

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-523727

(P2005-523727A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
GO 1 N 37/00	GO 1 N 37/00	1 0 2
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2004-501910 (P2004-501910)	(71) 出願人	503137300 アイアールエム エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成15年5月1日(2003.5.1)		イギリス領バーミューダ諸島 エイチエム エルエックス ハミルトン ピー・オー ・ボックス エイチエム 2899
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月17日(2004.12.17)	(74) 代理人	100064355 弁理士 川原田 一穂
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/013709	(72) 発明者	ガレット・エム・ハンプトン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン ディエゴ アーボア グロ ープ コート 5659
(87) 国際公開番号	W02003/093794	(72) 発明者	ジョン・バーナード・ウェルシュ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 122 サン ディエゴ ディラク スト リート 5852
(87) 国際公開日	平成15年11月13日(2003.11.13)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/377,402		
(32) 優先日	平成14年5月1日(2002.5.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/442,853		
(32) 優先日	平成15年1月24日(2003.1.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 腫瘍のバイオマーカーを発見して腫瘍を診断する方法

(57) 【要約】

本発明は、各種癌の治療効果の診断、予後及び監視に有用なバイオマーカーの発見方法を提供する。また本発明は、本発明に従って確認されたバイオマーカーを用いて各種形態の癌を診断する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物中の癌の存在について診断するバイオマーカーを確認する方法であって、ポリヌクレオチド配列が、ポリペプチドを発現する細胞から分泌されたポリペプチドをコード化することを予測するかどうかを測定するアルゴリズムを用いて、1つ以上のポリヌクレオチド配列を分析する工程、及び

該分泌ポリペプチドのコード化を予測する1つ以上のポリヌクレオチド配列に相当する mRNA が、1種以上の癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するかどうかを測定する工程、

を含み、癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現した mRNA、又は該差別的に発現した mRNA によりコード化されたポリペプチドが、哺乳動物中の癌の存在について診断するバイオマーカーとして有用である該方法。

10

【請求項 2】

前記方法が、データベースに存在する複数のポリヌクレオチド配列について行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記データベースが、1,000以上のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記データベースが、10,000以上のポリヌクレオチド配列を含む請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記データベースが、遺伝子腫瘍学協会により提供される請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アルゴリズムが、ポリヌクレオチド配列を確認する工程を含み、該配列に対し、関連する注釈は、ポリヌクレオチド配列によりコード化されたポリペプチドが細胞から分泌されたことを示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アルゴリズムが、貫通膜領域を含む予測されたアミノ酸配列をコード化するポリヌクレオチド配列を確認する工程を含む請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記アルゴリズムが、Tmapを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記アルゴリズムが、信号ポリペプチド及び信号ポリペプチド切断部位の1つ以上を含む、予測されたアミノ酸配列をコード化するポリヌクレオチド配列を確認する工程を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記アルゴリズムが、SigCleaveを含む請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

細胞から分泌されたポリヌクレオチドをコード化することを予測するポリヌクレオチド配列を確認する2つ以上のアルゴリズムが使用される請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記1つ以上のポリヌクレオチド配列が、分泌を示す関連注釈を確認することにより、かつTmap及びSigCleaveの一方又は両方により分析される請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

差別的発現の測定が、癌細胞又は非癌細胞から得られたサンプル中に存在する mRNA、cRNA 又は cDNA をハイブリダイズできる複数のプローブを含有するポリヌクレオチドアレイを用いて行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記ポリヌクレオチドアレイが、GeneChip（登録商標）を含む請求項13に記載の方法。

【請求項15】

差別的発現が、複数の異なる癌から得られた細胞中で評価される請求項1に記載の方法。

【請求項16】

差別的発現が、前記各々異なる癌について複数のサンプルから得られた細胞中で評価される請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記癌細胞が、前立腺、乳房、肺、卵巣、結腸直腸、腎臓、肝臓、膵臓、ボウコウ/尿道及び胃腸/食道、の癌よりなる群から選ばれた癌から得られる請求項1に記載の方法。

10

【請求項18】

哺乳動物から得たサンプルにおいて、バイオマーカー水準の増加を検出する工程を含む哺乳動物中の癌の診断方法であって、該バイオマーカーは、以下の工程：

ポリヌクレオチド配列が、ポリペプチドを発現する細胞から分泌されたポリペプチドをコード化することを予測するかどうかを測定するアルゴリズムを用いて、1つ以上のポリヌクレオチド配列を分析する工程、及び

該分泌ポリペプチドのコード化を予測する1つ以上のポリヌクレオチド配列に相当するmRNAが、1種以上の癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するかどうかを測定する工程、

20

を含み、癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現したmRNA、又は該差別的に発現したmRNAによりコード化されたポリペプチドが、哺乳動物中の癌の存在について診断するバイオマーカーとして有用である方法を用いて、確認したものである該診断方法。

【請求項19】

前記癌細胞が、前立腺、乳房、肺、卵巣、結腸直腸、腎臓、肝臓、膵臓、ボウコウ/尿道及び胃腸/食道、の癌よりなる群から選ばれた癌から得られる請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記バイオマーカーが、差別的に発現したmRNAによりコード化されたポリペプチドである請求項18に記載の方法。

30

【請求項21】

前記サンプルが、哺乳動物から得た血液又は血清を含む請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記動物がヒトである請求項18に記載の方法。

【請求項23】

異なる時点で哺乳動物から得たサンプルにおいて、哺乳動物中の癌の存在を診断するバイオマーカー水準の増加又は減少を検出する工程を含む、哺乳動物での癌治療の効果を監視する方法であって、該バイオマーカーは、以下の工程：

ポリヌクレオチド配列が、ポリペプチドを発現する細胞から分泌されたポリペプチドをコード化することを予測するかどうかを測定するアルゴリズムを用いて、1つ以上のポリヌクレオチド配列を分析する工程、及び

40

該分泌ポリペプチドのコード化を予測する1つ以上のポリヌクレオチド配列に相当するmRNAが、1種以上の癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するかどうかを測定する工程、

を含み、癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現したmRNA、又は該差別的に発現したmRNAによりコード化されたポリペプチドが、哺乳動物中の癌の存在について診断するバイオマーカーとして有用である方法を用いて、確認したものである該監視方法。

前記哺乳動物が、2つ以上のサンプルを得る間に癌治療を行ったものである請求項23に記載の方法。

【請求項24】

50

前記哺乳動物が、2つ以上のサンプルを得る間に癌治療を行ったものである請求項23に記載の方法。

【請求項25】

哺乳動物の前立腺癌を診断するか、又はその発身体質を確認する方法であって、(a)前立腺癌を持つか、又は前立腺癌に発展する傾向があると疑われる哺乳動物から生体サンプルを得る工程、(b)該サンプルにおいて前立腺癌の少なくとも1つの分泌したバイオマーカーの異常水準を検出し、これにより哺乳動物が前立腺癌を持つか、或いはその発身体質を確認する工程を含み、前記前立腺癌の少なくとも1つの分泌バイオマーカーが、リラキシン-1(H1)、ニューロペプチドY、MIC-1、腓臓筋(thread)蛋白質様(ラット)、前立腺特異的膜抗原、前立腺特異的膜抗原、前立腺特異的膜抗原及び一心(single-minded)ホモログ2(ショウジョウバエ)よりなる群から選ばれる、該方法。

10

【請求項26】

前記生体サンプルが、血清、プラズマ、又は全血液である請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記哺乳動物は、癌に罹っていない対照集団のバイオマーカーの発現水準に比べてバイオマーカーの発現水準が高い請求項25に記載の方法。

