝子座を同定し；d) 該同定された遺伝子座の優先順位をつけ；次いで、e) 同定された遺伝子座における遺伝子を問い合わせて、それにより、膵臓腺癌に関連するバイオマーカーを同定することを含む、膵臓腺癌に関連するバイオマーカーを同定する方法を提供する。1つの実施形態において、同定された遺伝子座における遺伝子の問い合わせは遺伝子発現データに基づく。もう1つの実施形態において、同定された遺伝子座における遺伝子の問い合わせはイン・ビトロスクリーニングアッセイに基づく。

10

【0014】

もう1つの態様において、本発明は膵臓腺癌に関連する遺伝子座を同定する方法を提供し、該方法はa) 癌細胞のゲノムのプロファイリングを行い、ここに、該細胞は膵臓腺癌の動物モデルからのものであり、ここに、該動物モデルはKRASの活性化突然変異を含み、およびここに、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座が誤発現され；b) 工程a) で同定されたプロファイルのセグメント化分析を行い；c) 遺伝子座を同定し；次いで、d) 該同定された遺伝子座の優先順位をつけて、それにより、膵臓腺癌に関連する遺伝子座を同定する工程を含む。1つの実施形態において、バイオマーカーは該方法によって同定される。

20

【0015】

1つの実施形態において、該プロファイリングは比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) を用いて行われる。もう1つの実施形態において、癌細胞は膵臓腺癌細胞株または膵臓腺癌腫瘍に由来する。

【0016】

本発明のなもう1つの態様は、本明細書中に記載された方法によって同定されたバイオマーカー、例えば、核酸バイオマーカーまたは蛋白質バイオマーカーを提供する。

【0017】

もう1つの態様において、本発明は、膵臓腺癌の動物モデルからの間質における遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、不存在、またはレベルに対して、膵臓腺癌の動物モデルからの腫瘍における遺伝子または蛋白質の発現または活性の存在、不存在、またはレベルを比較することを含み、ここに、該動物モデルはKRASの活性化突然変異を含み、およびここに、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座は誤発現され、およびここに、遺伝子または蛋白質の存在、不存在、または発現または活性レベルの差は、該遺伝子または蛋白質が間質－腫瘍連絡に関与することを示すことを特徴とする、間質－腫瘍連絡に関与する遺伝子または蛋白質を同定する方法を提供する。

30

【0018】

なもう1つの態様において、本発明は、被験体が膵臓腺癌に悩んでいるか否かを評価する方法を提供し、該方法は、被験体の試料、例えば、血液、例えば、血清、尿、糞、胆汁、膵液、膵臓組織または膵臓細胞試料における本明細書中に記載した方法によって同定されたバイオマーカーの発現または活性の存在、不存在、またはレベル、および対照試料、例えば、血液、例えば、血清、尿、糞、胆汁、膵液、膵臓組織または膵臓細胞試料におけるバイオマーカーの発現または活性の存在、不存在、またはレベルを比較することを含み、ここに、被験体試料および正常レベルにおけるバイオマーカーの発現または活性の存在、不存在、またはレベルの差は、被験体が膵臓腺癌に悩んでいることを示す。1つの実施形態において、試料は特許から得られた細胞を含む。

40

【0019】

なもう1つの態様において、本発明は被験体において膵臓腺癌の進行をモニタリングする方法を提供し、該方法はa) 本明細書中に記載された方法によって同定されたバイオマーカーの発現または活性の存在、不存在、またはレベルを第一の時点において被験体試

50

料において検出し；b）その後の時点において工程a）を反復し；次いで、c）工程a）およびb）で検出された発現または活性の存在、不存在、またはレベルを比較し、それから、被験体における膵臓腺癌の進行をモニターすることを含む。1つの実施形態において、試料は特許から得られた細胞を含む。もう1つの実施形態において、第一の時点およびその後の時点の間で、被験体は腫瘍を除去する外科的処置を受けたことがある。

【0020】

さらなる態様において、本発明は、被験体において膵臓腺癌を阻害するためのテスト化合物の効力を評価する方法を提供し、該方法は、被験体から得られ、かつテスト化合物に曝露された第一の試料中のバイオマーカーの発現または活性の存在、不存在、またはレベル、ここに、該バイオマーカーは本明細書中に記載された方法によって同定され、および被験体から得られた第二の試料中のバイオマーカーの発現または活性の存在、不存在、またはレベルを比較することを含み、ここに、該試料はテスト化合物に曝露されておらず、ここに、第二の試料に対する、第一の試料中のバイオマーカーの発現または活性の存在、不存在、またはレベルの有意な差は、テスト化合物が、被験体において膵臓腺癌を阻害するのに効力があることを示す。1つの実施形態において、第一および第二の試料は、被験体から得られた単一試料の一部である。

10

【0021】

また、本発明は、療法の少なくとも一部を被験体に供するに先立って被験体から得られた第一の試料中のバイオマーカーの発現、ここに、該バイオマーカーは本明細書中に記載された方法によって同定され、および療法の一部の提供に続いて被験体から得られた第二の試料中のバイオマーカーの発現を比較することを含み、ここに、第一の試料に対する、第二の試料におけるバイオマーカーの発現の有意に低いレベルは、該療法が被験体において膵臓腺癌を阻害するのに効力があることを示すことを特徴とする、被験体において膵臓腺癌を阻害する療法の効力を評価する方法を提供する。

20

【0022】

もう1つの態様において、本発明は被験体において膵臓腺癌を阻害するための組成物を選択する方法を提供し、該方法は、被験体からの癌細胞を含む試料を得；複数のテスト組成物の存在したで試料のアリコートを手々に曝露し；アリコートの各々におけるバイオマーカーの発現を比較し、ここに、該バイオマーカーは本明細書中に記載された方法によって同定され；次いで、他のテスト組成物に対する、そのテスト組成物を含有するアリコートにおけるバイオマーカーの発現のより低いレベルを誘導するテスト組成物の1つを選択することを含む。

30

【0023】

さらにもう1つの態様において、本発明は被験体において膵臓腺癌を阻害する方法を提供し、該方法は被験体から癌細胞を含む試料を得；複数のテスト組成物の存在下で試料のアリコートを手々に維持し；アリコートの各々においてバイオマーカーの発現を比較し、ここに、該バイオマーカーは本明細書中に記載した方法によって同定され；次いで、他のテスト組成物に対する、そのテスト組成物を含有するアリコートにおいてバイオマーカーのより低いレベルの発現を誘導するテスト組成物の少なくとも1つを被験体に投与することを含む。

40

【0024】

なおもう1つの実施形態において、本発明は、被験体が膵臓腺癌に悩んでいるか否かを評価するためのキットであって、該キットは本明細書中に記載された方法によって同定されたバイオマーカーの発現を評価するための試薬を含む。本発明のもう1つの態様は膵臓腺癌の存在を評価するためのキットを提供し、該キットは核酸プローブを含み、ここに、該プローブは本明細書中に記載された方法によって同定されたバイオマーカーに対応する転写されたポリヌクレオチドに特異的に結合する。

【0025】

また、本発明は、被験体において膵臓腺癌を阻害するための複数の化合物の各々の適性を評価するためのキットを提供し、該キットは複数の化合物；および本明細書中に記載

50

された方法によって同定されたバイオマーカーの発現を評価するための試薬を含む。

【0026】

もう1つの態様において、本発明は、ヒト膵臓腺癌細胞の存在を評価するためのキットを提供し、該キットは抗体を含み、ここに、該抗体は本明細書中に記載された方法によって同定されたバイオマーカーに対応する蛋白質に特異的に結合する。

【0027】

本発明のもう1つの態様はテスト化合物の膵臓細胞発癌性能力を評価する方法を提供し、該方法は、テスト化合物の存在下および非存在下で膵臓細胞の別々のアリコートを維持し；次いで、アリコートの各々におけるバイオマーカーの発現を比較することを含み、ここに、該バイオマーカーは本明細書中に記載された方法によって同定され、ここに、テスト化合物の非存在下において維持されたアリコートに対する、テスト化合物の存在下において維持されたアリコートにおけるバイオマーカーの発現の有意に増強されたレベルは、テスト化合物がヒト膵臓細胞発癌性能力を保有することを示す。

【0028】

さらなる態様において、本発明はテスト化合物の膵臓細胞発癌性能力を評価するためのキットを提供し、該キットは膵臓細胞、およびバイオマーカーの発現を評価するための試薬を含む。

【0029】

さらにもう1つの態様において、本発明は、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座が誤発現される、K R A Sの活性化突然変異を含む動物モデル、またはそれから単離された細胞にテスト化合物を投与し、次いで、該動物モデルにおいて膵臓腺癌の開始、維持、または進行に対するテスト化合物の効果を決定することを含む、膵臓腺癌の発生、進行、および／または維持を変調する化合物を同定する方法を提供する。

【0030】

なおもう1つの態様において、本発明は、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座が誤発現される、K R A Sの活性化突然変異を含む動物モデル、またはそれから単離された細胞にテスト化合物を投与し；次いで、該動物モデルにおいて膵臓腺癌の開始、維持、または進行に対するテスト化合物の効果を決定することを含み、膵臓腺癌の治療または予防用の潜在的治療剤を評価する方法を提供する。1つの実施形態において、該化合物は蛋白質、核酸分子、抗体、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、および有機または非有機低分子よりなる群から選択される。

【0031】

また、本発明は、本明細書中に記載された方法によって同定された化合物を投与することを含み、膵臓腺癌を有する、またはそれを発症する危険性がある被験体において膵臓腺癌を治療するまたは予防する方法を提供する。

【0032】

なおもう1つの態様において、本発明は、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座が誤発現される、K R A Sの活性化突然変異を含む膵臓腺癌の動物モデルからの単離された細胞、または細胞の精製された調製物を提供する。1つの実施形態において、該細胞は膵臓腺癌の該動物モデルからの膵臓組織から単離される。もう1つの実施形態において、該細胞は上皮、間質、腺房、または管細胞である。なおもう1つの実施形態において、細胞はトランスジェニック細胞、例えば、マウス細胞である。

【0033】

1つの態様において、本発明は、被験体が膵臓腺癌に悩んでいる、または膵臓腺癌を発症する危険性があるか否かを評価する方法を提供し、該方法は、被験体試料中の最小共通領域(M C R)のコピー数を、M C Rの正常なコピー数と比較することを含み、ここに、該M C Rは表2に列挙されたM C Rよりなる群から選択され、ここに、試料中のM C Rの改変されたコピー数は、被験体が膵臓腺癌に悩んでいるか、または膵臓腺癌を発症する危険性があることを示す。1つの実施形態において、コピー数は蛍光イン・サイチュハイブリダイゼーション(F I S H)によって評価される。もう1つの実施形態において、コピ

10

20

30

40

50

ー数は定量PCR（qPCR）によって評価される。1つの実施形態において、正常なコピー数は対照試料から得られる。

【0034】

もう1つの態様において、本発明は、被験体が膵臓腺癌に悩んでいるか、または膵臓腺癌を発症する危険性があるか否かを評価する方法を提供し、該方法はa) 試料中のバイオマーカーの量、構造および／または活性、ここに、該バイオマーカーは表2に列挙されたMCRに存在するバイオマーカーであり；およびb) 該バイオマーカーの正常な量、構造、および／または活性と比較することを含み、ここに、試料中のバイオマーカーの量、構造、および／または活性、および正常な量、構造、および／または活性の間の有意な差は、被験体が膵臓腺癌に悩んでいるか、または膵臓腺癌を発症する危険性があることを示す。1つの実施形態において、バイオマーカーの量を比較する。もう1つの実施形態において、バイオマーカーの構造を比較する。もう1つの実施形態において、バイオマーカーの活性を比較する。もう1つの実施形態において、バイオマーカーの量を、バイオマーカーの発現のレベルを測定することによって決定する。1つの実施形態において、バイオマーカーはバイオマーカーのコピー数を測定することによって決定される。なおもう1つの実施形態において、バイオマーカーの正常な量／構造および／または活性は対照試料から得られる。1つの実施形態において、試料は血液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織よりなる群から選択される。1つの実施形態において、コピー数は比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）によって評価される。さらなる実施形態において、CGHはアレイで行われる。1つの実施形態において、試料中のバイオマーカーの発現のレベルは、バイオマーカーに対応する蛋白質の試料中での存在を検出することによって評価される。もう1つの実施形態において、蛋白質の存在は、該蛋白質と特異的に結合する試薬を用いて検出される。1つの実施形態において、該試薬は抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントよりなる群から選択される。さらなる実施形態において、試料中のバイオマーカーの発現のレベルは、転写されたポリヌクレオチドの試料、またはその部分の存在を検出することによって評価され、ここに、転写されたポリヌクレオチドはバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、転写されたポリヌクレオチドはmRNAである。もう1つの実施形態において、転写されたポリヌクレオチドはcDNAである。さらなる実施形態において、検出する工程は、さらに、転写されたポリヌクレオチドを増幅することを含む。1つの実施形態において、試料中のバイオマーカーの発現のレベルは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、バイオマーカーにアニールする、またはバイオマーカーを含むポリヌクレオチドの部分にアニールする転写されたポリヌクレオチドの試料中での存在を検出することによって評価される。

【0035】

なおもう1つの態様において、本発明は、被験体において膵臓腺癌の進行をモニターする方法を提供し、該方法はa) バイオマーカーの量および／または活性を第一の時点において被験体試料中で検出し、ここに、該マーカーは表2に列挙されたMCRに存在するマーカーであり；b) その後の時点において工程a) を反復し；次いで、c) 工程a) およびb) で検出された量および／または活性を比較し、次いで、それより、被験体における膵臓腺癌の進行をモニターすることを含む。1つの実施形態において、試料は血液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織よりなる群から選択される。1つの実施形態において、バイオマーカーの活性が測定される。もう1つの実施形態において、バイオマーカーの量が測定される。さらなる実施形態において、バイオマーカーの量は、バイオマーカーの発現のレベルを測定することによって決定される。さらなる実施形態において、試料中のバイオマーカーの発現のレベルは、バイオマーカーに対応する蛋白質の試料中での存在を検出することによって評価される。なおさらなる実施形態において、蛋白質の存在は、蛋白質に特異的に結合する試薬を用いて検出される。1つの実施形態において、試薬は抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントよりなる群から選択される。1つの実施形態において、試料中のバイオマーカーの発現のレベルは、転写されたポリヌクレオチドまたはその部分の試料中での存在を検出することによって評価され、ここに、転写されたポリヌ

10

20

30

40

50

レオチドはバイオマーカーを含む。さらなる実施形態において、転写されたポリヌクレオチドはmRNAである。もう1つの実施形態において、転写されたポリヌクレオチドはcDNAである。なおもう1つの実施形態において、検出する工程は、さらに、転写されたポリヌクレオチドを増幅することを含む。もう1つの実施形態において、試料中のバイオマーカーの発現のレベルは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、バイオマーカーにアニールする、またはバイオマーカーを含むポリヌクレオチドの部分にアニールする転写されたポリヌクレオチドでの存在を検出することによって評価される。1つの実施形態において、試料は被験体から得られた細胞を含む。もう1つの実施形態において、第一の時点およびその後の時点の間で、被験体は膵臓腺癌に対する治療を受けており、膵臓腺癌に対する治療を完了しており、および／または緩解中である。

10

【0036】

本発明の1つの態様は、被験体において膵臓腺癌を阻害するためのテスト化合物の効力を評価する方法を提供し、該方法はa)被験体から得られ、テスト化合物の存在下で維持された第一の試料中のバイオマーカーの量および／または活性、ここに、該バイオマーカーは表2にリストしたMC Rに存在するバイオマーカーであり；およびb)被験体から得られ、かつテスト化合物の非存在下で維持された第二の試料中のバイオマーカーの量および／または活性を比較することを含み、ここに、第二の試料に対する、膵臓腺癌で欠失されるMC Rに存在する第一の試料中のバイオマーカーの有意に高い量および／または活性は、テスト化合物が膵臓腺癌を阻害するのに効力があることを示し、ここに、第二の試料に対する、膵臓腺癌で増幅されたMC Rに存在する第一の試料中のバイオマーカーの有意に低い量および／または活性は、テスト化合物が被験体において膵臓腺癌を阻害するのに効力があることを示す。1つの実施形態において、第一および第二の試料は被験体から得られた単一試料の部分である。もう1つの実施形態において、第一および第二の試料は被験体から得られたプールされた試料の部分である。

20

【0037】

本発明のもう1つの態様は被験体において膵臓腺癌を阻害するための療法の効力を評価する方法を提供し、該方法は：a)被験体に療法の少なくとも一部を供するに先立って被験体から得られた第一の試料中のバイオマーカーの量および／または活性、ここに、該バイオマーカーは表2に列挙されたMC Rに存在するバイオマーカーであり、およびb)療法の一部の提供に続いて被験体から得られた第二の試料中のバイオマーカーの量および／または活性を比較することを含み、ここに、第二の試料に対する、膵臓腺癌において欠失されたMC Rに存在する第一の試料中のバイオマーカーの有意に高い量および／または活性は、テスト化合物が膵臓腺癌を阻害するのに効力があることを示し、ここに、第二の試料に対する、膵臓腺癌で増幅されるMC Rに存在する第一の試料中のバイオマーカーの有意に低い量および／または活性は、該療法が被験体において膵臓腺癌を阻害するのに効力があることを示す。

30

【0038】

本発明のなおもう1つの態様は膵臓腺癌を変調することができる組成物を選択する方法を提供し、該方法はa)膵臓腺癌細胞を含む試料を得；b)該細胞をテスト化合物と接触させ；次いで、c)バイオマーカーの量および／または活性を変調するテスト化合物の能力を測定し、ここに、該バイオマーカーは表2にテストされたMC Rに存在するバイオマーカーであり、それにより、膵臓腺癌のモジュレーターを同定することを含む。1つの実施形態において、細胞は膵臓腺癌の動物モデルから単離される。もう1つの実施形態において、細胞は膵臓腺癌細胞株からのものである。なおもう1つの実施形態において、細胞は膵臓腺癌に罹った被験体からのものである。さらなる実施形態において、細胞は膵臓腺癌腫瘍に由来する膵臓腺癌細胞株からのものである。

40

【0039】

本発明の1つの態様は膵臓腺癌を変調することができる組成物を選択する方法を提供し、該方法はa)表2に列挙されたMC Rに存在するバイオマーカーをテスト化合物と接触させ；次いで、b)表2に列挙されたMC Rに存在するバイオマーカーの量および／また

50

は活性を変調するテスト化合物の能力を測定し、それにより、膵臓腺癌を変調することができる化合物を同定することを含む。1つの実施形態において、該方法は、さらに、膵臓腺癌の動物モデルにテスト化合物を投与することを含む。

【0040】

本発明のもう1つの態様は膵臓腺癌を阻害する化合物の能力を評価するためのキットを提供し、該キットは表2に列挙されたM C Rに存在するバイオマーカーの量、構造、および／または活性を評価するための試薬を含む。

【0041】

本発明の1つの態様は被験体が膵臓腺癌に悩んでいるか否かを評価するためのキットを提供し、該キットは、表2に列挙されたM C Rよりなる群から選択されるM C Rのコピー数を評価するための試薬を含む。

10

【0042】

本発明のなもう1つの態様は被験体が膵臓腺癌に悩んでいるか否かを評価するためのキットを提供し、該キットは表2に列挙されたM C Rに存在するバイオマーカーの量、構造、および／または活性を評価するための試薬を含む。

【0043】

本発明の1つの態様はヒト膵臓腺癌細胞の存在を評価するためのキットを提供し、該キットは抗体またはそのフラグメントを含み、ここに、該抗体またはそのフラグメントは表2に列挙されたM C Rに存在するバイオマーカーに対応する蛋白質に特異的に結合する。

【0044】

20

本発明のもう1つの態様は膵臓腺癌細胞の存在を評価するためのキットを提供し、該キットは核酸プローブを含み、ここに、該プローブは表2に列挙されたM C Rに存在するバイオマーカーに対応する転写されたポリヌクレオチドに特異的に結合する。1つの実施形態において、核酸プローブは分子ビーコンプローブである。

【0045】

本発明の1つの態様は、表2に列挙されたM C Rに存在するバイオマーカーに対応する遺伝子または蛋白質の量および／または活性のモジュレーターを被験体に投与し、それにより、膵臓腺癌に悩む被験体を治療することを含む、膵臓腺癌に悩む被験体を治療する方法を提供する。

【0046】

30

本発明のもう1つの態様は、膵臓腺癌で増幅される表2に列挙されたM C Rに存在するバイオマーカーに対応する遺伝子または蛋白質の量および／または活性を阻害する化合物を被験体に投与し、それにより、膵臓腺癌に悩む被験体を治療することを含む、膵臓腺癌に悩む被験体を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、該化合物は薬学的に受容可能な処方にて投与される。1つの実施形態において、該化合物は、該マーカーに対応する蛋白質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである。さらなる実施形態において、抗体はトキシンに結合体化される。なおもう1つの実施形態において、抗体は化学療法剤に結合体化される。1つの実施形態において、該化合物は、該マーカーに対応する遺伝子の発現を阻害するRNA干渉因子である。さらなる実施形態において、RNA干渉因子はs i RNA分子またはs h RNA分子である。1つの実施形態において、該化合物は該バイオマーカーに対応する遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドである。もう1つの実施形態において、該化合物はペプチドまたはペプチドミメティックである。なおもう1つの実施形態において、該化合物は該バイオマーカーの活性を阻害する低分子である。1つの実施形態において、低分子はバイオマーカーおよび標的蛋白質の間の蛋白質-蛋白質相互作用を阻害する。1つの実施形態において、該化合物は該バイオマーカーの発現または活性を阻害するアプタマーである。

40

【0047】

本発明のもう1つの態様は、膵臓腺癌において欠失した表2に列挙されたM C Rに存在するバイオマーカーに対応する遺伝子または蛋白質の発現または活性を増加させる化合物を被験体に投与し、それにより、膵臓腺癌に悩む被験体を治療することを含む、膵臓腺癌

50

に悩む被験体を治療する方法を提供する。

【0048】

本発明のなもう1つの態様は、膵臓腺癌において欠失した表2に列挙されたMCRに存在するバイオマーカーに対応する蛋白質を被験体に投与し、それにより、膵臓腺癌に悩む被験体を治療することを含む、膵臓腺癌に悩む被験体を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターによって、蛋白質は被験体の細胞に供される。もう1つの実施形態において、化合物は薬学的に受容可能な処方にて投与される。

【0049】

本発明の1つの態様は、表2に列挙されたMCRから選択されたMCR内に含まれる単離された核酸分子、またはそのフラグメントを提供し、ここに、該核酸分子は膵臓腺癌において改変された量、構造、および／または活性を有する。

【0050】

本発明のもう1つの態様は核酸分子によってコードされた単離されたポリペプチドを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0051】

(発明の詳細な説明)

本発明は、当該疾患の開始、維持、および進行を含めた、ヒト膵臓腺癌の遺伝的および組織学的特徴を発生反復する膵臓腺癌の非-ヒト動物モデルの創製に少なくとも部分的には基づく。従って、本発明は、癌、例えば、膵臓腺癌の動物モデルを提供し、そこでは、Krasの活性化突然変異が導入されており、いずれかの1以上の既知または未知の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座、例えば、Ink4a/Arf、Ink4a、Arf、p53、Smad4/Dpc、Lkb1、Brca2、またはMlh1が誤発現され、例えば、誤発現されて、減少した発現または非-発現に導かれている。1つの実施形態において、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座の誤発現は、Creレコンビナーゼの組織-特異的発現によって特異的細胞型において活性化し、または欠失することができる条件対立遺伝子によって達成される。1つの実施形態において、Ink4a/ArfはKrasの活性化と組み合わせられて誤発現される。もう1つの実施形態において、Ink4a/Arfおよびp53はKrasの活性化と組み合わせられて誤発現される。

【0052】

特に、本発明者らは、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座、例えば、Ink4a/Arfの誤発現と組み合わせられたKrasの活性化が膵臓腺癌を強力に誘導し、他方、いずれかの遺伝的病巣単独が進行した悪性病の生成に不十分であることを示した。動物モデルは、膵臓-特異的Cre-媒介突然変異体Kras対立遺伝子(Kras^{G12D}) (Jackson, et al. (2001) Genes Dev. 15:3243) および条件Ink4a/Arf対立遺伝子(Ink4a/Arf^{lox})の欠失双方を担うように作成された。Kras対立遺伝子は「ノックイン」であり、すなわち、それはその内因性プロモーターによって制御される。Kras対立遺伝子、Kras^{G12D}は活性化突然変異(G12D)を運び、その結果、Krasが構成的に発現される。従って、動物モデルにおいて、Krasはヒト膵臓腺癌における遺伝子の発現を模倣したレベルで発現される。Creレコンビナーゼ発現では、全ての腺房、島および管細胞においてCre活性を生じ、全ての膵臓系列においてloxP含有対立遺伝子を欠失するPdx1-Cre導入遺伝子(Gu G. et al. (2002) Development 129, 2447-2457)を用いた：Krasは、従って、内因性レベルで活性化され、Ink4a/Arfは膵臓の全ての細胞において特異的に欠失される。

【0053】

これらの突然変異体対立遺伝子の組合せを担う動物は、高度に攻撃的で、侵入的かつ転移性の腫瘍まで迅速かつ確実に進行し、最後には、11週齢までに動物の死滅をもたらす膵臓上皮内新形成(本明細書中で用いるPanINs)といわれる病巣プレ悪性管病変を

10

20

30

40

50

発症する。

【0054】

これらの腫瘍の進化は、貧弱に分化した状態まで進む傾向を持つ増殖性間質成分および管病変を保有する、ヒト疾患に対して驚くべき類似性を担う。該腫瘍はヒト癌に対して、同様な組織学的進行および同一の免疫組織化学的プロファイルでもって生起する。例えば、癌は、*Ink4a/Arf* 欠失と組み合わされて腺癌まで進行し、管マーカーを発現するが、内分泌または外分泌マーカーを発現しない *Kras* 活性化 (*PanINs*) に関連したプレ悪性管病変から生起する。腫瘍は極端に迅速に（全て7および11週の間）かつ高度に再現可能な履歴でもって生起する。

【0055】

腫瘍、例えば、膵臓腺癌が本発明の動物モデルにおいてその中で生起する迅速かつ狭いウィンドウは、本明細書中に記載された、膵臓腺癌に対するバイオマーカーおよび治療剤の同定、および化合物のプレ臨床的テストを大いに促進する。従って、本発明は、例えば、バイオマーカー発見およびスクリーニングアッセイのような、本明細書中に記載された癌、例えば、膵臓腺癌の動物モデルでの使用を提供する。バイオマーカーは疾患に対するバイオマーカー、例えば、初期疾患バイオマーカー、または腫瘍の維持および進行を含めた疾患の種々の段階を同定する疾患マーカーであり得る。

【0056】

さらに、本発明の動物モデルによって表示された膵臓癌およびヒト疾患の間の高度な同源性に基づき、本発明は本明細書中に記載された動物モデルを用いる方法および、例えば、膵臓腺癌を有する、またはその危険性がある被験体において、膵臓腺癌の検出、または癌進行の段階の同定のための方法における本明細書中に記載されたこれらのバイオマーカーの使用も含む。

【0057】

1つの実施形態において、バイオマーカーの同定は、対照動物と比較した本発明の動物モデルの血清プロテオミックス分析に基づく（例えば、実施例2参照）。もう1つの実施形態において、バイオマーカーの同定は、本発明の動物モデルからの腫瘍の比較ゲノミック分析に基づく（例えば、実施例3参照）。

【0058】

従って、本発明は、ある種の染色体領域（遺伝子座）内に含まれ、癌に関連する再発コピー数変化の、（最小共通領域（MCR）とここではいわれる）ゲノムの特異的領域を提供する。これらのMCRは、膵臓癌ゲノム、例えば、膵臓腺癌ゲノムにおいてコピー数改変の高分解能特徴付けを可能とする新規なcDNAまたはオリゴマーベースのプラットフォームおよびバイオインフォーマティクスツールを用いて同定された。

【0059】

MCRに到達するためには、アレイ比較ゲノミックハイブリダイゼーション（アレイCGH）を利用して、膵臓腺癌細胞株および腫瘍検体中でコピー数異常（CNA）（染色体領域の獲得および喪失）を規定した。

【0060】

本明細書中で同定されたMCRの増幅または欠失は、癌、例えば、膵臓癌および他の上皮癌の存在と相関する。さらに、各MCR内に存在する遺伝子のコピー数および／または発現レベルの分析は、個々のバイオマーカーおよびバイオマーカーの組合せの同定、被験体における癌、例えば、膵臓癌、例えば、膵臓腺癌の存在および／または不存在と相関する増大したおよび減少した発現および／または増大したおよび減少したコピー数に導く。

【0061】

従って、試料中の癌の存在、試料中の癌の不存在、およびバイオマーカーの量、構造および／または活性の改変を評価することによって、被験体における癌の予防、診断、特徴付け、および療法に関連する癌の他の特徴を検出するための方法がここに提供される。例えば、本明細書中で同定される、またはバイオマーカーの活性、またはMCR内のバイオマーカーのいずれかの1以上のメチル化状態に影響するコピー数、発現レベル、蛋白質レ

10

20

30

40

50

ベル、蛋白質活性、突然変異の存在（例えば、置換、欠失、または付加突然変異）を評価することによる、M C R の存在、不存在またはコピー数の評価は本発明の範囲内のものである。

【0062】

また、被験体において癌を阻害することができる化合物の同定のための、および本発明の遺伝子または蛋白質バイオマーカーのモジュレーター、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストを用いる癌の治療、予防および／または阻害のための方法もまたここに提供される。

【0063】

本明細書中に記載されたM C R およびバイオマーカーは膵臓癌試料で同定されたが、本発明の方法は膵臓癌の予防、診断、特徴付け、療法および予防での使用に断じて限定されず、例えば、本発明の方法は本明細書中に記載されたようにいずれの癌でも適用される。

10

【0064】

また、本発明は、膵臓腺癌の治療および／または予防用の治療剤、例えば、腫瘍の悪性成長を予防または阻害する分子的に標的化された治療剤の同定のために、本明細書中に記載された動物モデル、またはこれらの動物モデルに由来する細胞または細胞形を用いるスクリーニング方法も提供する。

【0065】

もう1つの態様において、本発明は、膵臓腺癌の治療および／または予防についての潜在的治療剤の評価のための、モデルシステム、例えば、プレ臨床モデルシステムとして本明細書中に記載された動物モデルを用いる方法を提供する。本発明の動物モデルにおける膵臓腺癌の進行、例えば、3週における非常に初期のプレ悪性病巣（P a n I N - 1）の存在、4週におけるより進行したプレ悪性病巣（P a n I N - 2）における存在、および5週までの小さな膵臓腺癌の存在に基づき、疾患の開始および進行に対する化学予防剤の、および化学治療剤および疾患の応答および治療の臨床的インパクトの迅速測定が可能である。

20

【0066】

なおもう1つの態様において、本発明は、例えば、ヘテロタイプ腫瘍-間質相互作用の研究、および腫瘍維持プログラムにおけるK r a s の同定のための、膵臓腺癌の疾患生物学を研究するのに用いることができる細胞系の創製のための本発明の動物モデルの使用も提供する。

30

【0067】

本発明の遺伝的に匹敵する初期継代マウス細胞系は、例えば、共培養、遺伝子発現プロファイリング、およびいずれかの細胞型における特異的遺伝子発現の操作を用いる腫瘍および間質の間のヘテロタイプ相互作用についての基礎的研究によって、疾患生物学を理解するのに有用である（O l u m i , A . F . , e t a l . (1 9 9 9) C a n c e r R e s 5 9 , 5 0 0 2 - 5 0 1 1 ; T l s t y , T . D . , およびH e i n , P . W . (2 0 0 1) C u r r O p i n G e n e t D e v 1 1 , 5 4 - 5 9 ）。

【0068】

また、本発明の細胞系は、例えば、腫瘍細胞を直接的に標的とするのみならず、腫瘍細胞とのマイクロ環境の相互作用によって作り出された成長および生存シグナルを抑制することによって間接的な効果を発揮する化合物のような、腫瘍-間質共生を破壊する新しい薬物標的の発見で用いることもできる。

40

【0069】

また、本発明の細胞系は、K R A S 転写プログラムおよびシグナリング代理を同定するのにも用いることができる。これらの細胞系は、K r a s 癌遺伝子プログラムおよびプロテオミックスプロファイルの同定でも有用である。腫瘍細胞の維持された増殖のためのK R A S の重要性は、R N A i 技術を用いる発現ノックダウン、続いての、S C I D マウスにおける直伸注射によって評価することができる。これは1) K R A S またはそのシグナリング代理が適当な薬物標的であるか否かの判断、2) 潜在的新規な治療標的として働

50

くであろう（無傷または破壊されたK R A S発現での発現プロファイリング細胞による）特異的K R A Sシグナリング代理の同定、3）活性化されたK R A Sのプロテオミックスシグニチャーの判断を可能とするであろう。シグニチャー発現プロフィールおよびプロテオミックスプロフィールの利用可能性は、K R A Sまたはそのシグナリング代理に向けられた薬物効力および特異性の評価において強力な源を提供する。

【0070】

もう1つの実施形態において、本発明の動物モデルにおける癌の高度に再現可能であって迅速な進化もまたそれを、他の同系繁殖株と交雑させて、それらの癌に対する可能なモデルを同定するのに、および腫瘍形成に対する特定の蛋白質の寄与も遺伝的テストで適当であるようにする。また、開示された動物を研究ツールとして用いて、膵臓癌の遺伝的および生理学的特徴を決定することもできる。

10

【0071】

本発明の種々の態様を以下のサブセクションにおいてさらに詳しく記載する。

【0072】

（I. 定義）

本明細書中で用いるように、以下の用語の各々はこのセクションにおいてそれに関連する意味を有する。

【0073】

冠詞「a」および「an」は、本明細書中においては、冠詞の文法的目的の1または1を超える（すなわち、少なくとも1）をいうのに用いる。例えば、「an element（ある要素）」は1つの要素または1を超える要素を意味する。

20

【0074】

用語「腫瘍」または「癌」は、制御されない増殖、不滅、転移能力、迅速な成長および増殖速度、およびある種の特徴的形態学的特徴のような癌を引き起こす細胞に典型的な特徴を保有する細胞の存在をいう。癌細胞はしばしば腫瘍の形態であるが、そのような細胞は動物内で単独に存在することができるか、あるいは白血病細胞のような非一腫瘍形成性癌細胞であり得る。本明細書中で用いるように、用語「癌」はプレ悪性ならびに悪性癌を含む。癌は、限定されるものではないが、膵臓癌、例えば、膵臓腺癌、メラノーマ、乳癌、肺癌、気管支癌、結直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳または中枢神経系癌、末梢神経系癌、食道癌、頸癌、子宮または子宮内膜癌、口腔または咽頭の癌、肝臓癌、腎臓癌、精巣癌、単環癌、小腸または中樞癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、血液学的組織の癌などを含む。

30

【0075】

本明細書中で用いる用語「膵臓癌」はアデノーマ、腺癌、ガストリノーマ、ソマトスタチノーマ、インスリノーマおよびグルカゴノーマを含む。

【0076】

本明細書中で用いるように、用語「腺癌」は、器官のライニングまたは内部表面に発症し、腺組織に由来し、または腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫である。

【0077】

本明細書中において相互交換的に用いるように、「膵臓腺癌」または「膵管腺癌」は膵臓の腺癌である。1つの実施形態において、膵臓腺癌は膵臓管で起こる病変の進行から生起する（「PanIN」とここではいう膵臓上皮内新形成）。

40

【0078】

本明細書中で用いるように、「トランスジェニック動物」は、当該動物の細胞の1以上、好ましくは実質的に全てが導入遺伝子を含む動物、例えば、非ヒト哺乳動物、例えば、霊長類、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、またはげっ歯類、例えば、マウスを含む。導入遺伝子は、例えば、マイクロインジェクション、トランスフェクションまたは感染によって、例えば、組み換えウイルスでの感染によって、細胞の前駆体への導入によって直接的または間接的に細胞に導入される。用語遺伝子操作は組換えDNA分子の導入を含む。この分子は染色体内に組み込まれ得るか、あるいはそれは染色体外

50

で複製するDNAであり得る。

【0079】

本明細書中で用いるように、用語「げっ歯類」とは、系統分類目げっ歯目の全てのメンバーをいう。

【0080】

本明細書中で用いるように、用語「誤発現」は遺伝子発現の非一野生型パターンを含む。発現は、本明細書中で用いるように、転写、転写後、例えば、mRNA安定性、翻訳、および翻訳後段階を含む。誤発現は：非一野生型レベルにおける、すなわち、発現を超えるまたは下回る発現；遺伝子が発現される時点または段階の点で野生型とは異なる発現のパターン、例えば、所定の発生期間または段階における（野生型と比較した）増大したまたは減少した発現；所定の細胞型または組織型、例えば、膵臓組織における（野生型と比較した）減少した発現の点で野生型と異なる発現のパターン；スプライシングサイズ、アミノ酸配列、トランジション後修飾、または発現されたポリペプチドの生物学的活性の点で野生型と異なる発現のパターン；遺伝子の発現に対する環境刺激または細胞外刺激の効果の点で野生型と異なる発現のパターン、例えば、刺激の長さの増大または減少の存在下で（野生型と比較して）増大したまたは減少した発現のパターンを含む。誤発現はトランスジェニック核酸からのいずれの発現も含む。誤発現は、例えば、遺伝子またはその制御配列の全てまたは一部の欠失によって誘導することができる遺伝子または導入遺伝子の欠如または非一発現を含む。

【0081】

例えば、1以上の腫瘍サプレッサー蛋白質、例えば、該Ink4a/Arf蛋白質をコードする遺伝子の誤発現は、腫瘍サプレッサー遺伝子、例えば、Ink4a/Arf遺伝子の破壊によって引き起こされ得る。1つの実施形態において、腫瘍サプレッサー遺伝子、例えば、Ink4a/Arf遺伝子は該蛋白質の全てまたは一部をコードするDNAの除去を介して破壊される。もう1つの実施形態において、動物は誤発現された腫瘍サプレッサー遺伝子、例えば、該Ink4a/Arf遺伝子につきヘテロ接合性またはホモ接合性であり得る、例えば、それは腫瘍サプレッサー遺伝子、例えば、Ink4a/Arf導入遺伝子につきヘテロ接合性またはホモ接合性のトランスジェニック動物であり得る。もう1つの実施形態において、動物は腫瘍遺伝子、例えば、Ink4a/Arf遺伝子のトランスジェニック破壊、好ましくは、遺伝子産物を不活化する挿入または欠失を持つトランスジェニックマウスである。好ましい実施形態において、本発明の動物または細胞は1以上の腫瘍サプレッサー導入遺伝子、例えば、Ink4a/Arf導入遺伝子、およびKras、例えば、Kras^{G12D}における導入遺伝子、またはInk4a/Arf導入遺伝子、p53導入遺伝子、およびKras、例えば、Kras^{G12D}における導入遺伝子を運ぶ。もう1つの実施形態において、本発明の動物または細胞はInk4a、Arf、p53、Smad4/Dpc、Lkb1、Brca2、またはMlh1よりなる群から選択される腫瘍サプレッサー導入遺伝子を運ぶ。

【0082】

本明細書中で用いるように、用語「ノックアウト」とは、導入遺伝子の挿入が当該動物またはそれからの細胞において内因性遺伝子を破壊する動物またはそれからの細胞をいう。この破壊は、例えば、動物または細胞においてInk4a/Arfを実質的に排除することができる。

【0083】

本明細書中で用いるように、用語「ノックイン」とは、導入遺伝子の挿入が動物またはそれからの細胞において内因性遺伝子を破壊し、その結果、遺伝子機能、例えば、野生型発現レベルまたは発現パターンと異なる発現レベルまたは発現パターンをもたらす、その遺伝子の機能の喪失をもたらさない動物またはそれからの細胞をいう。

【0084】

用語ノックアウトおよびノックインは、遺伝子発現が条件付きで変調された（例えば、破壊されたまたは改変された）動物またはそれからの細胞、例えば、スクリーニングア

10

20

30

40

50

ッセイで用いられる細胞を創製するのに用いることもできる「条件ノックアウト」および／または「条件ノックイン」システムをいうことも意図される。例えば、（ここに引用して援用する）WO 94/29442および米国特許第5,650,298号に記載された遺伝子の条件改変についてのテトラサイクリン調節システムを用いて、当該細胞と接触したテトラサイクリン濃度の変調を介して制御されるように改変された細胞、またはそれから細胞を単離することができる動物を創製することができる。もう1つの実施形態において、トランスジェニック非ヒト動物を作出することができ、それは導入遺伝子の調節された発現を可能とする選択されたシステムを含む。そのようなシステムの1つの例はバクテリオファージP1のcre/loxPレコンビナーゼシステムである。cre/loxPレコンビナーゼシステムの記載については、例えば、（ここに引用してその内容を明示的に一体化させる）Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236およびU. S. P. N. 4,959,317参照。レコンビナーゼシステムのもう1つの例はSaccharomyces cerevisiaeのFLPレコンビナーゼシステムである（ここに引用してその内容を明示的に一体化させるO'Gorman et al., 1991, Science 251:1351-1355）。もしcre/loxPレコンビナーゼシステムを用いて導入遺伝子の発現を制御するならば、Creレコンビナーゼおよび選択された蛋白質を共にコードする導入遺伝子を含む動物が要求される。そのような動物は「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて、例えば、一方が選択された蛋白質をコードする導入遺伝子を含む、他方がレコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含む2つのトランスジェニック動物を接合させることによって供することができる。

【0085】

1つの実施形態において、本発明のノックアウト動物は腫瘍抑制遺伝子、例えば、p53またはInk4a/Arfの条件ノックアウトを運ぶ。例えば、条件Ink4a/Arf対立遺伝子(Ink4a/Arf^{lox})は、エクソン2および3のCre-媒介切り出しを維持し、それにより、組織特異的にp16^{Ink4a}およびp19^{Arf}蛋白質を共に排除するように作成した（実施例1参照）。もう1つの実施形態において、本発明のノックイン動物は条件Kras^{G12D}ノックイン対立遺伝子(LSL-Kras)を運び、そこでは、LSL-Kras^{G12D}対立遺伝子は転写ストッパーエレメントのCre-媒介切り出しに続いて内因性レベルで発現される（Jackson et al. (2001) Genes Dev. 15:3243）。もう1つの実施形態において、ノックイン導入遺伝子は遺伝子、例えば、Kras^{G12D}の活性化突然変異を保有する。本明細書中で用いるように、「活性化突然変異」は、その遺伝子の構成的発現をもたらす遺伝子配列の変化である。例えば、イン・ビボにて、腫瘍形成の結果、減少したGTPase活性およびKrasの構成的シグナリングに関連するKrasのコーディング配列において突然変異をもたらす。

【0086】

もう1つの態様において、本発明は、動物または細胞に導入されると、該動物または細胞において1以上の腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座、例えば、Ink4a/Arf遺伝子またはp53遺伝子の誤発現をもたらす核酸分子をその特徴とする。好ましい実施形態において、該核酸分子は腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座、INK4a/Arf、p53、Ink4a、Arf、p53、Smad4/Dpc、Lkb1、Brca2、またはMlh1、破壊、例えば、挿入または欠失、例えば、マーカー配列の挿入を含むヌクレオチド配列を含む。野生型INK4aのヌクレオチド配列は当該分野で知られており、例えば、Genebank, gi:6753389（配列番号：1）に記載されており；野生型p53のヌクレオチド配列は当該分野で知られており、例えば、Genebank, gi:8400737（配列番号：20）に記載されており；野生型SMAD4のヌクレオチド配列は当該分野で知られており、例えば、Genebank, gi:31543223（配列番号：21）に記載されており；野生型Lkb1のヌクレオチド配列は当該分野で知られており、例えば、Genebank, gi:7106424（配列番

10

20

30

40

50

号：22）に記載されており；野生型Mlh1のヌクレオチド配列は当該分野で知られており、例えば、Genebank, gi:19387851（配列番号：25）に記載されており；野生型Brca2のヌクレオチド配列は当該分野で知られており、例えば、Genebank, gi:6857764（配列番号：26）に記載されており；野生型Arf1のヌクレオチド配列は当該分野で知られており、例えば、Genebank, gi:31560734（配列番号：27）に記載されており；各々の内容をここに引用して援用する。

【0087】

本明細書中で用いるように、「遺伝子の破壊」とは、遺伝子配列の変化、例えば、コーディング領域の変化をいう。破壊は：挿入、欠失、点突然変異、および再編成、例えば、インバージョンを含む。破壊は天然遺伝子または遺伝子座の領域、例えば、天然Ink4a/Arfまたはp53 DNA配列（例えば、1以上のエクソン）および／または遺伝子のプロモーター領域で起こって、遺伝子の野生型または天然に生じる配列と比較して細胞における遺伝子の発現を減少または防止することができる。「破壊」は古典的なランダム突然変異によって、または部位特異的方法によって誘導することができる。破壊はトランスジェニック的に導入することができる。全遺伝子の欠失は破壊である。1つの実施形態において、破壊は、ヘテロ接合においては、腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座の発現または活性レベル、例えば、Ink4a/Arfまたはp53の発現または活性レベルを、野生型の約50%まで低下させ、あるいはホモ接合体においては、腫瘍抑制遺伝子または遺伝子座、例えば、Ink4a/Arfまたはp53の発現または活性を実質的に排除する。

【0088】

本明細書中で用いるように、用語「トランスジェニック細胞」とは、導入遺伝子を含有する細胞をいう。

【0089】

本明細書中で用いるように、用語「マーカー配列」とは、（a）核酸構築体（例えば、標的化構築体）の一部として用いて、注目する遺伝子（例えば、Ink4a/Arf遺伝子）の発現を破壊し、および（b）標的化構築体をそれらのゲノムに組み込んだ細胞を同定するのに用いられる核酸分子をいう。例えば、マーカー配列は、抗生物質耐性遺伝子、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、または細胞で典型的には見出されないアッセイ可能な酵素、例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼなどのような検出可能な特性を細胞に付与する蛋白質をコードする配列であり得る。

【0090】

本明細書中で用いる「最小共通領域（MCR）」とは、癌のゲノムにおける獲得および増幅（増大したコピー数）または喪失または欠失（減少したコピー数）いずれかを呈する連続的染色体領域をいう。MCRは、増大したまたは減少したコピー数を有し、かつ癌と関連する少なくとも1つの核酸配列を含む。本発明のMCRは、限定されるものではないが、表2に記載されたものを含む。

【0091】

「バイオマーカー」は改変することができる遺伝子または蛋白質であり、ここに、該改変は癌に関連したものである。該改変は正常なまたは健康な組織または細胞（例えば、対照）におけるその量、構造および／または活性と比較して、癌組織または癌細胞における量、構造および／または活性であり得、癌のような病期に関連する。例えば、癌と関連する本発明のバイオマーカーは、正常な、健康な組織または細胞と比較して、癌組織または癌細胞において、改変されたコピー数、発現レベル、蛋白質レベル、蛋白質活性、またはメチル化状態を有することができる。さらに、「バイオマーカー」は、癌のような病期に関連する組織または細胞に存在した場合、例えば、置換、欠失または付加によって、ヌクレオチドまたはアミノ酸レベルにおいてその構造が改変された、例えば、突然変異した（対立遺伝子変種を含有する）、例えば、野生型配列と異なる分子を含む。

【0092】

バイオマーカーの用語「改変された量」またはバイオマーカーの「改変されたレベル」とは、対照試料におけるバイオマーカーの発現レベルまたはコピー数と比較した、バイオマーカーまたは染色体領域、例えば、M C Rの増大したまたは減少したコピー数、および／または癌試料における特定のバイオマーカー遺伝子または複数遺伝子の増大したまたは減少した発現レベルをいう。バイオマーカーの用語「改変された量」は、正常、対照試料におけるバイオマーカーの蛋白質レベルと比較して、試料、例えば、癌試料におけるバイオマーカーの増大したまたは減少した蛋白質レベルも含む。さらに、バイオマーカーの改変された量は、バイオマーカーの発現または活性に影響し得る、本明細書中に記載した、バイオマーカーのメチル化状態を検出することによって測定することができる。

10

【0093】

被験体におけるバイオマーカーの量、例えば、バイオマーカーまたはM C Rの発現またはコピー数、またはバイオマーカーの蛋白質レベルは、もしバイオマーカーの量を評価するのに使用するアッセイの標準誤差よりも大きな量、好ましくは、その量の少なくとも2、より好ましくは3、4、5、10以上倍だけ正常レベルよりも、各々、より大きいかまたはより小さければ、バイオマーカーまたはM C Rの正常な量よりも「有意に」高いまたは低い。あるいは、被験体におけるバイオマーカーまたはM C Rの量は、もし該量がバイオマーカーまたはM C Rの正常な量よりも、各々、少なくとも約2、好ましくは少なくとも約3、4または5倍高いかまたは低ければ、正常な量よりも「有意に」高いまたは低いと考えることができる。

20

【0094】

「遺伝子のコピー数」または「バイオマーカーのコピー数」とは、特定の遺伝子産物をコードする細胞中のDNA配列の数をいう。一般に、与えられた遺伝子に対して、哺乳動物は各遺伝子の2つのコピーを有する。しかしながら、コピー数は遺伝子増幅または複製によって増加し得るか、あるいは欠失によって減少し得る。

【0095】

バイオマーカーのまたはM C Rの「正常な」コピー数、またはバイオマーカーの発現の「正常な」レベルは、被験体、例えば、癌に悩まされていないヒトからの生物学的試料、例えば、組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有する試料中の発現のレベル、バイオマーカーのコピー数、またはM C Rのコピー数である。

30

【0096】

バイオマーカーまたはM C Rの用語「発現の改変されたレベル」とは、発現またはコピー数を評価するのに使用されるアッセイの標準誤差よりも大きいまたは小さい、テスト試料、例えば、癌に罹った対照に由来する試料中のバイオマーカーの発現レベルまたはコピー数をいい、好ましくは、対照試料（例えば、関連する疾患を有しない健康な被験体からの試料）中のバイオマーカーまたはM C Rの発現レベルまたはコピー数の、好ましくは、いくつかの対照試料中のバイオマーカーM C Rの平均発現レベルまたはコピー数の好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは3、4、5または10以上倍である。発現の改変されたレベルは発現またはコピー数を評価するのに使用されるアッセイの標準誤差よりも大きいまたは小さく、好ましくは、対照試料（例えば、関連する疾患を有しない健康な被験体からの試料）におけるバイオマーカーまたはM C Rの発現レベルまたはコピー数の、好ましくは、いくつかの対照試料中のバイオマーカーまたはM C Rの平均発現レベルまたはコピー数の好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは3、4、5または10倍以上である。

40

【0097】

バイオマーカーまたはM C Rの「過剰発現」または「発現またはコピー数の有意により高いレベル」とは、発現またはコピー数を評価するのに使用されるアッセイの標準誤差よりも大きいテスト試料中での発現レベルまたはコピー数をいい、対照試料（例えば、癌に悩んでいない健康な被験体からの試料）におけるバイオマーカーまたはM C Rの発現レベ

50

ルまたはコピー数、好ましくは、いくつかの対照試料におけるバイオマーカーまたはMCRの平均発現レベルまたはコピー数の好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは3、4、5または10倍以上である。

【0098】

バイオマーカーまたはMCRの「過小発現」または「発現またはコピー数の有意により低いレベル」とは、発現またはコピー数を評価するのに使用されるアッセイの標準誤差よりも大きいテスト試料における発現またはコピー数をいうが、対照試料（例えば、癌に悩んでいない健康な被験体からの試料）におけるバイオマーカーまたはMCRの発現レベルまたはコピー数、好ましくは、いくつかの対照試料におけるバイオマーカーまたはMCRの平均発現レベルまたはコピー数の好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは3、4、5または10倍以上少ない。

10

【0099】

バイオマーカーの「メチル化状態」とは、メチル化パターン、例えば、バイオマーカーのプロモーターのメチル化、および／またはバイオマーカーのメチル化レベルをいう。DNAメチル化は遺伝可能であって、可逆的かつ後成の変化である。なお、DNAメチル化は発生および遺伝的結果を有する、遺伝子発現を改変する能力を有する。DNAメチル化は、例えば、その内容をここに引用して援用するLaird, et al. (1994)

Human Molecular Genetics 3:1487-1495およびLaird, P. (2003) Nature 3:253-266に記載されたように癌にリンクされている。例えば、腫瘍抑制遺伝子のプロモーターにおけるCpGオリゴヌクレオチドのメチル化はその不活化に至りかねない。加えて、正常なメチル化プロセスにおける改変はゲノム不安定性と関連付けられている(Lengauer, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2545-2550, 1997)。そのような異常な後成の変化は多くのタイプの癌で見出すことができ、従って、癌遺伝子トランスフォーメーションについての潜在的バイオマーカーとして供することができる。

20

【0100】

メチル化を測定する方法は制限ランドマークゲノミックスキャニング(Kawai, et al., Mol. Cell. Biol. 14:7421-7427, 1994)、メチル化-感受性任意起点PCR(Gonzalgo, et al., Cancer Res. 57:594-599, 1997);メチル化-感受性制限酵素でのゲノミックDNAの消化、引き続いての、注目する領域のサザン分析(消化-サザン方法);PCR増幅に先立ってのメチル化-感受性制限酵素でのゲノミックDNAの消化を含むPCRベースのプロセス(Singer-Sam, et al., Nucl. Acid Res. 18:687, 1990);ビスルファイト処理を用いるゲノミック配列決定(Frommer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992);メチル化-特異的PCR(MSP)(Herman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1992);およびビスルファイト-変換DNAから増幅されたPCR産物の制限酵素消化(Sadri and Hornsby, Nucl. Acid Res. 24:5058-5059, 1996;およびXiong and Laird, Nucl. Acids. Res. 25:2532-2534, 1997);遺伝子突然変異の検出のためのPCR技術(Kuppuswamy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1143-1147, 1991)および対立遺伝子-特異的発現の定量(Szabo and Mann, Genes Dev. 9:3097-3108, 1995;およびSinger-Sam, et al., PCR Methods Appl. 1:160-163, 1992;および米国特許第6,251,594号に記載された方法を含み、それらの内容をここに引用して援用する。Zardo, et al., (2000) Nature Genetics 32:453-458に記載された集積ゲノミックおよびエピゲノミック分析も用

30

40

50

いることができる。

【0101】

バイオマーカーの用語「改変された活性」とは、正常な対照試料中でのバイオマーカーの活性と比較して、例えば、癌試料における病期で増加したまたは減少したバイオマーカーの活性をいう。バイオマーカーの改変された活性は、例えば、バイオマーカーの改変された発現、バイオマーカーの改変された蛋白質レベル、バイオマーカーの改変された構造、または例えば、バイオマーカーと同一または異なる経路に関与する他の蛋白質との改変された相互作用、または転写アクチベーターまたはインヒビターとの改変された相互作用、または改変されたメチル化状態の結果であり得る。

【0102】

バイオマーカーの用語「改変された構造」とは、正常なまたは野生型遺伝子または蛋白質と比較した、バイオマーカー遺伝子またはメーカー蛋白質内の突然変異または対立遺伝子変種、例えば、バイオマーカーの発現または活性に影響する突然変異の存在をいう。例えば、突然変異は、限定されるものではないが、置換、欠失、または付加突然変異を含む。突然変異はバイオマーカーのコーディングまたは非コーディング領域に存在することができる。

【0103】

「バイオマーカー核酸」は、本発明のバイオマーカーによってコードされた、またはそれに対応する核酸（例えば、DNA、mRNA、cDNA）である。バイオマーカー核酸分子は、核酸配列のいずれか、またはそのような配列の相補体の完全なまたは部分的配列をコードするRNAも含む、ここに、全てのチミジン残基はウリジン残基で置き換えられている、「バイオマーカー蛋白質」は、本発明のバイオマーカーによってコードされた、またはそれに対応する蛋白質である。バイオマーカー蛋白質は、配列のいずれかまたはそのフラグメントによってコードされた蛋白質の完全なまたは部分的配列を含む。用語「蛋白質」および「ポリペプチド」は本明細書中では相互交換可能に用いられる。

【0104】

本明細書中で用いる「バイオマーカー」は、表3に記載されたMCRに存在するいずれかの核酸配列、またはそのような配列によってコードされる蛋白質を含む。

【0105】

本明細書中で同定されたバイオマーカーは診断および治療バイオマーカーを含む。単一のバイオマーカーは診断バイオマーカー、治療バイオマーカー、または診断および治療バイオマーカーの双方であり得る。

【0106】

本明細書中で用いるように、用語「治療バイオマーカー」は、癌の発生（維持、進行、脈環形成、および／または転移を含む）に関与すると信じられているバイオマーカーを含む。治療バイオマーカーの癌-関連機能は、例えば、（1）例えば、ヒト癌の約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%以上を超えるにおいて、増大したまたは減少したコピー数（例えば、イン・サイチュハイブリダイゼーションにおける蛍光（FISH）、およびFISH+スペクトルハロタイプ（SKY）、または定量PCR（qPCR）による）、または突然変異（例えば、配列決定による）、過剰発現または過小発現（例えば、イン・サイチュハイブリダイゼーション（ISH）、ノーザンブロット、またはqPCRによる）、増大したまたは減少した蛋白質レベル（例えば、免疫組織化学（IHC）による）、または増大したまたは減少した蛋白質活性（例えば、バイオマーカーが関与する経路の変調によって決定）；（2）例えば、バイオマーカーのRNA干渉（「RNAi」）による、例えば、軟寒天における癌細胞の増殖および成長の阻害；（3）癌遺伝子、例えば、MycおよびRASによる、またはRAS単独による、マウス胚線維芽細胞（MEF）の形質転換を増強するためのバイオマーカーの能力；（4）例えば、軟寒天における、腫瘍細胞系の成長を増強または減少させるバイオマーカーの能力；（5）SCID外植体において一次マウス細胞を形質転換するバイオマーカーの能力；および／または；（6）バイオマーカーを阻害し、または活

10

20

30

40

50

性化することによる、腫瘍、例えば、ヒト癌細胞系に由来する動物または腫瘍でデ・ノボ生起する腫瘍の維持または形成の予防によって確認することができる。

【0107】

本明細書中で用いるように、用語「診断バイオマーカー」は、癌の診断で有用なバイオマーカー、例えば、療法の前、間または後における、腫瘍の過剰—または過小—活性出現、発現、成長、緩解、再発または抵抗性を含む。バイオマーカーの予言的機能は、例えば、（１）例えば、ヒト癌の約５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、２０％、２５％以上を超えるにおいて、増大したまたは減少したコピー数（例えば、FISH、FISH+SKY、またはqPCRによる）、過剰発現または過小発現（例えば、FISH、ノーサンプロット、またはqPCRによる）、増大したまたは減少した蛋白質レベル（例えば、IHCによる）、増大したまたは減少した活性（例えば、バイオマーカーが関与する経路の変調によって測定）；（２）癌に悩む被験体、例えば、ヒトからの生物学的試料、例えば、組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、脳脊髄液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有する試料におけるその存在または不存在；（３）癌をもつ被験体の臨床的サブセットにおけるその存在または不存在（例えば、特定の治療に応答するもの、または抵抗性を発生するもの）によって確認することができる。

10

【0108】

診断バイオマーカーは、「代理バイオマーカー」、例えば、癌の進行の間接的バイオマーカーであるバイオマーカーも含む。

20

【0109】

用語「プローブ」とは、特に意図した標的分子、例えば、本発明のバイオマーカーに選択的に結合することができるいずれかの分子をいう。プローブは当業者が合成することができるか、あるいは適当な生物学的調製物に由来することができる。標的分子の検出の目的では、プローブは、本明細書中に記載したように、標識されるように特別に設計することができる。プローブとして利用することができる分子の例は、限定されるものではないが、RNA、DNA、蛋白質、抗体、および有機モノマーを含む。

【0110】

本明細書中で用いるように、用語「プロモーター／調節配列」は、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な核酸配列を意味する。いくつかの実施形態において、この配列はコアプロモーター配列であってよく、他の例においては、この配列は、遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の調節エレメントも含むことができる。プロモーター／調節配列は、例えば、空間的にまたは時間的に制限された様式で遺伝子産物を発現するものであり得る。

30

【0111】

本明細書中で用いる「RNA干渉因子」は、RNAで干渉（RNAi）によって、標的遺伝子例えば、本発明のバイオマーカーの発現に干渉し、またはそれを阻害するいずれかの剤と定義される。そのようなRNA干渉因子は、限定されるものではないが、標的遺伝子、例えば、本発明のバイオマーカー、またはそのフラグメントに相同なRNA分子、短い干渉RNA（siRNA）、およびRNA干渉（RNAi）によって標的遺伝子の発現に干渉し、またはそれを阻害する低分子を含めた核酸分子を含む。

40

【0112】

「RNA干渉（RNAi）」は進化的に保存されたプロセスであり、それにより、標的遺伝子を同一または高度に類似する配列のRNAの発現または導入の結果、その標的化遺伝子（Coburn, G. and Cullen, B. (2002) J. of Virology 76 (18): 9225）から転写されたメッセンジャーRNA（mRNA）の配列特異的分解または特異的転写後遺伝子ライセンシング（PTGS）がもたらされ、それにより、標的遺伝子の発現が阻害される。1つの実施形態において、RNAは二本鎖、RNA（dsRNA）である。このプロセスは植物、無脊椎動物、および哺乳動物細胞で記載されている。天然では、RNAiは、長いdsRNAの、siRNAと呼ば

50

れる二本鎖フラグメントへのプロセス的切断を促進するdsRNA-特異的エンドヌクレアーゼダイサー(Dicer)によって開始される。siRNAは、標的mRNAを認識し、それを切断する蛋白質複合体に一体化される。RNAiは、核酸分子、例えば、合成siRNAまたはRNA干渉因子を導入して、標的遺伝子の発現を阻害し、またはそれをサイレントとすることによって開始することもできる。本明細書中で用いるように、「標的遺伝子発現の阻害」または「バイオマーカー遺伝子発現の阻害」は、標的遺伝子(例えば、本発明のバイオマーカー遺伝子)または標的遺伝子によってコードされた蛋白質(例えば、本発明のバイオマーカー蛋白質)の発現または蛋白質活性のいずれかの減少を含む。該減少は、標的遺伝子の発現、またはRNA干渉因子によって標的とされてこなかった標的遺伝子によってコードされる蛋白質の活性またはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%以上であり得る。

10

【0113】

「小干渉RNA」とも本明細書中ではいう「短い干渉RNA」(siRNA)は、例えば、RNAiによって標的遺伝子の発現を阻害するように機能する剤と定義される。siRNAは化学的に合成することができ、イン・ビトロ転写によって生産することにより、あるいは、宿主細胞内で生産することができる。1つの実施形態において、siRNAは長さが約15ないし約40ヌクレオチド、おそらくは約15ないし約28ヌクレオチド、より好ましくは長さが約19ないし約25ヌクレオチド、より好ましくは長さが約19、20、21または22ヌクレオチドの二本鎖RNA(dsRNA)分子であり、約0、1、2、3、4または5ヌクレオチドの長さを有する各ストランド上に3'および/または5'突出を含むことができる。該突出の長さは独立して2つのストランドの間であり、すなわち、1つのストランド上の突出の長さは第二のストランド上の突出の長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的メッセンジャーRNA(mRNA)の分解または特異的な転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)を通じてRNA干渉を促進することができる。

20

【0114】

もう1つの実施形態において、siRNAは(ステムループとも呼ばれる)小さなヘアピンRNA(shRNA)である。1つの実施形態において、これらのshRNAは短い(例えば、19ないし25ヌクレオチド)アンチセンスストランド、続いての、5ないし9ヌクレオチドループ、および類似のセンスストランドから構成される。別法として、センスストランドはヌクレオチドループ構造に先行することができ、アンチセンスストランドは続くことができる。これらのshRNAはプラスミド、レトロウイルスおよびレンチウイルスに含ませることができ、例えば、pol III U6プロモーター、またはもう1つのプロモーターから発現させることができる(例えば、ここに引用して援用するStewart, et al., (2003) RNA Apr; 9(4): 493-501参照)。

30

【0115】

RNA干渉因子、例えば、siRNA分子は、癌を有する、または有する危険性がある被験体に投与して、本発明のバイオマーカー遺伝子、例えば、(表2にリストしたバイオマーカーのような)癌で過剰発現されるバイオマーカー遺伝子の発現を阻害し、それにより、被験体において癌を治療し、予防し、または阻害することもできる。

40

【0116】

「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードする、また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、細胞のほとんどまたは全ての生理学的条件下で遺伝子産物が生きたヒト細胞で生産されるようにするヌクレオチド配列である。

【0117】

「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードする、また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、実質的に、プロモーターに対応するインデューサーが細胞に存在する場合のみ遺伝子産物が生きたヒト細胞で生産されるようにするヌクレオチド

50

配列である。

【0118】

「組織－特異的」プロモーターは、遺伝子産物をコードする、またはそれを特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結した場合、実質的に、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のみ、遺伝子産物が生きたヒト細胞で生産されるようにするヌクレオチド配列である。

【0119】

「転写されたポリヌクレオチド」は、本発明のバイオマーカーの転写、およびもしあれば転写体の正常な転写後プロセッシング（例えば、スプライシング）、および転写体の逆転写によって作成された成熟RNAの全てまたは部分に相補的な、またはそれに相同なポリヌクレオチド（例えば、RNA、cDNA、またはRNA、cDNAの1つのアナログ）である。

10

【0120】

「相補的な」とは、2つの核酸ストランドの領域の間、または同一核酸ストランドの2つの領域の間の配列相補性の広い概念をいう。第一の核酸領域のアデニン残基は、もし該残基がチミンまたはウラシルであれば、第一の領域に反平行である第二の核酸領域の残基とで特異的な水素結合（「塩基対合」）を結合することが知られている。同様に、第一の核酸ストランドのシトシン残基は、もし該残基がグアニンであれば、第一のストランドに対して反平行である第二の核酸ストランドの残基とで塩基対合できることが知られている。核酸の第一の領域は、もし2つの領域が反平行に配列させる場合に、第一の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基が第二の領域の残基とで塩基対合できるならば、同一または異なる核酸の第二の領域に相補的である。好ましくは、第一の領域は第一の部分を含み、第二の領域は第二の部分を含み、それにより、第一および第二の部分が反平行に整列した場合、第一の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%は第二の部分におけるヌクレオチド残基とで塩基対合できる。より好ましくは、第一の部分の全てのヌクレオチド残基は第二の部分におけるヌクレオチド残基とで塩基対合できる。

20

【0121】

本明細書中においては相互交換的に用いられる用語「相同性」または「同一性」とは、2つのポリヌクレオチド配列の間、または2つのポリペプチド配列の間の配列同様性をいい、同一性はより厳格な比較である。フレーズ「%同一性または相同性）」および「%同一性または相同性」とは、2以上のポリヌクレオチド配列または2以上のポリペプチド配列の比較で見出された配列同様性のパーセンテージをいう。「配列同様性」とは、2以上のポリヌクレオチドの配列の間における（いずれかの適当な方法によって測定して）塩基対配列におけるパーセント同様性をいう。2以上の配列は0ないし100%同様のいずれかの場所、またはそれらの間のいずれかの正数値であり得る。同一性または同様性は、比較の目的で成立することができる各配列の位置を比較することによって決定することができる。比較した配列中の位置が同一のヌクレオチド塩基またはアミノ酸によって占められれば、該分子はその位置において同一である。ポリヌクレオチド配列の間の同様性または同一性の程度は、ポリヌクレオチド配列によって共有される位置における同一またはマッチするヌクレオチドの数の関数である。ポリペプチド配列の同一性の程度は、ポリペプチド配列によって共有される位置における同一アミノ酸の数の関数である。ポリペプチド配列の相同性または同様性の程度はポリペプチド配列によって共有される位置におけるアミノ酸の数の関数である。本明細書中で用いる用語「実質的相同性」とは、少なくとも50%、より好ましくは60%、70%、80%、90%、95%以上の相同性をいう。

30

40

【0122】

バイオマーカーは、もしそれが、基質から解離するバイオマーカーの実質的割合なくして基質を流体（例えば、標準セーラインクエン酸、pH7.4）で漱ぐことができるように基質と共有結合により、または非共有結合により会合すれば基質に固定）される。

【0123】

50

本明細書中で用いるように「天然に生じる」核酸分子とは、天然で生じる（例えば、天然蛋白質をコードする）ヌクレオチド配列を有するRNAまたはDNA分子をいう。

【0124】

癌は、もし癌の少なくとも1つの兆候が軽減され、終止され、遅れ、または妨げられるならば「阻害」される。本明細書中で用いるように、もし癌の再発または転移が低下し、遅れ、遅延し、または妨げられたならば、癌はやはり「阻害」される。

【0125】

キットは少なくとも1つの剤、例えば、本発明のバイオマーカーを特異的に検出するためのプローブを含むいずれかの製造物（例えば、パッケージまたは容器）であり、該製造物は本発明の方法を実行するためのユニットとして促進され、分配され、または販売される。

10

【0126】

（II. 本発明の使用）

本発明は、疾患の開始、維持、および進行を含めた、ヒト疾患の遺伝的および組織化学的特徴を発生反復する膵臓癌の非ヒト動物モデルの創製に少なくとも部分的に基づく。したがって、本発明は、本明細書中に記載された動物モデルを用いて膵臓癌を変調し、例えば、阻害し、治療し、または予防する化合物を同定するための方法を提供する。本発明は、膵臓癌の診断または予後で用いることができる膵臓癌特異的バイオマーカーを同定する方法も提供する。これらのバイオマーカーは、例えば、無兆候被験体において初期段階の疾患の検出のための、または被験体において膵臓癌の段階または進行を同定するための診断剤として働く。

20

【0127】

本明細書中で記載するように、本発明の動物モデルにおける、Krasの誤発現、例えば、活性化、および1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子、例えば、Ink4a/Arf、Ink4a、Arf、p53、Smad4/Dpc、Lkb1、Brca2、またはMlh1の誤発現、例えば、減少した発現の結果、ヒトにおける疾患の開始、進行および/または維持を模倣する膵臓癌、例えば、膵臓癌の発生および進行をもたらす。かくして、本明細書中に記載した動物モデル、ならびに特異的細胞型、例えば、膵臓癌動物モデルに由来する膵臓、間質、腺房、管、精製された細胞、または本明細書中に記載された、これらの細胞型から発生し、膵臓癌動物モデルに由来する細胞系をスクリーニングアッセイ

30

【0128】

（A. バイオマーカーの発見）

本発明は、膵臓癌、例えば、膵臓癌の開始、進行および/または維持についての診断、予後および/または薬理ゲノミクスバイオマーカー、または予後バイオマーカーの同定方法を提供する。本発明の同系繁殖体の遺伝的に決定された動物モデルは制御された環境条件下で維持され、高度に再現性があり、かつ迅速な膵臓癌の発症を示し、これは、それらを、限定されるものではないが、初期段階、進行した段階、および後期段階の疾患のバイオマーカーを含めた疾患に対する段階特異的バイオマーカーの同定用の理想的なツールとする。また、本発明の動物モデルは、限定されるものではないが、Ink4a/Arf、Ink4a、Arf、p53、Smad4/Dpc、Lkb1、Brca2、またはMlh1を含めた特異的遺伝子の機能の喪失を含めた、特定の遺伝的病変に特異的なバイオマーカーの同定を可能とする。

40

【0129】

一般に、膵臓癌、例えば、膵臓癌に関連したバイオマーカーを同定する方法は、野生型動物、例えば、対照動物からの1以上の誤発現腫瘍サプレッサー遺伝子または遺伝子座に加え、本明細書中に記載された動物モデル、例えば、KRASの活性化突然変異を運ぶ動物モデルからの組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有する試料中のバイオマーカーの量および/または活性を比較することを

50

含む。バイオマーカーの量および／または活性における動物の間の差は、バイオマーカーが膵臓腺癌に関連付けられることを示す。

【0130】

1つの実施形態において、本発明の動物モデルからの試料、例えば、組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有する試料を、野生型動物、例えば、対照動物からの試料、例えば、組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有する試料と比較する。

【0131】

本発明の動物モデルおよびそれから単離された細胞系もまた、蛍光イメージングプローブ用の適当な基質として働くことができるカテプシンのような特異的腫瘍関連プロテアーゼのような間質成分と反応する診断剤の発見で用いることもできる (Ntziachristos, V., et al., (2003) Eur Radiol 13, 195-208; Ntziachristos, V., et al., (2002) Nat Med 8, 757-760; Weissleder, R., and Ntziachristos, V. (2003) Nat. Med. 9, 123-128)。膵臓腺癌における間質の特徴づけは、腫瘍サイズに対するその重要な寄与を仮定すれば、診断における活動性である。イン・ビトロでの培養技術は、腫瘍細胞および関連する間質総合の培養が、各腫瘍区画における (例えば、ファジー表示技術を用いる (Spear, M. A., et al. (2001) Cancer Gene Ther 8, 506-511) 細胞表面マーカーの発現プロファイルを研究する潜在能力を可能とする。細胞系はSCIDマウスの皮下注射で用いられており、元の腫瘍細胞形態および遺伝学の頑強な成長および保持を示している。したがって、もう1つの実施形態において、間質からの組織を腫瘍の上皮区画からの組織と比較し、それを用いて、腫瘍の間質区画または上皮区画に特異的なバイオマーカーを同定する。更なる実施形態において、細胞系はその全体が膵臓腫瘍から生じさせ、それを利用して、前記したバイオマーカーを同定する。なおもう1つの実施形態において、細胞系はその全体が膵臓腫瘍の間質および／またはその上皮成分から発生し、それを利用して、前記したバイオマーカーを同定する。1つの実施形態において、腫瘍の間質区画からの細胞を腫瘍の上皮区画からの細胞と混合する。

【0132】

1つの実施形態において、バイオマーカーは、当該分野で知られ、本明細書中に記載された免疫組織化学方法を用いて概観される、例えば、腫瘍の成長を調節することができる種々の分子の蓄積のパターンに基づいて同定される。病因に関与する特異的遺伝子または分子の群の発現を分析に指向されるスクリーニングを、動物モデルの一生の間継続することができる。発現は、免疫組織化学によって、ならびに蛋白質およびRNAブロッティング技術によってモニターすることができる。転移性病巣は、一旦形成されたならば、そのような比較概観に付すこともできる。この分析は、異なる遺伝子発現に対する (本発明の動物モデルにおいて本明細書中に記載されたように同定された膵臓腺癌を変調するとして同定された化合物の使用を含めた) 種々の治療範例の効果の評価を含めるように拡大することもできる。異なる遺伝子発現の外観に由来する情報は、最後には、動物モデルにおける疾患の開始と進行とを相関させることができる。

【0133】

1つの実施形態において、バイオマーカーは蛋白質またはそのフラグメントである。例示的实施形態として、本発明のバイオマーカーの蛋白質および／またはフラグメントは、対照動物と比較した場合のその誤発現に基づいて、本発明の動物モデルの血液 (全血、血清、および／または血漿)、頬切屑、唾液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織から同定される。血清検体は、膵臓腺癌の、例えば、開始、進行および／または維持についての診断、予後および／または薬理ゲノミクスである段階-特異的バイオマーカーの同定を可能とするために、例えば、マスマスプロトメトリーによって特異的ペプチドの同定用の分析に容易に付すことができるフラクションへ検体を分解する当該分野で知られた蛋白質発見プラットフォームによって分析される (実施例2参照)。

【0134】

1つの実施形態において、抗体、例えば、モノクローナルおよび／またはポリクローナル抗体はこれらのバイオマーカーに対して生起される。抗体発生のためのエピトープは、ヒトにおけるオルソログス蛋白質を認識する当業者によって選択することができる。これらの抗体は、例えば、ELISAベースのアッセイを用いてヒト診断、予後および／または薬理ゲノミクスバイオマーカーとしてのそれらの適用性につき評価して、その臨床的追跡が膵臓癌、例えば、膵臓腺癌の発生を明らかとする予測臨床試験において、ヒト膵臓腺癌被験体からの、およびコントロール被験体からの試料、例えば、血清をテストすることができる。

【0135】

もう1つの実施形態において、蛋白質バイオマーカーは、(Zyomyxサイトカインチップのような)特異的蛋白質チップを利用して同定される。

【0136】

もう1つの実施形態において、バイオマーカーは核酸またはそのフラグメントである。核酸バイオマーカーは、例えば、本発明の動物モデルの発現パターンを対照同腹子と比較する遺伝子発現パターンに基づいて同定することができる。例えば、1以上の遺伝子の発現パターンは、次いで、そのような評価で用いることができる「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」に一部形成することができる。本明細書中で用いることができる「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」は、与えられた条件の組の下で、与えられた組織または細胞型で得られたmRNA発現のパターンを含む。そのような条件は、限定されるものではないが、細胞成長、増殖、分化、形質転換、腫瘍形成、転移、およびカルシノーゲン曝露を含むことができる。

【0137】

遺伝子発現のプロファイルは、例えば、差分遺伝子発現手法、ノーザン分析および／またはRT-PCRを利用することによって作り出すことができる。遺伝子発現プロファイルは、細胞および／または動物ベースのモデルシステム内で既知の状態につき特徴付けることができる。引き続いて、これらの既知の遺伝子発現プロファイルを比較して、そのような遺伝子発現プロファイルを修飾する、およびより望ましいプロファイルのそれにプロファイルをより密接に類似させる、テスト化合物が有する効果を確認することができる。

【0138】

もう1つの実施形態において、非侵入的イメージング技術、例えば、磁気共鳴イメージング(MRI)を利用して、本発明のモデルシステムにおいて膵臓腫瘍の発生および成長をモニターして本明細書中に記載したようにして発見されたバイオマーカーと癌の進行の相関を可能とする。

【0139】

本発明のもう1つの態様において、正常な(すなわち、非癌性)細胞と比較して、癌細胞、例えば、本明細書中に記載された膵臓癌の動物モデルからの細胞の異なるコピー数に導く実質的に改変された染色体領域(MCR)内でバイオマーカーが同定される。したがって、本発明は、正常な(すなわち、非癌性)細胞と比較して、癌細胞の異なるコピー数に導く構造的に改変された染色体領域(MCR)の同定に部分的に基づく。さらに、本発明は、正常な(すなわち、非癌性)細胞と比較して、癌細胞における改変された量、構造および／または活性を有する、バイオマーカー、例えば、本発明のMCRに存在するバイオマーカーの同定に部分的に基づく。本発明のバイオマーカーは、正常および癌性細胞の一方または双方で検出することができるDNA、cDNA、RNAおよびポリペプチド分子に対応する。

【0140】

また、試料中の本発明の1以上のMCRの存在、不存在および／またはコピー数もまた組織の癌状態と相関する。本発明は、かくして、細胞(例えば、非ヒト、培養された非ヒト細胞、イン・ビボ細胞から得られた細胞)の癌状態を評価するための組成物、キッ

10

20

30

40

50

ト、および方法、ならびに本発明のバイオマーカーのモジュレーター、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストを用いて癌を治療、予防および／または阻害する方法を提供する。

【0141】

(B. スクリーニングアッセイ)

1つの態様において、本発明は、膵臓癌を変調し、治療し、または予防する、または膵臓癌、例えば、膵臓腺癌の開始、維持、および／または進行に関与する分子を変調するモジュレーター、すなわち、候補またはテスト化合物または剤（例えば、蛋白質、ペプチド、ペプチドミメティックス、低分子（有機または無機）または他の薬物）を同定するために（ここでは「スクリーニングアッセイ」ともいう）スクリーニング方法を提供する。

10

【0142】

1つの実施形態において、本発明の動物モデルに由来する細胞、例えば、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子を誤発現する、および活性化Kras突然変異を有する細胞を、エクス・ビボにて、1以上のテスト化合物と接触させることができ、Ink4a／Arf、p53、または1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または膵臓癌に関連する他の遺伝子に関係するシグナル変換経路における分子によって調節される生物学的応答をモニターすることができる。（例えば、未処理細胞または対照剤で処理した細胞のような適当な対照と比較して）細胞、または1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子または膵臓癌に関連する他の遺伝子に関係するシグナル変換経路における分子での応答の変調は、膵臓癌、例えば、膵臓腺癌のモジュレーターとしてテスト化合物を同定する。

20

【0143】

もう1つの実施形態において、1以上のテスト化合物をイン・ビボにて本発明の動物モデル（例えば、本明細書中に記載した膵臓癌の動物モデル）に直接投与して、1以上の腫瘍サプレッサー遺伝子を誤発現し、活性化Kras変調を有する細胞のイン・ビボ応答を変調するテスト化合物を同定し、または該動物における膵臓癌の開始、維持、および／または進行に対する、または疾患の兆候に対するテスト化合物の効果を評価する。曝露に対する動物の応答は、膵臓癌の逆行、またはそれに伴う兆候、例えば、処理の前および後における腫瘍負荷、腫瘍サイズ、および侵入的および／または転移能力の低下を評価することによってモニターすることができる。

【0144】

テスト化合物は医薬組成物として動物モデルに投与することができる。そのような組成物は、典型的には、テスト化合物および薬学的に受容可能な担体を含む。本明細書中で用いるように、用語「薬学的に受容可能な担体」は、医薬投与に適合する、いずれかのおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌および抗真菌化合物、等張および吸収遅延化合物等を含む。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および化合物の使用は当該分野でよく知られている。いずれかの慣用的媒体または化合物が活性化合物に適合しないのを除き、組成物におけるその使用が考えられる。補助的活性化合物もまた組成物に配合することもできる。

30

【0145】

エクス・ビボでのスクリーニング方法を実行するには、本発明の動物モデルに由来する細胞を標準的な方法によって動物または胚から単離し、テスト化合物と共にイン・ビトロにてインキュベート（すなわち、培養）することができる。細胞（例えば、膵臓細胞、例えば、膵臓上皮、間質、腺房、管）を標準的な技術によって本発明の動物から単離することができる。

40

【0146】

1以上のテスト化合物と細胞との接触（エクス・ビボまたはイン・ビボいずれか）に続き、細胞の生物学的応答に対するテスト化合物の効果を、例えば、細胞の光学顕微鏡分析、細胞の組織化学分析、蛋白質の生産、ある種の遺伝子、例えば、腫瘍サプレッサー遺伝子の導入を含めた種々の適当な方法のいずれか1つによって測定することができる。

【0147】

50

また、本発明は、(a) 本発明のバイオマーカーに結合する、または (b) 本発明のバイオマーカーの活性に対する変調 (例えば、刺激または阻害) 効果を有し、さらに詳しくは、(c) その天然基質 (例えば、ペプチド、蛋白質、ホルモン、補因子、核酸) の 1 以上と本発明のバイオマーカーの相互作用に対する変調効果を有し、または (d) 本発明のバイオマーカーの発現に対する変調効果を有するモジュレーター、すなわち、候補またはテスト化合物または剤を同定する方法も提供する。そのようなアッセイは、典型的には、バイオマーカーおよび 1 以上のアッセイ成分の間の反応を含む。他の成分はテスト化合物それ自体、またはテスト化合物およびバイオマーカーの天然結合パートナーの組合せいずれかであり得る。本明細書中に記載されたもののようなアッセイを介して同定された化合物は、例えば、癌を変調し、例えば、阻害し、軽減し、治療し、または予防するのに有用であり得る。

10

【0148】

本発明のテスト化合物は、天然および／または合成化合物の系統的ライブラリーを含めたいずれかの利用可能な源から入手することができる。また、テスト化合物は：生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー、そうでなければ生体活性なままである酵素分解に対して耐性である新規な非ペプチド骨格をもつ以外は、ペプチドの機能を有する分子のライブラリー；例えば、Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37: 2678-85 参照)；空間的にアドレス可能な平衡固相または液相ライブラリー；脱回旋を必要とする合成ライブラリー方法；「1-ビーズ1-化合物」ライブラリー方法；アフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法を含めた当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー方法においていずれかの多数のアプローチによって得ることもできる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定され、他方、他の 4 つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子ライブラリーに適用できる (Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145)。

20

【0149】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば、DeWitt et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6909; Erb et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422; Zuckermann et al. (1994). J. Med. Chem. 37: 2678; Cho et al. (1993) Science 261: 1303; Carrell et al., (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carrell et al., (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; および Gallop et al., (1994) J. Med. Chem. 37: 1233 において当該分野で見出すことができる。化合物のライブラリーは溶液中 (例えば、Houghten, 1992, Biotechniques 13: 412-421) ビーズ (Lam, 1991, Nature 354: 82-84)、チップ (Fodor, 1993, Nature 364: 555-556)、細菌および／または孢子 (Ladner, USP 5, 223, 409)、プラスミド (Cull et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) 上、またはフェージ上 (Scott and Smith, 1990, Science 249: 389-390; Devlin 1990, Science 249: 404-406; Cwirla et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382; Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222: 301-310; Ladner, 前掲) に存在させることができる。

30

40

【0150】

1 つの実施形態において、本発明は、本発明のバイオマーカーまたはその生物学的に活性な部分の基質である候補またはテスト化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供することができる。もう 1 つの実施形態において、本発明は、本発明のバイオマーカー

50

またはその生物学的に活性な部分に結合する候補またはテスト化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。バイオマーカーに直接的に結合するテスト化合物能力の測定は、例えば、当該化合物のバイオマーカーへの結合が複合体中の標識されたバイオマーカー化合物を検出することによって測定できるように、該化合物を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせることによって達成することができる。例えば、化合物（例えば、バイオマーカー基質）は直接的または間接的のいずれかで ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で標識することができ、放射性同位体は放射性発光の直接的カウンティングによって、またはシンチレーションカウンティングによって検出することができる。別法として、アッセイ成分は、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識することができ、酵素標識は、適当な基質の生成物への返還の測定によって検出することができる。

10

【0151】

もう1つの実施形態において、本発明は、本発明のバイオマーカーまたはその生物学的に活性な部分を活性を変調する候補またはテスト化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。全ての尤度において、バイオマーカーは、イン・ビボにて、限定されるものではないが、ペプチド、蛋白質、ホルモン、補因子、および核酸のような1以上の分子と相互作用することができる。この議論の目的では、そのような細胞および細胞外分子を本明細書中においては「結合パートナー」またはバイオマーカー「基質」という。

【0152】

そのようなスクリーニングを容易にするための本発明の1つの必要な実施形態は、その天然のイン・ビボの結合パートナーを同定するためのバイオマーカーの使用である。当業者に知られたこれを達成するための多くの方法がある。1つの例は、バイオマーカー（結合パートナー）に結合し、またはそれと相互作用する、従って、バイオマーカーの天然の機能に恐らくは関与する他の蛋白質を同定するための、2-ハイブリッドアッセイまたは3-ハイブリッドアッセイにおける「エサ蛋白質」としてのバイオマーカー蛋白質の使用である（例えば、米国特許第5,283,317号；Zervos et al., 1993, Cell 72:223-232；Madura et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:12046-12054；Bartel et al., 1993, Biotechniques 14:920-924；Iwabuchi et al., 1993 Oncogene 8:1693-1696；Brent WO94/10300参照）。そのようなバイオマーカー結合パートナーは、バイオマーカー-媒介シグナリング経路のバイオマーカーまたは下流エレメントによるシグナルの増殖に関与するようでもある。別法として、そのようなバイオマーカー結合パートナーはまた、バイオマーカーの阻害剤としても用いられる。

20

30

【0153】

2-ハイブリッドシステムは、別々のDNA-結合および活性化ドメインよりなるほとんどの転写因子のモジュール性質に基づく。簡単に述べれば、該アッセイは2つの異なるDNA構築体を利用する。1つの構築体において、バイオマーカー蛋白質をコードする遺伝子は、既知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合する。他の構築体において、同定されていない蛋白質（「プレイ（prey）」または「試料」）をコードする、DNA配列のライブラリーからのDNA配列は、既知の転写因子の活性化ドメインにつきコードする遺伝子に融合される。もし「エサ」および「プレイ」蛋白質が相互作用し、イン・ビボにて、バイオマーカー-依存性複合体を形成できるならば、転写因子のDNA-結合および活性化ドメインは近接される。この近接は、転写因子に応答性の転写調節部位に操作可能に連結したレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写を可能とする。レポーター遺伝子の発現は容易に検出でき、機能的転写因子を含有する細胞コロニーを単離し、これを用いて、バイオマーカー蛋白質と相互作用する蛋白質をコードするクローン化遺伝子を得ることができる。

40

【0154】

さらなる実施形態において、アッセイは、バイオマーカーおよびその基質および／また

50

は結合パートナーの間の相互作用を変調する（例えば、正にまたは負に影響する）化合物を同定する目的で本発明の使用を介して工夫することができる。そのような化合物は、限定されるものではないが、抗体、ペプチド、ホルモン、オリゴヌクレオチド、核酸、およびそのアナログのような分子を含むことができる。そのような化合物は、天然および／または合成化合物の系統的ライブラリーを含めたいずれかの利用可能な源から得ることもできる。この実施形態で用いられる好ましいアッセイ成分は本明細書中で同定される癌バイオマーカー、その既知の結合パートナーおよび／または基質、またはテスト化合物である。テスト化合物はいずれかの源から供給することができる。

【0155】

バイオマーカーおよびその結合パートナーの間の相互作用に干渉する化合物を同定するのに用いられるアッセイシステムの基本的原理は、2つの生成物が相互作用し、結合し、かくして、複合体を形成するのを可能とするのに十分な条件下で、かつ十分な時間にて、バイオマーカーおよびその結合パートナーを含有する反応混合物を調製することを含む。阻害活性につき剤をテストするには、反応混合物をテスト化合物の存在下および非存在下で調製する。テスト化合物は最初に反応混合物に含めることができるか、あるいはバイオマーカーおよびその結合パートナーの添加に引き続いた時点で加えることができる。対照反応混合物はテスト化合物なくして、あるいはプラセボと共にインキュベートされる。次いで、バイオマーカーおよびその結合パートナーの間のいずれかの複合体の形成を検出する。テスト化合物を含有する反応混合物におけるそのような形成は少ないかまたはほとんどないが、対照反応における複合体の形成は、化合物がバイオマーカーおよびその結合パートナーの相互作用に干渉することを示す。逆に、対照反応におけるよりも化合物の存在におけるより多くの複合体の形成は、化合物がバイオマーカーおよびその結合パートナーの相互作用を増強することができることを示す。

【0156】

バイオマーカーとその結合パートナーとの相互作用に干渉する化合物についてのアッセイは、不均一または均一フォーマットで行うことができる。不均一アッセイは、バイオマーカーまたはその結合パートナーいずれかを固相に係留させ、反応の最後に固相に係留された複合体を検出することを含む。均一アッセイにおいて、全反応は液相で行われる。いずれかのアプローチにおいて、反応体の添加の順序を変更して、テストすべき化合物についての異なる情報を得ることができる。例えば、（例えば、競合によって）バイオマーカーおよび結合パートナーの間の相互作用に干渉するテスト化合物は、テスト物質の存在下で反応を行うことによって、すなわち、バイオマーカーおよびその相互作用性結合パートナーに先立って、または同時に反応混合物へテスト物質を加えることによって同定することができる。別法として、予め形成された複合体を破壊するテスト化合物、例えば、複合体からの成分の1つを置き換えるより高い結合定数を持つ化合物は、複合体が形成された後にテスト化合物を反応混合物に加えることによってテストすることができる。