【請求項28】

前記哺乳動物を慣用の癌診断法と併用して検査する工程を更に含む請求項25に記載の方法。

20

【請求項29】

哺乳動物の結腸癌を診断するか、又はその発身体質を確認する方法であって、(a)結腸癌を持つか、又は結腸癌に発展する傾向があると疑われる哺乳動物から生体サンプルを得る工程、及び(b)該サンプルにおいて高水準のムチン2(MUC-2)を検出する工程を含む該方法。

【請求項30】

哺乳動物の癌を診断するか、又はその発身体質を確認する方法であって、(a)癌を持つか、又は癌に発展する傾向があると疑われる哺乳動物から生体サンプルを得る工程、及び(b)該哺乳動物から高水準のマプシンを検出する工程を含み、該癌が、結腸癌、食道癌、肺癌、又は膵臓癌である該方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、米国暫定特許出願No. 60/442, 853(2003年1月24日出願)及び同60/377, 402(2002年5月1日出願)による利益を主張する。これら出願の全開示は、あらゆる目的のため、その全体をここに援用した。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般には、癌の治療介入において診断用マーカー及び/又は標的として有用な遺伝子に関する。更に詳しくは、本発明は、分泌された蛋白質をコード化して、悪性組織及び正常組織中に差別的に発現する遺伝子の確認に関する。これらの遺伝子による各種癌の診断、予後及び治療の方法を提供する。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

米国では、癌は死亡の主要原因で、死亡原因の4人に1人で、これは、心臓疾患にだけ続いて第二位である。米国では毎年、50万を超える人々が癌で死んでいる。Annual Report to the Nation on the Status of Cancer(Howe等,(2001), J. Nat'l. Cancer Insti

50

tute 93:924-842)によれば、肺、前立腺、乳房、直腸の4つの癌部位は、新癌患者全体の56%を占め、いずれの人種及び民族群の癌死の主要原因となっている。これら及び他種の癌の早期段階は、多くの場合、例えば外科、放射線治療又は化学的治療により治療可能である。したがって、効果的な治療には、癌の早期診断が重要である。

【0004】

また多くの場合、首尾よく介入するための窓が閉じた後まで、癌として診断されないため、患者は死亡する。この問題は、現存の癌診断法における重大な欠点により悪化する。第一に、癌として診断された全患者の約4%では、観察された腫瘍は、転移によるもので、腫瘍の一次(primary)源は、測定されていない。一次腫瘍の部位を確認できないと、診断及び治療は複雑化する(Hillien, Postgrad. Med. J. 76:690-693(2000))。一次腫瘍が判っている患者に対してさえ、現存の診断法は、最適な方法に達していない。例えば、前立腺癌には、例えばCatalona等, JAMA 270:948-954(1993)に記載されるように、前立腺特異性抗原(PSA)選別による検出努力により、局所疾患を持つ人が数千人、確認ができた。血清PSAは、例えばBrawer, Semin. Surg. Oncol., 18:3-9(2000)に記載されるように、現在入手できる最良の前立腺腫瘍マーカーとして広く認識されているが、PSA単独又はこれをデジタル直腸検査と組合せて用いる選別プログラムでは、前立腺癌を持つ人の延命率を改良できなかった。

10

【0005】

PSAを診断マーカーとして使用する場合、幾つかの欠点を伴う。第一に、PSAは、前立腺組織に特異的であるが、悪性腫瘍組織ばかりでなく、正常組織によっても作られ、前立腺組織片でのPSA発現の定量は、組織を悪性か又は悪性可能性かについて明確に分類しない。第二に、いずれの前立腺腫瘍もPSAを分泌しない。第三に、高水準のPSA血清は、前立腺癌の効果的な指示薬であるが、閉塞性又は炎症性神経障害を持つ人には、やや高い水準、例えば4~10ng/mLの水準が見られ、例えばBrawer等, Am. J. Clin. Pathol., 92巻、760-764頁(1989)に記載されるように、PSAの癌マーカーとしての特異性を低下させる。腺性カリクレイン2(hK2)及び前立腺特異的トランスグルタミナーゼ(pTGase)のような他のバイオマーカーは、例えばNam等, J. Clin. Oncol., 18巻、1036-1042頁(2000)に記載されるように、診断特異性を増大させるPSA助剤として提案され、不

20

30

【特許文献1】USP No. 6,040,138

【特許文献2】USP No. 4,946,778

【特許文献3】USP No. 5,932,448

【特許文献4】USP No. 5,693,762

【特許文献5】USP No. 5,693,761

【特許文献6】USP No. 5,585,089

【特許文献7】USP No. 5,530,101

【特許文献8】USP No. 5,569,825

【特許文献9】USP No. 5,625,126

40

【特許文献10】USP No. 5,633,425

【特許文献11】USP No. 5,789,650

【特許文献12】USP No. 5,661,016

【特許文献13】USP No. 5,770,429

【特許文献14】USPN 6,365,352

【特許文献15】WO 0111082

【非特許文献1】Annual Report to the Nation on the Status of Cancer(Howe等,(2001),J.Nat'l. Cancer Institute 93:924-842)

【非特許文献2】Hillien, Postgrad. Med. J. 76:690-693

50

(2 0 0 0)

【非特許文献3】Catalona等, JAMA 270: 948 - 954 (1993)

【非特許文献4】Brawer, Semin. Surg. Oncol., 18: 3 - 9 (2000)

【非特許文献5】Brawer等, Am. J. Clin. Pathol., 92巻、760 - 764頁(1989)

【非特許文献6】Nam等, J. Clin. Oncol., 18巻, 1036 - 1042頁(2000)

【非特許文献7】Eizen等, Proc Natl Acad Sci USA 95, 14863 - 8, 1998

【非特許文献8】Singleton等, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (第2編, 1994)

【非特許文献9】THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker等, 1988)

【非特許文献10】Hale & Marham, THE HAPPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)

【非特許文献11】Person等, J Mol Biol, 237: 182 - 192, 1994

【非特許文献12】von Heijne等, Nucl. Acids Res., 14: 4683 - 4690, 1986

【非特許文献13】Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, pp. 4.1.1 - 4.2.9及び4.5.1 - 4.5.3, John Wiley & Sons, Inc. (1996)

【非特許文献14】Lockhart等, Nature Biotechnology 第14巻、pp. 1675 - 1680 (1996)

【非特許文献15】McGall等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第93巻、pp. 13555 - 13460 (1996)

【非特許文献16】Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第81巻, pp. 6851 - 6855 (1984)

【非特許文献17】Neuberger等, Nature, 第312巻, pp. 604 - 608 (1984)

【非特許文献18】Takeda等, Nature, 第314巻, pp. 452 - 454 (1985)

【非特許文献19】Bird, Science, 第242巻, pp. 423 - 426 (1988)

【非特許文献20】Huston等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第85巻, pp. 5879 - 5883 (1988)

【非特許文献21】Ward等, Nature, Vol. 334, pp. 544 - 546 (1989)