【0157】

種々のフォーマットを以下に簡単に述べる。

【0158】

不均一アッセイシステムにおいては、バイオマーカーまたはその結合パートナーいずれかを固体表面またはマトリックスに係留させ、他方、他の対応する非一係留成分を直接的にまたは間接的にのいずれかで標識することができる。実行に際しては、マイクロタイタープレートをこのアプローチでしばしば利用する。係留された種は、典型的には、該技術を実行する者によく知られている非共有結合的または共有結合的多数の方法によって固定化することができる。非共有結合的付着は、しばしば、単に、固体表面をバイオマーカーまたはその結合パートナーの溶液で被覆し、次いで、乾燥することによって達成することができる。別法として、係留すべきアッセイ成分に対して特異的な固定化された抗体をこの目的で用いることができる。そのような表面は、しばしば、予め調製し、貯蔵することができる。

【0159】

関連する実施形態において、アッセイ成分の一方または他方がマトリックスに係留されるのを可能とするドメインを加える融合蛋白質を供することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/バイオマーカー融合蛋白質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/結合パートナーをグルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させることができ、次いで、これをテスト化合物またはテスト化合物と非-吸着バイオマーカーまたはその結合パートナーいずれかと組み合わせ、混合物を、複合体形成に導く条件 (例えば、生理学的条件) 下でインキュベートする。インキュベーションに続き、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、いずれかの未結合アッセイ成分を除去し、固定化された複合体を、例えば、前記したように直接的にまたは間接的に評価する。別法として、複合体をマトリックスから解離させ、標準的な技術を用いてバイオマーカー結合または活性のレベルを決定することができる。

10

【0160】

蛋白質をマトリックスに固定化するための他の技術もまた本発明のスクリーニングアッセイで用いることもできる。例えば、ビオチンおよびストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用して、バイオマーカーまたはバイオマーカー結合パートナーいずれかを固定化することができる。ビオチニル化バイオマーカー蛋白質または標的分子は、当該分野で知られた技術 (例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL) を用いてビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製し、ストレプトアビジン-被覆96ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定化することができる。ある実施形態において、蛋白質-固定化表面を予め調製し、貯蔵することができる。

20

【0161】

アッセイを行うためには、固定化されたアッセイ成分の対応するパートナーをテスト化合物の有りまたは無しにて、被覆された表面に曝露する。反応が完了した後、未反応アッセイ成分を (例えば、洗浄によって) 除去し、いずれかの形成された複合体は固体表面に固定化されたままであろう。固体表面に係留された複合体の検出は、多数の方法で達成することができる。非-固定化成分を予め標識する場合、表面に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。非-固定化成分が予め標識されない場合、間接的標識を用いて、例えば、最初に非-固定化種に特異的な標識された抗体を用いて表面に係留された複合体を検出することができる (抗体は、今度は、直接的に標識するか、または例えば、標識された抗-Ig抗体で間接的に標識することができる)。反応成分の添加の順序に応じて、複合体形成を変調する (阻害または増強する)、または予め形成された複合体を破壊するテスト化合物を検出することができる。

30

【0162】

本発明の別の実施形態において、均一アッセイを用いることができる。これは、典型的には、テスト化合物の存在下または非存在下で液相中で行われる前記したものに類似の反応である。次いで、形成された複合体を未反応成分から分離し、形成された複合体の量を測定する。不均一アッセイシステムで述べたように、反応体の液相への付加の順序は、いずれのテスト化合物が複合体形成を変調する (阻害または増強する) のか、いずれが予め形成された複合体を破壊するのかについての情報を得ることができる。

40

【0163】

そのような均一アッセイにおいては、反応生成物は、限定されるものではないが、分画遠心法、クロマトグラフィー、電気泳動および免疫沈澱を含めた多数の標準的技術のいずれかによって未反応アッセイ成分から分離することができる。分画遠心法においては、分子の複合体は、それらの異なるサイズおよび密度に基づく複合体の異なる沈積平衡により一連の遠心工程を通じて未複合体化分子から分離することができる (例えば、Rivas, G., and Minton, A. P., Trends Biochem Sci 1993 Aug; 18 (8): 284-7 参照)。また、標準的なクロマトグラフィー技術を利用して、未複合体化のものから複合体化分子を分離することもできる。例え

50

ば、ゲル濾過クロマトグラフィーはサイズに基づき、かつカラムフォーマットにて適当なゲル濾過樹脂の利用を通じて分子を分離し、例えば、比較的大きな複合体は比較的小さな未複合体化成分から分離することができる。同様に、未複合体化分子と比較した複合体の比較異なる電荷特性を開発して、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂の使用を介して残りの個々の反応体から複合体を異なって分離することができる。そのような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者によく知られている（例えば、Heegaard, 1998, J. Mol. Recognit. 11:141-148; Hage and Tweed, 1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 699:499-525参照）。また、ゲル電気泳動を使用して、未結合種から複合体化分子を分離することもできる（例えば、Ausubel et al. (編), In: Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, New York, 1999参照）。この技術においては、蛋白質または核酸複合体を、例えば、サイズまたは電荷に基づいて分離する。電気泳動プロセスの間に結合相互作用を維持するためには、還元剤の非存在下での非変性ゲルが典型的には好ましいが、特別な相互作用体に適当な条件は当業者によく知られているであろう。免疫沈澱は溶液から蛋白質-蛋白質複合体の単離のために利用されるもう1つの普通の技術である（例えば、Ausubel et al. (編), In: Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, New York, 1999参照）。この技術において、結合分子の1つに特異的な抗体に結合する全ての蛋白質は、遠心によって容易に収集することができるポリマービーズに抗体を結合体化することによって溶液から沈殿させる。結合したアッセイ成分は（特異的蛋白質分解事象、あるいは複合体における蛋白質-蛋白質相互作用を乱さないであろう当該分野でよく知られた他の技術を介して）ビーズから放出され、第二の免疫沈澱工程が行われ、このとき、対応して異なる相互作用アッセイ成分に特異的な抗体を利用する。このようにして、形成された複合体のみがビーズに結合したままであるはずである。テスト化合物の存在下および非存在下の双方における複合体形成の変動を比較することができ、かくして、バイオマーカーおよびその結合パートナーの間の相互作用を変調する化合物の能力についての情報を供することができる。

【0164】

また、さらなる試料操作なくして、均一または不均一アッセイシステムにおける、バイオマーカーおよびその天然結合パートナーおよび／またはテスト化合物の間の相互作用の直接的検出のための方法は本発明の範囲内のものである。例えば、蛍光エネルギー移動の技術を利用することができる（例えば、Lakowicz et al., 米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulos et al., 米国特許第4,868,103号参照）。一般には、この技術は、その発光された蛍光エネルギーが、今度は、吸収されたエネルギーにより蛍光を発することができる第二の「アクセプター」分子（例えば、バイオマーカーまたはテスト化合物）上の蛍光標識によって吸収されるような、第一の「ドナー」分子（例えば、バイオマーカーまたはテスト化合物）上へのフルオロフォア標識の付加を含む。別法として、「ドナー」蛋白質分子は、単に、トリプトファン残基の天然蛍光エネルギーを利用することができる。「アクセプター」分子標識が「ドナー」のそれと区別することができるように、異なる波長の光を発する標識が選択される。標識の間のエネルギー移動の効率は分子を分離する距離に関連するため、分子の間の空間的關係を評価することができる。結合が分子の間で起こる状況において、アッセイにおける「アクセプター」分子の蛍光発光は最大とすべきである。FET結合事象は、便宜には、（例えば、フルオリメーターを用いて）当該分野でよく知られた標準的フルオロメーター検出手段を介して測定することができる。予め形成された複合体中の種の1つの参画を増強し、または邪魔するテスト物質の結果、バックグラウンドのそれに対するシグナル変種の創製がもたらされる。このようにして、バイオマーカーおよびその結合パートナーの間の相互作用を変調するテスト物質を制御されたアッセイにおいて同定することができる。

【0165】

もう1つの実施形態において、バイオマーカー発現のモジュレーターがある方法で同定され、そこでは、細胞を候補化合物と接触させ、細胞中のバイオマーカーに対応するmRNAまたは蛋白質の発現が測定される。候補化合物の存在下でのmRNAまたは蛋白質の発現のレベルを、候補化合物の非存在下におけるmRNAまたは蛋白質の発現のレベルと比較する。次いで、候補化合物を、この比較に基づいてバイオマーカー発現のモジュレーターとして同定することができる。例えば、バイオマーカーmRNAまたは蛋白質の発現がその不存在におけるよりも候補化合物の存在下で大きい（統計学的に有意に大きい）場合、候補化合物はバイオマーカーmRNAまたは蛋白質発現のスティミュレーターとして同定される。逆に、バイオマーカーmRNAまたは蛋白質の発現がその不存在におけるよりも候補化合物の存在下で小さい（統計学的に有意に小さい）場合、候補化合物はバイオマーカーmRNAまたは蛋白質発現の阻害剤として同定される。細胞におけるバイオマーカーmRNAまたは蛋白質発現のレベルは、バイオマーカーmRNAまたは蛋白質を検出するための本明細書中に記載された方法によって測定することができる。

10

【0166】

もう1つの態様において、本発明は、本明細書中に記載されたアッセイの2以上の組合せに関する。例えば、変調剤は、細胞ベースの、または無細胞アッセイを用いて同定することができる。バイオマーカー蛋白質の活性を変調する剤の能力は、さらに、例えば、本明細書中に記載したもののような、癌、細胞形質転換および／または腫瘍形成のための全動物モデルにおいて、イン・ビボにてさらに確認することができる。癌のさらなる動物ベースのモデルは当該分野でよく知られており（Animal Models of Cancer Predisposition Syndromes, Hiai, Hand Hino, O (編) 1999, Progress in Experimental Tumor Research Vol. 35; Clarke AR Carcinogenesis (2000) 21:435-41）、例えば、カルシノーゲン誘導腫瘍（Rithidech, K et al. Mutat Res (1999) 428:33-39; Miller, ML et al. Environ Mol Mutagen (2000) 35:319-327）、腫瘍細胞の動物への注射および／または移植、ならびに成長調節遺伝子、例えば、癌遺伝子（例えば、ras）（Arbeit, JM et al. Am J Pathol (1993) 142:1187-1197; Sinn, E et al. Cell (1987) 49:465-475; Thorgeirsson, SS et al. Toxicol Lett (2000) 112-113:553-555）および腫瘍抑制遺伝子（例えば、p53）（Vooijs, M et al. Oncogene (1999) 18:5293-5303; Clark AR Cancer Metast Rev (1995) 14:125-148; Kumar, TR et al. J Intern Med (1995) 238:233-238; Donehower, LA et al. (1992) Nature 356:215-221）において突然変異を担う動物を含む。さらに、実験モデルシステムは、例えば、卵巣癌（Hamilton, TC et al. Semin Oncol (1984) 11:285-298; Rahman, NA et al. Mol Cell Endocrinol (1998) 145:167-174; Beamer, WG et al. Toxicol Pathol (1998) 26:704-710）、胃癌（Thompson, J et al. Int J Cancer (2000) 86:863-869; Fodde, R et al. Cytogenet Cell Genet (1999) 86:105-111）、乳癌（Li, M et al. Oncogene (2000) 19:1010-1019; Green, JE et al. Oncogene (2000) 19:1020-1027）、メラノーマ（Satyamoorthy, K et al. Cancer Metast Rev (1999) 18:401-405）、および前立腺癌（Shirai, T et al. Mutat Res (2000) 462:

20

30

40

50

219-226; Bostwick, DG et al. Prostate (2000) 43: 286-294) の研究で利用できる。例えば、Chin L. et al (1999) Nature 400 (6743): 468-72 に記載された動物モデルを本発明の方法で用いることもできる。

【0167】

本発明は、さらに、前記したスクリーニングアッセイによって同定される新規な剤に関する。従って、適当な動物モデルにおいて本明細書中で記載したように同定された剤をさらに用いることは本発明の範囲内のものである。例えば、本明細書中に記載したように同定された剤（例えば、バイオマーカー変調剤、低分子、アンチセンスバイオマーカー核酸分子、リボザイム、バイオマーカー特異的抗体、そのフラグメント、バイオマーカー蛋白質、バイオマーカー核酸分子、RNA 干渉因子、例えば、本発明のバイオマーカーを標的化する siRNA 分子、またはバイオマーカー結合パートナー）を動物モデルで用いて、そのような剤での処理の効率、毒性、または副作用を測定することができる。別法として、本明細書中に記載したように同定された剤を動物モデルで用いて、そのような剤の作用機序を決定することができる。さらに、本発明は、本明細書中で記載された処置のための前記スクリーニングアッセイによって同定された新規な剤の使用に関する。1つの実施形態において、本発明は、治療が起こるように、膵臓癌、例えば、膵臓腺癌のモジュレーターとして同定された化合物を被験体に投与することを含む膵臓癌を有する被験体を治療する方法をその要旨とする。

【0168】

III. 使用の方法

本発明の組成物、キットおよび方法はとりわけ以下の使用を有する：

- 1) 被験体が癌、膵臓腺癌に悩んでいるか否かの評価；
- 2) ヒト被験体における癌、例えば、膵臓腺癌の段階の評価；
- 3) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌のグレードの評価；
- 4) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌の良性または悪性の性質の評価；
- 5) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌の転移能力の評価；
- 6) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌に関連する新生物の組織学的タイプの評価；
- 7) 癌、例えば、膵臓腺癌を治療するのに有用な抗体、抗体フラグメント、または抗体誘導体の作成、および／または被験体が癌に悩んでいるか否かの評価；
- 8) 癌、例えば、膵臓腺癌、細胞の存在の評価；
- 9) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌を阻害するための1以上のテスト化合物の効率の評価；
- 10) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌を阻害するための療法の効率の評価；
- 11) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌の進行のモニタリング；
- 12) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌を阻害する組成物または療法の選択；
- 13) 癌、例えば、膵臓腺癌に悩む被験体の治療；
- 14) 被験体における癌、例えば、膵臓腺癌の阻害；
- 15) テスト化合物の癌腫形成能力の評価；
- 16) 癌を発症する危険性がある被験体における癌、例えば、膵臓腺癌の開始の予防；
- 17) 膵臓腺癌における特異的突然変異の存在または特異的シグナリング経路の活性化の評価；および

18) 膵臓腺癌における特異的シグナリング経路に標的化された治療剤のインパクトの測定。

【0169】

本発明は、正常な（すなわち、非一癌性）膵臓細胞におけるバイオマーカーのその量および／または活性と比較した、膵臓癌細胞において変調されるバイオマーカーを同定する方法を提供する。試料、例えば、血液、例えば、血清、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵液を含有する試料中のこれらのバイオマーカーの1以上の変調された量および／または活性は、ここに、組織の癌性状態と相関する。本発明は、膵臓細胞（例えば、非一ヒト培養

非一ヒト細胞、およびイン・ビボ細胞から得られた細胞)の癌性状態を評価し、ならびに膵臓腺癌に悩む被験体を治療するための組成物、キットおよび方法を提供する。

【0170】

本発明は、かくして、被験体が癌に悩んでいるか、または癌を発症する危険性があるかを評価する方法を含む。この方法は、被験体試料中のバイオマーカーの、突然変異、例えば、バイオマーカーの活性に影響する突然変異(例えば、置換、欠失、または付加突然変異)の量、構造、および/または活性、例えば、突然変異の存在、不存在、コピー数、発現レベル、蛋白質レベル、蛋白質活性、存在、および/またはメチル化状態を正常なレベルと比較することを含む。被験体試料中のバイオマーカーの量、構造、または活性、および正常なレベルの間の有意な差は、患者が癌に悩んでいることを示す。本発明は、癌試料におけるMCR内のバイオマーカーの発現のレベル、またはMCRのコピー数を、正常な対照試料におけるMCR内のバイオマーカーの発現のレベルまたはMCRのコピー数と比較することによって、被験体が癌に悩んでいるか、または癌を発症する危険性があるかを評価する方法も提供する。被験体試料におけるMCR内のバイオマーカーの発現のレベルまたはMCRのコピー数の間の有意な差は、被験体が癌に悩んでいる指標である。MCRは表2に列挙されたものよりなる群から選択される。

10

【0171】

本明細書中に記載されたように同定されたいずれかのバイオマーカーまたはバイオマーカーの組合せ、または表2に列挙されたいずれかのMCRまたはMCRの組合せは、本発明の組成物、キットおよび方法で用いることができる。一般に、癌細胞におけるバイオマーカーまたはMCRの量、例えば、発現のレベルまたはコピー数および/または活性と、正常な細胞における同一バイオマーカーの量、例えば、発現のレベルまたはコピー数、および/または活性との間の差ができる限り大きいバイオマーカーを用いるのが好ましい。この差はバイオマーカーの量および/または活性を評価するための方法の検出をできる限り小さく制限できるが、該差は評価方法の標準誤差よりも少なくとも大きく、好ましくは正常な組織における同一バイオマーカーの量、例えば、発現のレベルまたはコピー数、および/または活性よりも少なくとも2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-、10-、15-、20-、25-、100-、500-、1000-倍以上の差であるのが好ましい。

20

【0172】

本発明のバイオマーカーの1以上を用いてさらなる被験体試料をルーチン的にスクリーニングすることによって、ある種のバイオマーカーは、具体的膵臓癌、例えば、膵臓腺癌、ならびにその例が限定されるものではないが、メラノーマ、乳癌、気管支癌、結直腸癌、前立腺癌、肺癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳または中枢神経系癌、末梢神経系癌、食道癌、頸癌、子宮または子宮内膜癌、口腔または咽頭の癌、肝臓癌、腎臓癌、精巣癌、単管癌、小腸または虫垂癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉種、軟骨肉腫、血液学的組織の癌などを含む他の癌を含めた種々のタイプの癌において変化した量、構造および/または活性を有するのが認識されることは理解される。

30

【0173】

例えば、本発明のバイオマーカーのいくつかは、癌、例えば、膵臓腺癌のいくらか、すなわち、10%、20%、30%、または40%、またはほとんど(すなわち、50%以上)、または事実的に全て(すなわち、80%以上)において変化した量、構造および/または活性を有することが確認されるであろう。さらに、本発明のバイオマーカーのあるものは種々の組織学的サブタイプの癌に関連付けられることが確認されるであろう。

40

【0174】

加えて、本発明のバイオマーカーの変化した量、構造および/または活性、またはMCRの変化した発現またはコピー数につき非常に多数の対照試料が評価され、試料がそれから得られた個々の被験体の結果が相関するため、バイオマーカーは本発明のバイオマーカーのあるものの変化した量、構造および/または活性、またはMCRの変化した発現またはコピー数が悪性癌と強く相関し、および本発明の他のバイオマーカーの変化した発現は

50

両性腫瘍またはプレ悪性状態と強く相関することも確認されるであろう。かくして、本発明の組成物、キット、および方法は、被験体における癌の段階、グレード、組織学的タイプ、および良性／プレ悪性／悪性性質の1以上を特徴付けるのに有用である。

【0175】

本発明の組成物、キットおよび方法を、被験体において癌の段階、グレード、組織学的タイプ、および良性／プレ悪性／悪性性質の1以上を特徴付けるのに用いる場合、本発明のバイオマーカーまたはMCR、またはバイオマーカーまたはMCRのパネルは、陽性の結果が、対応する段階、グレード、組織学的タイプ、または良性／プレ悪性／悪性性質の、癌に悩む被験体の少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約40%、60%、または80%、より好ましくは実質的全てにおいて得られるように選択されるのが好ましい。好ましくは、本発明のバイオマーカーまたはバイオマーカーのパネルは、約10%よりも大きなPPV（陽性予測値）が（より好ましくは、99.5%よりも大きなアッセイ特異性とカップリングされて）一般的集団で得られるように選択される。

10

【0176】

本発明の複数のバイオマーカーまたはMCRが本発明の組成物、キット、および方法で用いられる場合、各バイオマーカーの量、構造および／または活性、または発現のレベルまたはコピー数を、単一の反応混合物（すなわち、各バイオマーカーにつき異なる蛍光プローブのような試薬を用いる）またはバイオマーカーまたはMCRの1以上に対応する個々の反応混合物のいずれかにおいて、同一タイプの非一癌性試料における複数のバイオマーカーの各々の正常な量、構造および／または活性、または発現のレベルまたはコピー数と比較することができる。

20

【0177】

1つの実施形態において、対応する正常なレベルに対して、試料中の複数のバイオマーカーのうち1を超えたものの有意に変化した量、構造および／または活性、またはMCRの1以上の有意に変化したコピー数は、被験体が癌に悩んでいることの指標である。例えば、対応する正常なレベルまたはコピー数に対する、複数のバイオマーカーまたはMCRの各々の試料中の有意に低いコピー数は、被験体が癌に悩んでいることの指標である。さらにもう1つの実施形態において、対応する正常なレベルに対する試料中の1以上のバイオマーカーまたはMCRの有意に増強されたコピー数、および1以上のバイオマーカーまたはMCRの有意により低いレベルの発現またはコピー数は、被験体が癌に悩んでいることの指標である。また、例えば、対応する正常なコピー数に対する、複数のバイオマーカーまたはMCRの各々の試料中での有意に増強されたコピー数は、被験体が癌に悩んでいる指標である。なおもう1つの実施形態において、対応する正常レベルに対する、試料中の1以上のバイオマーカーまたはMCRの有意に増強されたコピー数、および1以上のバイオマーカーまたはMCRの有意に低いコピー数は被験体が癌に悩んでいる指標である。

30

【0178】

複数のバイオマーカーまたはMCRを用いる場合、2、3、4、5、8、10、12、15、20、30または50以上の個々のバイオマーカーまたはMCRを用い、または同定するのが好ましく、ここに、より少数のバイオマーカーまたはMCRが好ましい。

【0179】

少数のバイオマーカーのみが、例えば、膵臓腺癌と関連付けられることが知られている（例えば、p16^{INK4A}およびTP53腫瘍抑制剤およびMYC、KRAS2およびAKT2癌遺伝子）。これらのバイオマーカー、または癌の他のタイプと関連付けられることが知られている他のバイオマーカーを、例えば、バイオマーカーのパネルにおいて、本発明の1以上のバイオマーカーと一緒に用いることができる。加えて、頻繁な利得が膵臓癌において3q、5p、7p、8q、11q、12p、17qおよび20qにマッピングされており、喪失は3p、4q、6q、8p、9p、10q、12q、13q、17p、18qおよび21qおよび22qにマッピングされている。いくつかの場合において、これらの遺伝子内に存在する確証された癌遺伝子および腫瘍抑制剤遺伝子が同定されており、MYC（8q24）、p16^{INK4A}（9p21）、p53（17p

40

50

13)、SMAD4(18q21)およびAKT2(19q13)を含む。癌遺伝子、腫瘍サプレッサー遺伝子、成長因子様遺伝子、プロテアーゼ様遺伝子、および蛋白質キナーゼ様遺伝子のようなあるタイプの遺伝子は、しばしば、種々のタイプの癌の発生に関係することはよく知られている。かくして、本発明のバイオマーカーの中で、公知の癌遺伝子および腫瘍サプレッサー遺伝子によってコードされる公知の蛋白質に似た蛋白質に対応するもの、および成長因子、プロテアーゼ、および蛋白質キナーゼに似た蛋白質に対応するものの使用が好ましい。

【0180】

本発明の組成物、キットおよび方法は、癌を発症する増大した危険性を有する被験体、およびそれらの医療アドバイザーに対して特に有用であろうことは認識される。癌を発症する増大した危険性を有すると認められた被験体は、例えば、癌の家族性履歴を有する被験体、突然変異体癌遺伝子（すなわち、少なくとも1つの対立遺伝子）を有すると同定された被験体、および進行する年齢の被験体を含む。

10

【0181】

正常な（すなわち、非一癌性）ヒト組織におけるバイオマーカーの変化、例えば、コピー数、量、構造および／または活性は、種々の方法で評価することができる。1つの実施形態において、発現またはコピー数のレベルは、非一癌性であるように見える細胞の一部においてバイオマーカーまたはMCRの発現のレベルおよび／またはコピー数を評価することによって、および癌性であることが疑われる細胞の一部において発現のレベルまたはコピー数とこの正常な発現のレベルまたはコピー数とを比較することによって評価される。例えば、腹腔鏡検査または他の医療手法が器官の一部で腫瘍の存在を明らかにする場合、バイオマーカーまたはMCRの正常な発現レベルまたはコピー数は、器官の非一患部を用いて評価することができ、この正常な発現のレベルまたはコピー数は、器官の患部（すなわち、腫瘍）における同一バイオマーカーの発現のレベルまたはコピー数と比較することができる。別法として、かつ特に、さらなる情報が、本明細書中に記載された方法のルーチンの実行の結果として利用可能となるため、本発明のバイオマーカーまたはMCRの「正常な」コピー数、量、構造および／または活性についての集団平均値を用いることができる。他の実施形態において、バイオマーカーまたはMCRの「正常な」コピー数、量、構造および／または活性は、非一癌一罹患被験体から得られた被験体試料において、被験体における癌の疑われる開始前の被験体から得られた被験体試料からの、編纂された被験体試料からの、バイオマーカーまたはMCRのコピー数、量、構造および／または活性を評価することによって決定することができる。

20

30

【0182】

本発明は、試料（例えば、編纂された組織試料、または被験体から得られた試料）において癌細胞の存在を評価するための組成物、キットおよび方法を含む。これらの組成物、キットおよび方法は、必要であれば、組成物、キットおよび方法があるタイプの試料で用いるために適合させる以外は、前記したのと実質的に同一である。例えば、試料がパラフィン化された編纂されたヒト組織試料である場合、本発明の組成物において、本発明のキットにおいて、または用いる方法において、化合物の比率を調整する必要がある。そのような方法は当該分野でよく知られており、当業者の技量内のものである。

40

【0183】

本発明は、かくして、（例えば、被験体試料のような試料中の）癌細胞の存在を評価するためのキットを含む。該キットは、例えば、本発明のバイオマーカーまたはMCRに対応する核酸またはポリペプチドと特異的に結合する本発明のバイオマーカーまたはMCRを同定することができる1以上の試薬を含むことができる。本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドと結合するための適当な試薬は抗体、抗体誘導體、抗体フラグメントなどを含む。核酸（例えば、ゲノミックDNA、mRNA、スプライシングされたmRNA、cDNAなど）と結合するための適当な試薬は相補性核酸を含む。例えば、核酸試薬は基材に固定された（標識されたまたは標識されていない）オリゴヌクレオチド、基材に結合していない標識されたオリゴヌクレオチド、PCRプライマーの対、分子ビーコンプ

50

ローブなどを含むことができる。

【0184】

本発明のキットは、所望により、本発明の方法を実行するのに有用なさらなる成分を含むことができる。その例として、キットは相補的核酸にアニールするのに、またはそれが特異的に結合する蛋白質で抗体に結合するのに適した流体（例えば、SSC緩衝液）、1以上の試料区画、本発明の方法の実行を記載する指令資料、正常な細胞の試料、癌細胞の試料などを含むことができる。

【0185】

本発明のキットは、バイオマーカーの蛋白質レベルまたは蛋白質活性を測定するのに有用な試薬を含むことができる。もう1つの実施形態において、本発明のキットはバイオマーカーのメチル化状態を測定するための試薬を含むことができるか、あるいはバイオマーカーの構造の変化、例えば、突然変異の存在を測定するための試薬を含むことができる。

【0186】

また、本発明は、本発明の方法およびキットで有用な抗体を生産する単離されたハイブリドーマの製法も含む。本発明のバイオマーカーに対応する蛋白質は（例えば、その中でそれが発現する細胞からの精製によって、または公知の方法を用いるイン・ビボまたはイン・ビトロでの蛋白質をコードする核酸の転写および翻訳によって）単離することができ、脊椎動物、好ましくはマウス、ラット、ウサギまたはヒツジのような哺乳動物を単離された蛋白質を用いて免疫化する。脊椎動物は、該脊椎動物が蛋白質に対して頑強な免疫応答を呈するように、所望により（かつ好ましくは）単離された蛋白質で少なくともさらに1回免疫化することもできる。脾臓細胞は免疫化された脊椎動物から単離し、不滅化細胞系と融合させて、当該分野でよく知られた種々の方法のいずれかを用いてハイブリドーマを形成する。次いで、このようにして形成されたハイブリドーマを標準的な方法を用いてスクリーニングして、蛋白質に特異的に結合する抗体を生じる1以上のハイブリドーマを同定する。また、本発明はこの方法によって作成されたハイブリドーマおよびそのようなハイブリドーマを用いて作成された抗体も含む。

【0187】

また、本発明は、癌細胞を阻害するテスト化合物の効率を評価する方法も含む。前記したように、本発明のバイオマーカーの量、構造および／または活性、または本発明のMCRの発現のレベル、またはコピー数の差は、細胞の癌性状態と相関する。本発明のバイオマーカーのあるものの量、例えば、発現またはコピー数、構造および／または活性、あるいはMCRの発現またはコピー数のレベルの変化は、細胞の癌性状態に由来する量であることは認識されるが、該量の変化は癌性状態を誘導し、維持し、および促進し得ることが同様に認識される。かくして、被験体において癌を阻害する化合物は変化、例えば、そのバイオマーカーについての正常なレベル（例えば、非癌性細胞におけるバイオマーカーについての量、例えば、発現、および／または活性）により近いレベルに対する本発明のバイオマーカーの1以上の発現および／または活性の変化を引き起こし得る。

【0188】

この方法は、かくして、第一の細胞試料における、テスト化合物の存在下で維持されたバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性を、第二の細胞試料における、かつテスト化合物の不存在したにおいて維持されたバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性と比較することを含む。バイオマーカー、例えば、癌において減少することが示されたバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の有意な増加、バイオマーカー、例えば、癌において増加することが示されたバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の有意な減少は、テスト化合物が癌を阻害する指標である。細胞試料は、例えば、被験体から得られた正常な細胞の単一試料のアリコート、被験体から得られた正常な細胞のプールされた試料、正常な細胞系の細胞、癌の単一試料のアリコート、被験体から得られた細胞、癌のプールされた試料、被験体から得られた細胞、癌細胞系の細胞、癌の動物モデルからの細胞などであり得る。1つの実施形態において、試料は被験体から得られた癌細胞であって、種々の癌を阻害するのに効果的であることが

知られている複数の化合物をテストして、被験体において癌を最良に阻害するようである化合物を同定する。

【0189】

この方法を同様に用いて、療法、例えば、化学療法、放射線療法、外科的処置、または被験体においた癌を阻害するようないずれかの他の治療的アプローチの効率を評価することができる。この方法においては、試料の対（1つは療法に付され、他方は療法に付されない）における本発明の1以上のバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性を評価する。テスト化合物の効率を評価する方法に関しては、もし療法がバイオマーカー、例えば、癌において増加することが示されているバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の有意な減少を誘導し、バイオマーカー、例えば、癌において増加することが示されているバイオマーカーの誘導をブロックするならば、あるいはもし療法がバイオマーカー、例えば、癌で減少することが示されているバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の有意な増強を誘導するならば、該療法は癌を阻害するのに効果的である。前記したように、もし選択された被験体からの試料をこの方法で用いるならば、別の療法をイン・ビトロで評価して、被験体において癌を阻害するのに効果的であるように最も見える療法を選択することができる。

10

【0190】

この方法を同様に用いて、被験体において癌の進行をモニターすることができ、ここに、もし被験体における試料がバイオマーカー、例えば、癌において増大することが示されているバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の有意な減少を有し、またはバイオマーカー、例えば、癌において増大することが示されているバイオマーカーの誘導、または癌の進行の間に、例えば、第一の時点においておよびその後の時点においてバイオマーカー、例えば、癌で減少することが示されているバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の有意な増強をブロックするならば、癌は改善されている。なおもう1つの実施形態において、第一の時点およびその後の時点の間に、被験体は治療、例えば、化学療法、放射線療法、外科的処置、癌を阻害するのに有用であるいずれかの他の治療的アプローチを受けており、完全な治療を完了しており、あるいは緩解している。

20

【0191】

本明細書中に記載するように、被験体における癌は、癌において増大することが示されている1以上のバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の増加、および／または癌において減少することが示されている1以上のバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の減少に関連付けられる。前記したように、量、例えば、発現、および／または活性数のこれらの変化のいくつかが癌の発生に由来するが、これらの変化の他のものは癌細胞の癌性状態を誘導し、維持し、および促進する。かくして、1以上のバイオマーカー、例えば、癌で増加することが示されているバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の増加によって特徴付けられる癌は、それらのバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性を阻害することによって阻害することができる。同様に、1以上のバイオマーカー、例えば、癌で減少することが示されているバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性の減少によって特徴付けられる癌は、これらのバイオマーカーの量、例えば、発現、および／または活性を増強させることによって阻害することができる。

30

40

【0192】

バイオマーカー、例えば、癌で増加することが示されているバイオマーカーの量および／または活性は当該分野で一般的に知られた多数の方法で阻害することができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを癌細胞に供して、バイオマーカーの転写、翻訳、または双方を阻害することができる。バイオマーカー、例えば、癌で増加することが示されているバイオマーカーに標的化される、RNA干渉因子、例えば、siRNA分子を癌細胞に供して、例えば、標的バイオマーカーのメッセンジャーRNA（mRNA）の分解または特異的転写後遺伝子スプライシング（PTGS）を介して標的バイオマーカーの発現

50

を阻害することができる。別法として、抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメント、例えば、抗原に結合することができるフラグメントをコードし、かつ適当なプロモーターまたはレギュレーター領域に作動可能に連結されたポリヌクレオチドを細胞に供して、バイオマーカーに対応する蛋白質の機能、量、および／または活性を阻害するであろう細胞内抗体を生じさせることができる。結合体化された抗体またはそのフラグメント、例えば、化学標識された抗体、放射性標識抗体、または本発明のバイオマーカーを標的とするイムノトキシンを投与して、癌を治療し、予防しまたは阻害することもできる。

【0193】

また、低分子を用いて、バイオマーカー、例えば、癌で増大することが示されているバイオマーカーの発現および／または活性を変調し、例えば、阻害することもできる。1つの実施形態において、低分子は本発明のバイオマーカーおよび標的分子またはリガンドの間の蛋白質-蛋白質相互作用を破壊し、それにより、バイオマーカーの活性を変調し、例えば、増加させまたは減少させるように機能する。

【0194】

本明細書中に記載された方法を用い、特に、細胞膜を横切ることができるのに十分に小さい分子を含めた種々の分子をスクリーニングして、バイオマーカーの量および／または活性を阻害する分子を同定することができる。そのように同定された化合物を被験体に供して、被験体の癌細胞におけるバイオマーカーの量および／または活性を阻害することができる。

【0195】

バイオマーカー、例えば、癌で減少することが示されているバイオマーカーの量および／または活性は、当該分野で一般的に知られた多数の方法で増強させることができる。例えば、バイオマーカーをコードし、かつ適当なプロモーター／レギュレーター領域に操作可能に連結されたポリヌクレオチドを被験体の細胞に供して、その中のバイオマーカーに対応する蛋白質（およびmRNA）の増強された発現および／または活性を誘導することができる。別法として、もし蛋白質が細胞膜を横切り、それ自体を細胞膜に挿入することができるか、または正常に分泌された蛋白質であるならば、蛋白質の量および／または活性は被験体における癌細胞に蛋白質を（例えば、直接的にまたは血流によって）供することによって増強することができる。また、低分子を用いて、バイオマーカー、例えば、癌で減少することが示されているバイオマーカーの発現または活性を変調、例えば、増加させることもできる。さらに、もう1つの実施形態において、本発明のバイオマーカーのモジュレーター、例えば、低分子を用いて、例えば、サイレントとされた遺伝子、例えば、腫瘍抑制剤を再度発現させて、癌を治療または予防することができる。例えば、そのようなモジュレーターはDNA結合エレメントまたはメチルトランスフェラーゼと干渉することができる。

【0196】

前記したように、ヒト細胞の癌性状態は本発明のバイオマーカーの量および／または活性の変化に相関する。かくして、癌で増加することが示されているバイオマーカーの1以上の増大した発現または活性、癌で減少することが示されているバイオマーカーの1以上の減少した量および／または活性を誘導する化合物は細胞癌形成を誘導することができる。また、本発明は、テスト化合物のヒト細胞癌形成能力を評価する方法も含む。この方法は、テスト化合物の存在下および非存在下でヒト細胞の別々のアリコートを維持することを含む。アリコートの各々における本発明のバイオマーカーの発現または活性を比較する。（テスト化合物の非存在下で維持されたアリコートに対する）テスト化合物の存在下で維持されたアリコートにおける、バイオマーカー、例えば、癌で増加することが示されているバイオマーカーの量および／または活性の有意な増加、またはバイオマーカー、例えば、癌で減少することが示されているバイオマーカーの量および／または活性の有意な減少は、テスト化合物がヒト細胞癌形成能力を保有する指標である。種々のテスト化合物の相対的癌形成能力は、関連バイオマーカーの量および／または活性の増強または阻害の程度を比較することによって、それに対して量および／または活性が増強され、または阻害

されるバイオマーカーの数を比較することによって、あるいは双方を比較することによって評価することができる。

【0197】

(I V. 単離された核酸分子)

本発明の1つの態様は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの部分をコードする核酸を含めた、本発明のバイオマーカーに対応する単離された核酸分子に関する。本発明の核酸分子は、ここに同定されたM C Rに存在する核酸分子を含む。本発明の単離された核酸分子は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする核酸分子、およびそのような核酸分子のフラグメント、例えば、核酸分子の増幅または突然変異のためのP C Rプライマーとして用いられるのに適したものを含めた、本発明のバイオマーカーに対応する核酸分子を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして用いるのに十分な核酸分子も含む。本明細書中で用いるように、用語「核酸分子」は、D N A分子（例えば、c D N AまたはゲノミックD N A）およびR N A分子（例えば、m R N A）およびヌクレオチドアナログを用いて生じさせたD N AまたはR N Aのアナログを含むことを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖とすることができるが、好ましくは、二本鎖D N Aである。

10

【0198】

「単離された」核酸分子は、核酸分子の天然源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。好ましくは、「単離された」核酸分子は、それから核酸分子が由来する生物のゲノミックD N Aにおいて核酸を天然で近接挟む（すなわち、核酸の5'および3'末端に位置した配列）配列（好ましくは蛋白質—コーディング配列）を含まない。例えば、種々の実施形態において、単離された核酸分子は、それから核酸が由来する細胞のゲノミックD N Aにおいて核酸分子を天然で近接挟む約5 k B、4 k B、3 k B、2 k B、1 k B、0.5 k Bまたは0.1 k B未満のヌクレオチド配列を含むことができる。さらに、c D N A分子のような「単離された」核酸分子は、組換え技術によって生産された場合に他の細胞物質または培養基を実質的に含まないようにでき、あるいは化学的に合成した場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まないようにできる。

20

【0199】

本発明の核酸分子、例えば、表1または2に列举されたバイオマーカーに対応する蛋白質をコードする核酸分子は、標準的な分子生物学技術、および本明細書中に記載されたデータベース記録中の配列情報を用いて単離することができる。そのような核酸配列の全てまたは一部を用い、本発明の核酸分子は、（例えば、Sambrook et al. 編, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されている）標準的なハイブリダイゼーションおよびクロニング技術を用いて単離することができる。

30

【0200】

本発明の核酸分子は、標準的なP C R増幅技術に従って、c D N A、m R N A、またはゲノミックD N Aを鋳型として、および適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅することができる。そのように増幅された核酸分子を適当なベクターにクローン化し、D N A配列分析によって特徴付けることができる。さらに、本発明の核酸分子の全てまたは一部に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動D N A合成器を用いて標準的な合成技術によって調製することができる。

40

【0201】

もう1つの好ましい実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、本発明のバイオマーカーに対応する核酸のヌクレオチド配列に、または本発明のバイオマーカーに対応する蛋白質をコードする核酸のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子を含む。与えられたヌクレオチド配列に対して相補的な核酸分子は、与えられたヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができ、それにより、安定なデュプレックスを形成することができる与えられたヌクレオチド配列に十分に相補的なものである。

50

【0202】

さらに、本発明の核酸分子は核酸配列の一部のみを含むことができ、ここに、全長核酸配列は本発明のバイオマーカーを含み、あるいは本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする。そのような核酸分子は、例えば、プローブまたはプライマーとして用いることができる。該プローブ／プライマーは、典型的には、1以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして用いられる。該オリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、本発明の核酸の少なくとも約7、好ましくは約15、より好ましくは約25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、または400以上の連続ヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

10

【0203】

本発明の核酸分子の配列に基づくプローブを用いて、本発明の1以上のバイオマーカーに対応する転写体またはゲノム配列を検出することができる。該プローブはそれに結合した標識基、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子を含む。そのようなプローブは、被験体からの細胞の試料中の蛋白質をコードする核酸分子のレベルを測定することによって、例えば、mRNAレベルを検出し、または蛋白質をコードする遺伝子が突然変異されているか、または欠失されているかを決定することによるなどして、プローブを誤発現する細胞または組織を同定するための診断テストキットの一部として用いることができる。

20

【0204】

本発明は、さらに、本発明のバイオマーカーに対応し、かくして、同一蛋白質をコードする、蛋白質をコードする核酸分子のヌクレオチド配列とは、遺伝子暗号の縮重のため、異なる核酸分子を含む。

【0205】

アミノ酸配列の変化に導くDNA配列多形が集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることは当業者に認識されるであろう。そのような遺伝子多形は、天然対立遺伝子変動のため集団内の個体の間で存在することができる。対立遺伝子は、与えられた遺伝子座においてあるいは起こる遺伝子の群の1つである。加えて、（例えば、調節または分解に影響することによって）その遺伝子の総じての発現レベルに影響し得るRNA発現レベルに影響し得るDNA多形も存在し得ることは認識されよう。

30

【0206】

本明細書中においては、「対立遺伝子変種」と相互交換的に用いられる用語「対立遺伝子」とは、遺伝子の別の形態またはその部分をいう。対立遺伝子は相同染色体上で同一の遺伝子座または位置を占める。被験体が遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を有する場合、該被験体は遺伝子または対立遺伝子につきホモ接合性といわれる。被験体が遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有する場合、被験体は遺伝子または対立遺伝子につきヘテロ接合性であるといわれる。特別な遺伝子の対立遺伝子は単一ヌクレオチド、またはいくつかのヌクレオチドにおいて相互に異なり得、ヌクレオチドの置換、欠失および挿入を含むことができる。また、遺伝子の対立遺伝子は1以上の突然変異を含む遺伝子の形態でもあり得る。

40

【0207】

本明細書中で相互交換的に用いられる、用語「遺伝子の多形領域の対立遺伝子変種」または「対立遺伝子変種」とは、集団における遺伝子のその領域に見出される数個の可能なヌクレオチド配列のうちの1つを有する遺伝子の別の形態をいう。本明細書中で用いるように、対立遺伝子変種は、機能的対立遺伝子変種、非一機能的対立遺伝子変種、SNP、突然変異および多形を含むことを意図する。

【0208】

用語「単一ヌクレオチド多形」（SNP）とは、対立遺伝子配列の間の変動の部位である単一ヌクレオチドによって占められる多形部位をいう。該部位には、通常、対立遺伝子の高度に保存された配列が先行し、およびそれに続く（例えば、集団の1/100または

50

1 / 1000未満のメンバーで変化する配列)。SNPは、通常、多形部位におけるもう1つに代えての1つのヌクレオチドの置換のため生起する。また、SNPは、参照対立遺伝子に対して、ヌクレオチドの欠失またはヌクレオチドの挿入から生起する。典型的には、多形部位は参照塩基以外の塩基によって占められる。例えば、参照対立遺伝子が多形部位に塩基「T」(チミジン)を含む場合、変化した対立遺伝子は多形部位に「C」(シチン)、「G」(グアニン)、または「A」(アデニン)を含むことができる。SNPは蛋白質コーディングヌクレオチド配列で起こることができ、その場合、それは欠陥のあるまたはそうでなければ変種の蛋白質、または遺伝病を生起させ得る。そのようなSNPは、遺伝子のコーディング配列を改変することができ、従って、もう1つのアミノ酸を特定することができ(「ミスセンス」SNP)、あるいはSNPは停止コドンを導入することができ(「ナンセンス」SNP)。SNPが蛋白質のアミノ酸配列を変化させない場合、SNPは「サイレント」と呼ばれる。SNPはヌクレオチド配列の非コーディング領域にも起こり得る。この結果、例えば、別のスプライシングの結果として欠陥のある蛋白質発現が生じ、あるいはそれは蛋白質の機能に対して効果を有さなくてもよい。

【0209】

本明細書中で用いるように、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」とは、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。そのような天然対立遺伝子変動は、典型的には、与えられた遺伝子のヌクレオチド配列において1ないし5%偏差を生じ得る。別の対立遺伝子は、多数の異なる個体において注目する遺伝子を配列決定することによって同定することができる。これは、ハイブリダイゼーションプローブを用いて、種々の個体において同一遺伝子座を同定することによって容易に行うことができる。天然対立遺伝子変動の結果であり、機能的活性を変化させないいずれかのおよび全てのそのようなヌクレオチド変動および得られたアミノ酸多形または変動は本発明の範囲内にあることを意図する。