【非特許文献22】Persson等, J Mol Biol, 237: 182 - 192, 1994

【非特許文献23】Persson等, J Protein Chem 16, 453 - 7, 1997

【非特許文献24】Milpetz等, Trends Biochem Sci 20, 204 - 5, 1995

【非特許文献25】Heasley, Oncogene 20, 1563 - 9, 2001

【非特許文献26】Diamandis等, Clin Biochem 33, 579 - 83, 2000

【非特許文献27】Luo等, Clin Chim Acta 306, 111 - 8, 2001

10

20

30

40

50

【非特許文献28】Johnson等, Clin Liver Dis 5, 145-59, 2001

【非特許文献29】Fleming等, Ann NY Acad Sci 923, 78-79, 2000

【非特許文献30】Bani, Gen Pharmacol 28, 13-22, 1977

【非特許文献31】Sager等, Adv Exp Med Biol 425, 77-88, 1997

【非特許文献32】Martin等, Cancer Res 60, 2232-8, 2000

【非特許文献33】Bhattacharjee等, Proc Natl Acad Sci USA 98, 13790-5, 1991

【非特許文献34】Sunday等, Pathol 22, 1030-9, 1991

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

血清学免疫アッセイによる癌の早期検出は、癌患者の診断及び予後を大きく改良するための重要な目標を表わす。本発明は、このような要件及び他の要件を満足する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本発明は、哺乳動物の癌の存在を診断するバイオマーカーを確認する方法を提供する。この方法は、(a)ポリヌクレオチド配列が、ポリペプチドを発現する細胞から分泌されたポリペプチドをコード化することを予測するかどうかを測定するアルゴリズムを用いて、1つ以上のポリヌクレオチド配列を分析する工程、及び(b)該分泌ポリペプチドのコード化を予測する1つ以上のポリヌクレオチド配列に相当するmRNAが、1種以上の癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するかどうかを測定する工程を含む。癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するmRNA、又はこの差別的に発現したmRNAによりコード化されるポリペプチドは、哺乳動物の癌の存在を診断するバイオマーカーとして有用である。

【0008】

本発明は、哺乳動物の癌を診断する方法も提供する。この方法は、哺乳動物から得られたサンプル中のバイオマーカーの水準増加を検出する工程を含み、バイオマーカーは、(a)ポリヌクレオチド配列が、ポリペプチドを発現する細胞から分泌されたポリペプチドをコード化することを予測するかどうかを測定するアルゴリズムを用いて、1つ以上のポリヌクレオチド配列を分析する工程、及び(b)該分泌ポリペプチドのコード化を予測する1つ以上のポリヌクレオチド配列に相当するmRNAが、1種以上の癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するかどうかを測定する工程を含む方法を用いて、確認したものである。癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するmRNA、又はこの差別的に発現したmRNAによりコード化されるポリペプチドは、哺乳動物の癌の存在を診断するバイオマーカーとして有用である。

【0009】

本発明は、哺乳動物における癌治療の有効性を監視する方法も提供する。この方法は、異なる時点で哺乳動物から得られた複数のサンプルにおいて、癌の存在を診断するバイオマーカー水準の増減を検出する工程を含み、バイオマーカーは、(a)ポリヌクレオチド配列が、ポリペプチド発現性細胞から分泌されるポリペプチドをコード化することを予測するかどうかを測定するアルゴリズムを用いて、1つ以上のポリヌクレオチド配列を分析する工程、及び(b)該分泌ポリペプチドのコード化を予測する1つ以上のポリヌクレオチド配列に相当するmRNAが、1種以上の癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的に発現するかどうかを測定する工程を含む方法を用いて、確認したものである。癌細胞中で非癌細胞

10

20

30

40

50

胞に比べて差別的に発現する mRNA、又はこの差別的に発現した mRNA によりコード化されるポリペプチドは、哺乳動物の癌の存在を診断するバイオマーカーとして有用である。

【0010】

更に本発明は、本発明により確認された、第1表に示す癌特異的バイオマーカーを用いて、癌の発現体質を診断又は確認する方法を提供する。この方法は、(a)癌を持つか、或いは癌に発現する(develop)傾向があると疑われる検体(例えば哺乳動物)から生体サンプル(例えば血清)を得る工程、及び(b)この生体サンプルにおいて、この癌用に分泌させた少なくとも1つのバイオマーカーの異常水準を検出する工程を含む。例えば前立腺癌の診断用に分泌させたバイオマーカーは、リラクシン(relaxin)1 (H1)、ニューロペプチドY、MIC-1、腓臓筋(thread)蛋白質様(ラット)前立腺特異的膜抗原、前立腺特異的膜抗原、前立腺特異的膜抗原及び一心(single-minded)ホモログ2(ショウジョウバエ)を含有できる。

10

【0011】

図面の簡単な説明

図1は、癌組織中で差別的に発現する分泌蛋白質をコード化する遺伝子を確認するための計画の概略を示す。

【0012】

図2A及び図2Bは、分泌したバイオマーカー候補の発現が多種類の癌で高まることを示す。注釈に基づく分析及び配列に基づく分析により選択された分泌蛋白質をコード化する32個の遺伝子は、少なくとも1つの腫瘍-正常対応物組織対では顕著な過大発現(>3倍)を示し、また腫瘍では、他の正常組織に比べて、顕著な過大発現(>2倍)を示した。BR:乳房(ER+、ER-)、CO:大腸、GA:胃/食道腺癌、KI:腎臓、LI:肝臓、LUA:肺の腺癌、LUS:肺の扁平上皮癌、LUO:肺の“その他”として小細胞肺癌及び肺の大細胞非識別癌、OV:卵巣、PA:膵臓、PR:前立腺。図(図2A)の右側に遺伝子記号を示す。前立腺癌において優先的に上方規制された(upregulated)遺伝子の拡大図を図2Bに示す。各対応物側からの多数の組織サンプルを括弧内に示す。遺伝子アトラスは、Te:精巣、Th:甲状腺、Ut:子宮、SG:唾液腺、Tr:気管、AG:副腎、He:心臓、Pi:下垂体、Sp:脊髄、CC:脳皮質、Nor.Pr:正常前立腺である。転写水準は、Clusterで標準化され、Tree Viewで視覚化された(Eizen等, Proc Natl Acad Sci USA 95, 14863-8, 1998)。

20

30

【0013】

図3A及び図3Bは、RT-PCR、IHC及びELISAによるマイクロアレイ遺伝子発現の証拠(validation)を示す。図3Aは、複数の異なるヒト組織(RT-PCRパネル上に標識した(labeled))から発現したRNAを示し、3つの正常及び6つの一次前立腺癌を、リラクシン-1に向けたプライマーを用いて標準状態で逆転写し、増幅した。一次マイクロアレイデータを上部に示し(Y軸はハイブリダイゼーション強度、X軸はサンプル)、代表的なPCRを下部に示す。cDNAの増幅量を制御するため、18Sに特異的なプライマーを用いた。図3Bは、全組織部分に対する抗NPY抗体で行ったIHCを示す。一次マイクロアレイを、正常なマイクロアレイ陽性及びマイクロアレイ陰性の前立腺癌中のIHC汚染例と共に、上部に示す。

40

【0014】

図4A、図4B及び図4Cは、診断用蛋白質候補における水準増加の証拠を示す。36の正常な上皮組織及び229の癌を含む組織マイクロアレイを汚染するため、分泌蛋白質候補に特異的な抗体であるNPY(図4A)、MUC-2(図4B)及びマスピン(maspin)(図4C)を用いた。各遺伝子に対する相対発現水準を、組織群及び確認された特異組織と一緒に、各図の上部に示す。遺伝子の発現水準は、Tree Viewで出力した。IHC汚染の例を、各蛋白質に対し陰性及び陽性の両癌を強調して、各図の下部に示す。