【0210】

もう1つの実施形態において、本発明の単離された核酸分子は長さが少なくとも7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500以上のヌクレオチドであり、ストリンジェントな条件下で、本発明のバイオマーカーに対応する核酸分子に、または本発明のバイオマーカーに対応する蛋白質をコードする核酸分子にハイブリダイズする。本明細書中で用いるように、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、ヌクレオチド配列の少なくとも60%(65%、70%、75%、80%、好ましくは85%)が相互に同一であり、典型的には、相互にハイブリダイズしたままである、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を記載することを意図する。そのようなストリンジェントな条件は当業者に知られており、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989)のセクション6.3.1ないし6.3.6に見出すことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的例は約45℃における6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)におけるハイブリダイゼーション、引き続いての、50ないし65℃における0.2×SSC、0.1%SDSにおける1以上の洗浄である。

【0211】

集団に存在できる本発明の核酸分子の天然に生じる対立遺伝子変種に加えて、当業者であれば、配列の変化を突然変異によって導入し、それによりコードされた蛋白質の生物学的活性を改変することなく、コードされた蛋白質のアミノ酸配列の変化に導くことができる認識するであろう。例えば、「非-必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換に導くヌクレオチド置換をなすことができる。「非-必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を改変することなく野生型配列から改変することができる残基であり、他方、「必須」アミノ酸残基は生物学的活性に必要なものである。例えば、種々の種のホモログの間で保存された

、または半保存されたに過ぎないアミノ酸残基は活性につき非一必須であり得、かくして、
、改変に対するありそうな標的であろう。別法として、種々の種（例えば、ネズミおよび
ヒト）のホモログの間で保存されたアミノ酸残基は活性に対して必須であり得、かくして
、改変に対して標的でありそうではない。

【0212】

従って、本発明のもう1つの態様は、活性に対して必須でないアミノ酸残基の変化を含む
本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に関する。そのようなポリペプチドは、本
発明のバイオマーカーに対応する天然に生じる蛋白質からアミノ酸配列が異なるが、生物
学的活性を保持する。1つの実施形態において、そのような蛋白質は、本発明のバイオマ
ーカーに対応する蛋白質の1つのアミノ酸配列に対して少なくとも約40%同一、50%
、60%、70%、80%、90%、95%または98%同一であるアミノ酸配列を有する。

10

【0213】

変種蛋白質をコードする単離されたアミノ酸分子は、1以上のヌクレオチドの置換、付
加または欠失を本発明の核酸のヌクレオチド配列に、1以上のアミノ酸残基の置換、付
加または欠失がコードされた蛋白質に導入されるように導入することによって創製するこ
とができる。突然変異は、部位一特異的突然変異誘発およびPCR一媒介突然変異誘発のよ
うな標準的な技術によって導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は1
以上の予測される非一必須アミノ酸残基においてなされる。「保存的アミノ酸置換」は、
アミノ酸残基が同様な側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。同様な側
鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野において規定されてきた。これらのファ
ミリーは塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、
アスパラギン酸、グルタミン酸）、未荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、
グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非一極性側鎖（例えば、ア
ラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、
トリプトファン）、ベーター分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）お
よび芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）
を持つアミノ酸を含む。別法として、突然変異は、飽和突然変異誘発によるなどしてコー
ディング配列の全てまたは一部に沿ってランダムに導入することができ、得られた突然変
異体を生物学的活性につきスクリーニングして、活性を保有する突然変異体を同定するこ
とができる。突然変異誘発に続き、コードされた蛋白質を組換えにより発現させることが
でき、蛋白質の活性を測定することができる。

20

30

【0214】

本発明は、アンチセンス核酸分子、すなわち、本発明のセンス核酸に対して相補的な、
例えば、本発明のバイオマーカーに対応する二本鎖cDNA分子のコーディングストランド
に対して相補的な、または本発明のバイオマーカーに対応するmRNA配列に対して相
補的な分子を含む。従って、本発明のアンチセンス核酸分子は本発明のセンス核酸に対
して水素結合することができる（すなわち、それとアニールすることができる）。アンチ
センス核酸は全コーディング配列に対して、またはその一部のみに対して、例えば、蛋白質
コーディング配列（またはオープンリーディングフレーム）の全部または一部に対して相
補的であり得る。アンチセンス核酸分子は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレ
オチド配列のコーディングストランドの非一コーディング領域の全部または一部に対
してアンチセンスでもあり得る。非一コーディング領域（「5'および3'非翻訳領域」）は、
コーディング領域に近接しそれを挟み、アミノ酸に翻訳されない5'および3'配列であ
る。

40

【0215】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、10、15、20、25、
30、35、40、45または50以上ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス
核酸は、当該分野で公知の手法を用い、化学合成および酵素的連結反応を用いて構築す
ることができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）

50

は、天然に生じるヌクレオチド、あるいは分子の生物学的安定性を増加させるように、またはアンチセンスおよびセンス核酸の間で形成されるデュプレックスの物理的安定性を増加させるように設計された種々に修飾されたヌクレオチドを用いて化学合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を創製するのに用いることができる修飾されたヌクレオチドの例は5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ウイプトキソシン、プソイドウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2, 6-ジアミノプリンを含む。別法として、アンチセンス核酸は、アンチセンス向きに核酸がサブクローンされた発現ベクターを用いて生物学的に生産することができる(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下のサブセクションにさらに記載した、注目する標的核酸に対してアンチセンス向きのものである)。

【0216】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、被験体に投与されるか、あるいはそれが細胞mRNAおよび/または本発明の選択されたバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードするゲノムDNAにハイブリダイズし、またはそれに結合し、それにより、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによってバイオマーカーの発現を阻害するように、イン・サイチュで創製される。該ハイブリダイゼーションは、安定なデュプレックスを形成するような慣用的ヌクレオチド相補性によることができるか、あるいは例えば、DNAデュプレックスに結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重ラセンの主要溝における特異的相互作用を介することができる。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例は、組織部位における直接的注射、または臍臓-関連体液へのアンチセンス核酸の注入を含む。別法として、アンチセンス核酸分子は選択された細胞を標的とするように修飾し、次いで、全身投与することができる。例えば、全身投与では、アンチセンス分子は、例えば、アンチセンス核酸分子を、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによって、選択された細胞表面に発現された受容体または抗原に特異的に結合するように修飾することができる。また、アンチセンス核酸分子を、本明細書中に記載されたベクターを用いて細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子が強力なpol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれるベクター構築体が好ましい。

【0217】

本発明のアンチセンス核酸分子は α -アノマー核酸分子であり得る。 α -アノマー核酸分子は相補性RNAとで特異的二本鎖ハイブリッドを形成し、そこでは、通常の α -ユニットとは対照的に、ストランドは相互に平行に走る(Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6625-6641)。また、アンチセンス核酸分子は2'- α -メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148)またはキメラRNA-DNAアナログ(Inoue et al., 1987, FEB S Lett. 215:327-330)を含むこともできる。

【0218】

本発明はリボザイムも含む。リボザイムは、それがそれに対して相補的領域を有するmRNAのような一本鎖核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を持つ触媒RNA分子である。かくして、リボザイム（例えば、Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334: 585-591に記載されたハンマーヘッドリボザイム）を用いて、触媒作用によりmRNA転写体を切断して、それにより、mRNAによってコードされた蛋白質の翻訳を阻害することができる。本発明のバイオマーカーに対応するポリヌクレオチドをコードする核酸分子に対する特異性を有するリボザイムは、バイオマーカーに対応するcDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。例えば、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体を構築することができ、そこでは、活性部位のヌクレオチド配列は切断されるべきヌクレオチド配列に対して相補的である（Cech et al. 米国特許第4,987,071号；およびCech et al., 米国特許第5,116,742号参照）。別法として、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを用いて、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択することができる（例えば、Bartel and Szostak, 1993, Science 261: 1411-1418参照）。

10

【0219】

また、本発明は、三重ラセン構造を形成する核酸分子を含む。例えば、本発明のポリペプチドの発現は、ポリペプチドをコードする遺伝子の調節領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって阻害して、標的細胞において遺伝子の転写を妨げる三重ラセン構造を形成することができる。一般には、Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; およびMaher (1992) Bioassays 14(12): 807-15参照。

20

【0220】

種々の実施形態において、本発明の核酸分子は、塩基部位、糖部位またはリン酸骨格において修飾して、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改良することができる。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格を修飾して、ペプチド核酸分子を創製することができる（Hyrup et al., 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23参照）。本明細書中で用いるように、用語「ペプチド核酸」または「PNA」とは、核酸ミミック、例えば、デオキシリボースリン酸骨格がプソイドペプチド骨格によって置き換えられ、4つの天然のヌクレオ塩基のみが保持されるDNAミミックをいう。PNAの中性骨格は、低いイオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能とすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup et al. (1996), 前掲; Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675に記載された標準固相ペプチド合成プロトコルを用いて行うことができる。

30

【0221】

PNAは治療および診断適用で用いることができる。例えば、PNAは、例えば、転写または翻訳阻止を誘導し、または複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列-特異的変調のためのアンチセンスまたはアンチジーン剤として用いることができる。また、PNAは、例えば、PNA指向性PCRクランピングによって遺伝子中の単一塩基対突然変異の分析において；例えば、他の酵素と組み合わせて用いる場合に人工的制限酵素、例えば、S1ヌクレアーゼ（Hyrup (1996), 前掲として；またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマー（Hyrup, 1996, 前掲; Perry-O'Keefe et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675）として用いることもできる。

40

50

【0222】

もう1つの実施形態において、PNAを修飾して、例えば、親油性または他のヘルパー基をPNAに付着させることによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリポソーム、あるいは当該分野で知られた薬物送達の他の技術の使用によって、それらの安定性または細胞摂取を増強させることができる。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組み合わせることができるPNA-DNAキメラを創製することができる。そのようなキメラは、DNA認識酵素、例えば、RNAse HおよびDNAポリメラーゼは、DNA部分と相互作用するのを可能とし、他方、PNA部分は高結合親和性および特異性を供するであろう。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、ヌクレオ塩基の間の結合の数、および向きの点で選択された適当な長さのリンカーを用いて連結することができる (Hyrup, 1996, 前掲)。PNA-DNAキメラの合成はHyrup (1996)、前掲、およびFinn et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24 (17): 3357-63に記載されたように行うことができる。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホルアミダイトカップリング化学および修飾されたヌクレオシドアナログを用いて固体支持体上で合成することができる。5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシチミジンホスホルアミダイトのような化合物は、PNAおよびDNAの5'末端の間のリンクとして用いることができる (Mag et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17: 5973-88)。次いで、PNAモノマーを段階的方法でカップリングさせて、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを持つキメラ分子を得る (Finn et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24 (17): 3357-63)。別法として、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを持つキメラ分子を合成することができる (Petersen et al., 1975, Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-1124)。

【0223】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、(例えば、イン・ビボで宿主細胞受容体を標的化する) ペプチド、または細胞膜 (例えば、Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556; Lemaître et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652; PCT公開番号WO 88/09810) または血液-脳関門 (例えば、PCT公開番号WO 89/10134参照) を横切る輸送を容易にする剤のような他の付属の基を含むこともできる。加えて、オリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーショントリガード切断剤 (例えば、Krol et al., 1988, Bio/Techiques 6: 958-976参照) またはインターカレーティング剤 (例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549参照) で修飾することができる。この目的では、オリゴヌクレオチドをもう1つの分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーショントリガード架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーショントリガード切断剤などに結合体化することができる。

【0224】

また、本発明は、分子ビーコンが試料中の本発明の核酸分子の存在を定量するのに有用であるように、本発明の核酸分子に対して相補的な少なくとも1つの領域を有する分子ビーコン核酸分子も含む。「分子ビーコン」核酸は、相補的な領域の対を含み、かつフルオロフォアおよびそれに会合した蛍光クエンチャーを有する核酸分子である。フルオロフォアおよびクエンチャーは、相補的領域が相互にアニールした場合に、フルオロフォアの蛍光がクエンチャーによって消光される向きに、核酸の異なる部分と会合する。核酸分子の相補的領域が相互にアニールしない場合、フルオロフォアの蛍光は低い程度にしか消光されない。分子ビーコン核酸分子は、例えば、米国特許第5, 876, 930号に記載されている。

【0225】

(V. 単離された蛋白質および抗体)

本発明の1つの態様、本発明の個々のバイオマーカーに対応する単離された蛋白質、およびその生物学的に活性な部分、ならびに本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドに対して向けられた抗体を生起するための免疫原として用いるのに適したポリペプチドフラグメントに関する。1つの実施形態において、バイオマーカーに対応する天然ポリペプチドは、標準的な蛋白質精製技術を用いる適当な精製スキームによって細胞または組織源から単離することができる。もう1つの実施形態において、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドは組換えDNA技術によって生産される。組換え発現の代替法として、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドは標準的なペプチド合成技術を用いて化学的に合成することができる。

【0226】

「単離された」または「精製された」蛋白質またはその生物学的に活性な部分は、細胞物質または蛋白質が由来する細胞または組織源からの他の汚染蛋白質を実質的に含まず、または化学合成した場合には化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞物質を実質的に含まない」は、当該蛋白質がそれが単離されたまたはそれから組換えにより生産された細胞の細胞成分から分離された蛋白質の調製物を含む。かくして、細胞物質を実質的に含まない蛋白質は、（本明細書中では「汚染蛋白質」ともいう）異種蛋白質の約30%、20%、10%、または5%（乾燥重量による）未満を有する蛋白質の調製物を含む。蛋白質またはその生物学的に活性な部分が組換えにより生産された場合、それは好ましくは培養基を実質的に含まず、すなわち、培養基は蛋白質調製物の約20%、10%、または5%の容量未満を表す。蛋白質が化学合成により生産される場合、それは好ましくは化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、すなわち、それは蛋白質の合成に参与する化学前駆体または他の化学物質から分離されている。従って、蛋白質のそのような調製物は注目するポリペプチド以外の化学前駆体または化合物の約30%、20%、10%、5%（乾燥重量による）未満を有する。

【0227】

本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドの生物学的に活性な部分は、全長蛋白質よりも少数のアミノ酸を含み、対応する全長蛋白質の少なくとも1つの活性を呈するバイオマーカーに対応する蛋白質のアミノ酸に十分に同一であるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。典型的には、生物学的に活性な部分は、対応する蛋白質の少なくとも1つの活性を持つドメインまたはモチーフを含む。本発明の蛋白質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10、25、50、100以上のアミノ酸であるポリペプチドであり得る。さらに、蛋白質の他の領域が欠失された他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製し、本発明のポリペプチドの天然形態の機能的活性の1以上につき評価することができる。

【0228】

好ましいポリペプチドは、本発明のバイオマーカーの核酸分子によってコードされる蛋白質のアミノ酸配列を有する。他の有用な蛋白質はこれらの配列のうちの1つに対して実質的に同一（例えば、少なくとも約40%、好ましくは50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%）であり、対応する天然に生じる蛋白質の蛋白質の機能的活性を保有するが、天然対立遺伝子変動または突然変異誘発のためアミノ酸配列は異なる。

【0229】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸のパーセント同一性を決定するためには、配列を最適な比較目的のために整列させる（例えば、第二のアミノ酸または核酸配列との最適な整列のために、ギャップを第一のアミノ酸または核酸配列の配列に導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一の配列中の位置が第二の配列中の対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、該分子はその位置において同一である。2つの配列の間のパーセント同一性は、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、%同一性＝同一位置の数／位置の全数（例えば、重複位置）×

100)。1つの実施形態において、2つの配列は同一の長さである。

【0230】

2つの配列の間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列の比較で利用する数学的アルゴリズムの好ましい非限定的例は、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877において修飾された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムはAltschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに取り込まれる。BLASTヌクレオチド 10
サーチはNBLASTプログラム、スコア=100、語長=12で実行して、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLAST蛋白質サーチをXBLASTプログラム、スコア=50、語長=3で実行して、本発明の蛋白質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップを入れたアルゴリズムを得るためには、Gapped BLASTをAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されたように利用することができる。別法として、PSI-Blastを用いて、分子の間の距離の関係を検出する反復サーチを実行することができる。BLAST、Gapped BLAST 20
、およびPSI-Blastプログラムを利用する場合、各プログラム（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. 参照。配列の比較で利用される数学的アルゴリズムの非限定的例はMyers and Miller, (1988) Comput Appl Biosci, 4:11-7のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列整列ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に一体化される。アミノ酸配列を比較するためのALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み付け残基表、12のギャップ長ペナルティー、および4のギャップペナルティーを用いることができる。局所的配列同源性および整列の領域を同定するためのさらにもう1つの有用なアルゴリズムは、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448に記載されたFASTAアルゴリズムである。ヌクレオチドまた 30
はアミノ酸配列を比較するためのFASTAアルゴリズムを用いる場合、PAM120重み付け残基表を、例えば、2のk-トゥプル (tuple 値) で用いることができる。

【0231】

2つの配列の間のパーセント同一性は、ギャップを許容し、または許容することなく、前記したのと同様な技術を用いて決定することができる。パーセント同一性を計算するにおいて、正確なマッチのみをカウントする。

【0232】

また、本発明は、本発明のバイオマーカーに対応するキメラまたは融合蛋白質を提供する。本明細書中で用いるように、「キメラ蛋白質」または「融合蛋白質」は、異種ポリペプチド（すなわち、バイオマーカーに対応するポリペプチド以外のポリペプチド）に操作 40
可能に連結した本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドの全てまたは部分（好ましくは、生物学的に活性な部分）を含む。融合蛋白質内では、用語「操作可能に連結した」は、本発明のポリペプチドおよび異種ポリペプチドが相互に枠内で融合することを示すことを意図する。異種ポリペプチドは本発明のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に融合することができる。

【0233】

1つの有用な蛋白質は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドがGST配列のカルボキシル末端に融合したGST融合蛋白質である。そのような融合蛋白質は、本発明の組み換えポリペプチドの精製を容易にすることができる。

【0234】

10

20

30

40

50

もう1つの実施形態において、融合蛋白質はそのアミノ末端において異種シグナル配列を含む。例えば、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドの天然シグナル配列を除去し、もう1つの蛋白質からのシグナル配列で置き換えることができる。例えば、バキュロウイルスエンベロープ蛋白質の gp67 分泌配列を異種シグナル配列として用いることができる (Ausubel et al. 編, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1992)。真核生物異種シグナル配列の他の例は、メリチンおよびヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼの分泌配列を含む (Stratagene; La Jolla, California)。なおもう1つの例において、有用な原核生物異種シグナル配列は phoA 分泌シグナル (Sambrook et al., 前掲) およびプロテイン A 分泌シグナル (Pharmacia Biotech; Piscataway, New Jersey) を含む。

10

【0235】

なおもう1つの実施形態において、融合蛋白質は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドの全部または一部が免疫グロブリン蛋白質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合した免疫グロブリン融合蛋白質である。本発明の免疫グロブリン融合蛋白質は医薬組成物に取り込み、被験体に投与して、リガンド（可溶性または膜一結合）および細胞の表面の蛋白質（受容体）の間の相互作用を阻害し、それにより、イン・ビボにてシグナル変換を抑制することができる。免疫グロブリン融合蛋白質を用いて、本発明のポリペプチドの同属リガンドの生物学的利用性に影響させることができる。リガンド／受容体相互作用の阻害は、増殖性および分化障害を治療するのに、および細胞生存を変調（例えば、促進または阻害）するのにの双方において、治療的に有用であり得る。さらに、本発明の免疫グロブリン融合蛋白質を免疫原として用いて、被験体において本発明のポリペプチドに対して向けられた抗体を精製させ、リガンドを精製し、およびスクリーニングアッセイにおいて、受容体とリガンドとの相互作用を阻害する分子を同定することができる。

20

【0236】

本発明のキメラおよび融合蛋白質は、標準的な組換え DNA 技術によって生産することができる。もう1つの実施形態において、融合遺伝子は、自動 DNA 合成器を含めた慣用的な技術によって合成することができる。別法として、遺伝子フラグメントの PCR 増幅は、引き続いてアニールし、再度増幅してキメラ遺伝子配列を生じさせることができる2つの連続遺伝子フラグメントの間に相補的突出を生起させるアンカープライマーを用いて行うことができる（例えば、Ausubel et al., 前掲参照）。さらに、融合部位（例えば、GST ポリペプチド）を既にコードする多くの発現ベクターが商業的に入手可能である。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、そのような発現ベクターに、融合部分が本発明のポリペプチドに枠内でリンクするようにクローン化することができる。

30

【0237】

シグナル配列を用いて、分泌された蛋白質または注目する他の蛋白質の分泌および単離を容易にすることができる。シグナル配列は、一般には、1以上の切断事象における分泌の間に成熟蛋白質から切断される疎水性アミノ酸のコアによって典型的には特徴付けられる。そのようなシグナルペプチドは、それが分泌経路を通過するにつれて成熟蛋白質からシグナル配列の切断を可能とするプロセッシング部位を含む。かくして、本発明は、シグナル配列を有する記載されたポリペプチド、ならびにそれからシグナル配列が蛋白質分解によって切断されたポリペプチド（すなわち、切断産物）に関する。1つの実施形態において、シグナル配列をコードする核酸配列は、通常は分泌されず、またはそうでなければ単離するのが困難な蛋白質のような注目する蛋白質に対して、発現ベクター中で操作可能に連結することができる。シグナル配列は、発現ベクターがそれに形質転換される真核生物宿主からのような、蛋白質の分泌を指令し、シグナル配列は引き続いてまたは同時に切断される。次いで、蛋白質は当該分野で認められた方法によって細胞外培地から容易に精製することができる。別法として、シグナル配列は、GST ドメインのような、精製を容

40

50

易にする配列を用いて注目する蛋白質に連結することができる。

【0238】

また、本発明は、本発明の個々のバイオマーカーに対応するポリペプチドの変種に関する。そのような変種は、アゴニスト（ミメティックス）またはアンタゴニストとして機能することができる改変されたアミノ酸配列を有する。変種は、突然変異誘発、例えば、区別される点突然変異または切形によって生じさせることができる。アゴニストは、蛋白質の天然に生じる形態の生物学的活性と実質的に同一な活性、または該活性のサブセットを保有することができる。蛋白質のアンタゴニストは、例えば、注目する蛋白質を含む細胞シグナリングカスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することによって、蛋白質の天然に生じる形態の1以上の活性を阻害することができる。かくして、限定された機能の変形での処理によって特別な生物学的効果を誘導することができる。蛋白質の天然に生じる形態の生物学的活性のサブセットを有する変種での被験体の処理は、蛋白質の天然に生じる形態での処理に対して被験体においてより少ない副作用を有することができる。

10

【0239】

アゴニスト（ミメティックス）またはアンタゴニストいずれかとして機能する本発明の蛋白質の変種は、アゴニストまたはアンタゴニスト活性につき本発明の蛋白質の突然変異体、例えば、切形突然変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。1つの実施形態において、核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって変種の変化に富んだライブラリーを創製し、これは変化に富んだ遺伝子ライブラリーによってコードされる。変種の変化に富んだライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列へ、潜在的蛋白質配列の縮重組が個々のポリペプチドとして、あるいは別法として（例えば、ファージディスプレイのための）より大きな融合蛋白質の組として発現可能となるように酵素的に連結することによって生産することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から本発明のポリペプチドの潜在の変種のライブラリーを生じさせるのに用いることができる種々の方法がある。縮重オリゴヌクレオチドを合成させるための方法は当該分野で知られている（例えば、Narang, 1983, Tetrahedron 39:3; Itakura et al., 1984, Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., 1984, Science 198:1056; Ike et al., 1983, Nucleic Acid Res. 11:477参照）。

20

30

【0240】

加えて、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドのコーディング配列のフラグメントのライブラリーを用いて、変種のスクリーニングおよび引き続いての選択のためにポリペプチドの変化に富む集団を創製することができる。例えば、コーディング配列フラグメントのライブラリーは、注目するコーディング配列の二本鎖PCRフラグメントを、ニックングが分子当たり約1回のみ起こる条件下でヌクレアーゼで処理し、二本鎖DNAを変性し、DNAを再生して、異なるニックド産物からのセンス／アンチセンス対を含むことができる二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼでの処理によってサイド形成されたデュプレックスから一本鎖部分を除去し、次いで、得られたフラグメントライブラリーを発現ベクターに連結することによって作り出すことができる。この方法によって、注目する蛋白質の種々のサイズのアミノ末端および内部フラグメントをコードする発現ベクターを誘導することができる。

40

【0241】

点突然変異または切形によって作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングし、および選択された特性を有する遺伝子産物につきcDNAライブラリーをスクリーニングするための数個の技術が当該分野で知られている。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析で 사용할 ことができる最も広く用いられる技術は、典型的には、遺伝子ライブラリーの複製可能な発現ベクターへのクローニング、ベクターの得られたライブラリーでの適当な細胞の形質転換、および

50

所望の活性の検出がその産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でのコンビナトリアル遺伝子の発現を含む。機能的アンサンブル突然変異誘発 (REM)、ライブラリーにおける機能的突然変異体の頻度を増強するための技術をスクリーニングアッセイと組み合わせて用いて、本発明の蛋白質の変種を同定することができる (Arkin and Yourvan, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al., 1993, Protein Engineering 6(3):327-331)。

【0242】

本発明のバイオマーカーに対応する単離されたポリペプチド、またはそのフラグメントを免疫原として用いて、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製のための標準的技術を用いて抗体を作り出すことができる。全長ポリペプチドまたは蛋白質を用いることができるか、あるいは別法として、本発明は免疫原として用いられる抗原性ペプチドフラグメントを提供する。本発明の蛋白質の抗原性ペプチドは本発明のポリペプチドの1つのアミノ酸配列の少なくとも8つ(好ましくは、10、15、20または30以上)アミノ酸残基を含み、当該蛋白質が対応する本発明のバイオマーカーとで、ペプチドに対して生起された抗体が特異的免疫複合体を形成するように、蛋白質のエピトープを含む。抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、蛋白質の表面に位置する領域、例えば、親水性領域である。疎水性配列分析、親水性配列分析、または同様な分析を用いて、親水性領域を同定することができる。

【0243】

免疫原は、典型的には、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物または脊椎動物のような適当な(すなわち、免疫コンピテント)被験体を免疫化することによって抗体を調製するのに用いられる。適当な免疫原性調製物は、例えば、組換えにより発現させた、または化学的に合成させたポリペプチドを含むことができる。該調製は、さらに、フロイントの完全または不完全アジュバント、または同様な免疫刺激剤のようなアジュバントを含むことができる。

【0244】

従って、本発明のもう1つの態様は本発明のポリペプチドに対して向けられた抗体に関する。本明細書中において相互交換的に用いられる用語「抗体」および「抗体物質」とは、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、本発明のペプチドのような、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子をいう。本発明の与えられたポリペプチドに特異的に結合する分子は、該ポリペプチドに結合するが、ポリペプチドを天然で含有する試料、例えば、生物学的試料中の他の分子に実質的に結合しない分子である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例は、ペプシンのような酵素で抗体を処理することによって生じさせることができるF(ab)およびF(ab')₂フラグメントを含む。本発明はポリクローナルおよびモノクローナル抗体を提供する。本明細書中で用いるように、用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」とは、特定のエピトープと免疫反応できる抗原結合部位の1つの種のみを含有する抗体分子の集団をいう。

【0245】

ポリクローナル抗体は、免疫原としての本発明のポリペプチドで適当な被験体を免疫化することによって前記したようにして調製することができる。免疫化された被験体における抗体力価は、免疫化されたポリペプチドを用い、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)でのような標準的技術によって経時的にモニターすることができる。所望により、抗体分子を被験体から(例えば、被験体の血液または血清から)収穫し、または単離し、プロテインAクロマトグラフィーのようなよく知られた技術によって精製して、IgG画分を得ることができる。免疫化後適当な時点で、例えば、特異的抗体力価が最高である場合、抗体生産細胞を被験体から得ることができ、これを用いて、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497によって元来記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al

., 1983, Immunol. Today 4:72参照)、EBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., pp. 77-96 In Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985)またはトリオーマ技術のような標準的技術によってモノクローナル抗体を調製することができる。ハイブリドーマを生産するための技術はよく知られている(一般に、Current Protocols in Immunology, Coligan et al. 編, John Wiley & Sons, New York, 1994参照)。本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的ELISAアッセイを用いて、注目するポリペプチドに結合する抗体につきハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出される。

10

【0246】

モノクローナル抗体-分泌ハイブリドーマを調製するための代替法として、注目するポリペプチドで組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー)をスクリーニングすることによって、本発明のポリペプチドに向けられたモノクローナル抗体を同定し、単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを作成し、スクリーニングするためのキットは商業的に入手可能である(例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号27-9400-01;およびStratagene SurfZAP Phage Display Kit, カタログ番号240612)。加えて、抗体ディスプレイライブラリーの作成およびスクリーニングで用いるのに特に適用できる方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5,223,409号;PCT公開番号WO 92/18619;PCT公開番号WO 91/17271;PCT公開番号WO 92/20791;PCT公開番号WO 92/15679;PCT公開番号WO 93/01288;PCT公開番号WO 92/01047;PCT公開番号WO 92/09690;PCT公開番号WO 90/02809;Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372;Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85;Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281;Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734に見出すことができる。

20

30

【0247】

加えて、標準組み換えDNA技術を用いて作成することができる、ヒトおよび非-ヒト部分を共に含む、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体の組換え抗体は本発明の範囲内のものである。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、PCT公開番号WO 87/02671;欧州特許出願184,187;欧州特許出願171,496;欧州特許出願173,494;PCT公開番号WO 86/01533;米国特許第4,816,567号;欧州特許出願125,023;Better et al. (1988) Science 240:1041-1043;Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3439-3443;Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526;Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218;Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005;Wood et al. (1985) Nature 314:446-449;およびShaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559;Morrison (1985) Science 229:1202-1207;Oi et al. (1986) Bio/Techniques 4:214;米国特許第5,225,539号;Jones et al. (1986) Nature 321:552-525;Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534;およびBeidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053

40

50

ー4060に記載された方法を用いて当該分野で公知の組換えDNA技術によって生じさせることができる。

【0248】

完全にヒトの抗体はヒト被験体の治療的処置で特に望ましい。そのような抗体は、内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて生産することができる。トランスジェニックマウスは選択された抗原、例えば、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドの全てまたは部分で通常に免疫化される。抗原に対して向けられたモノクローナル抗体は、慣用的なハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスによって保有されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子はB細胞分化の間に再編成され、引き続いて、クラススイッチング体細胞突然変異を受ける。かくして、そのような技術を用い、治療的に有用なIgG、IgAおよびIgE抗体を生産することが可能である。ヒト抗体を生産するためのこの技術の概観については、Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13: 65-93参照。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのこの技術、およびそのような抗体を生産するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；および米国特許第5,545,806号参照。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)のような会社が、前記したのと同様な技術を用いて選択された抗原に対して向けられたヒト抗体を提供するのに従事することができる。

【0249】

選択されたエピトープを認識する完全にヒトの抗体は、「ガイドド選択」といわれる技術を用いて作成することができる。このアプローチにおいては、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、ネズミ抗体を用いて、同一エピトープを認識する完全にヒト抗体の選択をガイドする(Jespersen et al., 1994, Biotechnology 12: 899-903)。

【0250】

癌で過剰発現される本発明のバイオマーカーに特異的に結合する、抗体、抗体誘導体、またはそのフラグメントを用いて、バイオマーカーの活性を阻害することができ、従って、被験体に投与して、該被験体における癌を治療し、阻害し、または予防することができる。さらに、結合体化抗体を用いて、被験体における癌を治療し、阻害し、または予防することもできる。結合体化抗体、好ましくはモノクローナル抗体、またはそのフラグメントは、薬物、トキシン、放射性原子に接合された抗体であり、これは、癌細胞に直接的にそれらの物質を送達するために送達ビークルとして用いられる。抗体、例えば、本発明のバイオマーカー（例えば、表2に列挙されたバイオマーカー）に特異的に結合する抗体を被験体に投与し、バイオマーカーに結合させ、それにより、毒性物質を癌細胞に送達し、身体の他の部分における正常な細胞への損傷を最小化する。

【0251】

結合体化抗体は「タグド」、「標識された」または「負荷された」ともいわれる。化学療法剤が付着された抗体は、一般には、化学標識されたという。化学療法剤の例はタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミタラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパノロロール、およびピューロマイシン、ならびにそのアナログまたはホモログを含む。治療剤は、限定されるものではないが、抗代謝産物（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロモスチン(C

CNU)、シクロトスファミド、ビスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン(以前のダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(AMC))、および抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)を含む。

【0252】

放射性粒子が付着された抗体は放射性標識されたといい、このタイプのライブラリーは放射性免疫療法(RIT)として知られている。癌を治療するのに用いられるかは別として、放射性標識抗体を用いて身体中の癌の拡大の領域を検出することもできる。トキシン

10

【0253】

イムノトキシンはトキシン(例えば、植物または細菌からの毒性物質)をモノクローナル抗体に付着させることによって作成される。イムノトキシンは、リボソーム結合蛋白質(その開示をここに引用してその全体を援用するBetter et al., 米国特許第6,146,631号参照)、アブリン、リシンA、シュードモナスエキソトキシン、またはジフテリャトキシンのような細菌トキシン;腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベータのような蛋白質;または例えば、リンホカイン、インターフェロン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)のような生物反応修飾物質、または他の成長因子、ジフテリャトキシン(DT)またはシュードモナスエキソトキシン(PE40)に、またはリシンAまたはサポリンのような植物トキシンに付着させることによって生じさせることができる。

20

【0254】

本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドに対して向けられた抗体(例えば、モノクローナル抗体)を用いて、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈澱のような標準的な技術によってポリペプチドを単離することができる。さらに、そのような抗体を用いて、(例えば、細胞溶解物または細胞上清中で)バイオマーカーを検出して、バイオマーカーの発現のレベルおよびパターンを評価することができる。また、抗体を診断に用いて、臨床試験手法の一部として(例えば、胆汁のような腠臓-関連体液中で)組織または体液中の蛋白質レベルをモニターして、例えば、与えられた治療レジメンの効率を決定することもできる。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングさせることによって促進することができる。検出可能な物質の例は種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、ルミネッセント物質、バイオルミネッセント物質、および放射性物質を含む。適当な酵素の例はホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含み;適当な補欠分子族複合体の例はストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含み;適当な蛍光物質の例はウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロ

30

40

ロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンを含み;ルミネッセント物質の例はルミノールを含み;バイオルミネッセント物質の例はルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびアクオリンを含み、および適当な放射性物質の例は ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H を含む。

【0255】

(VI. 組換え発現ベクターおよび宿主細胞)

本発明のもう1つの態様は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチド(またはそのようなポリペプチドの部分)をコードする核酸分子を含有するベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で用いるように、用語「ベクター」は、それが連結していたもう1つの核酸を輸送することができる核酸分子をいう。ベクターの1つのタイプ

50

は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントを連結することができる環状二本鎖DNAループをいう。ベクターのもう1つのタイプはウイルスベクターであり、ここでは、さらなるDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。ある種のベクターは、それが導入される宿主細胞中で自律複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非-エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入に際して宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムに沿って複製される。さらに、ある種のベクター、すなわち発現ベクターは、それが操作可能に連結された遺伝子の発現を指令することができる。一般には、組換えDNA技術で利用される発現ベクターは、しばしば、プラスミド（ベクター）の形態である。しかしながら、本発明は、同等な機能を発揮する、ウイルスベクター（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ-関連ウイルス）のような発現ベクターのそのような他の形態を含むことを意図する。

10

【0256】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞での核酸の発現に適した形態の本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現すべき核酸配列に操作可能に連結された、発現で用いられるべき宿主細胞に基づいて選択された、1以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内では、「操作可能に連結された」は、（例えば、イン・ビトロ転写／翻訳システムにおいて、あるいはベクターが宿主細胞に導入された場合には宿主細胞において）ヌクレオチド配列の発現を可能とするように注目するヌクレオチド配列が調節配列に連結していることを意味することを意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。そのような調節配列は、例えば、Goeddel, Methods in Enzymology: Gene Expression Technology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA (1991)に記載されている。調節配列は、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指令するもの、およびある種の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指令するもの（例えば、組織-特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計は、形質転換すべき宿主細胞の選択、所望の蛋白質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に認識されるであろう。本発明の発現ベクターは宿主細胞に導入して、それにより、本明細書中に記載された核酸によってコードされる、融合蛋白質またはペプチドを含めた蛋白質またはペプチドを生産することができる。

20

30

【0257】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物（例えば、E. coli）または真核生物細胞（例えば、{バキュロウイルス発現ベクターを用いる} 昆虫細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞）における、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドの発現のために設計することができる。適当な宿主細胞はGoeddel, 前掲においてさらに議論されている。別法として、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、イン・ビトロにて転写し翻訳することができる。

【0258】

原核生物における蛋白質の発現は、最もしばしば、融合または非-融合蛋白質いずれかの発現を指令する構成的または誘導性プロモーターを含有するベクターにてE. coliで行われる。融合ベクターは、多数のアミノ酸をそこにコードされる蛋白質、通常は、組み換え蛋白質のアミノ末端に加える。そのような融合ベクターは、典型的には、3つの目的で働く：1）組換え蛋白質の発現を増加させるため；2）組換え蛋白質の溶解性を増加させるため；および3）アフィニティー精製においてリガンドとして作用することによって組換え蛋白質の精製を助けるため。しばしば、融合発現ベクターにおいて、蛋白質分解切断部位を融合部位および組換え蛋白質の接合において導入して、融合蛋白質の精製に続いての組換え蛋白質の融合部位からの分離を可能とする。そのような酵素、およびその同族認識配列は、Xa因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターは、各々、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合

40

50

蛋白質またはプロテインAを標的組換え蛋白質に融合させるpGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) を含む。

【0259】

適当な誘導性非-融合E. coli 発現ベクターの例はpTrc (Amann et al., 1988, Gene 69:301-315) およびpET 11d (Studier et al., p. 60-89, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1991) を含む。pTrcベクターからの標的遺伝子発現はハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依拠する。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、共発現されたウイルスRNAポリメラーゼ (T7 gnl) によって媒介されるT7 gnl0-lac融合プロモーターからの転写に依拠する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV5プロモーターの転写制御下でT7 gnl遺伝子を保有する定住性プロファージから宿主株BL21 (DE3) またはHMS174 (DE3) によって供給される。

【0260】

E. coli における組み換え蛋白質発現を最大とするための1つの戦略は、組換え蛋白質を蛋白質分解により切断する損なわれた能力を持つ宿主細菌において蛋白質を発現させることである (Gottesman, p. 119-128, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990)。もう1つの戦略は、各アミノ酸についての個々のコドンがE. coli で優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入されるべき核酸の核酸配列を改変することである (Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のそのような改変は標準DNA合成技術によって行うことができる。

【0261】

もう1つの実施形態において、発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母S. cerevisiaeにおける発現用のベクターの例はpYepSec1 (Baldari et al., 1987, EMBO J. 6:229-234)、pMFa (Kurjan and Herskowitz, 1982, Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., 1987, Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation San Diego, CA) およびpPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA) を含む。

【0262】

別法として、発現ベクターはバキュロウイルス発現ベクターである。培養された昆虫細胞 (例えば、Sf9細胞) における蛋白質の発現で利用可能なバキュロウイルスベクターはpAcシリーズ (Smith et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) およびpVLシリーズ (Lucklow and Summers, 1989, Virology 170:31-39) を含む。

【0263】

なおもう1つの実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現の例は、pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329:840) およびpMT2PC (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6:187-195) を含む。哺乳動物細胞で用いる場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス調節エレメントによって供され

る。例えば、通常使用されるプロモーターはポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40に由来する。原核生物および真核生物細胞の双方のための他の適当な発現ベクターについては、Sambrook et al., 前掲の16章および17章を参照されたし。

【0264】

もう1つの実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指令することができる（例えば、組織－特異的調節エレメントを用いて核酸を発現させる）。組織－特異的調節エレメントは当該分野で知られている。適当な組織－特異的プロモーターの非限定的例はアルブミンプロモーター（肝臓－特異的；Pinker et al., 1987, Genes Dev. 1:268-277）、リンパ系－特異的プロモーター（Calame and Eaton, 1988, Adv. Immunol. 43:235-275）、特にT細胞受容体のプロモーター（Winoto and Baltimore, 1989, EMBO J. 8:729-733）および免疫グロブリン（Banerji et al., 1983, Cell 33:729-740; Queen and Baltimore, 1983, Cell 33:741-748）、ニューロン－特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；Byrne and Ruddle, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477）、脾臓－特異的プロモーターEdlund et al., 1985, Science 230:912-916）、および乳腺－特異的プロモーター（例えば、ミルクホエイプロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州特許出願第264,166号参照）を含む。また、発生的に関連したプロモーター、例えば、ネズミhoxプロモーター（Kessel and Gruss, 1990, Science 249:374-379）および α -フェトプロテインプロモーター（Camper and Tilghman, 1989, Genes Dev. 3:537-546）も考えられる。

【0265】

本発明は、さらに、発現ベクターにアンチセンス向きにクローン化された本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、本発明のポリペプチドをコードするmRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の（DNA分子の転写による）発現を可能とするように、調節配列に操作可能に連結される。アンチセンス向きにクローン化された核酸に操作可能に連結された調節配列を選択することができ、これは、種々の細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続的発現を指令し、例えば、アンチセンスRNAの構成的な組織－特異的または細胞－特異的発現を指令するウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサーまたは調節配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは組換えプラスミド、ファゲミド、または減弱ウイルスの形態とすることができ、そこでは、アンチセンス核酸は高効率調節領域の制御下で発現され、その活性はベクターが導入される細胞型によって決定することができる。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節の議論については、Weintraub et al., 1986, Trends in Genetics, Vol. 1(1)を参照されたし。

【0266】

本発明のもう1つの態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は本明細書中においては相互交換的に用いられる。そのような用語は特定の被験体細胞のみならず、そのような細胞の子孫または潜在的子孫もいうことは理解される。ある修飾が突然変異または環境の影響のいずれかにより後の世代で起こり得る故に、そのような子孫は事実親細胞と同一でないかもしれないが、依然として、本明細書中で用いる用語の範囲内に含まれる。

【0267】

宿主細胞はいずれかの原核生物（例えば、E. coli）または真核生物細胞（例えば、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞）であり得る。

【0268】

ベクターDNAは、慣用的形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物または真核生物に導入することができる。本明細書中で用いるように、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、リン酸カルシウム、またはリン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン-媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含めた、外来性核酸を宿主細胞に導入するための種々の当該分野で認められた技術をいうことを意図する。宿主細胞を形質転換し、またはトランスフェクトする適当な方法はSambrook et al. (前掲)、および他の実験マニュアルで見出すことができる。

【0269】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションでは、用いる発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞の小さな割合のみが外来性DNAをそのゲノムに取り込むことができることは知られている。これらの取込体を同定し、選択するためには、(例えば、抗生物質に対する耐性のための)選択可能なバイオマーカーをコードする遺伝子を注目する遺伝子と共に宿主細胞に一般的には導入する。好ましい選択可能バイオマーカーは、G418、ヒグロマイシンおよびメトトレキセートのような薬物に対する耐性を付与するものを含む。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は薬物選択によって同定することができる(例えば、選択可能なバイオマーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他方、他の細胞は死滅する)。

【0270】

培養中の原核生物または真核生物宿主細胞のような本発明の宿主細胞を用いて、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドを生産することができる。従って、本発明は、さらに、本発明の宿主細胞を用いて本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドを生産する方法を提供する。1つの実施形態において、該方法は、バイオマーカーが生産するように、適当な培地中で(本発明のポリペプチドをコードする組換え発現ベクターが導入された)本発明の宿主細胞を培養することを含む。もう1つの実施形態において、該方法は、さらに、培地または宿主細胞からバイオマーカーポリペプチドを単離することを含む。

【0271】

本発明の宿主細胞を用いて、非ヒトトランスジェニック動物を生産することもできる。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする配列が導入された受精卵母細胞または胚幹細胞である。次いで、そのような宿主細胞を用いて、本発明のバイオマーカー蛋白質をコードする外因性配列がそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物、または本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする内因性遺伝子が改変された相同組換え動物を作り出すことができる。そのような動物は、バイオマーカーに対応するポリペプチドの機能および/または活性を研究するのに、ポリペプチド活性のモジュレーターを同定しおよび/または評価するのに、ならびに治療または診断分子のプレ臨床試験において、バイオマーカーの発見または評価、例えば、治療および診断バイオマーカーの発見または評価のために、または薬物の効率および特異性の代用物として有用である。

【0272】

本明細書中で用いるように、「トランスジェニック動物」は非ヒト動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、動物の1以上の細胞が導入遺伝子を含むラットまたはマウスのようなげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例は非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などを含む。導入遺伝子は細胞のゲノムに組み込まれた外来性DNAであり、該細胞からトランスジェニック動物が発生し、該細胞は染色動物のゲノム中に残り、それにより、トランスジェニック動物の1以上の細胞型または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指令する。本明細書中で用いるように、「相同組換え動物」は非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここでは、内因性遺伝子が、該内因性遺伝子、および動物の発生に先立って動物の細胞、例えば、動物の胚細胞に導入された外因性DNA分子の間での相同組換えによって改変され

ている。トランスジェニック動物は、例えば、Chan I. T., et al. (2004) J Clin Invest. 113 (4): 528-38およびChin L. et al. (1999) Nature 400 (6743): 468-72に記載されたもののような誘導性トランスジェニック動物も含む。

【0273】

本発明のトランスジェニック動物は、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする核酸を受精卵母細胞の雄プロ核に導入することによって作成することができ、卵母細胞が偽妊娠雌養育動物中で発生させるのを可能とする。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルも導入遺伝子に含めて、導入遺伝子の発現の効率を増大させることもできる。組織—特異的調節配列は導入遺伝子に操作可能に連結して、本発明のポリペプチドの発現を特定の細胞に対して指令することができる。胚操作およびマイクロインジェクションを介してトランスジェニック動物、特に、マウスのような動物を作り出す方法は当該分野においては慣用的なものとなっており、例えば、米国特許第4,736,866号および第4,870,009号、米国特許第4,873,191号、およびHogan, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor N. Y., 1986に記載されている。同様な方法を他のトランスジェニック動物の生産で用いる。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムにおける導入遺伝子の存在および／または動物の組織または細胞における導入遺伝子をコードするmRNAの発現に基づいて同定することができる。次いで、トランスジェニック創始動物を用いて、導入遺伝子を運ぶさらなる動物を育種することができる。さらに、導入遺伝子を運ぶトランスジェニック動物を、さらに、他の導入遺伝子を運ぶ他のトランスジェニック動物と交雑させることができる。

【0274】

相同組換動物を作成するためには、その中へ欠失、付加、または置換が導入されて、それにより、遺伝子を改変する、例えば、機能的に破壊した本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする遺伝子の少なくとも一部を含むベクターが調製される。好ましい実施形態において、ベクターは、相同組換えに際して、内因性遺伝子が機能的に破壊される（すなわち、もはや機能的蛋白質をコードしない；「ノックアウト」ベクターともいわれる）ように設計される。あるいは、ベクターは、相同組換えに際して、内因性遺伝子が突然変異され、またはそうでなければ改変されるが、依然として、機能的蛋白質をコードする（例えば、上流調節領域を改変して、それにより、内因性蛋白質の発現を改変する）ように設計することができる。相同組換えベクターにおいては、遺伝子の改変された部分は遺伝子のさらなる核酸によってその5'および3'末端において近接挟まれて、ベクターによって運ばれた外因性遺伝子および胚幹細胞における内因性遺伝子の間で相同組換えが起こるのを可能とする。さらなるフランキング核酸配列は、内因性遺伝子との成功した相同組換えに十分な長さのものである。典型的には、（5'および3'末端双方における）数キロ塩基のフランキングDNAをベクターに含ませる（例えば、相同組換えベクターの記載についてはThomas and Capecechi, 1987, Cell 51: 503参照）。ベクターは（例えば、エレクトロポレーションによって）胚幹細胞系に導入され、導入された遺伝子が内因性遺伝子と相同組換えされた細胞を選択する（例えば、Li et al., 1992, Cell 69: 915参照）。次いで、選択された細胞を動物（例えば、マウス）の未分化胚芽細胞に注入して、同種キメラを形成する（例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson編, IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152参照）。次いで、キメラ胚を適当な偽妊娠雌養育動物に移植し、胚を出産予定日まで持つて行く。その染色細胞において相同組換えDNAを保有する子孫を用いて、動物の全ての細胞が導入遺伝子の生殖系伝達によって相同組換えDNAを含有する動物を育種す

ることができる。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法は、さらに、Bradley (1991) Current Opinion in Bio/Technology 2:823-829およびPCT公開番号WO 90/11354、WO 91/01140、WO 92/0968、およびWO 93/04169に記載されている。

【0275】

もう1つの実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能とする選択されたシステムを含むトランスジェニック非ヒト動物を生産することができる、そのようなシステムの1つの例はバクテリオファージP1のcre/loxPレコンビナーゼシステムである。cre/loxPレコンビナーゼシステムの記載については、Laks et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236参照。レコンビナーゼシステムのもう1つの例はSaccharomyces cerevisiaeのFLPレコンビナーゼシステムである(O'Gorman et al., 1991, Science 251:1351-1355)。もしcre/loxPレコンビナーゼシステムを用いて導入遺伝子の発現を調節するならば、Creレコンビナーゼおよび選択される蛋白質の双方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要とされる。そのような動物は、例えば、1つは選択される蛋白質をコードする遺伝子を含み、他方はレコンビナーゼをコードする導入遺伝子をコードする2つのトランスジェニック動物を交配させることによって、「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて供することができる。

【0276】

本明細書中に記載された非ヒトトランスジェニック動物のクローンの、Wilmut et al. (1997) Nature 385:810-813およびPCT公開番号WO 97/07668およびWO 97/07669に記載された方法に従って生産することもできる。

【0277】

(VII. 治療の方法)

本発明は、癌、例えば、膵臓癌、例えば、膵臓腺癌を有する、またはその危険性がある（またはそれに対して感受性である）被験体、例えば、ヒトを処置する予防的治療的双方の方法を提供する。本明細書中で用いるように、被験体の「治療」は、疾患または疾病、疾患または疾病の兆候、または疾患または疾病の危険性（またはそれに対する感受性）を治癒し、阻害し、回復し、軽減し、緩和し、改変し、救済し、和らげ、改善し、または影響させる目的で、治療剤の、疾患または疾病を有し、疾患または疾病の兆候を有し、疾患または疾病の危険性がある（またはそれに対して感受性の）被験体への適用または投与、または治療剤の被験体からの細胞または組織への適用または投与を含む。本明細書中で用いるように、「治療剤」または「化合物」は、限定されるものではないが、低分子、ペプチド、ペプチドミメティックス、ポリペプチド、RNA干渉因子、例えば、siRNA分子、抗体、リボザイム、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【0278】

本明細書中で用いるように、被験体における癌は、1以上のバイオマーカー、例えば、癌において増加することが示されているバイオマーカーの量および/または活性の変化、例えば、増加、または構造の変化、および/または1以上のバイオマーカー、例えば、癌において減少することが示されているバイオマーカーの量および/または活性の減少、または構造の変化に関連付けられる。前記で議論したように、量、構造、および/または活性のこれらの変化のいくつかは癌の発生に由来し、これらの変化の他のものは癌細胞の癌性状態を誘導し、維持し、および促進する。かくして、1以上のバイオマーカー、例えば、癌で増加することが示されているバイオマーカーの量および/または活性の増加、または構造の変化によって特徴付けられる癌は、それらのバイオマーカーの量、例えば、発現または蛋白質レベルおよび/または活性を阻害することによって阻害することができる。同様に、1以上のバイオマーカー、例えば、癌において減少することが示されているバイ

オマーカーの量および／または活性の減少、または構造の変化によって特徴付けられる癌は、それらのバイオマーカーの量、例えば、発現または蛋白質のレベル、および／または活性を増強させることによって阻害することができる。

【0279】

したがって、本発明のもう1つの態様は癌に罹った被験体を治療する方法に関する。これらの方法は、本発明の1以上のバイオマーカーの量および／または活性を変調する化合物を被験体に投与することを含む。例えば、癌の治療または予防の方法は、1以上のバイオマーカー、例えば、癌において増加することが示されているバイオマーカーの量および／または活性を減少させる化合物を被験体に投与することを含む。バイオマーカー、例えば、癌において増大することが示されているバイオマーカーの量および／または活性を阻害するのに用いて、それにより、癌を治療または予防することができる化合物、例えば、アンタゴニストは抗体（例えば、結合体化抗体）、低分子、RNA干渉因子、例えば、siRNA分子、リボザイム、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。1つの実施形態において、治療で用いられる抗体はトキシン、化学療法剤、または放射性粒子に結合体化させる。

10

【0280】

癌の治療または予防の方法は、バイオマーカー、例えば、癌において減少することが示されているバイオマーカーの量および／または活性を増加させる化合物を被験体に投与することを含む。バイオマーカー、例えば、癌において減少することが示されているバイオマーカーの発現または活性を増加させるのに用いて、それにより、癌を治療または予防する化合物、例えば、アゴニストは低分子、ペプチド、ペプチド、ペプチドミメティックス、およびポリペプチドを含む。

20

【0281】

本発明の方法で用いる低分子は、蛋白質-蛋白質相互作用を阻害し、それにより、バイオマーカーの量および／または活性を増加または減少させるものを含む。さらに、サイレントとされた遺伝子、例えば、腫瘍サプレッサーの再発現を引き起こすモジュレーター、例えば、低分子もここでは含まれる。例えば、そのような分子はDNA結合またはメチルトランスフェラーゼ活性に干渉する化合物を含む。

【0282】

アダマーを用いて本発明のバイオマーカーの発現または活性を変調し、例えば、増加させ、阻害し、それにより、癌を治療または予防し、阻害することもできる。アダマーは、他の分子に結合するその能力に基づいてランダムなプールから選択されているDNAまたはRNA分子である。核酸または蛋白質に結合するアダマーを選択することができる。

30

【0283】

(VII. 医薬組成物)

本発明のバイオマーカーに対応する（ここでは「活性化合物」または「化合物」ともいわれる）低分子、ペプチド、ペプチド、ペプチドミメティックス、ポリペプチド、RNA干渉因子、例えば、siRNA分子、抗体、リボザイムおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与に適した医薬組成物に取り込むことができる。そのような組成物は、典型的には、低分子、ペプチド、ペプチド、ペプチドミメティックス、ポリペプチド、RNA干渉因子、例えば、siRNA分子、抗体、リボザイム、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的に受容可能な担体を含む。本明細書中で用いるように、用語「薬学的に受容可能な担体」は、医薬投与に適合する、いずれかのおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等を含むことを意図する。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および剤の使用は当該分野でよく知られている。いずれかの慣用的な媒体または剤が活性な化合物と適合しない限りを除き、組成物におけるその使用が考えられる。補助的な活性化合物の組成物に配合することもできる。

40

【0284】

本発明は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドまたは核酸の発現または活

50

性を変調するための医薬組成物を調製する方法を含む。そのような方法は、薬学的に受容可能な担体を、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドまたは核酸の発現または活性を変調する剤と共に処方することを含む。そのような組成物は、さらに、追加の活性剤を含むことができる。かくして、本発明は、さらに、薬学的に受容可能な担体を、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドまたは核酸の発現または活性を変調する剤および1以上の追加の活性化合物と共に処方することによって医薬組成物を調製する方法を含む。

【0285】

低分子剤および蛋白質またはポリペプチド剤の適当な用量は、通常の技量の医師、獣医または研究者の知識内の多数の因子に依存することは理解される。これらの剤の用量は、例えば、治療すべき被験体または試料の同一性、サイズ、および症状に依存して、さらに、組成物が投与されるべき経路、もし可能であれば、および実施者が化合物が本発明の核酸分子またはポリペプチドに対して有することを望む効果に依存して変化する。低分子は、限定されるものではないが、ペプチド、ペプチドミメティックス、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、モル当たり約10,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機および有機金属化合物を含む）、モル当たり約5,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物、モル当たり約1,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物、モル当たり約500グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物およびそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に受容可能な形態を含む。

【0286】

低分子の例示的な用量は、被験体または試料の重量1キログラム当たりミリグラムまたはマイクログラムの量を含む（例えば、キログラム当たり約1マイクログラムまたはキログラム当たり約500マイクログラム、キログラム当たり約100マイクログラムまたはキログラム当たり約5マイクログラム、またはキログラム当たり約1マイクログラムないしキログラムあたり約50マイクログラム）。

【0287】

本明細書中で定義するように、RNA干渉因子、例えば、siRNAの治療上有効量（すなわち、有効用量）は約0.001ないし3,000mg/kg体重、好ましくは約0.01ないし2500mg/kg体重、より好ましくは約0.1ないし2000、約0.1ないし1000mg/kg体重、0.1ないし500mg/kg体重、0.1ないし100mg/kg体重、0.1ないし50mg/kg体重、0.1ないし25mg/kg体重、なおより好ましくは約1ないし10mg/kg、2ないし9mg/kg、3ないし8mg/kg、4ないし7mg/kg、または5ないし6mg/kg体重の範囲である。治療上有効量のRNA干渉因子での対照の治療は、単一治療を含むことができるか、あるいは好ましくは系列的治療を含むことができる。好ましい例においては、被験体は約0.1ないし20mg/kg体重の間の範囲にて、RNA干渉因子で、約1ないし10週間の間に、好ましくは、2ないし8週間の間、より好ましくは約3ないし7週間の間、なおより好ましくは約4、5または6週間の間に1週間当たり1回処置する。

【0288】

蛋白質またはポリペプチドの例示的な用量は、被験体または試料重量1キログラム当たりグラム、ミリグラム、またはマイクログラムの量を含む（例えば、キログラム当たり約1マイクログラムないしキログラム当たり約5グラム、キログラム当たり約100マイクログラムないしキログラム当たり約500ミリグラム、またはキログラム当たり約1ミリグラムないしキログラム当たり約50ミリグラム）。さらに、これらの剤の1つの適当な用量は、変調すべき発現または活性に関する剤の能力に依存することがさらに理解される。そのような適当な用量は本明細書中に記載されたアッセイを用いて決定することができる。1以上のこれらの剤を動物（例えば、ヒト）に投与して、本発明のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を変調する場合、医師、獣医、または研究者は、例えば、まず比較

的低い容量を処方し、引き続いて、適当な応答が得られるまで用量を増加させる。加えて、いずれかの特定の動物被験体についての具体的用量レベルは、使用する特定の剤の活性、被験体の年齢、体重、一般的健康、性別、および食習慣、投与の時間、投与の経路、排出速度、いずれかの薬物組合せ、および変調すべき発現または活性の程度を含めた種々の因子に依存するであろうことは理解される。

【0289】

本発明の医薬組成物はその意図した投与経路に適合するよう処方される。投与の経路の例は非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与を含む。非経口、皮内または皮下適用で用いる溶液または懸濁液は以下の成分：注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸または二亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン-四酢酸のようなキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような等張性の調製用の剤を含む。pHは塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調整することができる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチックで作成されたアンプル、ディスポーザブルシリンジまたは多用量バイアルに入れることができる。

【0290】

注射使用に適した医薬組成物は滅菌水性溶液（水溶性の場合）、または分散液および滅菌注射溶液または分散液の即席調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与では、適当な担体は生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（BASF； Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、組成物は滅菌されていなければならない、容易な相乗効果が存在する程度まで流動性であるべきである。それは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない、細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびその適当な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロザール等によって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むのが好ましいであろう。注射組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含ませることによって実現される。

【0291】

滅菌注射溶液は、必要な量の活性化合物（例えば、ポリペプチドまたは抗体）を、必要であれば、前記リストの成分の1つまたは組合せと共に適当な溶媒に配合し、続いて、濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本的分散媒体を含む滅菌ビークルに活性化合物を配合し、次いで、前記リストからの必要な他の成分を配合することによって調製される。滅菌注射溶液の調製用の滅菌粉末の場合には、調製の好ましい方法は真空乾燥および凍結乾燥であり、これは、有効成分+その従前に滅菌濾過された溶液からのいずれかの追加の所望の成分の粉末を生じる。

【0292】

経口組成物は、一般には、不活性な希釈剤または食用担体を含む。それらはゼラチンカプセルに封入することができるか、または圧縮して錠剤とすることができる。経口治療投与の目的では、活性な化合物を賦形剤と共に配合することができ、錠剤、トローチまたはカプセルの形態で用いることができる。経口組成物は、マウスウォッシュとして用いるために流体担体を用いて調製することもでき、そこでは、流体担体中の化合物が経口により適用され、口内で転がし、吐き出し、または飲み込む。

【0293】

薬学的に適合する結合剤および／または賦形剤物質は組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは以下の成分、または同様な性質の化合物のいずれかを含有することができる：マイクロクリスタリンセルロース、トララガントガムまたはゼラチンのような結合剤；澱粉またはラクトースのような賦形剤、アルギン酸、プリモゲル、またはコーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム、またはステロート（Sterotes）のような滑沢剤；コロイド状に酸化ケイ素のようなグライダント；スクロースまたはサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバーのようなフレーバー剤。

【0294】

吸入による投与のためには、化合物を、適当なプロペラント、例えば、二酸化炭素のようなガス、ガスを含有する圧縮容器またはディスペンサー、あるいはネビュライザーからのエアロゾルスプレイの形態で送達される。

【0295】

全身投与は経粘膜または経皮手段によることもできる。経粘膜または経皮投与では浸透させるべきバリアに対して適当な浸透剤を処方で用いる。そのような浸透剤は一般的に当該分野で知られており、例えば、経皮投与では、洗剤、胆汁塩、および流動性酸誘導体を含む。経粘膜投与は鼻スプレイまたは坐薬の使用を介して達成することができる。経皮投与では、活性化化合物を当該分野で一般的に知られた軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームに処方される。

【0296】

化合物は（例えば、カカオバターおよび他のグリセリドのような慣用的な坐薬基剤での）坐薬、または直腸送達用の保持浣腸の形態で調製することができる。

【0297】

1つの実施形態において、有効化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含めた、制御放出処方のような、身体からの迅速な排出に対して化合物を保護する担体とで調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドライド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような生分解性生体適合性ポリマーを用いることができる。そのような処方の調製方法は当業者に明らかであろう。また、該物質はAlza Corporation およびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に得ることもできる。（その中にまたはその上にモノクローナル抗体が一体化されたりリポソームを含めた）リポソーム懸濁液は、薬学的に受容可能な担体として用いることもできる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されたように当業者に知られた方法によって調製することができる。

【0298】

経口または非経口組成物を、投与の容易性および投与量の均一性のために投与単位形態で処方するのが特に有利である。本明細書中で用いる投与単位形態とは、治療すべき被験体についての単位投与量として適した物理的に区分される単位をいい；各単位は、必要な医薬担体と組み合わせて所望の治療効果を生じさせるように計算された所定量の活性化化合物を含有する。本発明の投与単位形態のための仕様は、活性化化合物のユニークな特徴および達成すべき特定の治療効果、ならびに個体の治療用のそのような活性化化合物を調合する分野に固有の制限に直接的に指示され、かつ直接的にそれに依存する。

【0299】

抗体では、好ましい投与量は0.1mg/kgないし100mg/kg体重（一般に、10mg/kgないし20mg/kg）である。もし抗体が脳において作用すべきであれば、50mg/kgないし100mg/kgの投与量が通常は適切である。一般には、部分的にヒトの抗体および十分にヒトの抗体は他の抗体よりもヒト身体内で長い半減期を有する。したがって、より低い投与量およびより低い頻度の投与がしばしば可能である。脂質化のような修飾を用いて、抗体を安定化し、（例えば、上皮への）摂取および組織浸透を増強させることができる。抗体の脂質化のための方法はCruikshank et

10

20

30

40

50

al., (1997) J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193
によって記載されている。

【0300】

本発明のバイオマーカーに対応する核酸分子はベクターに挿入し、遺伝子治療ベクターとして用いることができる。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号）によって、または定位注射（例えば、Chen et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057 参照）によって被験体に送達することができる。遺伝子治療ベクターの医薬製剤は適当な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含むことができる、あるいは遺伝子送達ビークルが埋められた遅延放出マトリックスを含むことができる。別法として、完全な遺伝子送達ベクター、レトロウイルスベクターが組換え細胞から無傷で生じさせることができる場合、医薬製剤は遺伝子送達システムを生じさせる1以上の細胞を含むことができる。

10

【0301】

本発明の方法で用いるRNA干渉因子、例えば、siRNAをベクターに挿入することができる。これらの構築体は、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号）によって、または定位注射（例えば、Chen et al., (1994)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057 参照）によって被験体に送達することができる。ベクターの医薬製剤はRNA干渉因子、例えば、siRNAベクターを許容される希釈剤中に含むことができ、あるいは遺伝子送達ビークルが埋められた遅延放出マトリックスを含むことができる。別法として、完全な遺伝子送達ベクター、例えば、レトロウイルスベクターが組換え細胞から無傷で生産できる場合、医薬製剤は、遺伝子送達システムを生じる1以上の細胞を含むことができる。

20

【0302】

医薬組成物は投与用の指示書と共に容器、パックまたはディスペンサーに含めることができる。

【0303】

(IX. 予測される医療)

また、本発明は、予測医療の分野にも関し、ここに、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノミクス、およびモニタリング臨床試験が予後（予測）目的で用いられ、それにより、個体を予防的に処置する。したがって、本発明の1つの態様は、本発明の1以上のバイオマーカーに対応するポリペプチドまたは核酸の量、構造および／または活性を測定して、個体が癌を発症する危険性があるか否かを判断するための診断アッセイに関する。そのようなアッセイは、予後または予測目的で用いて、それにより、癌の開始に先立って個体を予防的に処置することができる。

30

【0304】

本発明のなもう1つの態様は、臨床試験における本発明のバイオマーカーの量、構造および／または活性に対する剤（例えば、癌を阻害し、またはいずれかの他の疾病を治療または予防して {すなわち、そのような処置が有するかも知れないいずれかの癌形成効果を理解する} ために投与される薬物または他の化合物）の影響をモニターすることに関する。これらおよび他の剤を以下のセクションでさらに詳しく記載する。

40

【0305】

A. 診断アッセイ

1. コピー数の検出のための方法

特定のバイオマーカーまたは染色体領域（例えば、MCR）のコピー数を評価する方法は当業者によく知られている。染色体獲得または喪失の存在または不存在は、単に、個々に同定された領域またはバイオマーカーのコピー数の測定によって評価することができる。

【0306】

試料中のコーディング核酸のコピー数を評価するための方法は、限定されるものではな

50

いが、ハイブリダイゼーションベースのアッセイを含む。例えば、試料中のコーディング核酸のコピー数を評価する1つの方法はサザンブロットを含む。サザンブロットにおいては、（典型的には、フラグメント化され、電気泳動ゲルで分離された）ゲノムDNAを、標的領域に対して特異的なプローブにハイブリダイズさせる。標的領域についてのプローブからのハイブリダイゼーションシグナルの強度の、正常なゲノムDNA（例えば、同一または関連細胞、組織、器官等の非増幅部分）の分析からの対照プローブシグナルとの比較により、標的核酸の相対的コピー数の見積もりが提供される。別法として、ノーザンブロットは、試料中のコーディング核酸のコピー数を評価するために利用することができる。ノーザンブロットにおいては、mRNAを、標的領域に対して特異的なプローブにハイブリダイズさせる。標的領域プローブからのハイブリダイゼーションシグナルの強度と、正常なmRNA（例えば、同一または関連細胞、組織、器官等の非増幅部分）の分析からの対照プローブシグナルとの比較により、標的核酸の相対的コピー数の見積もりが提供される。

10

【0307】

コピー数を決定するための代替手段はイン・サイチュハイブリダイゼーションである（例えば、Angerer (1987) Meth. Enzymol 152:649）。一般に、イン・サイチュハイブリダイゼーションは以下の工程：（1）分析すべき組織または生物学的構造の固定；（2）標的DNAの接近性を増加させ、および非特異的結合を低下させるための生物学的構造のプレハイブリダイゼーション処理；（3）核酸の混合物の生物学的構造または組織中の核酸へのハイブリダイゼーション；（4）ハイブリダイゼーションで結合しない核酸フラグメントを除去するためのハイブリダイゼーション後洗浄、および（5）ハイブリダイズした核酸フラグメントの検出を含む。これらの工程の各々で用いる試薬、および使用のための条件は特定の適用に依存して変化する。

20

【0308】

好ましいハイブリダイゼーションベースのアッセイは、限定されるものではないが、サザンブロットまたはイン・サイチュハイブリダイゼーション（例えば、FISHおよびFISH+SKY）のような伝統的な「直接的プローブ」方法、および比較ゲノミックハイブリダイゼーション（CGH）、例えば、cDNAベースのまたはオリゴヌクレオチド配列ベースCGHのような「比較プローブ」方法を含む。該方法は、限定されるものではないが、基材（例えば、膜またはガラス結合方法またはアレイベースのアプローチを含めた広く種々の様式で用いることができる。

30

【0309】

典型的なイン・サイチュハイブリダイゼーションアッセイにおいては、細胞は固体支持体、典型的には、ガラススライドに固定化される。もし核酸をプローブするならば、細胞は典型的には熱またはアルカリで変性する。次いで、細胞を、蛋白質をコードする核酸配列への特異的な標識されたプローブのアニリングを可能とする中程度の温度にてハイブリダイゼーション溶液と接触させる。次いで、標的（例えば、細胞）を、適当なシグナル／ノイズ比が得られるまで、所定のストリンジェンシーにて、または増大させるストリンジェンシーにて典型的には洗浄する。

40

【0310】

プローブは、典型的には、例えば、放射性同位体または蛍光レポーターで標識される。好ましいプローブは、ストリンジェントな条件下で標的核酸と特異的にハイブリダイズするように十分に長い。好ましいサイズの範囲は約200塩基ないし約1000塩基である。

【0311】

いくつかの適用においては、反復配列のハイブリダイゼーション能力をブロックする必要がある。かくして、いくつかの実施形態においてtRNA、ヒトゲノムDNA、またはCot-I DNAを用いて、非特異的ハイブリダイゼーションをブロックする。

【0312】

CGH方法においては、（例えば、試料、例えば、可能な腫瘍からの）核酸の第一のコ

50

レクションを第一の標識で標識し、他方、核酸（例えば、健康な細胞／組織からの、例えば、対照）の第二のコレクションを第二の標識で標識する。核酸のハイブリダイゼーションの比率は、アレイにおける各繊維に結合する2つの（第一および第二）の標識によって決定される。染色体の欠失または多重化がある場合、2つの標識からのシグナルの比率の差を検出し、該比率はコピー数の尺度を供するであろう。また、アレイベースのCGHは、（2つの異なる色素で被験体および可能な腫瘍細胞を標識し、ハイブリダイゼーションに先立ってそれらを混合するのとは対照的に（これは、アレイ上のプローブの競合ハイブリダイゼーションによる比率を生じるであろう））単一色標識で行うこともできる。単一色CGHにおいては、対照を標識し、1つのアレイにハイブリダイズさせ、絶対シグナルを読み、可能な腫瘍試料を標識し、（同一含有量にて）第二のアレイにハイブリダイズさせ、絶対シグナルを読む。コピー数の差は、2つのアレイからの絶対シグナルに基づいて計算される。

10

【0313】

本発明の方法で用いるのに適したハイブリダイゼーションプロトコルは、例えば、Albertson (1984) EMBO J. 3:1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142; EPO公開番号430,402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In situ Hybridization Protocols, Choo編, Humana Press, Totowa, N. J. (1994) 等に記載されている。1つの実施形態において、Pinkel, et al. (1998) Nature Genetics 20:207-211、またはKallioniemi (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5321-5325 (1992) のハイブリダイゼーションプロトコルを用いる。

20

【0314】

本発明の方法は、アレイベースのハイブリダイゼーションフォーマットによく適合している。アレイベースのCGHは、その内容をここに引用して援用する米国特許第6,455,258号に記載されている。

【0315】

さらにもう1つの実施形態において、増幅ベースのアッセイを用いて、コピー数を測定することができる。そのような増幅ベースのアッセイにおいて、核酸配列は増幅反応（例えば、ポリメラーゼ鎖反応（PCR））において鋳型として作用する。定量的な増幅において、増幅産物の量は基の試料に於ける鋳型の量に比例するであろう。適当な対照、例えば、健康な組織に対する比較により、コピー数の尺度が提供される。

30

【0316】

「定量的」増幅の方法は当業者によく知られている。例えば、定量的なPCRは、同一プライマーを用いて既知の量の対照配列を同時に増幅することを含む。これは、PCR反応をキャリブレートするのに用いることができる内部標準である。定量PCRについての詳細なプロトコルはInnis, et al., (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N. Y. に供される。定量PCR分析を用いるマイクロサテライト遺伝子座におけるDNAコピー数の測定はGinzonger, et al., (2000) Cancer Research 60:5405-5409に記載されている。遺伝子についての既知の核酸配列は、当業者は、ルーチ的にプライマーを選択して、遺伝子のいずれかの部分を増幅するのを可能とするのに十分なのである。発蛍光性定量PCRを本発明の方法で用いることもできる。発蛍光性定量PCRにおいては、定量は蛍光シグナル、例えば、TaqManおよびsybr緑色の量に基づく。

40

【0317】

他の適当な増幅方法は、限定されるものではないが、リガーゼ鎖反応（LCR）（Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560、Lande

50

gren, et al., (1988) Science 241:1077、および Barringer et al., (1990) Gene 89:117)、転写増幅 (Kwoh, et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173)、自己-維持配列複製 (Guatelli, et al., (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:1874)、ドットPCR、およびリンカーアダプターPCR等を含む。

【0318】

ヘテロ接合性 (LOH) の喪失のマッピング (Wang, Z. C., et al., (2004) Cancer Res. 64 (1):64-71; Seymour, A. B., et al., (1994) Cancer Res. 54, 2761-4; Hahn, S. A., et al., (1995) Cancer Res. 55, 4670-5; Kimura, M., et al., (1996) Genes Chromosomes Cancer 17, 88-93) を用いて、増幅または欠失の領域を同定することもできる。

【0319】

2. 遺伝子発現の検出方法

バイオマーカー発現レベルは、癌の、または癌を発症する危険性の診断方法として圧制することもできる。本発明のバイオマーカーの発現は、転写された分子または蛋白質の発現を検出するための広く種々のよく知られた方法のいずれかによって評価することができる。そのような方法の非限定的例は分泌された細胞-表面、細胞質、または核蛋白質の検出のための免疫学的方法、蛋白質精製方法、蛋白質機能または活性アッセイ、核酸ハイブリダイゼーション方法、核酸逆転写方法、および核酸増幅方法を含む。

【0320】

好ましい実施形態において、特定の遺伝子の活性は、遺伝子転写体 (例えば、mRNA) の尺度によって、翻訳された蛋白質の量の尺度によって、または遺伝子産物活性の尺度によって特徴付けられる。バイオマーカー発現は、mRNAレベル、蛋白質レベル、または蛋白質活性を検出することによるのを含めた種々の方法でモニターすることができ、そのいずれも標準技術を用いて測定することができる。検出は遺伝子発現のレベル (例えば、ゲノミックDNA、cDNA、mRNA、蛋白質、または酵素活性) の定量を含むことができるか、あるいは特に対照レベルと比較した、遺伝子発現のレベルの定量的評価であり得る。検出すべきレベルのタイプは文脈から明らかであろう。

【0321】

核酸ハイブリダイゼーション技術を用いる遺伝子転写体 (mRNAまたはそれから作成されたcDNA) を検出し、および/または定量する方法は当業者に知られている (Sambrook et al., 前掲参照)。例えば、cDNAの存在、不存在、または量を評価するための1つの方法は前記したサザン移動を含む。簡単に述べれば、該mRNAを (例えば、酸グアニジウム-フェノールクロロホルム抽出方法を用い、Sambrook et al., 前掲) 単離し、逆転写して、cDNAを得る。次いで、該cDNAを所望により消化し、緩衝液中にてゲル上で泳動させ、膜に移動させる。次いで、標的cDNAに対して特異的な核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションを行う。

【0322】

そのような診断および予後アッセイの一般的原理は、試料、またはバイオマーカーおよびプローブを含有することができる反応混合物を、適当な条件下で、バイオマーカーおよびプローブが相互反応し、結合し、かくして、除去でき、および/または反応混合物中で検出できる複合体を形成するのに十分な時間の間で、調製することを含む。これらのアッセイは種々の方法で行うことができる。

【0323】

例えば、そのようなアッセイを行う1つの方法は、基材ともいわれる固相支持体上にバイオマーカーまたはプローブを係留させ、次いで、反応の最後に固相に係留された標的バイオマーカー/プローブ複合体を検出することを含むであろう。そのような方法の1つの

実施形態において、バイオマーカーの存在および／または濃度につきアッセイすべき被験体からの試料を担体または固相支持体に係留させることができる。もう1つの実施形態において、逆の状況が可能であり、そこでは、プローブを固相に係留させることができ、被験体からの試料をアッセイの未係留成分として反応させることができる。

【0324】

アッセイ成分を固相に係留するための多くの確立された方法がある。これらは、限定されるものではないが、ビオチンおよびストレプトアビジンのコンジュゲーションを通じて固定化されるバイオマーカーまたはプローブ分子を含む。そのようなビオチニル化アッセイ成分は当該分野で知られた技術（例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL）を用いて、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製することができ、ストレプトアビジン-被覆96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルで固定化することができる。ある実施形態においては、固定化されたアッセイ成分を持つ表面は予め調製し、貯蔵することができる。

10

【0325】

そのようなアッセイのための他の適当な担体または固相支持体は、バイオマーカーまたはプローブが属する分子のクラスに結合することができるいずれかの材料を含む。よく知られた支持体または担体は、限定されるものではないが、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、およびマグネタイトを含む。

20

【0326】

前記したアプローチにてアッセイを行うために、非一固定化成分を、それに対して第二の成分に係留された固相に加える。反応が完了した後、いずれかの複合体が固相に固定化されたままである条件下で、未複合体化成分を（例えば、洗浄によって）除去することができる。固相に係留されたバイオマーカー／プローブ複合体の検出は、本明細書中に概説された多数の方法で達成することができる。

【0327】

好ましい実施形態において、プローブはそれが未係留アッセイ成分である場合、アッセイの本明細書中で議論し、かつ当業者によく知られた検出可能な標識での、直接的または間接的なアッセイの検出および呼出の目的で標識することができる。

30

【0328】

また、例えば、蛍光エネルギー移動の技術を利用することによって、いずれかの成分（バイオマーカーまたはプローブ）のさらなる操作または標識なくして、バイオマーカー／プローブ複合体系性を直接的に検出することも可能である（例えば、Lakowicz et al., 米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulos, et al., 米国特許第4,868,103号参照）。第一の「ドナー」分子上のフルオロフォアは、適当な波長の入射光での励起に際して、その発光された蛍光エネルギーが、吸収されたエネルギーにより今度は発光できる第二の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収されるように選択される。別法として、「ドナー」蛋白質分子は、単に、トリプトファン残基の天然蛍光エネルギーを利用することができる。「アクセプター」分子標識が「ドナー」のそれから区別できるように、異なる波長の光を発する標識を選択する。標識の間のエネルギー移動の効率は分子を分離する距離に関連するため、分子の間の空間的な関係の評価することができる。結合が該分子の間で起こる状況では、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光発光は最大になるはずである。FET結合事象は、（例えば、フルオリメーターを用いて）当該分野でよく知られた標準フルオロメーター検出手段を通じて便宜には測定することができる。

40

【0329】

もう1つの実施形態において、バイオマーカーを認識するプローブの能力の測定は、リアルタイム生体分子相互作用分析（BIA）のような技術を利用することによって、いずれかのアッセイ成分（プローブまたはバイオマーカー）を標識することなく達成するこ

50

とができる（例えば、Sjoland, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345およびSzabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705参照）。本明細書中で用いるように、「BIA」または「表面プラズモン共鳴」は、相互作用体（例えば、BIACore）のいずれも標識することなく、リアルタイムにて生体特異的相互作用を調べるための技術である。（結合事象を示す）結合表面における質量の変化の結果、表面近くの光の屈折率の変化（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学現象）がもたらされ、その結果、検出可能なシグナルが生じ、これは生物学的分子の間のリアルタイム反応の尺度として用いることができる。

【0330】

別法として、もう1つの実施形態において、類似の診断および予後アッセイを、液相中の溶質としてのバイオマーカーおよびプローブにて行うことができる。そのようなアッセイにおいて、複合体化バイオマーカーおよびプローブは、限定されるものではないが：分画遠心法、クロマトグラフィー、電気泳動および免疫沈澱を含めた多数の標準技術のいずれかによって未複合体化成分から分離する。分画遠心法においては、バイオマーカー／プローブ複合体は、それらの異なるサイズおよび密度に基づいて複合体の異なる沈積平衡により、一連の遠心工程について未複合体化アッセイ成分から分離することができる（例えば、Rivas, G., and Minton, A. P., 1993, Trends Biochem. Sci. 18(8):284-7参照）。また、標準クロマトグラフィー技術を利用して、複合体化分子を未複合体化分子から分離することもできる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーは、サイズに基づき、かつカラムフォーマットにて適当なゲル濾過樹脂の利用を介して分子を分離し、例えば、比較的大きな複合体は比較的小さな未複合体化成分から分離することができる。同様に、未複合体化成分と比較してバイオマーカー／プローブ複合体の相対的に異なる電荷特性を利用して、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂の利用を通じて、複合体を未複合体化成分から分けることができる。そのような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者によく知られている（例えば、Heegaard, N. H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6):141-8; Hage, D. S., および Tweed, S. A. J. Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997 Oct 10; 699(1-2):499-525参照）。ゲル電気泳動を使用して、複合体化アッセイ成分を未結合成分から分離することもできる（例えば、Ausubel et al., 編, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999参照）。この技術においては、蛋白質または核酸複合体を、例えば、サイズまたは電荷に基づいて分離する。電気泳動プロセスの間の結合反応を維持するために、非変性ゲルマトリックス物質および還元剤の非存在下における条件が典型的には好ましい。特定のアッセイおよびその成分に対する適当な条件は当業者によく知られている。

【0331】

特別な実施形態において、バイオマーカーに対応するmRNAのレベルは、当該分野で知られた方法を用い、生物学的試料においてイン・サイチュ様式によって、およびイン・ビトロ様式によって測定することができる。用語「生物学的試料」は、被験体から単離された組織、細胞、生物学的流体およびその単離体、ならびに被験体内に存在する細胞および流体を含むことを意図する。多くの発現検出方法は単離されたRNAを用いる。イン・ビトロ方法では、mRNAの単離に対して選択しないいずれかのRNA単離技術を、細胞からのRNAの精製で利用することができる（例えば、Ausubel et al., 編, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999参照）。加えて、多数の組織試料は、例えば、Chomczynski (1989, 米国特許第4,843,155号)の単一工程RNA単離プロセスのような当業者によく知られた技術を用いて容易に処理することができる。

【0332】

単離された核酸は、限定されるものではないが、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ鎖反応およびプローブアレイを含めたハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイで用いることができる。mRNAレベルの検出のための1つの好ましい診断方法は、検出すべき遺伝子によってコードされるmRNAにハイブリダイズすることができる核酸分子（プローブ）と単離されたmRNAとを接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、全長cDNA、またはストリンジェントな条件下で本発明のバイオマーカーをコードするmRNAまたはゲノミックDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分な長さが少なくとも7、15、30、50、100、250または500ヌクレオチドのようなその部分であり得る。本発明の診断アッセイで用いられる他の適当なプローブは本明細書中に記載される。mRNAとプローブとのハイブリダイゼーションは、問題とするバイオマーカーが発現されていることを示す。

10

【0333】

1つの様式において、mRNAは固体表面に固定化され、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲルに流し、次いで、ニトロセルロースのような膜へゲルからのmRNAを移すことによってプローブと接触させる。別の様式において、プローブは固体表面に固定化され、mRNAは、例えば、Assymetrix遺伝子チップアレイにおいてプローブと接触させる。当業者であれば、本発明のバイオマーカーによってコードされるmRNAのレベルを検出するのに用いられる公知のmRNA検出方法を容易に適合させることができる。

20

【0334】

プローブは蛋白質をコードする核酸配列の全長とすることができるか、または該全長未満とすることができる。より短いプローブは特異性につき経験的にテストされる。好ましくは、核酸プローブは長さが20塩基またはそれよりも長い。（例えば、核酸ハイブリダイゼーションで用いられる核酸プローブ配列を選択する方法についてはSambrook et al., 参照）。ハイブリダイズされた部分の可視化は、cDNAの存在または不存在の定量的測定を可能とする。

【0335】

試料中の本発明のバイオマーカーに対応する転写体のレベルを測定するための別の方法は、例えば、rtPCR (Mullis, 1987, 米国特許第4,683,202号に記載された実験実施形態)、リガーゼ鎖反応 (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193)、自己維持配列複製 (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製 (Lizardi et al., 米国特許第5,854,033号) またはいずれかの他の核酸増幅方法による核酸増幅のプロセス、続いての、当業者によく知られた技術を用いる増幅された分子の検出を含む。発蛍光性rtPCRを本発明の方法で用いることもできる。発蛍光性rtPCRにおいて、定量は蛍光シグナル、例えば、TaqManおよびSybr緑色の量に基づく。これらの検出スキームは、もしそのような分子が非常に少数で存在するならば、核酸分子の検出で特に有用である。本明細書中で用いるように、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域（各々、ストランドを加え、および除く、またはその逆）にアニールすることができ、双方の間で短い領域を含有することができる核酸分子の対と定義される。一般に、増幅プライマーは長さが約10ないし30ヌクレオチドであり、長さが約50ないし200ヌクレオチドの領域を近接挟む。適当な試薬にて、そのようなプライマーはプライマーによって近接挟まれるヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能とする。

30

40

【0336】

50

イン・サイチュ方法では、mRNAは検出に先立って細胞から単離される必要はない。そのような方法において、細胞または組織試料は、公知の組織学的方法を用いて調製／処理される。次いで、試料を支持体、典型的には、スライドガラスに固定化し、次いで、バイオマーカーをコードするmRNAにハイブリダイズすることができるプローブと接触させる。

【0337】

バイオマーカーの絶対的発現レベルに基づく測定をなすための代替法として、測定はバイオマーカーの正規化された発現レベルに基づくことができる。発現レベルは、その発現をバイオマーカーではない遺伝子、例えば、構成的に発現されるハウスキーピング遺伝子の発現と比較することによって、バイオマーカーの絶対発現レベルを修正することにより正規化される。正規化のための適当な遺伝子は、アクチン遺伝子、または上皮細胞特異的遺伝子のようなハウスキーピング遺伝子を含む。この正規化は、もう1つの試料、例えば、非一癌性試料に対する1つの試料、例えば、被験体試料における発現レベルの比較、あるいは異なる源からの試料の間の比較を可能とする。

10

【0338】

別法として、発現レベルは相対的発現レベルとして供することができる。バイオマーカーの相対的発現レベルを測定するために、バイオマーカーの発現のレベルを正常一対一癌細胞単離体の10以上の試料、好ましくは50以上の試料につき、問題の試料についての発現レベルの測定に先立って測定する。より多数の試料でアッセイした遺伝子の各々の平均発現レベルを測定し、これをバイオマーカーについてのベースライン発現レベルとして用いる。次いで、テスト試料で測定されたバイオマーカーの発現レベル（発現の絶対レベル）を、バイオマーカーで得られた平均発現値で除する。これにより、相対的発現レベルが供される。

20

【0339】

好ましくは、ベースライン測定で用いた試料は同一組織型の癌細胞または正常細胞からのものである。細胞源の選択は、相対的発現レベルの使用に基づく。平均発現スコアとして正常な組織と見出された発現の使用は、アッセイされたバイオマーカーが細胞が由来する（vs 正常細胞）組織に特異的か否かを確証するのを助ける。加えて、より大きなデータが蓄積されると、平均発現値を改正することができ、蓄積されたデータに基づいて、改善された相対的発現値が供される。正常な細胞からの発現データは、癌状態の重傷度を等級分けするための手段を提供する。

30

【0340】

もう1つの好ましい実施形態において、バイオマーカーの発現は、被験体試料中の細胞からゲノミックDNAまたはmRNA/cDNA（すなわち、転写されたポリヌクレオチド）を調製することによって、およびゲノミックDNAまたはmRNA/cDNAを、バイオマーカーを含むポリヌクレオチドの相補体である参照ポリヌクレオチド、およびそのフラグメントとハイブリダイズさせることによって評価される。cDNAは、所望により、参照ポリヌクレオチドとのハイブリダイズに先立って、種々のポリメラーゼ鎖反応方法のいずれかを用いて増幅することができる。1以上のバイオマーカーの発現は、同様に、定量PCR（QPCR）を用いて検出して、バイオマーカーの発現のレベルを評価することができる。別法として、本発明のバイオマーカーの突然変異または変種（例えば、単一ヌクレオチド多形、欠失等）を検出する多くの公知の方法のいずれかを用いて、被験体における突然変異したバイオマーカーの出現を検出することができる。

40

【0341】

関連する実施形態において、試料から得られた転写されたポリヌクレオチドの混合物を、それに固定された本発明のバイオマーカーの少なくとも一部（例えば、少なくとも7、10、15、20、25、30、40、50、100、500以上のヌクレオチド残基）に相補的な、または相同なポリペプチドを有する基材と接触させる。もし相補的または相同なポリヌクレオチドが基材上の異なって検出可能（例えば、異なるクロモフォアまたはフルオロフォアを用いて検出可能な、または異なる選択された位置に固定された）であれ

50

ば、複数のバイオマーカーの発現のレベルを単一基材（例えば、選択された位置に固定されたポリヌクレオチドの「遺伝子」チップマイクロアレイ）を用いて同時に評価することができる。1つの核酸ともう1つの核酸とのハイブリダイゼーションを含むバイオマーカー発現を評価する方法を用いる場合、該ハイブリダイゼーションはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で行うのが好ましい。

【0342】

もう1つの実施形態において、バイオマーカーの発現を評価するための方法の組合せが利用される。

【0343】

本発明の組成物、キットおよび方法は本発明の1以上のバイオマーカーの発現レベルまたはコピー数の差の検出に依拠するため、バイオマーカーの発現のレベルまたはコピー数は、正常な細胞および癌性細胞のうちの少なくとも1つにおける発現またはコピー数を評価するのに用いる方法の最小検出限界よりも有意に大きいのが好ましい。