50

【0015】

図5A及び図5Bは、マスピン発現の上方規制は、乳癌におけるエストロゲン受容体状態と相関することを示す。図5Aは、Affymetrix U95a GeneChipの2つの独立したプローブセット(PS1及びPS2)で監視したマスピン発現を示す。図5Bは、抗マスピン抗体を用いて正常、ER+及びER-の腫瘍における組織マイクロアレイでのマイクロアレイデータとIHCとの比較を示す。正常な管状(ductal)乳房組織と比べて、ER-腫瘍に対する汚染が強いことに注目。

【0016】

図6は、正常及び腫瘍の肺組織サンプルの拡大セットにおける肺癌マーカー候補の発現を示す。正常肺、肺膜癌、小細胞非識別癌、扁平上皮癌及びカルチノイドでの肺癌候補遺伝子(第1表において、GO注釈及び配列:陽性、GO注釈:陽性のみ、及び配列:陽性のみ)の各候補群から誘導した)の発現水準を測定した。この研究データ(<http://research.dfci.harvard.edu/meyersonlab/lungca/data.html>で入手できる)は、TreeViewでダウンロードし、出力した。カルチノイドにおけるGRP、及びSCLCの高水準発現、及び扁平上皮癌におけるマスピンのほぼ均一な過大発現に注目。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

詳細な説明

本発明は、分泌した癌特異的バイオマーカーの発見について、地球規模の接近方法を提供する。この方法は、蛋白質を発現する細胞から分泌しそうな蛋白質をコード化する核酸を確認する工程及びこの分泌蛋白質コード化用核酸のセットから、癌細胞中で非癌細胞に比べて差別的発現を示す核酸を確認する工程を含む。この方法を分泌蛋白質に絞ることにより、ヒト又は他の哺乳類から得たサンプル中で検出可能なバイオマーカーを確認し、こうして哺乳類における癌の診断を容易化できる。好ましい実施態様では、バイオマーカーポリペプチドは、哺乳動物から容易に得られる血液、血清又はその他の生体サンプル中で検出できる。

20

【0018】

特に定義しない限り、ここで使用した技術的、科学的用語は全て、本発明に關与する当業者が普通に理解する意味と同じ意味を有する。以下の文献は、当業者に、本発明で使用した多くの用語についての一般的な定義を与える。Singleton等, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (第2編, 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker等, 1988); 及び Hale & Marham, THE HAPPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。ここに記載した方法及び材料に類似又は同等のいかなる方法及び材料も本発明の実施及びテストに使用できるが、好ましい方法及び材料について説明する。

30

【0019】

分泌蛋白質をコード化する核酸は、当業者に公知の方法を用いて確認できる。例えば分泌蛋白質は、例えばデータベースに存在するヌクレオチド又はアミノ酸配列と関連する注釈により確認できる。このような注釈配列の好適な供給源の一例は、Genome Ontology Consortium (<http://www.genomeontology.org>)により提供されるデータベースである。これにより、分泌を指示する細胞位置に見い出されるコード化用蛋白質として注釈された配列用のデータベースを探ることができる。

40

【0020】

或いは又は更に、注釈を用いて、分泌蛋白質と関連するポリヌクレオチドを確認し、ポリペプチドが分泌されるかどうかを測定するのに有用なコンピューターで実行したアルゴリズムの1つ以上を使用できる。例えばこのようなアルゴリズムは、アミノ酸配列が、例

50

例えば膜貫通領域を含むかどうかを測定できる。この分析に好適なアルゴリズムは、“Tmap”プログラムである(Person等、J Mol Biol, 237:182-192, 1994)。このプログラムは、インターネットの例えば<http://www.mbb.ki.se/tmap/>で入手できる。分泌ポリペプチドは、信号ペプチドを含むポリペプチド内、及び/又は信号ポリペプチドについての切断部位を認識するポリペプチド内のアミノ酸配列を確認するアルゴリズムを用いても確認できる。この種の分析を行うソフトウェアの例は、“Sigcleave”である(von Heijne等、Nucl. Acids Res., 14:4683-4690, 1986)。Sigcleaveは、任意のアミノ酸配列データにおいて、真正の信号ペプチド切断部位の可能性を評価する。Sigcleaveは、インターネットの例えば<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/sigcleave.html>で入手できる。 10

【0021】

細胞からの分泌を予測する蛋白質をコード化するポリヌクレオチドのセットは、次に、腫瘍細胞では非腫瘍細胞に比べて差別的な発現を示すポリヌクレオチドを確認するため、腫瘍細胞及び非腫瘍細胞中で発現分析を受ける。これらの差別的に発現した分泌ポリペプチドは、これらポリペプチドを過大発現する癌にバイオマーカーとして使用するのに好適である。

【0022】

検体及び病気の無い検体から得たサンプル中に分泌したポリペプチドをコード化する遺伝子の少なくとも1つの発現水準は、該遺伝子に相当するmRNAの水準、該遺伝子によりコード化した蛋白質又は該蛋白質の断片を測定することにより検出できる。本発明方法では、癌組織中に現われた遺伝子の1つの発現水準は、非癌組織中の遺伝子の発現水準とは、十分大きな量で異なる。この好ましい実施態様では、発現水準の差は、少なくとも約2倍であることが観察されている。幾つかの実施態様では、癌組織中の遺伝子の発現水準は、非癌組織に比べて、少なくとも約3、5、10又は100倍、又はそれ以上相違する。 20

【0023】

RNAは、例えばAusubel等、Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, pp. 4.1.1-4.2.9及び4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc. (1996)に記載されるような当業者に周知の方法でサンプルから単離できる。mRNAの発現水準の検出方法は、当該技術分野で周知であり、限定されるものではないが、ノーザンブロッティング法、逆転写PCR法、リアルタイム定量PCR法及びその他ハイブリダイゼーション法が挙げられる。複数の開示遺伝子から得られたmRNA転写の水準を検出する特に有用な方法は、オリゴヌクレオチドが規則的に整列したアレイに、標識したmRNAをハイブリダイズする方法である。このような方法は、複数の遺伝子の発現プロファイル又はパターンを発生させるため、複数の遺伝子の転写水準を同時に測定できる。検体サンプルから誘導された遺伝子発現プロファイルは、癌の無い検体サンプルから誘導された遺伝子発現プロファイルと比べて、癌検体サンプルの遺伝子が、病気の無い検体サンプルに比べて過大発現しているかどうかを測定し、これにより検体が癌性の病気(例えば前立腺癌又は結腸癌)を持つか或いは発展する危険があるかどうかを測定することができる。 40

【0024】

このハイブリダイゼーション法で利用されるオリゴヌクレオチドは、通常、固体支持体に結合している。固体支持体の例としては、限定されるものではないが、膜、フィルター、スライド、紙、ナイロン、ウエーハー、繊維、磁気又は非磁気ビーズ、ゲル、管、ポリマー、ポリ塩化ビニル皿等が挙げられる。オリゴヌクレオチドを結合できる固体表面は、いずれも直接又は間接的に、或いは共有的又は非共有的に使用できる。特に好ましい固体支持体は、高密度のアレイ又はDNAチップである(例えばAffymetrix Inc., Santa Clara, カナダのU95a GeneChip(商標))。これ 50

らの高密度アレイは、アレイ上の予め選択された位置に、特定のオリゴヌクレオチドプローブを有する。各予備選択位置は、特定プローブを1分子より多く含有できる。オリゴヌクレオチドは、支持体の特定位置にあるので、ハイブリダイゼーションのパターン及び強度（これらは一緒になって、独特の発現プロファイル又はパターンを生じる）は、特定遺伝子の発現水準として解釈できる。