【0344】

3. 発現された蛋白質の検出方法

バイオマーカー蛋白質の活性またはレベルは、発現されたポリペプチドを検出するまたは定量することによって検出および／または定量することもできる。ポリペプチドは、当業者によく知られた多数の手段のいずれかによって検出し、定量することができる。これらは電気泳動、毛細管電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高拡散クロマトグラフィー等のような分析的生化学方法、または液体またはゲル沈殿反応、免疫拡散（一重または二重）、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素-結合免疫吸着検定法（ELISA）、免疫経口アッセイ、ウェスタンブロッティング等のような種々の免疫学的方法を含むことができる。当業者であれば、細胞は本発明のバイオマーカーを発現するか否かを決定するのに用いる公知の蛋白質-抗体検出方法を容易に適合させることができる。

【0345】

本発明のポリペプチドを検出するための好ましい剤は、本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドに結合することができる抗体、好ましくは検出可能な標識を持つ抗体である。抗体はポリクローナル、より好ましくはモノクローナルとすることができる。無傷の抗体、またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')₂）を用いることができる。プローブまたは抗体に関して、用語「標識された」は、検出可能な物質をプローブまたは抗体ヘカップリングさせる（すなわち、物理的に連結させる）ことによるプローブまたは抗体の直接的標識、ならびに直接的に標識されるもう1つの試薬での反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を含むことを意図する。間接的標識の例は、蛍光標識された二次抗体、およびそれが蛍光標識されたストレプトアビジンで検出できるようなビオチンでのDNAプローブの末端-標識を用いる一次抗体の検出を含む。

【0346】

好ましい実施形態において、抗体は標識され、例えば、放射性-標識され、クロモフォア-標識され、フルオロフォア-標識され、または酵素-標識された抗体である。もう1つの実施形態において、バイオマーカーに対応するオープンリーディングフレームによってコードされる蛋白質、またはその正常な翻訳のち修飾の全てまたは一部を受けたそのような蛋白質のような、バイオマーカーに対応する蛋白質に特異的に結合する抗体誘導体（例えば、基質と、または蛋白質-リガンド対 [例えば、ビオチン-ストレプトアビジン] の蛋白質またはリガンドと結合体化した抗体）、または抗体フラグメント（例えば、単鎖抗体、単離された抗体超可変ドメイン等）が用いられる。

【0347】

細胞からの蛋白質は当業者によく知られた技術を用いて単離することができる。使用される蛋白質単離方法は、例えば、Harlow and Lane (Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pres

10

20

30

40

50

s、Cold Spring Harbor、New York)に記載されたもの
とすることができる。

【0348】

1つの様式において、抗体、または抗体フラグメントを、ウェスタンブロットまたは免疫蛍光技術のような方法を用いて、発現された蛋白質を検出することができる。そのような使用において、抗体または蛋白質いずれかを固体支持体に固定化するのが一般には好ましい。適当な固相支持体または担体は抗原または抗体に結合することができるいずれの支持体も含む。よく知られた支持体または担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、マグネタイトを含む。

10

【0349】

当業者であれば、抗体または抗原に結合するどれくらい多くの他の適当な担体を本発明で用いるそのような支持体に適合することができるかを知っている。例えば、細胞から単離された蛋白質をポリアクリルアミドゲル電気泳動に流すことができ、ニトロセルロースのような固相支持体の固定化することができる。次いで、支持体を適当な緩衝液で洗浄し、続いて、検出可能に標識された抗体で処理することができる。次いで、固相支持体を2回目として緩衝液で洗浄して、未結合抗体を除去することができる。次いで、固体支持体上の結合した標識の量は慣用的な手段によって検出することができる。電気泳動技術を用いる蛋白質を検出する手段は当業者によく知られている（一般に、R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, M. Y.; Deutscher, (1990) Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N. Y. 参照)。

20

【0350】

もう1つの好ましい実施形態において、ウェスタンブロット（イムノブロット）分析を用いて、試料中のポリペプチドの存在を検出し、定量する。この技術は、一般には、分子量に基づいてゲル電気泳動によって試料蛋白質を分離し、分離された蛋白質を（ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、または誘導体化されたナイロンフィルターのような）適当な固体支持体に移し、次いで、ポリペプチドに特異的に結合する抗体と共に試料をインキュベートすることを含む。抗ポリペプチド抗体は固体支持体上のポリペプチドに特異的に結合する。これらの抗体は直接的に標識することができるか、あるいは別法として、抗ポリペプチドに特異的に結合する標識された抗体（例えば、標識されたヒツジ抗ヒト抗体）を用いて引き続いて検出することができる。

30

【0351】

より好ましい実施形態において、ポリペプチドはイムノアッセイを用いて検出される。本明細書中で用いるように、イムノアッセイは、分析物に特異的に結合する抗体を利用するアッセイである。かくして、イムノアッセイは、分析物を単離し、標的化し、および定量するための他の物理的または化学的特性の使用とは反対に、ポリペプチドの抗抗体への特異的結合の検出によって特徴づけられる。

【0352】

40

ポリペプチドは多数のよく認められた免疫学的結合アッセイのうちいずれかを用いて検出され、および／または定量される（例えば、米国特許第4,366,241号；第4,376,110号；第4,517,288号；および第4,837,168号参照）。一般的なイムノアッセイのレビューについては、Asai (1993) Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) Basic and Clinical Immunology 第7版も参照されたし。

【0353】

免疫学的結合アッセイ（またはイムノアッセイ）は、典型的には、「捕獲剤」を利用し

50

て、分析物またはポリペプチドまたはサブ配列に特異的に結合させ、しばしばそれを固定化する。捕獲剤は、分析物に特異的に結合する部位である。好ましい実施形態において、捕獲剤はポリペプチドに特異的に結合する抗体である。抗体（抗－ペプチド）は、当業者によく知られた多数の手段のいずれかによって生産することができる。

【0354】

また、イムノアッセイは、標識剤を利用して、捕獲剤および分析物によって形成された結合複合体に特異的に結合させ、それを標識する。標識剤は、それ自体、抗体－分析物複合体を含む部位の1つであり得る。かくして、標識剤は標識されたポリペプチドまたは標識された抗－抗体であり得る。別法として、標識剤は、抗体／ポリペプチド複合体に特異的に結合する、もう1つの抗体のような、第3の部位であり得る。

10

【0355】

1つの好ましい実施形態において、標識剤は標識を担う第2のヒト抗体である。別法として、第2の抗体は標識を欠いてもよいが、今度は、第2の抗体が由来する種の抗体に特異的な標識された第3の抗体によって結合され得る。第2の抗体は、酵素－標識ストレプトアビジンのような、第3の標識された分子が特異的に結合することのできる検出可能な部位、例えば、ビオチンで修飾することができる。

【0356】

プロテインAまたはプロテインGのような免疫グロブリン定常領域に特異的に結合することができる他の蛋白質を標識剤として用いることもできる。これらの蛋白質はストレプトコッカス細菌の細胞壁の通常の構成成分である。それらは、種々の種からの免疫グロブリン定常領域との強い非－免疫原性反応性を呈する（一般に、Kronval, et al. (1973) J. Immunol., 111:1401-1406、およびAkerstrom (1985) J. Immunol., 135:2589-2542参照）。

20

【0357】

前記したように、ポリペプチドの検出および／または定量のためのイムノアッセイは、当業者によく知られた広く種々の様式を取ることができる。

【0358】

ポリペプチドを検出するための好ましいイムノアッセイは競合的または非競合的である。非競合的イムノアッセイは、捕獲された分析物の量が直接的に測定されるアッセイである。1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイにおいては、例えば、捕獲剤（抗－ペプチド抗体）を固体基材に直接的に結合させることができ、そこでそれらは固定化される。次いで、これらの固定化された抗体はテスト試料に存在するポリペプチドを捕獲する。かく固定化されたポリペプチドを、次いで、標識を担う第2のヒト抗体のような標識財によって結合させる。

30

【0359】

競合アッセイにおいては、試料に存在する分析物（ポリペプチド）の量は、試料に存在する分析物によって捕獲剤（抗－ペプチド抗体）からの置き換えられた（または競合除去された）付加された（外因性）分析物（ポリペプチド）の量を測定することによって間接的に測定される。1つの競合アッセイにおいては、この場合はポリペプチドの既知の量を試料に加え、次いで、試料を捕獲剤と接触させる。抗体に結合したポリペプチドの量は、試料に存在するポリペプチドの濃度に逆比例する。

40

【0360】

1つの特に好ましい実施形態において、抗体を固体基材に固定化させる。抗体に結合したポリペプチドの量は、ポリペプチド／抗体複合体に存在するポリペプチドの量を測定することによって、あるいは別法として、残存する未複合体化ポリペプチドの量を測定することによって決定することができる。ポリペプチドの量は標識されたポリペプチドを供することによって検出することができる。

【0361】

本発明のアッセイは、当業者によく知られた標準的な方法に従い（ポリペプチドの正ま

50

たは負または量として) スコア取りされる。スコアリングの特定の方法は、アッセイ様式および標識の選択に依存するであろう。例えば、ウェスタンブロットアッセイは、酵素標識によって生じた着色産物を可視化することによってスコア取りすることができる。正しい分子量における明らかに目に見える着色バンドまたはスポットは正の結果としてスコア取りされ、他方、明らかに目に見えるスポットまたはバンドの不存在は負としてスコア取りされる。バンドまたはスポットの強度はポリペプチドの定量的尺度を供することができる。

【0362】

本明細書中に記載された種々のイムノアッセイで用いる抗体は本明細書中に記載したように生産することができる。

10

【0363】

もう1つの実施形態において、レベル(活性)は遺伝子産物の酵素活性を測定することによってアッセイされる。酵素の活性をアッセイする方法は当業者によく知られている。

【0364】

バイオマーカー蛋白質の検出のためのイン・ビボ技術は、蛋白質に対して向けられた標識抗体を被験体に導入することを含む。例えば、抗体を、被験体におけるその存在および位置を標準的なイメージング技術によって検出することができる放射性バイオマーカーで標識することができる。

【0365】

本発明の方法によって同定されるある種のバイオマーカーは分泌された蛋白質であり得る。いずれかの特定のバイオマーカー蛋白質は分泌された蛋白質であるか否かを決定するのは当業者にとって単純な事柄である。この決定をなすためには、バイオマーカー蛋白質は、例えば、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞系で発現させ、細胞外流体を収拾し(例えば、蛋白質と特異的に結合する標識抗体を用いて)細胞外流体中の蛋白質の存在または不存在を評価する。

20

【0366】

以下に、蛋白質の分泌を検出するのに用いることができる方法の例を挙げる。約 8×10^5 293 T細胞を、5% (v/v) CO_2 、95% 空気雰囲気下で、増殖培地(10% 胎児ウシ血清を補足したダルベッコの修飾イーグル培地 [DMEM]) を含有するウェル中で 37°C にて約60ないし70% 密集までインキュベートする。次いで、ウェル当たり蛋白質をコードする発現ベクターを含む2マイクログラムのDNA、および10マイクロリットルの LipofectAMINETM (GIBCO/BRLカタログ番号18342-012) を含む標準トランスフェクション混合物を用いてトランスフェクトする。トランスフェクション混合物を約5時間維持し、次いで、新鮮な増殖培地で置き換え、空気雰囲気中で維持する。各ウェルを、メチオニンまたはシステインを含有しないDMEM (DMEM-MC; ICNカタログ番号16-424-54) で2回温和にすすぐ。約1ミリリットルのDMEM-MCおよび約50マイクロキュリーのトランス-³⁵STM 試薬 (ICNカタログ番号51006) を各ウェルに加える。ウェルを前記した5% CO_2 雰囲気下に維持し、選択された時間の間 37°C でインキュベートする。インキュベーションに続き、150マイクロリットルの条件培地を取り出し、遠心して、浮遊する細胞およびデブリスを除去する。上積み中の蛋白質の存在は、蛋白質が分泌されることを示す。

30

40

【0367】

被験体試料、例えば、組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、脊髄液、尿、糞、胆汁、膵臓液または膵臓組織を含有する試料は、特に、当該細胞が癌性である場合、より特別には該癌が転移性である場合にはその中に細胞を含有し得、かくして、本発明の方法で用いることができることが認識されよう。細胞試料は、もちろん、試料中のバイオマーカーの発現のレベルの評価に先立って、種々のよく知られた収集後の分取および貯蔵技術(例えば、拡散および/または蛋白質抽出、固定、貯蔵、凍結、限外濾過、濃縮、蒸発、遠心等)に付すことができる。かくして、本発明の組成物、キットおよび方法を用いて、それを発現する細胞の表面に表示される少なくとも1つの部分を有する蛋白質に対応するバイ

50

オマーカーの発現を検出することができる。いずれかの特定のバイオマーカーに対応する蛋白質が細胞－表面蛋白質を含むか否かを決定するのは当業者にとって単純な事柄である。例えば、免疫学的方法を用いて、全細胞上のそのような蛋白質を検出することができるか、あるいはよく知られたコンピューターベースの配列分析方法（例えば、S I G N A L P プログラム；N i e l s e n e t a l . , 1997、P r o t e i n E n g i n e e r i n g 10:1-6）を用いて、（分泌された蛋白質および少なくとも1つの細胞－表面ドメインを有する蛋白質双方を含めた）少なくとも1つの細胞外ドメインの存在を予測することができる。それを発現する細胞の表面に表示された少なくとも1つの部分を有する蛋白質に対応するバイオマーカーの発現は、（例えば、蛋白質の細胞－表面ドメインに特異的に結合する標識された抗体を用いて）細胞を必ずしも溶解することなく検出することができる。

10

【0368】

また、本発明は、生物学的試料、例えば、組織、全血、血清、血漿、頬切屑、唾液、尿、糞、胆汁、膵臓細胞または膵臓組織を含有する試料中の本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドまたは核酸の存在を検出するためのキットも含む。そのようなキットを用いて、被験体が癌を罹患しているか、または癌を発症する増大した危険性があるかを判断することができる。例えば、該キットは、生物学的試料中の本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチド、またはポリペプチドをコードするmRNAを検出することができる標識された化合物または剤、および試料中のポリペプチドまたはmRNA（例えば、ポリペプチドに結合する抗体、またはポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ）の量を測定するための手段を含むことができる。キットは、キットを用いて得られた結果を解釈するための指示書を含むこともできる。

20

【0369】

抗体－ベースのキットでは、キットが、例えば：（1）本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドに結合する（例えば、固体支持体に付着した）第1の抗体；および、所望により、（2）ポリペプチドまたは第1の抗体いずれかに結合し、結合可能な標識に結合体化された第2の異なる抗体を含むことができる。

【0370】

オリゴヌクレオチド－ベースのキットでは、キットが、例えば：（1）本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または（2）本発明のバイオマーカーに対応する核酸分子を増幅するのに有用なプライマーの対を含むことができる。キットは、例えば、緩衝剤、保存剤、または蛋白質安定化剤を含むこともできる。キットは、さらに、検出可能な標識（例えば、酵素または基質）を検出するのに必要な成分を含むことができる。また、キットは、アッセイすることができ、テスト試料と比較することができる対照試料または一連の対照試料を含有することもできる。キットの各成分は、個々の容器内に封入することができ、種々の容器の全てが、該キットを用いて行われるアッセイの結果を解釈するための指示書と共に単一パッケージ内に入れることができる。

30

【0371】

4. 構造の改変を検出するための方法

40

本発明は、癌試料中のバイオマーカーの構造的改変、例えば、突然変異または対立遺伝子変種を、正常な、例えば、対照試料中のバイオマーカーの構造的改変、例えば、突然変異と比較することによって、被験体が癌を罹患しているか、または癌を発症する危険性があるかを評価する方法も提供する。癌試料中のバイオマーカーにおける構造的改変、例えば、突然変異または対立遺伝子変種の存在は、被験体が癌を罹患していることを示す。

【0372】

好ましい検出方法は、多形部位と重複し、かつ多形領域の周りに約5、10、20、25または30ヌクレオチドを有するプローブを用いる対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションである。本発明の好ましい実施形態において、対立遺伝子変種に特異的にハイブリダイズできる数個のプローブを固相支持体、例えば、「チップ」に付着させる。オリゴヌ

50

クレオチドはリソグラフィーを含めた種々のプロセスによって固体支持体に結合させることができる。例えば、チップは250,000までのオリゴヌクレオチドを保持することができる (GeneChip、AffymetrixTM)。「DNAプローブアレイ」とも言われるオリゴヌクレオチドを含めるこれらのチップを用いる突然変異検出分析は、例えば、Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244に記載されている。1つの実施形態において、チップは、遺伝子の少なくとも1つの多形領域の全ての対立遺伝子変種を含む。次いで、固相支持体をテスト核酸と接触させ、特異的プローブに対するハイブリダイゼーションを検出する。従って、1以上の遺伝子の多数の対立遺伝子変種の同一性は試料ハイブリダイゼーション実験で同定することができる。例えば、5'上流調節エレメントにおけるヌクレオチド多形の対立遺伝子変種の同一性は、単一ハイブリダイゼーション実験で測定することができる。

10

【0373】

他の検出方法においては、対立遺伝子変種を同定するに先立ってバイオマーカーの少なくとも1つの部分をまず増幅する必要がある。増幅は、当該分野で公知の方法に従い、例えば、PCRおよび／またはLCR (Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560参照)によって行うことができる。1つの実施形態において、細胞のゲノミックにDNAを、必要量の増幅されたDNAを生じるのに十分な多数のサイクルの間、2つのPCRプライマーおよび増幅に曝露する。好ましい実施形態においては、プライマーは150および350塩基対離して一致させる。

【0374】

20

代替増幅方法は：自己維持配列複製 (Guatelli, J. C. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwoh, D. Y. et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ (Lizardi, P. M. et al., (1988) Bio/Techonology 6:1197) および自己一維持配列複製 (Guatelli et al., (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. 87:1874)、および核酸ベースの配列増幅 (NABSA)、またはいずれかの他の核酸増幅方法、引き続いての、当業者によく知られた技術を用いる増幅された分子の検出を含む。これらの検出スキームはもし核酸分子が非常に低い数で存在するならば、該分子の検出で特に有用である。

30

【0375】

1つの実施形態において、当該分野で知られた種々の配列決定反応のいずれかを用いて、試料配列の配列を対応する参照 (対照) 配列と比較することによって、バイオマーカーの少なくとも一部を直接的に配列決定し、対立遺伝子変種、例えば、突然変異を検出することができる。例示的な配列決定反応はMaxam and Gilbert (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977) 74:560) またはSanger (Sanger et al. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. 74:5463) によって開発された技術に基づくものを含む。また、質量スペクトロメトリによる配列決定を含めた、種々の配列決定手法のいずれかを、被験体アッセイ (Biotechniques (1995) 19:448) を行う場合に利用することができる (例えば、H. KosterによるDNA Sequencing by Mass Spectrometryなる発明の名称の、米国特許第5,547,835号および国際特許出願公開番号WO 94/16101; H. KosterによるDNA Sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradationなる発明の名称の、米国特許第5,547,835号および国際特許出願公開番号WO 94/21822、およびH. KosterによるDNA Diagnostics Based on Mass Spectrometryなる発明の名称の、米国特許第5,605,798号および国際特許出願PCT/US96/03651; Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; およびGriffin et al. (1993)

40

Spectrometryなる発明の名称の、米国特許第5,547,835号および国際特許出願公開番号WO 94/16101; H. KosterによるDNA Sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradationなる発明の名称の、米国特許第5,547,835号および国際特許出願公開番号WO 94/21822、およびH. KosterによるDNA Diagnostics Based on Mass Spectrometryなる発明の名称の、米国特許第5,605,798号および国際特許出願PCT/US96/03651; Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; およびGriffin et al. (1993)

50

Appl Biochem Biotechnol 38:147-159参照)。ある実施形態については、核酸塩基の1、2または3のみの出現が、配列決定反応において決定される必要があることは当業者に明らかであろう。例えば、1つのみのヌクレオチドが検出されるA-トラック等を行うことができる。

【0376】

なお他の配列決定方法は、例えば、「Method of DNA sequencing employing a mixed DNA-polymer chain probe」なる発明の名称の米国特許第5,580,732号、および「Method for mismatch-directed in vitro DNA sequencing」なる発明の名称の米国特許第5,571,676号に開示されている。

10

【0377】

いくつかの場合においては、被験体からのDNAにおけるバイオマーカーの特異的対立遺伝子の存在は、制限酵素分析によって示すことができる。例えば、特異的ヌクレオチド多形の結果、もう1つの対立遺伝子変種のヌクレオチド配列には存在しない制限部位を含むヌクレオチド配列を得ることができる。

【0378】

さらなる実施形態において、(ヌクレアーゼ、ヒドロキシアミンまたはピペリジンと共に四酸化オスミウムのような)切断剤からの保護を用いて、RNA/RNA DNA/DNA、またはRNA/DNAヘテロデュプレックスにおけるミスマッチした塩基を検出することができる(Myers, et al. (1985) Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の技術は、所望により標識されていてもよい対照核酸、例えば、RNAまたはDNAをハイブリダイズさせることによって形成されたヘテロデュプレックスを供し、バイオマーカー対立遺伝子変種のヌクレオチド配列を、組織試料から得られた試料核酸、例えば、RNAまたはDNAと比較することによって開始する。二本鎖デュプレックスは、対照および試料ストランドの間の塩基対ミスマッチに基づいて形成されたデュプレックスのようなデュプレックスの一本鎖領域を切断する剤で処理する。例えば、RNA/DNAデュプレックスをRNaseで処理することができ、DNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼで処理して、ミスマッチした領域を酵素的に消化することができる。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAデュプレックスをヒドロキシアミンまたは四酸化オスミウムで、およびピペリジンで処理して、ミスマッチした領域を消化することができる。ミスマッチした領域の消化の後に、次いで、得られた物質を変性トリアクリルアミドゲルでサイズによって分離して、対照および試料核酸が同一のヌクレオチド配列を有するか否か、あるいはいずれのヌクレオチドにおいてそれらが異なるかを決定する。例えば、Cotton et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleeba et al. (1992) Methods Enzymol. 217:286-295参照。好ましい実施形態において対照試料核酸を検出のために標識する。

20

30

【0379】

もう1つの実施形態において、変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)によって対立遺伝子変種を同定することができる(Oefner and Underhill, (1995) Am. J. Human Gen. 57:Suppl. A266)。DHPLCは逆相イオン-対合クロマトグラフィーを用いて、PCRフラグメント内の特定のヌクレオチド遺伝子座においてヘテロ接合性である個体からの該フラグメントの増幅の間に生じるヘテロデュプレックスを検出する(Oefner and Underhill (1995) Am. J. Human Gen. 57:Suppl. A266)。一般に、PCR産物は注目するDNAを近接挟むPCRプライマーを用いて生じさせる。DHPLC分析を行い、得られたクロマトグラムを分析して、特異的クロマトグラフィープロフィールに基づいて塩基対の改変または欠失を同定する(O'Donovan et al. (1998) Genomics 52:44-49参照)。

40

【0380】

50

他の実施形態において、電気泳動移動度の改変を用いて、バイオマーカー対立遺伝子変種のタイプを同定する。例えば、単一ストランド立体配座多形 (SSCP) を用いて、突然変異体および野生型核酸の間の電気泳動移動度の差を検出することができる (Orita et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766、また Cotton (1993) Mutat Res 285: 125-144; および Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9: 73-79 参照)。試料および対照核酸の一本鎖 DNA フラグメントを変性し、再生させる。一本鎖核酸の二次構造は配列に従って変化し、電気泳動移動度における得られた改変は単一塩基の変化さえを検出も可能とする。DNA フラグメントを標識するか、または標識されたプローブで検出することができる。アッセイの感度は (DNA よりはむしろ) RNA を用いることによって増強させることができ、ここに、二次構造は配列の変化により感受性である。もう 1 つの好ましい実施形態において、主題の方法はヘテロデュプレックス分析を利用して、電気泳動移動度の変化に基づいて二本鎖ヘテロデュプレックス分子を分離する (Keen et al. (1991) Trends Genet 7: 5)。

【0381】

なおもう 1 つの実施形態において、多形領域の対立遺伝子変種の同一性は、変性剤のグラジエントを含むポリアクリルアミドゲルにおける多形領域を含む核酸の移動を分析することによって得られ、変性グラジエントゲル電気泳動 (DGGE) を用いてアッセイされる (Myers et al. (1985) Nature 313: 495)。DGGE を分析の方法として用いる場合、DNA を修飾して、例えば、PCR によって高融解 GC-リッチの DNA のほぼ 40bp の GC クランプを加えることによって、それが完全に変性されていないことを確認する。さらなる実施形態において、変性剤グラジエントの代わりにオンドグラジエントを用いて、対照および試料 DNA の移動度の差を同定する (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265: 1275)。

【0382】

2 つの拡散の間の少なくとも 1 つのヌクレオチドの差を検出するための技術の例は、限定されるものではないが、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー延長などがあげられる。例えば、公知の多形ヌクレオチドが中央に入れられたオリゴヌクレオチドプローブ (対立遺伝子-特異的プローブ) を調製し、次いで、完全なマッチが見出される場合のみハイブリダイゼーションを可能とする条件下で標的 DNA にハイブリダイズさせることができる (Saiki et al. (1986) Nature 324: 163; Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230; および Wallace et al. (1979) Nucl. Acids. Res. 6: 3543)。そのような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション技術は、バイオマーカーの異なる多形領域における数個のヌクレオチド変化の同時検出で用いることができる。例えば、特異的対立遺伝子変種のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドをハイブリダイズする膜に付着させ、次いで、この膜を標識された試料の核酸とハイブリダイズさせる。次いで、ハイブリダイゼーションシグナルの分析は、試料核酸のヌクレオチドの同一性を明らかにするであろう。

【0383】

別法として、選択的 PCR 増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術を、本発明と組み合わせる用いることができる。特異的増幅用のプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、(増幅が異なるハイブリダイゼーションに依存するように) (Gibbs et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2437-2448) 分子の中央で、または適当な条件下で、ミスマッチがポリメラーゼ延長を妨げまたは低下させることができる (Prossner (1993) Tibtech 11: 238; Newton et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17

：2503）場合には1つのプライマーの極端な3'末端において注目する対立遺伝子変種を運ぶことができる。この技術はプローブオリゴ塩基延長では「PROBE」とも言われる。加えて、突然変異の領域中に新規な制限部位を導入して、切断ベースの欠失を作り出すのが望ましいであろう（Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6:1）。

【0384】

もう1つの実施形態において、対立遺伝子変種の同定は、例えば、米国特許第4,998,617号およびLandegren、U. et al.、(1988) Science 241:1077-1080に記載されたオリゴヌクレオチド連結アッセイ（OLA）を用いて行う。該OLAプロトコルは、標的の単一ストランドの境を接する配列にハイブリダイズすることができるように設計された2つのオリゴヌクレオチドを用いる。該オリゴヌクレオチドの1つを分離バイオマーカーに連結し、例えば、ビオチニル化し、他方を検出可能に標識する。もし正確な相補的配列が標的分子で見出されたならば、該オリゴヌクレオチドはそれらの末端が境界を接し、連結基質を生じるようにハイブリダイズするであろう。次いで、連結はアビジンまたはもう1つのビオチンリガンドを用いて標識されたオリゴヌクレオチドが回収されるのを可能とする。Nickerson、D. A. et al. は、PCRおよびOLAの属性を組み合わせる核酸検出アッセイを記載している（Nickerson、D. A. et al.、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 87:8923-8927）。この方法においては、PCRを用いて標的DNAの指数関数的増幅を達成し、次いでこれをOLAを用いて検出する。

【0385】

本発明は、さらに、バイオマーカーにおける単一ヌクレオチド多形を検出する方法を提供する。単一ヌクレオチド多形は不変配列の領域によって近接挟まれる変異の部位を構成するため、それらの分析は、変異の部位に存在する単一ヌクレオチドの同一性の決定を超えるものは必要とせず、各被験体についての完全な遺伝子配列を決定する必要はない。数個の方法が、そのような単一ヌクレオチド多形の分析を容易にするために開発されている。

【0386】

1つの実施形態において、単一塩基多形は、例えば、Mundy、C. R.（米国特許第4,656,127号）に開示されているように、特殊化されたエキソヌクレアーゼー抵抗性ヌクレオチドを用いることによって検出することができる。該方法に従って、多形部位からすぐに3'側の対立遺伝子配列に相補的なプライマーを、特定の動物またはヒトから得られた標的分子にハイブリダイズさせる。もし標的分子上の多形部位が、存在する特定のエキソヌクレアーゼー抵抗性ヌクレオチド誘導体に相補的なヌクレオチドを含有すれば、その誘導体は、ハイブリダイズされたプライマーの末端に取り込まれるであろう。そのような取り込みがプライマーをエキソヌクレアーゼーに対して抵抗性とし、それにより、その検出を可能とする。試料のエキソヌクレアーゼー抵抗性誘導体の同一性は知られているため、プライマーがエキソヌクレアーゼーに対して抵抗性となったという知見は、標的分子の多形部位に存在するヌクレオチドが反応で用いたヌクレオチド誘導体のそれに相補的であったことを明らかとする。この方法は、大量の外来性配列データの測定を必要としない利点を有する。

【0387】

本発明のもう1つの実施形態において、多形部位のヌクレオチドの同一性を決定するために溶液ベースの方法を用いる（Cohen、D. et al. のフランス特許第2,650,840号；PCT出願WO 91/02087）。米国特許第4,656,127号のMundyの方法におけるように、多形部位の直3'側の対立遺伝子配列に相補的なプライマーを使用する。該方法は、もし多形部位のヌクレオチドに相補的であれば、プライマーの末端に取り込まれるようになるであろう標識されたジデオキシヌクレオチド誘導体を用いてその部位のヌクレオチドの同一性を決定する。

【0388】

Genetic Bit Analysis (遺伝子ビット分析) またはGBATMとして知られた代替方法がGoellet、P. et al. によって記載されている (PCT出願番号92/15712)。Goellet、P. et al. の方法は標識されたターミネーターの混合物、および多形部位の3'側の配列に相補的なプライマーを使用する。取り込まれた標識ターミネーターは、かくして、評価すべき標的分子の多形部位に存在するヌクレオチドによって決定され、それに相補的である。Cohen et al. (フランス特許第2,650,840号、PCT出願WO 91/02087) の方法とは対照的に、Goellet、P. et al. の方法は、好ましくは、不均一相アッセイであり、ここでは、プライマーまたは標的分子が固相に固定化される。

10

【0389】

DNA中の多形部位をアッセイするための数個のプライマーガイドドヌクレオチド取り込み手法は記載されている (Komher、J. S. et al.、(1989) Nucl. Acids Res. 17:7779-7784; Sokolov、B. P.、(1990) Nucl. Acids Res. 18:3671; Syvanen、A. -C. et al.、(1990) Genomics 8:684-692; Kuppuswamy、M. N. et al.、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 88:1143-1147; Prezant、T. R. et al.、(1992) Hum. Mutat. 1:159-164; Ugozzoli、L. et al.、(1992) GATA 9:107-112; Nyrén、P. (1993) et al.、Anal. Biochem. 208:171-175)。これらの方法は、それらが多形部位における塩基の間を区別するために標識されたデオキシヌクレオチドの取り込みに全てが依拠する点でGBATMとは異なる。そのような様式においては、シグナルは取り込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するため、同一ヌクレオチドの実行において起こる多形の結果、実行の長さに比例するシグナルを得ることができる (Syvanen、A. C.、et al.、(1993) Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59)。

20

【0390】

バイオマーカーのコーディング領域に位置した多形領域の対立遺伝子変種の同一性を決定させるためには、前記したものよりもさらに他の方法を用いることができる。例えば、突然変異したバイオマーカーをコードする対立遺伝子変種の同定は、例えば、免疫組織化学または免疫沈澱において突然変異体蛋白質を特異的に認識する抗体を用いることによって行うことができる。野生型バイオマーカーまたはバイオマーカーの突然変異した形態に対する抗体は、当該分野で知られた方法に従って調製することができる。

30

【0391】

別法として、バイオマーカーリガンドへの結合のようなバイオマーカーの活性を測定することもできる。結合アッセイは当該分野で知られており、例えば、被験体から細胞を得、次いで、標識されたリガンドでの結合実験を行って、蛋白質の突然変異した形態に対する結合が蛋白質の野生型に対する結合と異なるか否かを決定することを含む。

【0392】

40

B. 薬理ゲノミクス

本発明のバイオマーカーの量および／または活性に対する刺激または阻害効果を有する剤またはモジュレーターを個体に投与して、被験体において癌を(予防的または治療的に)処置することができる。そのような処置の関連において、個体の薬理ゲノミクス(すなわち、個体の遺伝子型および外来性化合物または薬物に対する個体の応答の間の関係の研究)を考えることができる。治療剤の代謝の差は、薬理学的に活性な薬物の用量および血中濃度の間の関係を改変することによって、ひどい毒性または治療的失敗に導きかねない。かくして、個体の薬理ゲノミクスは、個体の遺伝子型の考慮に基づいて予防的または治療的処置についての効果的な剤(例えば、薬物)の選択を可能とする。そのような薬理ゲノミクスをさらに用いて、適当な投与量および治療レジメンを決定することができ

50

る。従って、個体における本発明の量、構造および／または活性を測定して、それにより、個体の治療的予防的処置のための適当な剤を選択することができる。

【0393】

薬理ゲノミクスは、侵された患者における改変された薬物処理および異常な作用による、薬物に対する応答の臨床的に有意な変動を取り扱う。例えば、Linder (1997) Clin. Chem. 43 (2) : 254-266 参照。一般には、ファルマコゲネティック条件の2つのタイプを区別することができる。薬物が身体に作用する方法を改変する単一因子として伝達される遺伝的条件は「改変された薬物作用」と言われる。進退が薬物に作用する方法を改変する単一因子として伝達された遺伝的条件は「改変された薬物代謝」と言われる。これらのファルマコゲネティック条件は稀な欠陥として、または多形としてのいずれかで起こり得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) の欠乏は、主な臨床的合併症がオキシダント薬物 (抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛剤、ニトロフラン) の摂取およびソラマメの消費後における溶血である通常の遺伝された酵素病である。

【0394】

例示的实施形態において、薬物代謝酵素の活性は薬物作用の強度および持続双方の主な決定因子である。薬物代謝酵素 (例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2 (NAT2) およびチトクロームP450 酵素CYP2D6 およびCYP2C19) の遺伝的多形の発見は、なぜ幾人かの被験体が予測される薬物効果を得ないのか、または標準かつ安全用量の薬物を摂取した後において過剰な薬物応答および深刻な毒性を示すのかに関する説明を提供した。これらの多形は集団において2つの表現型、広範なメタボライザー (EM) および貧弱なメタボライザー (PM) で発現される。PMの優勢は異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子はコードに多形であって、数個の突然変異がPMで同定されており、その全ては機能的CYP2D6の不存在に導く。CYP2D6 およびCYP2C19の貧弱なメタボライザーは、それらが標準用量を受け取る場合に、かなり頻繁に過剰な薬物応答および副作用を経験する。もし代謝産物が活性な治療的部位であれば、PMは、そのCYP2D6-形成代謝産物モルフィンによって媒介されるコデインの鎮痛効果について示されているように治療的応答を示さないであろう。他の極端は、標準用量に応答しないいわゆる超速メタボライザーである。最近、超速代謝の分子的基础はCYP2D6 遺伝子増幅によるものと同定されている。

【0395】

したがって、個体における本発明のバイオマーカーの量、構造および／または活性を測定し、それにより、個体の治療的または予防的処置のための適切な剤を選択することができる。加えて、ファルマコゲネティック研究を用いて、薬物-代謝酵素をコードする多形対立遺伝子の遺伝子型分けを、個体の薬物応答性表現型の同定に適用することができる。この知識が、投与または薬物選択に適用する場合、有害反応または治療的失敗を回避することができ、かくして、して、本発明のバイオマーカーの量、構造および／または活性のモジュレーターで被験体を処置する場合に治療的または予防的効率を増強させることができる。

【0396】

C. モニタリング臨床試験

本発明のバイオマーカーの量、構造および／または活性についての剤 (例えば、薬物化合物) の影響のモニタリングは、基本的な薬物スクリーニングにおいてのみならず、臨床試験においても適用することができる。例えば、バイオマーカーの量、構造および／または活性に影響する剤の有効性は、癌の治療を受けている被験体の臨床試験においてモニターすることができる。好ましい実施形態において、本発明は、(i) 剤の投与に先立って被験体からプレー投与試料を得；(ii) プレー投与試料において本発明の1以上の選択されたバイオマーカーの量、構造および／または活性を検出し；(iii) 被験体から1以上の投与後試料を得；(iv) 投与後試料においてバイオマーカーの量、構造および／または活性を検出し；(v) プレー投与試料におけるバイオマーカーの量、構造および／

または活性を投与後試料または複数試料におけるバイオマーカーの量、構造および／または活性と比較し；次いで、(v i) 剤の被験体への投与をそれに従って改変する工程を含む、被験体の剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、蛋白質、ペプチド、抗体、核酸、アンチセンス核酸、リボザイム、低分子、RNA緩衝剤、または他の薬物候補）での処置の有効性をモニターする方法を提供する。例えば、剤の増大した投与は、検出されるよりも高いレベルまでバイオマーカーの量および／または活性を増加させ、すなわち、剤の有効性を増加させるのが望ましくあり得る。別法として、剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルまでバイオマーカーの量および／または活性を減少させ、すなわち、剤の有効性を減少させるのが望ましくあり得る。

【0397】

D. 代理マーカー

本発明のバイオマーカーは、病期、特に、膵臓癌、例えば、膵臓腺癌に導く、1以上の疾病または病期に対する、または疾患に対する代理マーカーとして働くことができる。本明細書中で用いるように、「代理バイオマーカー」は、疾患または疾病の不存在または存在に、または疾患または疾病の進行に（例えば、腫瘍の存在または不存在に）相関する目的生化学バイオマーカーである。そのようなマーカーの存在または量は疾患とは独立している。従って、これらのマーカーは、処置の特定のコースが病期または疾病を小さくするのに効果的であるか否かを示すよう働くことができる。代理マーカーは、病期または疾病の存在または程度が標準的な方法（例えば、初期段階腫瘍）を通じて評価するのが困難である場合、または潜在的に危険な臨床的終点に到達する前に疾患進行の評価が望まれる場合に特に用いられる（例えば、心血管病の評価は、代理バイオマーカーとしてのコレステロールレベルを用いてなすことができ、HIV感染の分析は、心筋梗塞または十分に発症したAIDSの望ましくない臨床的結果に充分に先立って、代理バイオマーカーとしてのHIV RNAレベルを用いてなすことができる）。当該分野における代理マーカーの使用の例は：Koomen et al. (2000) J. Mass. Spectrom. 35:258-264；およびJames (1994) AIDS Treatment News Archive 209を含む。

【0398】

本発明のバイオマーカーはファルマコダイナミックマーカーとしても有用である。本明細書中で用いるように、「ファルマコダイナミックバイオマーカー」は、薬物効果に特異的に相関する目的的生化学バイオマーカーである。ファルマコダイナミックバイオマーカーの存在または量は、薬物がそれに対して投与される病期または疾病に関せず；従って、バイオマーカーの存在または量は被験体における薬物の存在または活性を示す。例えば、ファルマコダイナミックバイオマーカーは、薬物のレベルに関連するその組織において該バイオマーカーが発現されるかまたは転写され、あるいは発現または転写されない点で、生物学的組織における薬物の濃度の批評であり得る。このように、薬物の分布または摂取はファルマコダイナミックバイオマーカーによってモニターすることができる。同様に、ファルマコダイナミックバイオマーカーの存在または量は薬物の代謝産物の存在または量に関連し得、従って、バイオマーカーの存在または量はイン・ビボにおいて薬物の相対的分解速度の指標である。ファルマコダイナミックマーカーは、特に、薬物が低用量で投与される場合に、薬物効果の検出の感度を増加させるのに特に用いられる。少量の薬物でさえ複数ラウンドのバイオマーカー転写または発現を活性化するのに充分であり得るため、増幅されたバイオマーカーは薬物それ自体よりも容易に検出可能な量におけるものであり得る。また、バイオマーカーはバイオマーカーそれ自体の検出のためより容易に検出することができ；例えば、本明細書中で記載された方法を用い、抗体を蛋白質バイオマーカーについての免疫ベースの検出システムで使用することができ、あるいはバイオマーカー特異的放射性標識プローブを用い、mRNAバイオマーカーを検出することができる。さらに、ファルマコダイナミックバイオマーカーの使用は、可能な直接的観察の範囲を超える薬物処置のための危険なメカニズムベースの予測を提供することができる。当該分野におけるファルマコダイナミックマーカーの使用の例はMatsuda et al. 米

10

20

30

40

50

国特許第6, 033, 862号; Hattis et al. (1991) Env. Health Perspect. 90:229-238; Schentag (1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 Suppl. 3:S21-S24; および Nicolau (1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 Suppl. 3:S16-S20。

【0399】

実施例

限定的なものと解釈されるべきでない以下の実施例によって本発明をさらに説明する。本出願を引用して出願されたすべての文献、図面、配列表、特許および公開された特許出願の内容はここに引用して援用する。

【0400】

実施例1：膵臓腺癌のマウスモデルの創製

A. 材料および方法

条件 Ink4a/Arf マウス株の作成

ジフテリアトキシシン (DT) に対する陰性選択マーカー、ネオマイシンアセチルトランスフェラーゼ (Neo)、Frt 部位および loxP 部位を運ぶ pKOI I 標的化ベクターに Ink4a/Arf 遺伝子座をサブクローン化した (図7)。胚幹 (ES) 細胞をエレクトロポレーションし、標準的な技術によって選択した。Pst I 制限酵素および標的化構築体に対して外部である 3' フラグメントを用い、クローンをサザン分析によってスクリーニングした (図7)。未分化胚芽細胞注射を標的化クローンで行い、伝達キメラマウスを CAGG-Flpe およびトランスジェニックマウスまで育種して、Ink4a/Arf lox 対立遺伝子を得た。これらのマウスを FVB/n バックグラウンドで育種した (戻し交配4世代)。マウスをサザン分析および多重PCR (プライマーおよび条件が要求に応じて入手可能である) によって遺伝子型分けした。対立遺伝子の機能的テストでは、これらのマウスを EIIA-Cre の一般的デリター株 (Lakso, M., Jet al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:5860-5) に交配し、その結果、サザンプロットによって評価されるようにエクソン2および3が効果的に欠失された。MEF 単離および培養、Cre-媒介欠失および3T3 アッセイを含めた、マウス胚線維芽細胞 (MEF) において Ink4a/Arf^{lox} 対立遺伝子の機能性をテストする方法は記載されているように行った (Bardeesy, N., et al. (2002b) Nature 419:162-7)。

【0401】

マウスコロニー精製

LSL-Kras^{G12D} ノックイン株 (Jackson, E. L. et al. (2001) Genes Dev 15:3243-8) および Pdx1-Cre トランスジェニック株 (Gu, G., et al. (2002) Development 129:2447-57) を Ink4a/Arf^{lox}/+ マウスまで育種して、遺伝子型 Pdx1-Cre; Ink4a/Arf^{lox}/+ および LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox}/+ を得た。これらの株を交配して、実験コホートを得た。マウスをスロットプロットおよびPCRによって表現型分けした。

【0402】

組織学および免疫組織化学

組織を10%ホルマリン中で一晩固定し、パラフィンに包埋した。免疫組織化学では、スライドをキシレンに脱パラフィン化し、エタノール中で順次再水和した。抗原検索を必要とする抗体では、製造業者の支持に従って、Antigen Unmasking Solution (抗原マスク解除溶液) (Vector) を用いた。スライドを過酸化水素 (0.3ないし3%) 中でクエンチして、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックし、次いで、自動化緩衝液 (Automation Buffer) (Biomed) 中で洗浄した。スライドを5%正常血清中で室温にて1時間ブロックした。スライドをブロッキング緩衝液中に希釈された一次抗体と共に4℃にて一晩インキュベートした。アビジン

ービオチンペロキシダーゼ複合体方法 (Vector) を用い、スライドをヘマトキシリンで逆染色した。スライドをエタノール中で順次脱水し、キシレンで清浄し、Permount (Fisher) で設置した。抗体および希釈はアミラーゼ、1:500 (Calbiochem)、インスリン 1:100 (Dako)、TROMA3 (サイトケラチン 19) 1:10、および EGFR、1:50 (Cell Signaling) であった EGFR および サイトケラチン染色は抗原マスク解除を必要とした。ビオチニル化 DBA レクチン (Vector) は 1:100 で用いた。

【0403】

一次膵臓腺癌細胞株の樹立および培養

新たに単離された腫瘍検体を滅菌したカミソリの刃でミンチし、ディスパーゼ II / コラゲナーゼ (各々 4 mg/mL) で 37℃ にて 1 時間消化し、次いで、RPMI + 20% 胎児ウシ血清に再度懸濁し、ビトロゲン / フィブロネクチン被覆プレート上に摂取した。細胞をトリプシン処理によって継体した。全ての実験は 7 世代未満の培養した細胞で行った。

【0404】

分子分析

各々製造業者に従い、RNA を Trizol 試薬 (Gibco) によって単離し、RQ1 DNase (Promega) で処理し、次いで、RNAeasy キット (Qiagen) によって精製した。RNA は Superscript II (Gibco) を用いて逆転写した。PCR プライマーは、一連の重複する 400 ないし 500 bp フラグメントとして全 Smad4 および p53 コーディング領域を増幅した。

Smad4 では、プライマー対は以下のものであった：

【0405】

【化1】

A, 5'-TCCAGAAATTGGAGAGTTGGA-3' (配列番号 2),
 A1, 5'-TCAATTCAGGTGAGACAACC-3' (配列番号 :3),
 B, 5'-TGACAGTGTCTGTGTGAATCCAT-3' (配列番号 :4),
 B1, 5'-TTAGGTGTGTATGGTGCAGTCC-3' (配列番号 :5),
 C, 5'-ACAGCACTACCACCTGGACTGG-3' (配列番号 :6),
 C1, 5'-ACAAAGACCGCGTGGTCACTAA-3' (配列番号 :7),
 D, 5'-TTTGGGTCAGGTGCCTTAGTGA-3' (配列番号 :8),
 D1, 5'-GTCCACCATCCTGGAAATGGT-3' (配列番号 :9)

(1) (配列番号 2)

p53 では、プライマー対は以下のものであった：

【0406】

【化2】

E, 5'-GTGTCACGCTTCTCCGAAGACT-3' (配列番号 10),
 E1, 5'-CGTCATGTGCTGTGACTTCTTGT-3' (配列番号 :11),
 F, 5'-GCACGTACTCTCCTCCCCTCAA-3' (配列番号 :12),
 F1, 5'-AGGCACAAACACGAACCTCAAA-3' (配列番号 :13),
 G, 5'-ATGAACCGCCGACCTATCCTTA-3' (配列番号 :14),
 G1, 5'-GGATTGTGCTCAGCCCTGAAGT-3' (配列番号 :15).

PCR 産物を、PCR で用いたプライマーの 1 つにて直接的配列決定に付した。野生型 Kras および Kras^{G12D} 突然変異体転写体を区別するための RT-PCR / RFLP 分析はプライマー：

10

20

30

40

50

【0407】

【化3】

KRAS1*: 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTG-3'** (配列番号 :16)およびKRAS7*: 5'-CCCTCCCCAGTTCTCATGTA-3'** (配列番号 :17)

を用いて、野生型および突然変異体転写体双方からの243bp産物を増幅した。野生型対立遺伝子はそうではないが、*Kras*^{G12D}対立遺伝子はエクソン1中に作成されたHindIII制限部位を含む。かくして、243bpのPCR産物のHindIIIでの消化により、突然変異体産物のみから213bpおよび30bpバンドが得られる。ウェスタンブロット分析では、プトテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) およびホスファターゼ阻害剤カクテル (キットIおよびII, Calbiochem) の存在下で、20mMトリス (pH7.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA

1% Triton X-100中で組織または細胞ペレットを音波処理した。50μgの溶解物を4ないし12%ビスートリスNuPAGEゲル (Invitrogen) で解像し、PVDF膜に移した。膜をp16 Ink4a (M-156, Santa Cruz)、p53 (Ab-7, Oncogene Research)、Smad4 (B-8, Santa Cruz)、p21 (C-19, Santa Cruz)、p19 Arf (Ab-80, Abcam)、およびチューブリン (DM-1A, Sigma) につきブロットした。p53誘導では、10Gyにおいてセシウム源 (カナダ国の原子エネルギー委員会 (Atomic Energy Commission)) を用いて細胞を照射し、4時間後に収穫した。活性化されたRasレベルの測定では、製造業者の指示に従ってRas活性化アッセイキット (Upstate) を用いた。

【0408】

定量的リアルタイムPCR

PCRプライマーは、エクソン1を含む*Kras*ゲノミックDNAの154bp産物を増幅するように設計した。

【0409】

【化4】

KrasE1-F*: 5'-TGTAAGGCCTGCTGAAAATG-3'** (配列番号 :18),KrasE1-R*: 5'-GCACGCAGACTGTAGAGCAG-3'** (配列番号 :19).

定量PCRは、ABI 7700配列検出システム (Perkin Elmer Life Sciences) にて、SYBR緑色素 (Qiagen) の蛍光の増加をリアルタイムでモニターすることによって行った。データは、比較Ct方法およびGAPDHに対する正規化を用いる相対的定量によって分析した。

【0410】

B. 結果

膵臓-特異的*Kras*^{G12D}発現およびInk4a/Arf欠失を持つマウス株の創製

ヒト膵臓腺癌で遭遇する2つのシグニチャー遺伝病変のユニークかつ協同的な相互作用をモデル化するために、潜在的*Kras*^{G12D}ノックイン対立遺伝子 (LSL-*Kras*) (Jackson, E. L. et al., (2001) *Genes Dev* 15:3243-8) および/または条件Ink4a/Arfノックアウト対立遺伝子を生殖系に保有するマウス株を特徴付けた。従前に記載されているように (Jackson, E. L. et al., ., (2001) *Genes Dev* 15:3243-8)、転写ストッパーエレメントのCre-媒介切除に続いて、LSL-*Kras*^{G12D}対立遺伝子を内因性レベルで発現させ、これは、与えられた癌のタイプにつき適当な細胞起源における*Kras*^{G12D}の指向性発現を助けることができる。条件Ink4a/Arf対立遺伝子 (Ink4a/Arf^{lox}) はエクソン2および3のCre-媒介切

除を保持するように作成し、それにより、 $p16^{INK4A}$ および $p19^{ARF}$ 蛋白質を共に排除した（図7）。この対立遺伝子の性能を遺伝子的に、かつ機能的に評価した：1） $Ink4a/Arf^{lox/lox}$ マウスの $E1A-Cre$ 構成的デリーター株への交配は予期された欠失産物を持つ子孫を生じ、2） $INK4a/Arf^{lox/lox}$ マウス胚線維芽細胞は正常なレベルの $p16^{INK4A}$ および $p19^{ARF}$ を示し、野生型細胞に対する同様なキネティックの継体—誘導老化を受け、他方、 Cre レコンビナーゼをコードするレトロウイルスでのこれらの細胞の感染は $p16^{INK4A}$ および $p19^{ARF}$ の発現をなくし、不滅細胞の増殖をもたらし、3） $Ink4a/Arf^{lox/lox}$ マウスは野生型マウスに対して同様な腫瘍発生および生命スパンを示した（図7）。これらのデータは、 $Ink4a/Arf^{lox/lox}$ 対立遺伝子が野生型機能を保持し、 $Ink4a$ および Arf 双方を Cre レコンビナーゼ活性によってなるとすることができることを示す。 $Kras^{G12D}$ 対立遺伝子を発現し、膵臓における条件 $Ink4a/Arf$ 対立遺伝子の双方のコピーを特異的に欠失するために、全ての膵臓系列（内分泌、外分泌および管細胞）（Gu, G., et al., (2002) Development 129:2447-57）において効果的に $loxP$ 含有対立遺伝子を欠失することが依然示された $Pdx1-Cre$ 導入遺伝子を利用した。

【0411】

$Kras^{G12D}$ はプレ悪性管病巣を刺激する。

【0412】

ヒト検体の組織病理学および遺伝的分析は、プレ悪性および悪性膵管病巣についての段階進行モデル、およびそれらの対応する突然変異プロファイルを生じた（図1a）。膵臓新形成の開始および進行についての $Kras^{G12D}$ の役割を調べるために、 $Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}$ マウスのコホートを作成し、膵臓病理学につき評価した。化合物 $Pdx1-Cre$ および $LSL-Kras^{G12D}$ 株は予期されたメンデル比率で生まれ、臨床的弱点の証拠はなかった。30週の年齢まで（ $n=15$ ）、 $Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}$ マウスは疾患健康の外方兆候は示さなかった。それに対応して、これらのマウス（ $n=5$ ）における血清グルコース、アミラーゼ、リパーゼ、アルブミンおよび全ビリルビン測定は正常な限界内であり、これは、正常な膵臓の構造および病理学を示す。さらに、組織学的に正常な島、腺房および管は、分析した全ての段階のこれらのマウスの膵臓において明瞭に明らかであった（図1b）。しかしながら、系列的な組織学的概観（9、12、18および26週）は、ヒト $PanINs$ の強く暗示する膵管病巣を明らかにした。より若いマウスにおいては、細長いムチン状管細胞よりなる小さな $PanIN-1$ 病巣のみが検出された（図1c）。12週までには、より大きなおよびより増殖性の管が認められ（図1d）、これらの変化は年齢と共に顕著となった。26週においては、膵臓実質の広範な領域が、顕著な繊維状間質によって囲まれた $PanINs$ によって置き換えられていた（図1e）。 $PanIN$ は年齢と共に数およびサイズが増加したが、分析した15匹のマウスのいずれにおいても侵入的腫瘍は30週齢まで観察されなかった。腺房細胞区画には新形成の証拠はないが、病巣反応性化変化が観察され— $PanIN$ による領域的管閉塞に関連するようである。同様に、いくつかの膵臓島は中程度に拡大したように見えたが、新形成の証拠は示さなかった。これらの区画に対する $Kras^{G12D}$ 発現の中程度のインパクトは前記した正常な体重獲得および血清化学と合致している。 $LSL-Kras^{G12D}$ または $Pdx1-Cre$ 対立遺伝子単独のいずれかを保有するマウスは膵臓の異常性を示さなかった。これらの結果は、 $LSL-Kras^{G12D}$ および異なる $Pdx1-Cre$ 対立遺伝子または $p48-Cre$ 対立遺伝子いずれかを保有するマウスの広範な独立した研究に沿うものである（Kawaguchi, Y., et al., (2002) Nat Genet 32:128-34）。この研究においては、双方の化合物株は、管組織学を伴う進行性プレ悪性病巣、膵臓腺癌における活性化された $KRAS$ に対する開始役割と合致する観察を呈した。

【0413】

$Ink4a/Arf$ の喪失は膵臓において悪性進行を引き起こす。

【0414】

Ink4a/Arf 遺伝子座は活性化された Ras 遺伝子の癌潜在能力を拘束すると提唱されており、これは、ヒト癌におけるこれらの遺伝子の合致した突然変異の高い程度、およびイン・ビトロおよびイン・ビボにおける活性化された Hras の癌原性を容易とするにおいて Ink4a/Arf 喪失の役割に沿った概念である (Serrano, M., et al., (1996) Cell 85:27-37; Chin, L., J. et al. (1997) Genes Dev 11:2822-34; Kamijo, T., et al. (1997) Cell 91:649-59; Rozenblum, E., M., et al., (1997) Cancer Res 57:1731-4; Serrano, M., et al. (1997) Cell 88:593-602; Ruas, M. および G. Peters (1998) Biochim Biophys Acta 1378:F115-77)。Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}における PanIN 病巣の進行の欠如は、膵臓における Kras^{G12D} 発現および Ink4a/Arf 欠失の組合せインパクトの評価を促進した。Pdx1-Cre; Ink4a/Arf^{lox/+}マウスからの全膵臓 DNA のサザンブロットは、Ink4a/Arf^{lox} 対立遺伝子の効果的な欠失を明らかとした (図 2a)。7 週齢まで、各遺伝子型のマウスは臨床的に正常であったが、7 および 11 週齢の間の全ての Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/+}動物 (n=26) は病態となり (図 2b, 生存曲線)、体重喪失、腹水、黄疸 (図 2c)、および触知可能腹部塊が共通して示される (表 1)。オートプシーは、4 ないし 20 mm の直径の範囲の固体膵臓腫瘍の存在を明らかとした (図 2c, 表 1)。肉眼的には、これらの腫瘍は不規則なかつはっきりとしない境界を持ち固く、しばしば、隣接する器官および腹膜後腔に接着していた。いくつかの場合において、1 を超える区別される腫瘍小節が明らかであり、これは、これらの新生物が性質が多病巣的であり得ることを示す。腫瘍は高度に侵襲的であり、しばしば、十二指腸および/または脾臓に関連し、場合によっては、共通胆管を閉塞した (表 1)。肝臓および肺転移は肉眼的には明らかでなかった。21 週齢までは、Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/+} および Pdx1-Cre; Ink4a/Arf^{lox/lox} 動物を含めた被験体コホートで腫瘍は観察されなかった。Kras^{G12D} の進行の促進においてこの病巣の強力なシネルジーと共に、膵臓における Ink4a/Arf を欠くマウスにおける膵臓癌の不存在は、PanINs を誘導し、腫瘍形成の開始相を調節するよりはむしろ、初期段階管新生物の悪性進行を拘束するにおいて Ink4a/Arf の役割を指摘する。

【0415】

【表 1】

表 1.

ID	年齢 (週)	サイズ(cm)	位置	HER2	胆管 閉塞	黄疸	血液が 混じった 腹水液	侵入／転移 (m)
30	7.9	1	頭部	Y	N	N	Y	D,C,S,A
31	7.9	1.4	頭部	N	Y	Y	Y	D,S
32	7.9	2	頭部	Y	Y	N	N	D,PN,L,S,RN (m)
33	7.9	1.4	尾部	Y	N	N	Y	SP,RP,DP
35	7.4	0.5	身体	Y	N	N	N	V
43	8.4	>2	全膵臓	Y	N	N	Y	D,S
44	7.3	2	全膵臓	N	N	N	N	V
45	8.6	1	頭部	Y	N	N	Y	SP,L,E,S,D
46	8.9	0.6	頭部	Y	Y	Y	N	D
52	8.1	1	頭部	N	N	N	N	-
58	8.7	0.5	頭部	Y	N	N	N	V,PN
59	9.3	1.5	全膵臓	Y	Y	Y	N	RP,RN
60	9.9	0.9	頭部	N	Y	Y	Y	D,PN,V,L(m),RP,A,DP
61	9.3	N/A	頭部	Y	Y	Y	N/A	PN,L(m),D
62	10.4	1.5	頭部	Y	Y	N	Y	PN,S,D,C
63	9.3	N/A	全膵臓	Y	Y	N	Y	GB,L(m),V,PN,L,S,D
64	9.1	1.5	全膵臓	Y	Y	N	Y	S,C,PN,SP
65	9.7	0.4	頭部	Y	Y	Y	N	PN(m),D
76	11.1	0.75	頭部	N	N	N	N	SP,D
81	8.6	1.5	頭部	Y	N	N	Y	V,LN,
90	8.4	2	全膵臓	N	N	N	N	PN,D
91	8.3	1	頭部	N	N	N	N	D,RN
94	8.3	N/A	下方膵臓	Y	NA	MA	N/A	LN,D
97	9.4	1	尾部	N	N	N	N	LN

表 1：臨床的に危うくされた $Pdx1-Cre$ $LSL-KRAS$ $cInk4a/Arf^{lox/lox}$ 動物からのデータ。複数の病巣が存在する場合、腫瘍のサイズは最大の区別される腫瘍節の近似的直径として与える。腫瘍はしばしば大きくかつ侵入的であり、サイズの近似を困難としている。位置はヒト解剖を参照して用いられる頭部、身体および尾については、隣接する器官に対する膵臓腫瘍の相対的関連を示す。「下方膵臓」とは、それについて類似のヒト膵臓組織がない腸に付属するマウス膵臓組織の位置をいう。体重喪失は物理的廃棄および同腹子と比較した減少した体重の兆候によって判断した。黄疸および血液の混じった腹水液はオートプシーを成した臨床的観察であった。侵入／転移は以下のように位置によって示す：十二指腸 (D)、胃 (S)、結腸 (C)、膵臓周囲リンパ節 (PN)、腎臓リンパ節 (RN)、副腎 (A)、肝臓 (L)、脾臓 (SP)、腹膜後腔 (RP)、横隔膜 (DP)、静脈 (V)、食道 (E)、特定されていないリンパ節 (LN)、膀胱 (GB)。転移は示した位置に続いて (m) によって示される。

【0416】

p53 は膵臓において悪性進行を加速する。

【0417】

$Pdx1-Cre$; $LSL-Kras^{G12D}$; $Ink4a^{lox/+}$; $p53^{lox/+}$ を運ぶマウスは、 $Pdx1-Cre$; $LSL-Kras^{G12D}$; $Ink4a/Arf^{lox/lox}$ を運ぶ動物 (図 2b 参照) よりも迅速に病態となり (図 9, 生存曲線参照)、体喪失、腹水液、黄疸、および触知可能腹部塊が共通して示された。

【0418】

ネズミ膵臓腫瘍はヒト膵臓腺癌の病理学的特徴を発生反復する。

【0419】

腫瘍の顕微鏡検査は、よく分化しおよび中程度に分化したヒト膵管腺癌に対して類似性を有するよく形成された腺形態を明らかにした (図 2d)。ヒト膵臓腺癌は圧倒的に管マーカーを発現し、内分泌および外分泌マーカーの発現を欠如する (Solcia, E.

10

20

30

40

50

, et al. (1995) Tumors of the Pancreas. Armed Forces Institute for Pathology, Washington, D. C.). 管表現型に合致して、ネズミ腫瘍の腺成分はサイトケラチン (Ck) - 19 免疫組織化学に対して陽性であり (図 2 g および h)、DBA レクチンと反応し (データは示さず)、周期的酸シッフ+ジアスターゼ (PAS+D) (図 2 j) およびアルシャンブルー染色によるムチン含有量を示した。さらに、腫瘍は、陽性三色染色によって示されるように間質コラーゲン沈積を示した (図 2 k)。各々、腺房および β -細胞分化に対するマーカーであるアミラーゼおよびインスリンに対する反応性を示した腫瘍はなかった (図 8)。これらの実験腫瘍の組織学的および免疫組織化学プロファイルは、ヒト膵管線癌に対する顕著な類似性を有する。

10

【0420】

よく、および中程度に分化した管線癌に加えて、未分化/退形成 (肉腫様) 腫瘍 (図 2 e および f) の領域はほとんどの場合に観察された。これらの退形成領域は、抗-Ck-19 抗体および DBA レクチンとの弱いまたは斑な反応性を示す (図 2 h, 2 i)。これらの腫瘍は高有糸分裂活性、ひどい核異型性および広範な細胞多形態性を呈した。いくつかの腫瘍においては、よく分化した、ないし退形成願主の範囲の数個のブレードの分化が認められた。これらの退形成領域の上皮性質は膜間接合および微小絨毛の存在を明らかにした電子顕微鏡によって確認された。

【0421】

ネズミ膵臓腺癌の侵入および転移

20

局所的侵入および転移拡大は、進行したヒト膵臓腺癌の病理学的ホールマークである。Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox} 動物に生起する膵臓腫瘍は、十二指腸、胃、肝臓および秘蔵を含めた隣接器官の広範な侵入を示した (表 1, 図 3, c, e)。腹膜後腔および横隔膜の腫瘍侵入も観察された。さらに、リンパ系および血管系の侵入はしばしば検出され、これらの新生物の転移可能性を示唆する観察であった。顕著には腫瘍の腺および退形成成分は共に観察され、侵入腫瘍細胞は Ck-19 に対して陽性に染色されることが示された (図 3 f)。

【0422】

これらの病巣の侵入的性質を仮定すれば、サブセットの場合における距離の離れた器官の全身組織学的概観を行った。この概観は、リンパ節 (図 3 b) への転移を明らかにし、場合によっては、肝臓 (図 3 d) への転移を明らかにしたが、肺転移は観察されなかった。転移はしばしば性質が多病巣的であったが、サイズは小さかった。これらのマウスで検出された血管系およびリンパ節の広範な侵入は、それを、組織学的概観がこれらの腫瘍の真の転移性を過小評価するようにする。総じて、転移の分布パターンは、肝臓および局所的リンパ節へ最も普通には拡大するヒト疾患で観察されたものと同様である (Solcia, E., et al., (1995) Tumors of the Pancreas. Armed Forces Institute for Pathology, Washington, D. C.)。

30

【0423】

Pdx1-Cre; LSL-Kras; Ink4a/Arf^{lox/lox} 膵臓における加速された悪性トランスフォーメーション

40

KRAS 活性化およびホモ接合性 Ink4a/Arf 欠乏によって生じたより早い段階の腫瘍発生を良好に理解するために、3、4、5 および 6 週齢において、外方に正常な Pdx1-Cre; LSL-Kras; Ink4a/Arf^{lox/lox} および Pdx1-Cre; LSL-Kras; Ink4a/Arf^{lox/+} 同腹子についてオートプシーシリーズを行った。全ての年齢において、Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/+} 動物は稀なおよび単離された PanIN-1a 病巣に関して正常な肉眼的膵臓組織学を呈した。3 週において、Pdx1-Cre; LSL-Kras; Ink4a/Arf^{lox/lox} 動物は一義的に正常な膵臓組織学を有し; しかしながら、この時点においては低グレードの管病巣も全てのマウスで観察された (図 4

50

b, n = 6 マウス)。低グレードの Pan IN 病巣に加えて、これらのマウスのうち 2 匹は悪性管細胞の偶発的病巣をやはり示した。4 週までは、これらのマウス (n = 4) は同腹子に対して増大した総数およびより高いグレードの膵臓管病巣を有した (図 4 c)。さらに、この年齢において初期段階腺癌が検出され、重要なことには、これらの腫瘍はそれらの最も初期の発端から管および退形成形態を共に示した (図 4 d)。5 週において、ほとんどのマウスは小さな多病巣膵臓腺癌を呈したが、限定的なシリーズのセクショニングは、いくつかの動物が進行した Pan IN を有するに過ぎず、率直な悪性疾患まで未だ進行していないことを明らかとした (図 4 e)。注目すべきは、数個の場合において、進行した Pan IN 病巣が侵入的管および退形成腫瘍細胞で囲まれて見出された (図 4 f)、これは、そのような Pan IN 病巣の進行から生起するこれらの腫瘍と合致する観察である。6 週齢までは、分析した全ての Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox} マウスは小さな膵臓腺癌を有し (n = 5)、成体マウスで生起する侵入的腫瘍に似た組織学であった。かくして、一旦開始すれば、Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox} マウスにおける膵臓管病巣は侵入的膵臓腺癌への迅速な組織学および進行を受けるようである。これらの特徴は、ヒト管腺癌が、INK4A/ARF 機能の喪失に際して悪性疾患に向かって進行する活性化 KRAS 突然変異を持つ Pan IN 病巣に由来するモデルを支持する。

【0424】

膵臓腺癌の分子分析

腫瘍の分子分析を行って、ヒト膵臓腺癌において普通に改変された経路の状態を決定した。Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D} マウスからの全膵臓溶解物が、年齢にマッチした野生型対照 (図 5 a) と比較して Ras-GTP の中程度の上昇を示し、これは、突然変異体の構成的に活性な Kras^{G12D} 対立遺伝子の発現に合致する。さらに、Ras-GTP のレベルは Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox} 腫瘍溶解物において有意に上昇し (図 5 a)、これは、活性化された KRAS シグナリング経路が働いたままである、進行した段階の腫瘍においてさえさらに増強され得るが、この増加は、腫瘍対正常膵臓において細胞型の改変されたバランスをあるいは反映することができようことを示す。

【0425】

腫瘍試料のさらなる分子研究は、ネズミ膵臓腺癌に由来する初期継体細胞系を利用して (材料および方法)、汚染正常細胞の存在を回避した。予測されるように、腫瘍細胞系は、PCR 分析によって測定されるように Ink4a/Arf 遺伝子座のホモ接合性欠失を示し (図 5 b)、p16^{Ink4a} または p19^{Arf} を発現しなかった (図 5 c)。次に、Smad4 および p53 腫瘍抑制遺伝子の状態を評価した; 進行したヒト膵臓腺癌は、しばしば、ホモ接合性欠失または Smad4 の切形突然変異を維持し、その結果、発現が喪失され、ならびに p53 ミスセンス突然変異を維持し、その結果、突然変異体蛋白質が安定化する。調べた全ての場合において (n = 15)、ウェスタンブロットは全長 SMAD4 蛋白質の頑強な発現を示し (図 5 c)、RT-PCR で生じたオープンリーディングフレームの配列分析は野生型 Smad4 配列を明らかとした (材料および方法参照)。加えて、ウェスタンブロット分析は中程度のレベルの p53 を明らかとし (図 5 d)、電離放射線に応答して増大した p53 および p21^{CIP1} レベルの誘導を示し (図 5 e)、これは野生型 p53 の機能に合致する。したがって、RT-PCR で生じた p53 オープンリーディングフレームの配列分析は、全ての検体が野生型 p53 状態を有することを確認した。KRAS 遺伝子座における遺伝子コピー数の改変は、活性化 KRAS 突然変異を保有するいくつかの腫瘍の進行に寄与すると考えられる。具体的には、KRAS 遺伝子増幅は、ヒト膵臓腺癌を含めたある種のヒト悪性疾患において、およびマウスにおいては数個の腫瘍タイプにおいて起こる (Yamada, H., et al. (1986) Jpn J Cancer Res 77:370-5; Mahlamaki, E. H., et al. (1997) Genes Chromosomes Cancer 20:383-91; Liu, M. L., et al., (1998) O

ncogene 17:2403-11; Schlegel, C., et al., (2000) J Pathol 191:27-32; Heidenblad, M., et al., (2002) Genes Chromosomes Cancer 34:211-23; O'Hagan, R. C., et al., (2002) Cancer Cell 2:149-55)。加えて、野生型RAS対立遺伝子の喪失は、活性化されたRASによる細胞形質転換を促進することも示されている (Bremner, R. and A. Balmain (1990) Cell 61:407-17; Finney, R. E. and J. M. Bishop (1993) Science 260:1524-7; Zhang, Z., Y. et al., (2001) Nat Genet 29:25-33)。定量的リアルタイムPCR (QPCR) を15の膵臓癌細胞系に由来するゲノミックDNAで行って、相対的Kras遺伝子コピー数を評価した (材料および方法参照)。これらの分析は2つの検体における高レベルの増幅を明らかとし、(図5f、上方パネル、レーン10および14、各々、6倍および45倍) ; これらの変化は対応する一次腫瘍においても明らかであった (各々、3倍および5.5倍)。加えて、ほぼ2倍の利得が3つの他の検体 (図5f、上方パネル、レーン5、6および9)、および対応する一次腫瘍で検出された。いくつかの一次腫瘍検体における増幅の低下した相対的大きさは、汚染間質組織の存在によるものであろう。イムノブロット分析は、高レベルの遺伝子増幅を有した細胞系からの溶解物において顕著なKras発現増加、およびより低いレベルの利得を持つ系からの溶解物において中程度の増加を明らかとした (図5f、下方パネル)。次に、RT-PCR/RFLP分析を使用して、突然変異体または野生型対立遺伝子がこれらの腫瘍で増幅するか否かを評価した。これらの分析は、Kras増幅を持つ試料における突然変異体Kras^{G12D}転写体に対応するバンドの増大した強度を明らかとし (図5g、レーン2および4)、これは、突然変異体対立遺伝子は特異的に増幅されることを示す。最後に、これらのデータは、野生型Kras対立遺伝子の発現はやはり全ての主要で保持されることを示し、野生型および突然変異体Kras対立遺伝子の双方が存在したことを示す (図5gおよびデータは示さず) ゲノムDNAのPCR分析によって確認された結果である。よって、野生型対立遺伝子の喪失ではなく、活性化されたKrasの遺伝子増幅は、膵臓における悪性進行に寄与するように見える。

【0426】

最後に、これらの腫瘍におけるアクセサリーシグナリング経路の状態に取り組んだ。EGFRおよびHER2/NEUの活性化および消滅は進化するヒト疾患の特徴である。具体的には、EGFRおよびHER2/NEUはPanIN進行において初期に誘導され、管腺癌においては上昇したままであり、他方、HER2/NEU発現はより進行した未分化腫瘍においては消滅するようになる (Korc, M., et al., (1992) J Clin Invest 90:1352-60; Day, J. D., et al., (1996) Hum Pathol 27:119-24; Friess, H., et al., (1996) J Mol Med 74:35-42)。同様に、マウスモデルにおいては、未分化肉腫様領域 (図6cおよび6d) においてではなく、腫瘍の腺成分におけるEGFR (図6a) およびHER2/NEU (図6b) 双方の発現が観察された。このモデルにおいては、増殖シグナリング分子の活性化と共に、Smad4およびp53突然変異の欠如は、この疾患の生物学においてこれらの経路のさらなる分析の機会を提供する。

【0427】

Kras活性化は、マウスにおけるPanIN発生での開始工程であるように見える。Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}マウスにおける普遍的なKras^{G12D}発現に拘わらず肉眼的に正常な膵臓人工物は、さらなる一恐らくは後成一事象がPanINの出現を可能とするよう要求されることを示唆する。同等に、KRAS突然変異が組織学的に正常なヒト膵臓検体で観察されている (Luttges, J., et al., (1999) Cancer 85:1703-10)。無傷Ink4a/Arf遺伝子座の存在下においては、ネズミPanINは、それらの高い多重性にも拘らず、30週齢

まではPanIN-2段階を超えて進行せず、これは、効果的かつ優れたp16^{INK4A}および／またはp19^{ARF}－媒介チェックポイントメカニズムが、活性化された病巣において悪性進行を拘束することを示す。Ink4a／Arf遺伝子座は、PanINの進行、および進入性膵臓腺癌の発生の双方を調節するにおいて臨界的である。

【0428】

6週までの膵臓腺癌の開始、進行した段階までのPanINの先行する迅速な進行、および他の区画における新形成変化の不存在は、Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Ink／Arf^{lox／lox}マウスにおけるPanINないし腺癌配列に対する証拠を提供する。同様に、PanINが異なる管細胞、定住性多能先祖細胞から、あるいは腺房または他の細胞型のトランス分化を介して生起するかを決定することはできない。事実、従前のデータは、Ink4a／Arf喪失が成熟神経膠星状細胞のイン・ピボにおける神経膠種細胞への脱分化を可能とし(Bachoo, R. M., et al., (2002) Cancer Cell 1:269-77)、したがって、p16^{INK4A}／および／またはp19^{ARF}がこのモデルにおける進行をブロックするにおいて同様な役割を演じることができることを示した。Pdx1プロモーターを介する膵臓発生初期におけるCreの発現は、全ての膵臓区画におけるKrasの効果的な活性化を可能とするが、管腫瘍のみが発症することに注意するのは興味深い。Kras活性化および膵管腫瘍形成のこのユニークな関連は、膵臓のヒト癌に適応できるように見える。というのは、KRAS突然変異は管腺癌において、およびもう1つのタイプの膵臓管悪性腫瘍、管内乳頭ムチン新生物(Z'Graggen, K., et al., (1997) Ann Surg 226:491-8; discussion 498-500)において検出されるが、腺房細胞腫においては検出されない(Terhune, P. G., et al., (1994) Mol Carcinog 10:110-4)ためである。したがって、バイアスされないPdx1-Creシステムは、生理学的レベルにおいては、活性化されたKrasが管表現型に向けて種々の系列の先祖細胞または分化した細胞を駆動し、あるいはこの癌蛋白質が管区画においてその形質転換効果を単独で発揮できることを示す。これらの問題の正式な解決は、厳しく規定された細胞培養ベースの系、ならびにより分化した膵臓系列に特異的に標的化されたCreレコンビナーゼ株への交配を必要とするであろう。

【0429】

Pdx1-Cre;Ink4a／Arf^{lox／lox}マウスにおけるPanINの病巣の不存在は、p16^{INK4A}およびp19^{ARF}がこれらの最も初期の新形成段階の開始を調節しないことを示唆する。むしろ、Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Ink4a／Arf^{lox／lox}マウスにおけるPanIN病巣の迅速な進行および腺癌の発生は、これらの開始された病巣の悪性トランスフォーメーションを拘束するのにInk4a／Arf遺伝子座を必要とすることを示す。開始よりはむしろ進行におけるそのような役割は、ヒトにおけるPanIN-2段階でのINK4A／ARF喪失の記載されている出現、および生殖系INK4A突然変異を持つファミリーのサブセットで観察された膵臓腺癌の匹敵する開始年齢、および散在性腫瘍で観察されたそれによくフィットする(Moskaluk, C. A., et al., (1997) Cancer Res 57:2140-3; Wilentz, R. E., et al. (1998) Cancer Res 58:4740-4; Lynch, H. T., et al. (2002) Cancer 94:84-96)。活性化されたKRASおよびINK4A／ARF欠乏のイン・共働的相互作用に対するメカニズムの基礎は重要な論点のままである。最近まで、支配的なモデルは、それにより、活性化されたRASがMAPKキナーゼの誘導を媒介し、Ink4aおよびArfの誘導および引き続いての成長阻止に直接的に導くフィードバックループの存在を提唱していた(Serrano, M., et al. (1996) Cell 85:27-37)。しかしながら、最近の研究は、そのような直接的ループは、活性化されたRASの内因性－過剰発現とは反対－レベルに応答して作動しないことを示している(Guerra, C., et al. (200

3) Cancer Cell 4:111-20)。この遺伝子座の生理学的発現は、恐らくは、インテグリン-細胞外マトリックス相互作用 (Plath, T., et al. (2000) J Cell Biol 150: 1467-78; Natarajan, E. et al. (2003) Am J Pathol 163: 477-91) および分裂刺激体 (Alani, R. M., et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 7812-6; Ohtani, N., et al. (2001) Nature 409: 1067-70) のような因子によって媒介された陽性および陰性双方のレギュレーターによって綿密に制御されているように見える。理論に拘束されるつもりはないが、これらの知見は、これらのシグナルのバランスの改変がPanIN病巣で起こるが、正常な膵臓 (Ras活性化の有りまたは無し) では起こらず、その結果、Ink4a/Arf遺伝子座が活性化されることを示す。

10

【0430】

ヒト膵臓腺癌におけるもう1つの重要な論点は、INK4A対-ARF喪失の相対的な病理学的役割である。ヒトにおいては、INK4A突然変異は疾患素因を決定するようである。というのは、INK4Aを特異的に標的化するが、ARFは無しで済ませる散在性および生殖系突然変異の双方があるためである (Rozenblum, E., M. et al. (1997) Cancer Res 57: 1731-4; Liu, L., et al. (1999) Nat Genet 21: 128-32; Lal, G., et al. (2000) Genes Chromosomes Cancer 27: 358-61; Lynch, H. T., et al. (2002) Cancer 94: 84-96)。他方、該遺伝子座のホモ接合性欠失を介する-ARFの喪失は腫瘍の約50%で起こる (Rozenblum, E., M. et al. (1997) Cancer Res 57: 1731-4)。注目すべきは、これらのARF-欠乏腫瘍のかなりの割合がまたp53突然変異を保有し (Rozenblum, E., M. et al. (1997) Cancer Res 57: 1731-4)、潜在的に、p53調節における以外のARF喪失の癌遺伝子役割、および/またはDNA損傷応答 (後記参照) に対するp53喪失の特異的役割を反映する。Ink4aによって、およびArfによって寄与される特異的腫瘍抑制活性はPdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}マウスの、この遺伝子座のいずれかの遺伝子が欠乏した遺伝的バックグラウンドへの交配によって解決されるべきである。p53突然変異がマウス腫瘍モデルにおいて存在しないことは注目に値する。これは、マウスにおいてではなくヒト癌におけるp53の機能を検知するp19^{ARF}-独立性DNA損傷を不活性化する必要性を反映するであろう。かくして、Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox}マウスにおいては、異常な細胞周期エントリーおよび活性化された癌遺伝子発現のような他のストレスによるp53誘導を中和する-Arf欠失は、腫瘍進行においてp53喪失に対して効果的に置き換えることができる。この多様性に対する1つの基礎は、テロメアダイナミックスの交差種差 (Maser, R. S. and R. A. DePinho (2002) Science 297: 565-9)、進化する腫瘍のテロメアチェックポイント応答における (ARFではなく) p53の顕著な役割 (Chin, L., et al., (1999) Cell 97: 527-38)、およびヒト膵臓腺癌の進行におけるテロメア機能不全の証拠 (van Heek, N. T., et al. (2002) Am J Pathol 161: 1541-7) であろう。

20

30

40

【0431】

最後に、データは、一般的には悪性疾患および特殊には膵臓癌の古典的特徴の多くは、KRAS活性化の設定におけるInk4a/Arf喪失によって発生反復することができるのを示す。KRAS活性化またはInk4a/Arf喪失単独は局所的侵入および進行した局所的成長を引き起こさないが、組合せは引き起こす。

【0432】

前記した、癌遺伝子Krasによって指令されたマウスモデルの分析、およびInk4

50

／A r f 腫瘍サプレッサー遺伝子の欠失は、K r a s 活性化が膵臓腺癌についての開始する病巣を構成するが、悪性進行については不十分であることを示した。I n k 4 a／A r f 遺伝子座は開始に寄与しないが、この遺伝子座の一体性は、K r a s 誘導病巣の悪性進行を拘束するにおいて臨界的である。これらの研究は、マウスが生じた、K r a s 活性化の背景に対する p 5 3、（無傷 A r f と共に）I n k 4 a、S m a d 4、および L k b 1 腫瘍サプレッサー、例えば、P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；I n k 4 a^{1 o x / 1 o x}；P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；p 5 3^{1 o x / 1 o x}；P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；S M A D 4^{1 o x / 1 o x}；P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；L k b 1^{1 o x / 1 o x}を分析することによって膵臓腺癌病因において遺伝子相互作用を調べるのに拡大されてきた。データは、1) p 5 3 欠失は、膵臓腺癌の促進において I n k 4 a／A r f 喪失の必要性を効果的に置き換えることができ、2) I n k 4 a 欠失は K r a s－駆動腫瘍形成を促進するのに不十分であり、3) S m a d 4 欠失は促進された進入性および転移性腫瘍の成長を促進し、および 4) L k b 1 欠失は K r a s 活性化と共に効果的に協働することを示す。これらの遺伝子モデルシステムは、これらの突然変異体対立遺伝子によって従事される癌遺伝子機構を解剖するのに、およびそれらの活性の代理バイオマーカーを同定するためのプラットフォームを提供する。具体的には、同調腫瘍形成を受けている多数の遺伝子的に同一の動物の利用可能性は、腫瘍形成プロセスの進行段階における検体の単離、ヒト疾患との関連において利用できない機会を可能とする。

【0433】

実施例 2：膵臓腺癌の動物モデルを利用するバイオマーカーの発見

本発明の動物モデルの組織学および臨床的確証を確立したので、膵臓癌特異的血清バイオマーカーの同定のためのこれらのモデルの適用可能性に取り組んだ。加えて、膵臓腺癌についての段階－特異的バイオマーカーの総括的な同定に対し、S m a d 4、p 5 3、I n k 4 a、A r f、および L k b 1 の機能の喪失を含めた、特定の遺伝的病巣に対して特異的なバイオマーカーを開発した。例えば、P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；I n k 4 a^{1 o x / 1 o x}；P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；p 5 3^{1 o x / 1 o x}；P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；S M A D 4^{1 o x / 1 o x}；P d x 1－C r e；L S L－K r a s^{G 1 2 D}；L k b 1^{1 o x / 1 o x}。これらのバイオマーカーは、臨床的に無兆候被験体における初期段階の疾患の検出のための、ならびに膵臓癌の種々の段階のための診断のための高度に感受性であり、迅速かつコスト的に有利なスクリーニング方法の開発を可能とするように働く。非－侵入的テスト関連血清分析は、ルーチンの臨床試験の意味で危険性があり得る被験体の迅速な評価を可能とする。

【0434】

バイオマーカー発見の重要な構成要素は、本発明のモデルシステムにおける膵臓腫瘍の発生および成長をモニターして、系列的血清分析および癌進行との相関を可能とする感受性で、非－侵入的イメージング技術を開発する必要性である。この目的で、進化するネズミ膵臓癌の磁気共鳴イメージング（M R I）検出に対する最適化されたプロトコルが開発されてきた。さらに、バイオマーカー発見の努力におけるそれらの適当性についての現存のプロテオミックスアプローチを評価する必要性があった。この目的で、中程度の腫瘍負荷を持つマウスからの、および対照同腹子マウスからの血清を単離した。血清検体は、E p r o g e n P r o t e o S e p プラットフォーム、新規な蛋白質発見化学、および高分解能蛋白質分析のための自動分析技術を使用するソフトウエアプラットフォームによって分析した。P r o t e o S e p は、液体クロマトグラフィー技術を用いて複合体蛋白質系の高分解の 2 D マップを生じさせるゲルフリーの全てが液相の蛋白質マッピング技術である。それらの p I および第二の次元の疎水性分離に基づく蛋白質の第一の次元の分離は、各々、ユニークな高速クロマトフォーカシング（C F）および高分解能逆相 N P S 蛋白質分離カラムを用いて発生される。次いで、試料についての完全な蛋白質プロフィールを提示する E p r o g e n ' s P r o t e o S e p S o f t w a r e S u i t e を

用いて2D蛋白質マップを作成する。該分析は、各々、腫瘍担持マウスおよび対照マウスからの血清検体の明瞭なクラスタリングを示し、多数の特異的癌-関連蛋白質ピークの存在を明らかにしたマッププロフィールを示した。これらのデータは、バイオマーカー発見プラットフォームとしてのE p r o g e n P r o t e o S e pシステムと組み合わせたネズミ腫瘍モデルの有用性についての明確な原理の証拠として働く。重要なことには、E p r o g e nシステムは、血清検体を9×96の液体画分に分解し、それは、一旦2Dプロットが同定された潜在的バイオマーカーを有すれば、特異的ペプチドの同定用のマスマススペクトロメトリー分析に容易に従うことができる。当業者であれば、他のクロマトグラフィアプローチ（例えば、P r o t e i n F o r e s t P r o t e o m e C h i pTM）および（Z y o m y xサイトカインチップのような）特異的蛋白質チップを使用するもののような、他のプロテオミクスプラットフォームを用いて、同一の結果を達成できることを認識するであろう。

10

【0435】

バイオマーカー発見および確証のための具体的なアプローチは以下の通りである：腫瘍-傾向および対照マウスを系列的（毎週の）血清单離およびMRIによるモニタリングに付し；E p r o g e nシステムまたはもう1つのプロテオミクスプラットフォーム、続いて、マスマススペクトロメトリーによって血清検体をプロファイルして、段階-特異的マーカーの同定を可能とした。抗体はこれらのマーカーに対して生起させる。ヒトにおいてオルトロガス蛋白質をやはり認識する、抗体発生のためのエピトープを選択する。E L I S A-ベースのアッセイを用い、これらの抗体をヒト診断マーカーとしてのそれらの適用につき評価して、ヒト臓器癌被験体からの、およびその臨床的追跡が腎臓腺癌の発生を明らかとする展望的研究における被験体からの血清をテストする。

20

【0436】

これらの努力は、P d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} ; I n k 4 a / A r f 1^{o x / 1 o x}マウスにおいて中程度に進行した疾患（確立された悪性腫瘍であるが、隣接する器官の侵入または転移はない）の特異的バイオマーカーを同定した（図10）。図11は、P d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} ; I n k 4 a / A r f 1^{o x / 1 o x}モデルにおいて腫瘍進行のタイムラインを示し、検体がこの分析のために収集された時点を示す。

【0437】

これらの分析に続き、L C - M Sを、直接的に、または血漿検体のトリプシン消化物に対して、またはプレ分画（E p r o g e nまたはレクチン結合）に続いて使用した。インフォーマティクス方法を用い、図13AおよびBに示すもののよう、疾患プロフィール-対-プロフィールノクラスタリングを行い、病期に対する高相関を持つ特異的ペプチドが同定されており、限定されるものではないが、H L G S V T A L H V L（配列番号：23）およびQ E Q E R K E K（配列番号：24）を含む（図13B）。図13Aは、共に身分画血漿で同定された、テロメラゼ-関連蛋白質および蛋白質A N K Tの癌-特異的発現を示す。核小体紡錘-関連蛋白質（N u S A P）としても知られたA N K Tは、紡錘微小管組織化において非常に重要であり、増殖しつつある細胞において選択的に発現される。

30

40

【0438】

実施例3：膵臓腺癌の動物モデルを利用するバイオマーカー発見

ヒト固体腫瘍は、しばしば、広範な染色体再編成を受け、正常な染色体物質およびトランスローケーションの獲得または喪失、または2つの異なる染色体の間の異常な融合に導く、新規なキメラ蛋白質の生産に導く、増幅および欠失を含めた顕著な細胞発生異常を呈する。「ゲノミック不安定性」のこのプロセスは、細胞の染色体物質の一体性を支配する分子メカニズムの破壊を通じて起こり、得られた細胞形成異常は、悪性新生物の病因に寄与すると考えられる。

【0439】

ゲノミック不安定性は膵臓腺癌のホールマーク特徴であって、ヒト腫瘍検体の多数の細

50

胞形成実験は、膵臓癌ゲノム内のかなりの数の再発増幅および欠失を示している。これらの遺伝的病巣はこの疾患における多くの潜在的に新規な癌遺伝子および腫瘍サプレッサー遺伝子を指摘するが、ヒト膵臓癌における極端なゲノム複雑性のレベルもまた、この新生物の病因に対して最も臨海的である病巣の同定を複雑化する。膵臓癌の信頼性のあるマウスモデルで起こる細胞系異常の研究は、一次的診断および病因重要性を持つヒト腫瘍で起こる事象を同定するのを助けるように価値あるフィルターとして働くことができる。さらに、マウスにおいて対立遺伝子を遺伝子的に操作する能力は、腫瘍形成の間にゲノム不安定性を生じるにおける癌形成病巣のメカニズムの役割に真剣に取り組むのを可能とする。

【0440】

本発明のMCRを同定するために、新規なcDNAまたはオリゴマーベースのプラットフォームおよびバイオインフォーマティクスツールを利用した。これらの方法は、膵臓癌ゲノム、例えば、膵臓腺癌ゲノムにおけるコピー数変化の高分解能特徴付けを可能とした。

【0441】

MCRに到達するには、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（アレイ-CGH）を利用して、膵臓腺癌細胞株および腫瘍検体においてコピー数異常（CNA）（染色体領域の獲得および喪失）を規定した（例えば、表2）。