【0025】

オリゴヌクレオチドプローブは、関連する前記確認された遺伝子の相補的転写にだけ特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを持つことが好ましい。ここで用いた用語“オリゴヌクレオチド”は、1本鎖の核酸を言う。オリゴヌクレオチドプローブの長さは、一般に少なくとも16~20ヌクレオチドであるが、幾つかの場合は、少なくとも20~25ヌクレオチドの長さのプローブが望ましい。

10

【0026】

オリゴヌクレオチドプローブは、ハイブリダイズしたプローブ/標的ポリヌクレオチド複合体を検出するため、1つ以上の標識性部分（labeling moiety）で標識できる。標識性部分は、分光学的、生化学的、光化学的、生体電子的、免疫化学的、電気光学的又は化学的手段により検出可能な組成物を含有できる。標識性部分の例としては、限定されるものではないが、放射性同位元素、例えば³²P、³³P、³⁵S、化学蛍光性化合物、標識付き結合性蛋白質、重金属原子、蛍光性のマーカー及び染料のような分光マーカー、結合酵素、質量分析タグ及び磁気標識が挙げられる。

【0027】

発現監視用のオリゴヌクレオチドプローブは、例えばLockhart等、Nature Biotechnology第14巻、pp. 1675-1680 (1996); McGall等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第93巻、pp. 13555-13460 (1996); 及びUSP No. 6,040,138に記載されるような、当業者に周知の技術に従って、製造し、使用できる。

20

【0028】

遺伝子によりコード化した蛋白質の発現又は該蛋白質断片の発現は、検出可能に標識付けするか、引き続き標識付けできるプローブにより検出できる。一般にプローブは、発現した蛋白質を認識する抗体である。幾つかの実施態様では、多数組織での蛋白質の発現は、組織マイクロアレイ（TMA）及び免疫組織化学により分析できる。組織マイクロアレイは、当該技術分野で日常的に行われる方法に従って建造できる。例えば多数の組織サンプルを含むマイクロアレイは、例えば亜鉛ホルマリン固定のパラフィン埋込み試験片を付けた（with）Tissue Microarrayer（Beecher Instruments, Silver Spring, MD）を用いて製造できる。各マイクロアレイは、1つの仲間（core）の各新生物を含有でき、分析の際、新生物の転写が輪郭的に描かれる（profile）。こうして、組織のマイクロアレイは、異なる癌の1組の組織ばかりでなく、複数の仲間の、選択された正常組織も含有できる（以下の実施例参照）。

30

【0029】

ここで用いた抗体と言う用語には、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化又は空想の抗体、及び生物学的機能の抗体断片（蛋白質又は該蛋白質の断片と十分、結合可能な抗体断片）が含まれる。

40

【0030】

TMAのIHC（免疫組織化学）分析に使用される抗体は、当該技術分野で周知で、日常的に行われる方法を用いて発生できる。本発明を行うのに採用される幾つかの抗体は、市販品、例えばモノクローナル抗MUC-2（BioGenex, San Ramon, CA）；モノクローナル抗マスピ（Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK）；及び兔ポリクローナル抗ニューロペプチドY（Research Diagnostics, Inc, Flanders NJ）としても入手できる。

50

【0031】

開示遺伝子の1つによりコード化された蛋白質又は該蛋白質の断片に対する抗体を製造するため、各種宿主動物は、ポリペプチド又はその一部を注射して、免疫化してもよい。このような宿主動物としては、限定されるものではなく、また少しであるが、兔、マウス及びラットが挙げられる。宿主種に応じて、免疫学的応答を向上するため、各種のアジュバントを使用してもよい。アジュバントとしては、限定されるものではないが、フロイント(完全又は不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムのような鉱物ゲル、リソレシチンのような界面活性物質、プルロン性(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳液、鍵穴笠貝(limpet)ヘモシアニン、ジニトロフェノール、及びBCG(bacille Calmette - Guerin)及びCorynebacterium parvumのような有用可能なヒトアジュバントが挙げられる。

【0032】

ポリクローナル抗体は、標的遺伝子生成物又はその抗原機能誘導体のような抗原で免疫化した海洋動物(the sea of animals)から誘導した抗体分子の不均質個体集団である。ポリクローナル抗体を製造するため、前述のような宿主動物は、前述のようなアジュバントを補充したコード化蛋白質又はその一部を注射して免疫化してよい。

【0033】

特定の抗原に対する抗体の均質個体集団であるモノクローナル抗体(mAb)は、培養時の連続細胞株により抗体分子を製造するいずれの方法でも得られる。これらの方法としては、限定されるものではないが、Kohler及びMilsteinのハイブリドーマ技術(Nature, 第256巻, pp. 495 - 497 (1975)、及びUSP No. 4, 376, 110)、ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術(Kosboret等, Immunology Today, 第4巻, p. 72 (1983): Cole等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第80巻, pp. 2026 - 2030 (1983))、及びEBV-ハイブリドーマ技術(Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96 (1985))が挙げられる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそれらの下位類のいずれかを含むいかなる免疫グロブリン類であってもよい。本発明のmAbを製造するハイブリドーマは、試験管内でも生体内でも培養してよい。生体内でのmAbの高タイター製造は、現在、好ましい製造法である。

【0034】

更に、適当な抗体特異性のマウス抗体分子の遺伝子を、適当な生物活性のヒト抗体分子の遺伝子と一緒にスライスすることによる“キメラ抗体”の製造について発展した技術(Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第81巻, pp. 6851 - 6855 (1984); Neuberger等, Nature, 第312巻, pp. 604 - 608 (1984); Takeda等, Nature, 第314巻, pp. 452 - 454 (1985))が使用できる。キメラ抗体は、ネズミ科のmAb及びヒトの免疫グロブリンの定常領域から誘導された可変又は超可変領域を有する分子のように、異なる動物の種から異なる部分が誘導される分子である。

【0035】

或いは、一本鎖抗体の製造について記載された技術(USP No. 4, 946, 778; Bird, Science, 第242巻, pp. 423 - 426 (1988); Huston等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第85巻, pp. 5879 - 5883 (1988); 及びWard等, Nature, Vol. 334, pp. 544 - 546 (1989))は、差別的に発現された遺伝子-一本鎖抗体を製造するのに適応できる。一本鎖抗体は、Fv領域の重い鎖断片と軽い鎖断片とをアミノ酸ブリッジで結合することにより形成され、一本鎖蛋白質を生成する。

【0036】

最も好ましくは、“ヒト化抗体”の製造に有用な技術は、その蛋白質、断片又は誘導体に対する抗体を製造するのに適応できる。このような技術は、USP No. 5, 932, 448、同5, 693, 762、同5, 693, 761、同5, 585, 089、同5, 530, 101、同5, 569, 825、同5, 625, 126、同5, 633, 425、同5, 789, 650、同5, 661, 016、同5, 770, 429に開示されている。

【0037】

特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知の技術で発生できる。例えばこのような断片としては、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により製造できるF(ab')₂断片、及びF(ab')₂断片のジスルフィドブリッジを還元することにより発生できるFab断片が挙げられる。或いは、モノクローナルFab断片を所望の特異性により迅速、かつ容易に確認するため、Fab発現ライブラリーを組み立ててもよい(Huse等、Science, 第246巻, pp. 1275-1281(1989))。