【0442】

(Olshen and Venkatraman, Olshen, A. B., and Venkatraman, E. S. (2002) ASA Proceedings of the Joint Statistical Meetings 2530-2535; Ginzinger, D. G. (2002) Exp Hematol 30, 503-12; Golub, T. R., et al. (1999) Science 286, 531-7; Hyman, E., et al. (2002) Cancer Res 62, 6240-5; Lucito, R., et al. (2003) Genome Res 13, 2291-305によって記載されたように) データセットからのフィルターノイズに対する生プロファイルのセグメント化分析を行い、これを用いて、データにおける統計学的に有意な変化点を同定した。

【0443】

MCR内の遺伝子座の同定は、以下のように、数個の基本的基準を利用した自動コンピュータアルゴリズムに基づいた：1) ある100分位数を超えるまたは下回るセグメントを改変されたと同定した；2) もし2以上の改変されたセグメントが500KB未満によって分離された単一プロファイルにおいて隣接すれば、セグメントにわたる全領域を改変されたスパンと考えた；3) 20MBより短い高度に改変されたセグメントまたはスパンを、区別される遺伝子座境界を規定するための「情報的スパン」として保持した。より長い領域は捨てなかったが、遺伝子座境界を規定するのに含めなかった；4) 情報的スパンを試料を横切って比較して、正の値または負の値のセグメントの重複する群を同定した；各群は遺伝子座を規定する；および5) MCRが高度に改変されたセグメントの出現をカウントすることによって計算されたピーク再発の少なくとも75%を有する連続スパンと定義された。もし2つのMCRが唯一つのプローブ位置のギャップによって分離されているならば、それらは合わせた。もし遺伝子座において3を超えるMCRがあれば、全領域は単一の複合体MCRとして報告した。

【0444】

サイズに基づく情報的CNA、および変化の振れに対する高有意性閾値の達成を規定する遺伝子座一同定アルゴリズムを用いた。次いで、多重プロファイルからの重複するCNAを自動様式に合わせて、その境界がこれらの重複するCNAまでの合わせた物理的拡大を表す、領域的コピー数の変化の区別される「遺伝子座」を規定した。各遺伝子座は、その幅および振幅が最も支配的な増幅の輪郭またはその遺伝子座についての欠失を反映するピークプロファイルによって特徴付けた。さらに、各遺伝子座内で、複数の腫瘍試料を横切って1以上のMCRを同定し、各MCRは、潜在的に、試料組を横切ったのコピー数改

10

20

30

40

50

変に標的化された区別される癌－関連遺伝子を保有する。

【0445】

遺伝子座－同定アルゴリズムは、細胞系および一次腫瘍双方における再発、変化の振幅および表示の点で注釈されたデータセット内で区別されるMCRを規定した。これらの区別されるMCRは、一次腫瘍および細胞系双方における再発高－閾値変化を強調する4つの基準に基づいて並べた。この並べるスキームの実行により、4つの基準のうち少なくとも3つを満足する本発明のMCRを得た（表2参照）。

【0446】

これらの並べられた遺伝子座に帰せらせる信頼性－レベルは、アレイ－CGHによって規定されたX選択MCRにて100%一致を示したリアルタイム定量PCR（QPCR）によってさらに確証される。

10

【0447】

表2において、遺伝子座およびMCRは「利得および増幅」または「喪失および欠失」いずれかを有するものとして示され、これは、各遺伝子座およびMCRが、癌において、（1）増大したコピー数および／または発現または（2）減少したコピー数および／または発現、または欠失いずれかを有することを示す。さらに、（p16^{INK4a}、Kras2、SMAD4、LKB1、およびテロメラーゼのような）膵臓癌の病因において重要な役割を演じることが知られている遺伝子が遺伝子座内に存在し、これは表2にも記載される。

【0448】

20

本発明のMCR内に存在する遺伝子の有意な割合の相補性発現プロファイル分析は、遺伝子量およびmRNA発現の間の統計学的に有意な関連を持つバイオマーカーのサブセットを提供する。まだ注釈されていないMCR内のさらなるバイオマーカーは、本明細書中に記載された癌についてのバイオマーカーとして用いることもでき、本発明に含まれる。

【0449】

本明細書中に記載されたような、改変されたコピー数の染色体領域を同定する新規な方法は、限定されるものではないが、癌を含めた種々の疾患についての種々のデータ組に適用することができる。限定されるものではないが、オリゴヌクレオチドベースのマイクロアレイ（Brennan, et al. (2004) In Press; Lucito, et al. (2003) Genome Res. 13:2291-2305; Bignell et al. (2004) Genome Res. 14:287-295; Zhao, et al. (2004) Cancer Research, 64(9):3060-71）、および、例えば、（例えば、FISHおよびFISH＋スペクトル核型（SKY）のような）ハイブリダイゼーション方法を含めた本明細書中に記載された他の方法を含めた他の方法を用いて、コピー数の異常を測定することができる。

30

【0450】

A. 材料および方法

細胞系および一次腫瘍

全ての一次腫瘍は、Ink4a／Arfまたはp53条件腫瘍サブレッサー対立遺伝子いずれかを保有するPdx-Cre；LSL-Kras^{G12D}マウスから獲得した。マウスに膵臓腺癌を発生させ、低継体細胞系はこれらの腫瘍に由来した。他の条件腫瘍サブレッサー対立遺伝子、例えば、Pdx1-Cre；LSL-Kras^{G12D}；Ink4a^{lox/lox}；Pdx1-Cre；LSL-Kras^{G12D}；p53^{lox/lox}；Pdx1-Cre；LSL-Kras^{G12D}；SMAD4^{lox/lox}；Pdx1-Cre；LSL-Kras^{G12D}；Lkb1^{lox/lox}；を保有するマウスもまた腫瘍を発生させ、これは後に記載するように分析で用いる。

40

【0451】

cDNAマイクロアレイについてのアレイ－CGHプロファイリング

製造業者の指示に従って（Gentra System Lie, Minneapo

50

lis, MN)、細胞系および一次腫瘍からのゲノミックDNAを抽出した。修飾を施した(詳細については、Aguirre, A. J., et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101, 9067-72参照)公表されたプロトコル(Pollack, J. R., et al. (1999a) Nat Genet 23, 41-46)に従って、ゲノミックDNAをフラグメント化し、ランダムプライム標識した。標識されたDNAをヒトcDNAマイクロアレイまたはオリゴマイクロアレイいずれかにハイブリダイズさせた。該cDNAマイクロアレイは、それに対してほぼ11,211のユニークなマップ位置が規定された(NCBI, Build 34)、13,281のマッピング可能なクローンと共に14,160のcDNAクローン(Agilent Technologies, Human 1クローンセット)を含む。マッピングされたエレメントの間のメジアン間隔は72.7キロ塩基であり;間隔の94.1%は1Mb未満であり、98.9%は3Mb未満である。該オリゴアレイは22Kのオリゴヌクレオチド(Agilent Technologies)を含む。全てのプローブは、ヒト/マウスゲノム配列の最も遅いドラフト(NCBI, Build 34)にてBLAST整列に付した。BLAST結果に基づき、マッピングできないプローブを排除し、これは55bp未満のベストヒットの整列長と任意に定義され;およびベストヒットの整列長につき95%異常の第二のベストヒットスコアを有することによって同定された未-情報的プローブと定義された。これらの基準はヒトアレイについて16022の情報的プローブを選択した。マッピングされたエレメントの間のメジアン間隔は54.7キロ塩基であり、間隔の96.7%は1Mb未満であり、および99.5%は3Mb未満である。

【0452】

アレイのスキャンされたイメージの蛍光比率を計算し、生のアレイ-CGHプロフィールを処理して、順列を用いて、生のデータにおける変化の点の有意性を決定するセグメント化アルゴリズムを用いてコピー数における統計学的に有意な転移を同定した(Olshen, A. B., et al. (2004) Biostatistics 5(4): 557-72)。各セグメントは、含まれるプローブのメジアンである $\log_2$ 比率が割り当てられた。データは、セグメント化値の分布において最も高いモードが中心であった。モードセンタリングの後、利得および喪失は+0.11または-0.11よりも大またはそれと等しい $\log_2$ 比率と定義され(データの中央50%変位値の+/-4標準偏差)、増幅および欠失は、各々、0.4よりも大きな、または-0.4よりも小さな比率と定義された。扁平および腺癌の間の比較は以下に行った:カスタムメイドのアルゴリズムを設計して、1つの腫瘍サブタイプにおける試料の少なくとも25%で0.5の $\log_2$ 比率を超えるが、他のデータセットに存在しないセグメント化データにつき全てのプローブを同定した。欠失については、アルゴリズムは、1つの腫瘍サブタイプにおける試料の少なくとも25%で0.5の $\log_2$ 比率未満であって、他のデータセットに存在しないセグメント化データについて全てのプローブをサーチした。

【0453】

自動化遺伝子座定義

遺伝子座は、以下の規則に基づいてセグメント化データに適用された自動化アルゴリズムによって定義される:

1. 0.4を超える、または-0.4未満のセグメントを改変されたと同定した。

【0454】

2. もし2以上の改変されたセグメントは単一プロフィールにおいて隣接するか、あるいは500KB未満だけ分離されていれば、セグメントにわたる全領域は改変されたスパンであると考えられた。

【0455】

3. 20MBよりも短い行動に改変されたセグメントまたはスパンは、区別される遺伝子座境界を定義するために「情報的スパン」として保持された。より長い領域は捨てなかったが、遺伝子座の境界を規定するにおいては含めなかった。

【0456】

4. 情報的スパンを試料を横切って比較して、正一値または負一値セグメントの重複する群を同定し：各群は遺伝子座を規定する。

【0457】

5. 再発率は全群についてのピーク再発についての25%未満であれば常に重複群を別々の群に分けた。再発率が全群についてのピーク再発の25%未満であれば常に重複群を別々の群に分けた。再発は、高い閾値における改変を持つ試料の数をカウントすることによって計算した(0.4, -0.4)

6. MCRは、高度に改変されたセグメントの出現をカウントすることによって計算されたピーク再発の少なくとも75%を有する連続スパンと定義された。もし2つのMCRが1つのみの位置のギャップによって分離されれば、それらは合わせた。もし遺伝子座において3を超えるMCRがあれば、全領域は単一複合体MCRとして報告された。

10

【0458】

MCR特徴付け

各MCRについては、ピークセグメント値を同定した。利得または喪失の再発は、従前に定義されたより低い閾値に基づいて全ての試料を横切って計算した(〜+/−0.11)。セグメント値または長さについての閾値とは独立した再発のさらなる尺度として、増幅された領域については0を超える、欠失された領域については0未満の全てのセグメント価のメジアンを取ることによって、メジアン異常(MA)を各プローブ位置について計算した。値のこの対を、各試料プロフィールにおいてプローブ標識を独立して順序を入れ替えた後に得られた値の分布に対して比較した。MAの大きさが順序を入れ替えた平均の95%を超えた場合、該領域は有意に利得されまたは喪失されたと記され、これを優先順位のための投票システムで用いた。公知の遺伝子の数は、NCBIにおける2003年7月ヒトアセンブリーに基づいてカウントする(ビルド34)。

20

【0459】

定量PCR(QPCR)証明

PCRプライマーは、標的および対照配列内の100ないし150bpの産物を増幅するように設計される。各細胞系における対照配列についてのプライマーは、アレイ-CGH分析によって示されたように正倍数体コピー数の領域内に設計される。定量PCRは、ABI7700配列検出システム(Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA)で、SYBR緑色素(Qiagen, Valencia, CA)の蛍光の増加をリアルタイムでモニターすることによって行う。相対的遺伝子コピー数は標準曲線方法(Ginziner, D. G. (2002) Exp Hematol 30, 503-512)によって計算される。遺伝子量の見積もりは、試料内の最も普通のコピー数に対してなされる。PCR確証のために、豊富なラインエレメントを、それに対してコピー数に改変を比較すべき参照として用いる。他のデータベースでの以前の経験に基づき(Aguirre, A. J., et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101, 9067-9072; Brennan, C, et al. (2004) Cancer Res 64, 4744-4748)、(相対的遺伝子量としての)2の閾値を改変のカットオフとして用いる。発現の確証のためには、RNA-特異的PCRプライマーを設計して、エクソンを横切って100ないし150bpの産物を増幅する。

30

40

【0460】

Affymetrix GeneChipについての発現プロファイリング

ビオチニル化標的cRNAは、標準的なプロトコル(Golub, T. R., et al. (1999) Science 286, 531-537)に従って、全試料RNAから作成し、ヒトオリゴヌクレオチドプローブアレイ(U133Plus 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA)にハイブリダイズさせる。発現値はdChip(Li, C., and Wong, W. H. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 31-36)において正規化

50

し、次いで、各群につき、コホートのメジアンに対して Log_2 比率により標準化する。

【0461】

積分されたコピー数および発現分析

アレイ-CGHデータは、各発現値をその対応するコピー数値にマッピングできるように内挿する。各遺伝子位置については、アレイ-CGHが改変されたコピー数を示すか否かに基づき、あるいは内挿されたCGH値に基づかないで試料をグループ分けする。発現に対する遺伝子量の効果は、改変されたおよび未改変試料群における発現値の平均の差を、改変されたおよび未改変試料群における発現値の標準偏差の合計で割ったものとして定義される遺伝子重み付けを計算することによって測定される (Aguirre, A. J., et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101, 9067-9072; Hyman, E., et al. (2002) Cancer Res 62, 6240-6245)。各遺伝子についての重み付けの有意性は、試料標識を10,000回並べ直し、0.05のアルファ閾値を適用することによって見積もられる。

【0462】

蛍光イン・サイチュハイブリダイゼーション (FISH)

メタ相拡大スライドは標準的なプロトコルに従って調製される (Protopopov, A. L., et al. (1996) Chromosome Res 4, 443-447)。凍結された組織セクション (4 μm) を製造業者のプロトコルに従って予備処理する (FISHについての凍結組織調製、Vysis, Downers Grove, IL)。FISH分析用のプローブは、ピオチン-14-dATPまたはジゴキシゲニン-11-sUTPで、製造業者の指示 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) に従ってニックトランスレーションを用いて標識する。ピオチニル化プローブは、Cy3-結合体化アビジン (Accurate Chemical, Westbury, NY) を用いて検出する。ジゴキシゲニン-標識プローブについては、抗ジゴキシゲニン-FITC Fabフラグメント (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) を用いる。スライドを5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (Merck, Wilmington, DE) で逆染色し、Vectashieldアンチフェード培地 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) に設置する。FISHシグナル獲得およびスペクトル分析は、Applied Spectral Imaging (Carlsbad, CA) によって開発されたフィルターセットおよびソフトウェアを用いて行う。

【0463】

膵臓腺癌ゲノムにおける公知および新規CNAの同定

膵臓腺癌のKras^{G12D}-駆動マウスモデルで起こるゲノム異常を同定するために、アレイ-比較ゲノミックハイブリダイゼーションを利用して、染色体コピー数における異常を包括的に評価した。Ink4a/Arfまたはp53腫瘍サプレッサー対立遺伝子を利用する膵臓腺癌のモデルは本明細書中に記載されたように作成し、アレイ-CGHによって35の腫瘍が集合的に分析されている、これらのプロファイルは膵臓腫瘍の生物学および遺伝学に関する価値ある情報の広範なデータベースを含む。まず、ゲノミック不安定性に対するInk4a/Arfまたはp53腫瘍サプレッサー遺伝子の不活化の異なるインパクトは、Ink4a/Arf-突然変異体腫瘍のゲノム複雑性をp53-突然変異体腫瘍のそれと比較した場合に明らかとなった (図12)。p53腫瘍サプレッサーにおける突然変異を含む腫瘍は、増大したゲノム不安定性およびより頻繁な細胞形成異常を有する (図12)。これらの分析は、現在、SMAD4、LKB1およびテロメラゼを含めた他の公知の膵臓癌遺伝子を評価するのに拡大されている。

【0464】

慣用的バイオインフォーマティクスアプローチを利用し、これらのマウス腫瘍のゲノムで起こるコピー数異常の包括的リストが作成された (表2)。表2における欄は以下の記

号を有する：Ch r, 「染色体」；M C R. S t., 与えられた改変についての塩基対開始位置；M C R. E n d., 同一改変についての塩基対末端位置；M C R. W i d t h (M b)、M bにおける増幅または欠失のサイズ；P e a k. V a l., C N Aに対してのピークA C G H値；R e c. A l l, データセットを横切る増幅または欠失の再発；M C R. g e n e s, 増幅または欠失内の遺伝子の数；C a n d i d a t e s, 増幅または欠失内の既知の候補癌遺伝子または腫瘍サプレッサー遺伝子。

【0465】

表2におけるM C Rのリストは、これらのマウス腫瘍における利得または喪失の全ての領域の列挙を表し、膵臓癌についての病理学および／または診断および治療的重要性を有し得る遺伝子を含む染色体の位置を概説する。例えば、これらの腫瘍ゲノムにおける利得／増幅の領域内に位置した遺伝子はR N Aおよび蛋白質レベルで過剰発現され、かくして、診断バイオマーカーまたは新規な治療標的に対する有効な候補である。

【0466】

同等物

当業者であれば、高々ルーチンの実験を用いて、本明細書中に記載された発明の特別な実施形態に対する多くの同等物を認識し、または確認することができよう、そのような同等物は以下の請求の範囲に含まれることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0467】

【図1】図1 Aないし1 EはP d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} マウスにおいて生起するプレ侵入的管病巣を示す。(A) ヒト膵臓腺癌の遺伝的進行モデル。管新形成病巣の増大するブレードの細胞表現型が示される。以前の研究は、時間的系列で示された、特異的病期における遺伝的改変の存在のカatalogを作成した。線の厚みは病巣の頻度に対応する。機能喪失事象は赤色で示し、他方、機能獲得の病巣は緑色で示す。(B) 上方パネル：12週P d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} マウスにおける正常な腺房組織（星印）のバックグラウンドにおける正常な島（矢印）および管（矢の根）を示すH & E株。隣接する血管（B V）も示される。下方パネル：単一層立方体様管上皮のより高いパワー図。(C) 9週齢P d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} マウス（H & E染色）で検出されるP a n I N - 1病巣。ムチン様柱状上皮（矢印）および乳頭人工物（ダッシュ線のボックス）を持つP a n I N病巣に注意されたし。(D) 12週齢P d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} マウス（H & E染色）における顕著な間質応答（星印）を持つ管増殖（ダッシュ線ボックス）の病巣。(E) 26週齢（H & E染色）におけるP d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} マウスの膵臓における親密に会合した線維間質（星印）の古典的なピクチャーを持つ広範なP a n I N病巣。

【図2】図2 Aないし2 Kは、I n k 4 a / A r f 欠乏は、侵入的膵臓腺癌への進行を促進することを示す。(A) P d x 1 - C r e での膵臓におけるI n k 4 a / A r f 遺伝子座の完全な切除。P d x 1 - C r e 導入遺伝子を保有する、またはそれを欠くI n k 4 a / A r f ^{1 0 x / +} マウスからの膵臓（P）または脾臓（S）DNAについてのP s t I サザンブロット。野生型またはl o x 対立遺伝子は9.0 k bにおいて移動し、組み換えられたI n k 4 a / A r f - ナル対立遺伝子は4.6 k bのバンドに対応する。(B) P d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} ; I n k 4 a / A r f ^{1 0 x / 1 0 x} マウス（「I n k / A r f L / L」で示す：n = 26マウス）および対照コホート（「c t r l」で示す：P d x 1 - C r e、L S L - K R A S およびI n k 4 a / A r f 対立遺伝子の全ての組合せ、n = 186マウス）についてのK a p l a n - M e i e r 膵臓無腫瘍生存曲線。臨床的には、瀕死状態で提示されたマウスはオートプシーのために安楽死させた。(C) 共通の胆汁管を閉塞し、膀胱の膨張（*）を引き起こす膵臓腺癌のグロス写真。黄疸は腹部皮膚（J）で容易に明らかである。T = 腫瘍；D = 十二指腸；L = 肝臓。棒線 = 0.6 cm。ダッシュ線の丸は腫瘍を示す。(D) 7.9週齢のP d x 1 - C r e ; L S L - K r a s ^{G 1 2 D} ; I n k 4 a / A r f ^{1 0 x / 1 0 x} 動物で観察されたよく分化した管腺癌。腺腫瘍細胞（矢の根）は豊富な間質によって囲われている（*）。(E) パ

10

20

30

40

50

ネル（D）からのそれと同一のマウスにおいて生起した貧弱に分化した腺癌。不規則な悪く形成された腺（矢の根）は高度に有糸分裂する非典型的な腫瘍細胞の混合物と共に存在する。（F）（D）および（E）と同一のマウスからの肉腫様特徴を持つ腫瘍の領域。（G）ないし（I）管マーカー、サイトケラチン-19につき染色されたよく分化した（G）、貧弱に分化した（H）および肉腫様（I）腫瘍の領域。（J）よく分化した腫瘍細胞における先端ムチンに対するPAS+D染色。（K）コラーゲンに対する三色染色は腫瘍間質の線維性質を明らかにする。

【図3】図3Aないし3Fは、ネズミ膵臓腫瘍が侵入し、転移するのを示す。（A）膵管腺癌による十二指腸侵入。腫瘍（T）、筋肉壁（M、矢の根）および腸上皮（IE）が示される。（B）リンパ節転移の高倍率顕微鏡写真（T、矢の根）。LNは正常なリンパ節人工物を示す。（C）胃壁（M、矢の根）に侵入する腫瘍細胞（T）。隣接する胃上皮が示される（GE）。（D）肝臓中の門管内の転移性腫瘍細胞（矢の根）の高パワー顕微鏡写真。肝細胞（H）、門静脈（PV）および反応性胆汁管（B）が示される。（E）脾臓に侵入する膵臓腫瘍細胞（T）。脾臓の白い髄が示される（WP）。（F）脾臓に侵入するパネルEにおける腫瘍細胞に対するサイトケラチン-19についての免疫組織化学染色。インセット：ck-19+侵入腫瘍細胞の高パワーイメージ。

【図4】図4Aないし4FはPdx1-Cre; LSL-Kras; Ink4a/Arf^{1.0x/1.0x}動物における初期段階膵臓病巣を示す。（A）5週Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{1.0x/1.0x}動物で見られる低グレードのPanIN病巣（矢の根）の高倍率図。（B）3週齢Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{1.0x/1.0x}マウスにおける低グレードのプレ侵入管病巣。（C）4週におけるPdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{1.0x/1.0x}マウスにおける高グレードプレ侵入的管病巣。（D）4週齢Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{1.0x/1.0x}マウスにおける膵臓腺癌の初期病巣。この初期癌の管および退形成成分双方に注意されたし。（E）5週Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{1.0x/1.0x}マウスにおける高グレードPanIN病巣。10μm間隔での全膵臓を通じての系列的セクションは、この動物において腺癌のいずれの病巣も発見できなかった。（F）5週Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{1.0x/1.0x}マウスにおける退形成腫瘍細胞によって囲われた高グレードPanIN病巣（星印）。

【図5】図5Aないし5Gはネズミ膵臓腺癌の分子分析を示す。（A）Ras活性化アッセイ。Raf-RBDアガロース（Upstate）で沈殿し、次いで、抗-Ras抗体でのイムノブロット分析に付された、野生型膵臓（レーン1および2）、Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}膵臓（レーン3および4）からの、およびネズミ膵臓腺癌（レーン5および6）アフィニティーからの溶解物。（B）ネズミ膵臓腺癌細胞株におけるInk4a/Arf遺伝子座のPCR分析。Ink4a/Arf+（下方バンド）、Ink4a/Arflox（中央バンド）、およびInk4a/Arf-（上方バンド）対立遺伝子を増幅するプライマーにて、多重PCRを膵臓癌細胞系からのDNAに対して行った（レーン3ないし16）。Ink4a/Arf+/+（+/+、レーン1および18）およびInk4a/Arf^{1.0x/1.0x}（L/L、レーン2および17）マウスからのDNAを対照として供した。全ての細胞系はInk4a/Arf-対立遺伝子のみを示す。（C）腫瘍溶解物の免疫ブロット分析。膜をp16Ink4a、p19Arf、Smad4、および（負荷対照としての）β-チューブリンに対して免疫ブロットした。一次マウス胚性線維芽細胞（MEF、レーン1）からの溶解物を陽性対照として供した。（D）p53発現のイムノブロット分析。一次MEF（レーン1）およびp53-/-MEF（レーン2）は、各々、陽性および陰性対照であった。（E）イオン化照射による膵臓腺癌細胞におけるp53およびp21の誘導。マウス膵臓癌細胞系は未処理（-）またはガンマ照射（+）のいずれかであった（レーン1ないし8）。溶解物をp53、p21およびβ-チューブリンにつきイムノブロットした。突然変異体p53対立遺伝子（p53*）を持つMEFはp53過剰発現についての対照であった。腫瘍は突然変異体安定化p5

10

20

30

40

50

3を持つ細胞と比較したp53の中程度の発現を示し、その電離放射線はこれらの腫瘍細胞においてp53およびp21を効果的に誘導することができる。(F) Kras遺伝子の増幅、および膵臓腺癌のサブセットにおける上昇したKras蛋白質の発現。上方パネルは、定量的リアルタイムPCRによって測定された相対的Kras遺伝子コピー数を示す。野生型検体は1.0の比率を有する；(一)行わず。中央および下方パネルは、各々、対応するKrasレベルおよびチューブリン(tub)負荷対照のウェスタンブロット分析を示す。レーン1は対照MEF検体である。レーン2ないし15は腫瘍細胞系検体である。レーン10および14は高レベルKras遺伝子増幅および蛋白質過剰発現を共に示す。(G) 突然変異体Kras対立遺伝子は、増大したKras遺伝子コピー数を示す腫瘍において増幅される。RT-PCR/RFLP分析を膵臓腺癌細胞株RNAで行って、野生型およびKras^{G12D}対立遺伝子がKras^{G12D}-特異的HindIII部位に基づいて発現されるか否かを評価した。PCR増幅cDNAは未処理(一)であるか、あるいはHindIII(+)で消化した。レーン1ないし12は腫瘍細胞系である。レーン13および14は対照精巢cDNAである。全ての腫瘍は双方の対立遺伝子を発現する。図(5F)中のレーン10および14に対応する腫瘍58および65(レーン2および4)は、より低いKras^{G12D}対立遺伝子の増大した相対的比率を示し、これは、この突然変異体対立遺伝子の増幅および過剰発現に合致する。

10

【図6】図6Aないし6Dは膵臓腺癌におけるEGFRおよびHER2の発現を示す。(A、B) 抗-EGFR(A)または抗-HER2(B)抗体での免疫組織化学は、腫瘍の腺領域におけるこれらの蛋白質の頑強な発現を示す。(C、D) EGFRおよびHER2に対する免疫組織化学は、これらの腫瘍の貧弱に分化された領域における非常に弱いまたは存在しない発現を明らかにする。(C)および(D)は、(A)および(B)で示されたスライドの隣接領域から写真を撮ったことに注意されたし。

20

【図7】図7Aないし7Dは、Ink4/Arf遺伝子座のエクソン2および3の条件標的化を示す。(A) 各々、ArfおよびInk4aのエクソン1βおよび1αは、通常のエクソン2および3のように示される。loxP部位がエクソン1αおよびエクソン2の間のEcoRVの部位に挿入され、Frt部位および単一loxP部位が近接するネオマイシンカセット(Neo)がエクソン3の3'側StuI部位に挿入されたKO構築体を用いてES細胞を標的化した。ジフテリアトキシン遺伝子(DT)を陰性選択マーカーとして供した。キメラマウスをCAGG:Flpe株に交雑させて、Neoをイン・ビボで切り出し、Ink4a/Arf^{lox}対立遺伝子を得た。Cre-媒介切り出しはエクソン2および3のInk4a/Arf^{lox}を欠失させ、この遺伝子座の双方の産物を破壊する。制限部位はStuI(S)、SpeI(Sp)、EcoRV(E)およびPstI(P)である。3'フラグメント(プローブA)をPstI制限消化に続いて用いて、組換え体ES細胞クローンにつきスクリーニングし、Cre-媒介欠失を評価した。(B) Ink4a/Arf^{lox}/loxマウスとEIIa-Creの一般的欠失株との交雑に続く4.6kb Ink4a/Arfヌル(一)対立遺伝子の生産を示す、プローブAとハイブリダイズしたPstI消化DNAのサザンブロット。野生型対立遺伝子は9kbである。(C) マウス胚性線維芽細胞(MEF)におけるp16^{Ink4a}およびp19^{Arf}発現のウェスタンブロット。MEFは2つのInk4a/Arf⁺/+および2つのInk4a/Arf^{lox}/lox胚から調製し、引き続いて、Creを発現するレトロウイルスで感染させる(SilverおよびLivingston 2001)(+、レーン6ないし9)か、または処理しなかった(一、レーン2ないし5)。Ink4a/Arf⁻/-MEF(Serrano et al. 1996)を免疫反応性に対する陰性対照として用いた。非-特異的(n.s.)バンドは同等な負荷を示すよう供した。未処理Ink4a/Arf^{lox}/loxMEFは野生型MEFに対して匹敵するレベルのp16^{Ink4a}およびp19^{Arf}発現を示し、他方、Ink4a/Arf^{lox}/loxMEFとしては、Creに曝露されたMEFはいずれの蛋白質も発現しない。(D) Ink4a/Arf^{lox}/lox(LL)およびInk4a/Arf⁺/+(++)MEFはCreレトロウイルスで感染させ(+Cre)、または未処理であって、3T3プロ

30

40

50

トコルによって系列的継代に付した。Cre-処理 *Ink4a*/*Arf*^{1.0x/1.0x} 培養は不減増殖を示し、他方、全ての他の培養は継代-誘導老化を受けた。

【図8】図8Aないし8Dは、腺房または島細胞分化のマーカーに対して陰性である *Pdx1*-Cre; *LSL*-*Kras*^{G12D}; *Ink4a*/*Arf*^{1.0x/1.0x} 腫瘍株を示す。(AおよびC) *Pdx1*-Cre; *LSL*-*Kras*^{G12D}; *Ink4a*/*Arf*^{1.0x/1.0x} マウスにおいて生起する同一膵臓腫瘍についての、よく分化した管腺癌 (A) および退形成変化の病巣 (C) の領域における腺房マーカーアミラーゼについての免疫組織化学。(A)におけるインセット: 腫瘍に隣接する保持された腺房組織における強い抗-アミラーゼ反応性。(BおよびD)よく分化した管腺癌 (B) および退形成腫瘍細胞 (D) 双方における内分泌マーカーインスリンについての免疫組織化学。(B)におけるインセット: 隣接する島における強い抗-インスリン反応性。並んだ管の陰性染色に注意されたし。

10

【図9】図9は、*Pdx1*-Cre; *LSL*-*Kras*^{G12D}; *Ink4a*^{1.0x/+}; *p53*^{1.0x/+} マウス (四角) および対照コホート (菱形) についてのKaplan-Meier膵臓無腫瘍生存曲線を示す。臨床的には、瀕死状態で提示されたマウスはオートプシーのために安楽死させた。

【図10】図10は、正常-対-膵臓腫瘍担持マウス (*LSL*-*Kras*^{G12D}; *Ink4a*/*Arf*^{1.0x/1.0x} マウス) の血清蛋白質プロファイルを示すEprogen ProteoSepシステムからのデータを示す。左側パネルは対照-対-癌担持マウスにおける蛋白質豊富度の差を比較するPI/疎水性プロットを示す。同等な豊富度は白色に見え、腫瘍-関連増大は明るい灰色に見え、正常な動物からのものは暗い灰色である。右側パネルは、対照および腫瘍担持動物における与えられたPIおよび異なる疎水性の蛋白質の追跡を示す。高度に発現された蛋白質は膵臓癌に対するバイオマーカーである (矢印) ことに注意されたし。

20

【図11】図11は*Pdx1*-Cre; *LSL*-*Kras*^{G12D}; *Ink4a*/*Arf*^{1.0x/1.0x} モデルにおける腫瘍進行のタイムラインを示し、検体がこの分析のために収集された時点を示す。

【図12】図12は、*Ink4a*/*Arf*-対-*p53*マウス膵臓腺癌のゲノム複雑性を示す。*Ink4a*/*Arf*または*p53*条件腫瘍サプレッサー遺伝子いずれかを保有する *Pdx1*-Cre; *LSL*-*Kras*^{G12D} マウスに膵臓腺癌を発生させ、低継代細胞系はこれらの腫瘍に由来した。これらの細胞系からのゲノムDNAを標準的なプロトコルに従ってアレイ-CGHによって分析した。*Ink4a*/*Arf*または*p53*腫瘍サプレッサー突然変異を保有する腫瘍のゲノム複雑性を密度関数としてプロットし、X軸はアレイ-CGH値に対応する (腫瘍および正常DNAの間の蛍光比率の $\log_2$)。「0」を超えるアレイ-CGH値は腫瘍ゲノムの増幅されたまたは獲得されたセグメントに対応し、「0」未満のものは腫瘍ゲノムの失われたまたは欠失されたセグメントに対応する。非常に多数の失われたまたは獲得されたセグメントが*p53*突然変異を持つ腫瘍で見られる。

30

【図13】図13Aおよび13Bは、膵臓腺癌の*Pdx1*-Cre; *LSL*-*Kras*^{G12D}; *Ink4a*/*Arf*^{1.0x/1.0x} モデルからの血清のプロテオミックスプロファイリングによって同定された、テロメラーゼ-関連蛋白質の、および蛋白質ANKTの癌-特異的発現 (13A)、およびこれらの分析で同定された病期と高い相関を持つ特異的ペプチドの配列 (13B) を示す。

40

【図14】表2である。

【図 5】

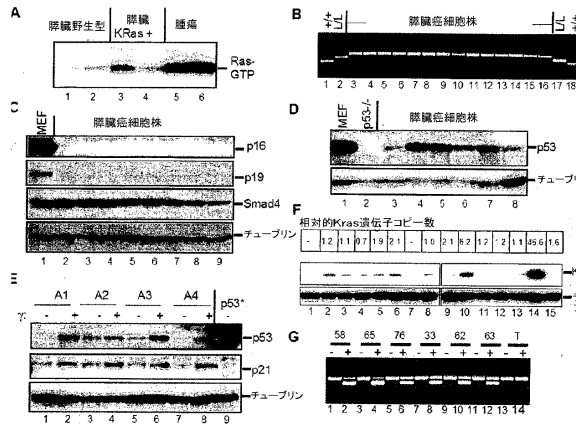


FIGURE 5

【図 6】

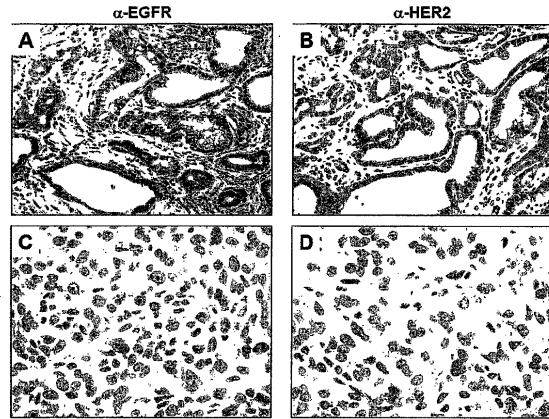


FIGURE 6

【図 7】

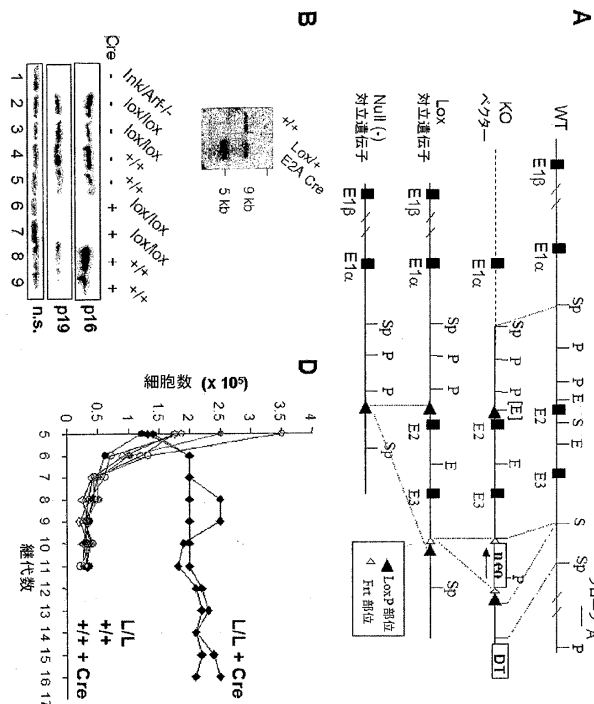


FIGURE 7

【図 8】

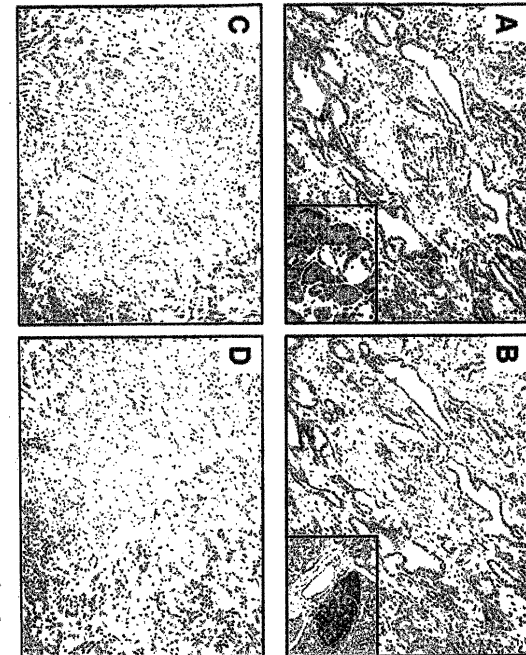


FIGURE 8

【図 9】

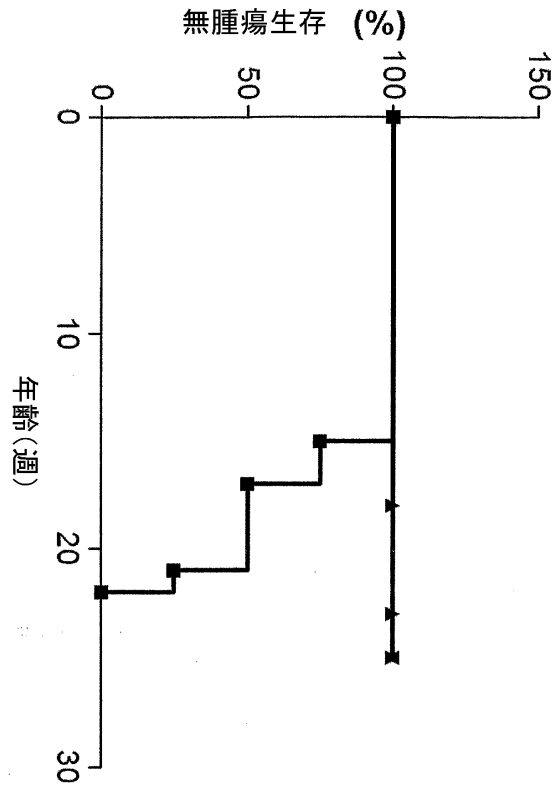


FIGURE 9

【図 10】

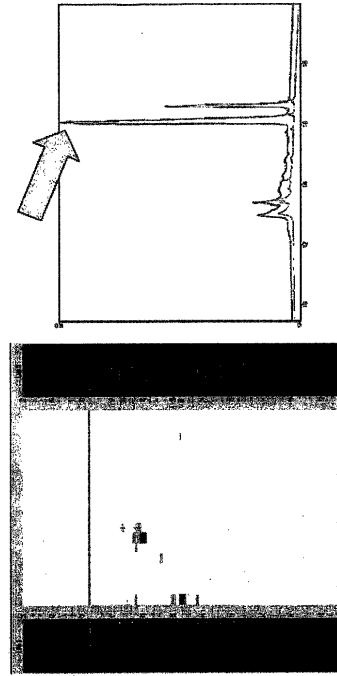


FIGURE 10

【図 11】

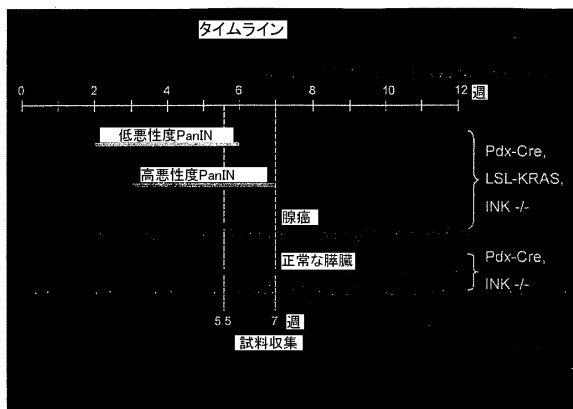


FIGURE 11

【図 12】

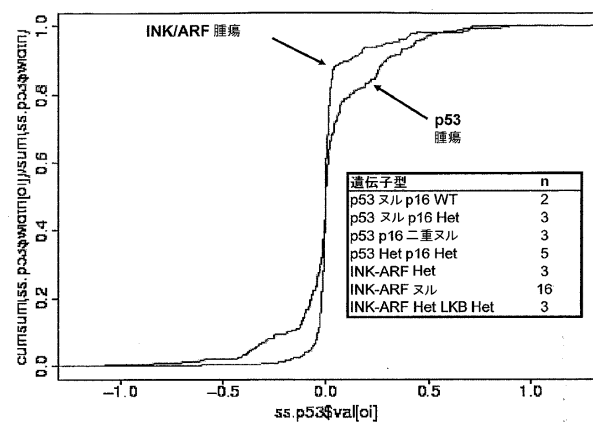


FIGURE 12

A.



#	参照ファイル、スキャン(s)	配列	MH+	チャージ	XC	スコア デルタ Cn	登録 Sp	RSp
#139	GPI19527068refNP_598612 JANKet					30.0695	19527068	
	Nabaei_383,1688-1587	..QEQRKEK..	1075.159	1	1.9329	0.0272	226.2	-11
	Nabaei_385,1494-1672	..QEQRKEK..	1075.159	1	1.8572	0.0161	268.1	20
	Nabaei_373,1708-1857	..QEQRKEK..	1075.159	1	1.8359	0.0033	151.8	60

獲得		増補		減失		合計		記事	MCR 消減	校補
品目	MCR 増減	MCR 元	MCR 率	品目	MCR 元	MCR 率	品目	MCR 元	MCR 率	校補
13300801	68402268	16,732.78	0.787612	13	224					
13301182	17867741	4,351.59	0.245101	12	60					
13301699	79133198	19,376.34	0.5202712	10	67					
13301798	13131988	3,194.49	0.529712	10	26					
13301896	5577311	1,362.87	0.622393	10	1					
13314073	20077465	4,937.78	0.337378	9	1					
13316811	101139515	25,055.15	0.5948465	6	1					
13320453	64311680	15,910.01	0.846759	7	19					
133241201	15355322	3,720.44	0.441	1	21					
13341058	105222608	25,716	0.354482	3	114					
40169352	7219176	23,995.42	0.807693	13	324					
40177713	149023263	37,070.52	0.770572	14	50					
41210921	1639894	610.936	0.5482712	5	25					
40691693	70245193	23,534.97	0.5482712	5	25					
18104642	7872700	5,532.78	0.518171	5	5					
3930026	1458097	4,496.93	0.518171	5	1					
45554471	4589697	3,507.026	0.0956144	2	6					
41674803	61759267	16,014.24	0.515877	2	1					
10554122	116327010	27,170.08	0.77172	1	52					
1119484176	120023681	29,548.55	0.6074367	2	6					
111650304	12134878	5,754.44	0.3812787	1	1					
105520024	10767610	2,651.074	0.441	1	1					
107679005	121172354	13,293.448	0.4431926	4	470					
53523544	50482662	15,070.18	1.2107712	3	1					
10314108	40708860	18,935.72	0.457712	3	186					
17220344	88292603	21,470.08	0.77172	3	242					
22034489	20929313	4,818.024	0.786593	5	10					
125549149	24578397	23,446.98	0.4190033	6	18					
125549133	10313133	2,992.924	0.518171	12	18					
59060815	10596104	2,644.55	0.901603	12	925					
4411823	6525951	2,042.422	0.5483738	12	12					
10552554	9959139	3,787.90	0.441	12	1					
3019725	407487	45.9591	1.0070705	12	1					
6867868	11343598	8,254.61	0.4587712	10	446					
42506249	61305662	18,400.38	0.4587712	10	321					
損失										
品目	MCR 増減	MCR 元	MCR 率	品目	MCR 元	MCR 率	品目	MCR 元	MCR 率	校補
13327616	30482469	26,667.67	1.018676							

表 2

0004733644000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

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 33/574 D

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 デフィノー, ロナルド エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ, ブルックライン, ボイルストン ストリート 565

(72)発明者 エルバーディーザー, ナビール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02116, ボストン, ダブリュー. ニュートン ストリート 219, アpartment 1

(72)発明者 アギレー, アンドリュー ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02445, ブルックライン, デービス アベニュー 10, アpartment ディー

(72)発明者 テューベッソン, デイビッド エー.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19312, バーウィン, ムーアフィールド コート 608

審査官 上條 肇

(56)参考文献 特表2003-506038 (JP, A)

国際公開第2002/079419 (WO, A1)

国際公開第2003/089580 (WO, A1)

Seminars in Cancer Biology, 2001年, Vol.11, p.201-218

Genes & Development, 2001年, Vol.15, p.3243-3248

Development, 2002年, Vol.129, p.2447-2457

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/63 - 15/90

A01K 67/027

C12N 5/00 - 5/28

C12Q 1/37

G01N 33/15

G01N 33/50

PubMed