10

【0038】

次に、前述の抗体を利用する免疫アッセイ法により、サンプル中の既知蛋白質の発現の程度を測定する。このような免疫アッセイ法としては、限定されるものではないが、ドットブロッキング、ウエスタンブロッキング、競争的及び非競争的蛋白質結合アッセイ、酵素結合免疫吸着(sorbant)アッセイ(ELISA)、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分類(FACS)、その他、科学及び特許文献に一般的に広く記載されている方法及び商業的に多数採用されている方法が挙げられる。

20

【0039】

特に好ましい方法は、検出が容易な点から、サンドイッチ式ELISAで、この方法には多数の変形が存在し、本発明は、これら変形の全てを包含することを意図する。例えば通常の前(forward)アッセイでは、非標識抗体は、固体基質上に固定され、テストサンプルは、この結合した分子と接触し、抗体-抗原の二成分系複合体を形成するのに十分な時間、温置される。次に、この点で、検出可能な信号を誘引できるレポーター分子で標識した第二抗体を加えて、抗体-抗原-標識抗体の三成分系複合体を形成するのに十分な時間、温置される。未反応の材料は、全て洗浄、除去する。抗原の存在は、信号の観察により測定されるが、既知量の抗原を含有する対照サンプルと比較して、定量してもよい。前アッセイの変形としては、サンプル及び抗体の両方を結合抗体に同時に加える同時アッセイ、又は標識抗体とテストサンプルとをまず結合し(combine)、温置して、非標識表面結合の抗体に加える逆アッセイが挙げられる。これらの技術は、当業者に周知で、小さい変形の可能性は、容易に明らかとなる。ここで用いた“サンドイッチアッセイ”は、この基本的な2サイト技術に関するあらゆる変形を包含することを意図する。本発明の免疫アッセイについての限定的ファクターは、標識抗体が、関心のある遺伝子により発現された蛋白質に特異的な抗体であるということだけである。

30

【0040】

この種のアッセイで最も普通に使用されているレポーター分子は、酵素、発蛍光団 - 又は放射性核種 - 含有分子である。酵素免疫アッセイの場合、酵素は、通常、グルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸塩により第二抗体に接合される。しかし、容易に認識されるように、当業者に周知の広範な異なる結さつ技術が存在する。普通に使用される酵素としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ及びその他の中でもアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。これら特定の酵素と併用される基質は、一般に、対応する酵素により加水分解して、検出可能な色調変化を生じるように選択される。例えばp-ニトロフェニルホスフェートは、アルカリ性ホスファターゼ複合体(conjugate)との併用に適し、またペルオキシダーゼ複合体には、普通、1,2-フェニレンジアミン又はトルイジンが使用される。前記色素原基質よりもむしろ、蛍光生成物を生じる発蛍光団基質を採用することも可能である。次に、適当な基質を含む溶液を第三複合体に加える。基質は、第二抗体に結合した酵素と反応し、定性的可視信号を与えるが、この信号は更に通常、分光測光法で定量して、分泌(secreted)蛋

40

50

白質又はその断片の量、例えば血清サンプル中に存在する P L A B 又はヘプシンの触媒領域を求めることができる。

【 0 0 4 1 】

或いはフルオレッセンやローダミンのような蛍光化合物は、これらの結合能力を変えることなく、化学的に抗体に結合できる。特定波長の光の照射により活性化すると、蛍光色素標識の抗体は、光エネルギーを吸収して、分子に励起可能な状態を誘引し、次いで特有の長波長で発光する。この発光は、顕微鏡で可視的に検出可能な特有の色として現われる。免疫蛍光技術も E I A 技術も当該技術分野では非常によく確立され、本方法には特に好ましい。しかし、放射性同位元素、化学発光又は生物発光分子のような他のレポーター分子も採用してよい。所要の用途に合うように手法をどのように変えるかは、当業者には容易に明らかとなる。

10

【 0 0 4 2 】

他の面では本発明は、各種形態の癌又はこれら癌のいずれかに発展する体質を診断する方法を提供する。この方法は、本発明に従って確認された所定の癌に対し、差別的に発現した少なくとも1つ（例えば1、2、3、4、5又はそれ以上）の癌特異的バイオマーカーを検出する工程を含む（例えば第1表参照）。通常、診断テストは、検体（例えば哺乳動物）中の少なくとも1つのバイオマーカー（例えば M I C - 1 ）の測定水準を、癌に罹っていない非罹患検体の対照集団について測定した基線水準と比較することにより機能する。幾つかの癌では、バイオマーカーの異常発現は、特定種類の組織（例えば乳癌については、乳房組織）に限定される。このような場合、比較用バイオマーカーの基線水準は、癌が存在しない対照組織でのバイオマーカーの発現水準であってもよい。

20

【 0 0 4 3 】

測定水準が、対照集団（又は対照組織）の基線水準と有意に相違していなければ、診断テストの結果は、マイナスとみなされる。これに対し、検体の測定水準と非罹患検体の基線水準（又は対照組織）との間に有意な隔たり（*d e p a r t u r e*）があれば、診断テストの結果はプラスであることを示し、検体は、バイオマーカーの異常な存在又は異常な水準を有するものとみなされる。一般に、この隔たりは、これらバイオマーカーの発現水準の増加である。しかし、特定の癌の幾つかのバイオマーカーについての異常は、低い発現水準であってもよい。

【 0 0 4 4 】

前述のように、好ましい実施態様では、発現水準において少なくとも2倍の差が観察されれば、基線水準からの隔たりは、統計的に有意である。しかし、特定の場（癌及びバイオマーカー）によっては、検体と実験誤差間の固有の変化のため、測定値が、非罹患検体で通常、観察される範囲外になれば、発現水準の2倍差未満の隔たりは、なお有意であるとみなし得る。例えば幾つかの方法では、測定水準が、対照集団での水準の平均 + 1 標準偏差以内であれば、隔たりは、有意とみなし得る。したがって、測定水準と基線水準との差が、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%であれば、有意の隔たりは起こるかも知れない。測定値と対照集団の基線値との隔たりの程度は、診断についてのほぼ確実な精度及び/又は検体が受けている病気の厳しさの指示薬ともなる。

30

40

【 0 0 4 5 】

癌の診断方法は、各バイオマーカーの発現水準を測定し、比較する工程の他、検体から所定の癌に対するバイオマーカーの発現プロファイルを得る工程、及びこの遺伝子発現を、癌を持つことが判っている検体の少なくとも1つの発現プロファイルと比較する工程を伴い得る。この発現プロファイルは、その癌用の少なくとも1つの（例えば1、2、3、4、5又はそれ以上）バイオマーカーの発現水準（例えば血清中で）を含有できる。発現プロファイルを得る方法及び病气診断にこれらプロファイルを使用する方法は、当該技術分野で周知である。例えば本発明方法は、例えば U S P N 6,365,352 又は W O 0111082 に記載されるように、本発明者らが確認した特定のバイオマーカーを用いて実施できる。

50

【0046】

この診断法では、分泌癌バイオマーカーの水準を測定するための好ましい生体サンプルは、血清である。血液からの他の組織サンプル、例えば全血液及びプラズマも、検体及び対照集団での分泌バイオマーカーの水準測定に使用できる。

【0047】

血液関連生体サンプル以外の他のサンプルも癌バイオマーカーの発現水準の測定に使用してよい。これらサンプルとしては、例えば器官、組織又は細胞や、尿、その他の体液から得られるサンプルが挙げられる。サンプルは、皮膚、毛、尿、唾液、精液、大便、汗、乳、羊水、肝臓、心臓、筋肉、腎臓、その他の器官から得られる組織生検であってよい。組織サンプルは、通常、サンプル内細胞の蛋白質及び/又は核酸分を遊離させるため、溶解する。このような粗溶解物からの蛋白質又は核酸断片は、次に分析前に部分的又は完全に精製する。

10

【0048】

下記第1表に、癌の診断に好適な分泌バイオマーカーの例を示す。例えば前立腺癌の存在又はその発展体質を診断する幾つかの方法は、リラキシン-1、MIC-1又はニューロペプチドYの差別的発現水準を検出する工程を含む。同様に、差別的に発現したMUC-2も、結腸癌の診断が可能である。特定組織の癌を診断する他、本発明の幾つかの方法は、数種の組織における癌の診断に向けたものである。例えばマプシン(mapsin)又はMUC-1の差別的発現水準の検出は、前立腺、結腸又はその他の組織(実施例参照)中の癌の存在又は癌の発展体質を指示できる。これらの方法は、更に、癌を検出し、診断する従来手法により、検体を検査する工程を含んでよい。このような手法、例えばCAT走査、MRI及び超音波検査は、当該技術分野で周知であり、日常的に行われている。その他の各種形態の癌の診断手法は、当該技術分野で例えば<http://www.bccancer.bc.ca/PPITypesofCancer/CancerinGeneral/DianosingCancer>に記載されている。

20

【0049】

本発明方法は、各種形態の癌の存在又は癌の発展体質を診断するため、検体の集団を大規模選別するのに好適である。これらの方法は、検体中に存在する可能性がある他の疾患についての更なる生物学及び/又は遺伝子学マーカーと共同で任意に採用できる。

【0050】

本発明の一面では、本発明方法を用いて確認された少なくとも1つのマーカーの発現水準を検出するためのキットが提供される。例えばキットは、バイオマーカーの少なくとも1つによりコード化した蛋白質又は相当するmRNAを検出できる標識した化合物又は試剤；該蛋白質の遺伝子又は断片により、又はこれらに相当するmRNAにより、コード化した蛋白質の量を検出する手段；及び検体サンプルから得られた、該蛋白質の遺伝子又は断片により、又はこれらに相当するmRNAにより、コード化した蛋白質の量を、例えば癌のない検体からの、遺伝子の基準発現水準と比較する手段；を備えることができる。標識化合物又は試剤は、適当な容器に包装できる。キットは、更に、蛋白質の遺伝子により、又はこれらに相当するmRNAにより、コード化した蛋白質を検出するために、キットを使用する指示書を備えることができる。

30

40

【0051】

本発明は、既に癌であると診断した検体、特に治療に対する応答を監視するのに適した方法を提供する。他の一面では、検体中の癌の進行は、経時、即ち、癌の各種段階において、検体から得られた体液サンプル又はその他の組織サンプル中で、本発明方法に従って確認されたバイオマーカーの発現水準を測定することにより監視できる。経時により、遺伝子に相当するmRNA又はコード化した蛋白質の発現水準の増加は、疾病(例えば前立腺癌又は結腸癌)の進行を示す。遺伝子に相当するmRNA又は蛋白質の発現水準は、前述のような標準的方法で検出できる。

実施例

以下の実施例は説明のため、本発明を制限するものではない。

50

【実施例 1】

【0052】

実施例 1：分泌蛋白質をコード化する遺伝子の確認

本実施例は、癌用バイオマーカーを確認するため、本発明の一使用例を説明する。一連の 45 の正常組織サンプル及び 150 の悪性組織サンプルについて、~12,500 転写の発現を調べた。悪性組織サンプルは、前立腺、乳房、肺、卵巣、結腸直腸、腎臓、肝臓、膵臓、ボウコウ/尿道及び胃腸/食道の癌を有する。データベース注釈と予測アミノ酸配列分析との組み合わせにより、主として分泌蛋白質をコード化する 576 の遺伝子の部分集合が確認され、そのうち、32 は、癌特異的過大発現を示した。確認した遺伝子のうち、幾つかは、それぞれ、乳癌中のマンマグロビン、及び卵巣癌中のカリクレイン 6 及び 10 のような既知又は候補の診断蛋白質をコード化する。従って、我々は、更に組織マイクロアレイについての免疫組織化学により、又は腫瘍細胞状態調節した媒体のウエスタンブロット分析により、幾つかの場合には高水準のコード化蛋白質を証拠した。現在の研究は、腫瘍バイオマーカー候補の体系的発見のため、転写プロファイリングと、注釈/蛋白質配列分析と、免疫アッセイとの結合力を示し、検出すれば、癌診断の感度を改良できる幾つかの蛋白質を強調する。

10

【0053】

図 1 に示すように、2つの異なる接近方法により、分泌蛋白質をコード化する遺伝子候補に対しオリゴペプチドプローブセットをろ過した。図 1A に示すように、プローブセットは、遺伝子腫瘍学 (GO) 協会 (Gene Oncology Consortium) 注釈 (www.genomeontology.org) にマップされ、蛋白質分泌を示唆する“場所”注釈を持つものが確認された (1,160)。図 1B に示すように、2つの配列に基づくアルゴリズム：“Tmap” (Persson 等, *J Mol Biol*, 237:182-192, 1994) 及び “Sigcleave” (von Heijne 等, *Nucl. Acids Res.*, 14:4638-4690, 1986) を用いて、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ上に表示された遺伝子の蛋白質配列を調べた。Sigcleave は、任意のアミノ酸配列データにおける本物の信号ペプチド切断部位の可能性を推定し、Tmap は、蛋白質における膜貫通領域を予測する。一連の 1,724 のプローブセット (“遺伝子”) は、両配列アルゴリズムにより課された基準に適合する。

20

30

【0054】

分泌蛋白質をコード化しそうな Affymetrix U95a GeneChip アレイ上の遺伝子に対し選択するため、2つの接近方法を用いた (図 1)。まず、各遺伝子と関連する注釈がコード化蛋白質の細胞外間隙への分泌を意味するかどうか尋ねた。詳しくは、Affymetrix U95a GeneChip から NCBI's Locus Link データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>) 経由で GO 団体により提供された注釈までプローブセットをマップした。前記データベースは、蛋白質の分子機能、生物学的プロセス、及び細胞成分に関する制御された語彙を提供する。これら用語の中の 30 の用語に絞ることにより、U95a GeneChip 上の遺伝子と関連する注釈のうち、1,160 の遺伝子が確認された。これら 30 の用語は、血液凝固、血液凝固因子、細胞-細胞信号送り (signaling)、細胞連絡、補体活性化、補体成分、利尿ホルモン、エフリン、細胞外、細胞外マトリックス、細胞外マトリックスグリコ蛋白質、細胞外マトリックス構造蛋白質、細胞外間隙、ホルモン、インスリン様成長因子受容体配位子、インターロイキン 12 受容体配位子、インターロイキン 2 受容体配位子、インターロイキン 4 受容体配位子、インターロイキン 5 受容体配位子、インターロイキン 6 受容体配位子、インターロイキン 7 受容体配位子、インターロイキン 8 受容体配位子、白血病阻害剤因子、レポーター配位子、配位子、ニューロペプチドホルモン、オプソニン、蛋白質分泌、分泌ホスホリパーゼ A2、組織カリクレイン、血管内皮成長因子受容体配位子である。

40

【0055】

50

蛋白質配列を特徴とする遺伝子を目的とした並行接近方法は、信号ペプチド切断部位の存在と同時に、膜貫通領域の不存在も暗示し、こうして膜を通過して分泌した蛋白質生成物を示唆した。TMAP及びSIGLEAVEプログラム用の保存的しきい値 (conservative threshold) (例えばPersson等、J Protein Chem 16, 453-7, 1997; Milpetz等、Trends Biochem Sci 20, 204-5, 1995; von Heijne等、Nucleic Acids Res, 14, 4683-90, 1986参照)をこれらの分析に用いた。この方法により、1,724の遺伝子1セットが潜在的に細胞外蛋白質をコード化していることが確認された(図1)。

同時に、これら2つの方法で2,308の遺伝子の部分集合を確認した。そのうちの576は、両方法を用いて得られた。 10

【実施例2】

【0056】

実施例2：腫瘍での候補遺伝子の発現

本実施例は、各種解剖学源の腫瘍に分泌した蛋白質をコード化する遺伝子候補の過大発現について説明する。これら2,308の遺伝子の発現を、10の異なる解剖学源、相当する解剖部位での46の正常組織、及び我々の“腫瘍/正常”コレクションには示さなかった9のその他の解剖学部位を示す一連の150の癌で検査した(図2)。探した遺伝子は、起点(origin)の一つ以上の部位の腫瘍で発現が高く、従って他の正常体組織では発現が低いか存在しなかった遺伝子である。 20

【0057】

2,308のプローブセットのうち、83(3.6%)が、第1表に示すように、これらの基準に適合し、77の異なる遺伝子を表示する。注釈及び配列の両方に基づく分析により確認された32のプローブセット(30の異種遺伝子)(第1表、図2A参照)では、殆ど全ては分泌蛋白質をコード化し、3/30遺伝子だけ(RET共同受容体、GFRA-1、腫瘍壊死因子スーパーファミリーの中のメンバー9であるTNFR9、及びサイトカイン受容体様因子1であるCRLF-1)は、このような蛋白質をコード化しそうもない。注釈単独で確認された16のプローブセット(15の異なる遺伝子)では、11/15が分泌することが見い出された。しかし、アミノ酸配列単独内の特徴により選択された9/29の独特の遺伝子だけは、分泌の証拠を持っていた。これら遺伝子の大部分は、GPI固定又は集積膜蛋白質であることが見い出された。 30

【0058】

或る研究では、分泌蛋白質をコード化するmRNAに相当するとして、これらのアルゴリズムを用いて確認したヌクレオチド配列に相当するmRNAを、各種癌及び非癌サンプルの発現について分析した。図2A、2Bに示すように、少なくとも1つの腫瘍-正常対応物組織対での有意の過大発現(>3倍)、及びその他のいずれかの正常組織と比べた、腫瘍での有意の過大発現(>2倍)により、分泌蛋白質をコード化する32の遺伝子を確認した。

【0059】

分泌蛋白質に対する転写の前立腺癌特異的高発現を示す結果を確かめるため、RT-PCR分析を行った。これらの結果から、確認遺伝子は、実際に前立腺癌細胞において非癌細胞に比べて過大発現することが確かめられた。これらの結果を更に確かめるため、バイオマーカー蛋白質候補に特異的な抗体を用いて、前立腺に生じるものを含む、36の上皮組織及び229の癌を有する組織マイクロアレイ(TMA)を汚染する免疫アッセイを行った。 40

【実施例3】

【0060】

実施例3：腫瘍サンプル中の遺伝子候補の証拠

前記接近方法の証拠は、まず、ここで確認した遺伝子の多くは、癌組織中で予め調節障害がある(例えば転写に基づく他の接近方法又はIHCによる)か、或いは相手の対照に 50

比べて癌患者の血清に高まりがあるという観察に由来する。後者には、肺癌でのガストリン放出性ペプチド (GPR / ボンベシン (bombesin)) (Heasley, Oncogene 20, 1563-9, 2001)、卵巣癌でのカリクレイン6及び10 (KLLK6、KLLK10) (Diamandis等, Clin Biochem 33, 579-83, 2000)及びLuo等, Clin Chim Acta 306, 111-8, 2001)、肝臓癌での - フェト蛋白質 (AFP) (Johnson等, Clin Liver Dis 5, 145-59, 2001)、及び乳癌でのマンマグロブリンA (MGBA) (Fleming等, Ann NY Acad Sci 923, 78-79, 2000)がある。

【0061】

10

【表1】

第1表：癌中に過大発現した分泌蛋白質候補をコード化する遺伝子

遺伝子名	Ref seq	組織	癌	TCN	TCN
軟骨結合性蛋白質 1	NM_001884	GO と TMSC	乳房, ER-	7.0	2.9
GDNF 科受容体 α1	NM_005264	GO と TMSC	乳房, ER+	9.3	9.0
リポフィリン B	NM_006351	GO と TMSC	乳房, ER+	47.5	89.7
小腸引性サイトカイン亜科 B10	NM_001565	GO と TMSC	乳房, ER+	10.3	6.9
小腸引性サイトカイン亜科 B11	NM_005409	GO と TMSC	乳房, ER+	8.1	3.7
コラーゲン, XI 型, α1	NM_001854	GO と TMSC	乳房, ER+	57.3	2.7
腫瘍壊死因子 (配位子) 上科 9	NM_003811	GO と TMSC	腎臓	3.6	3.6
アンジオポエチン 2	NM_001147	GO と TMSC	腎臓	15.3	13.3
インスリン様成長因子 2 (ソマトメジン A) NM_000612	NM_000612	GO と TMSC	腎臓	50.9	8.3
TNF-α 誘因蛋白質 6	NM_007115	GO と TMSC	腎臓	10.3	4.5
アドレノメジュリン	NM_001124	GO と TMSC	腎臓	3.4	3.4
インスリン様成長因子結合性蛋白質 3	NM_000598	GO と TMSC	腎臓	6.5	2.7
インスリン様成長因子結合性蛋白質 5	NM_000599	GO と TMSC	腎臓	4.1	2.5
アンジオポエチン 2	NM_001147	GO と TMSC	腎臓	3.5	2.5
リシロキシダーゼ	NM_002317	GO と TMSC	腎臓	3.0	2.4
ニューロテンシン	NM_006183	GO と TMSC	肝臓	96.3	9.0
サイトカイン受容体因子 1	NM_004750	GO と TMSC	肺, AdCa	16.2	8.5
ガストリン放出性ペプチド	NM_002091	GO と TMSC	肺, 他	16.5	10.4
アルギニンバソプレッシン	NM_000490	GO と TMSC	肺, 他	4.5	5.3
ペンタキシン関連遺伝子	NM_002852	GO と TMSC	肺, 他	15.1	4.2
小腸引性サイトカイン亜科 A20	NM_004091	GO と TMSC	肺, 他	5.6	3.0
マトリックス金属プロテアーゼ 10	NM_002425	GO と TMSC	肺, SCC	15.1	18.0
マトリックス金属プロテアーゼ 13	NM_002427	GO と TMSC	肺, SCC	7.4	7.4
マトリックス金属プロテアーゼ 1	NM_002421	GO と TMSC	肺, SCC	24.0	5.9
ヘパリン結合性成長因子結合性	NM_005130	GO と TMSC	肺, SCC	24.5	2.7
マトリックス金属プロテアーゼ 12	NM_002426	GO と TMSC	肺, SCC	32.2	2.1
ニューロメジン U	NM_006681	GO と TMSC	卵巣	12.1	5.3
カリクレイン 10	NM_002776	GO と TMSC	卵巣	5.1	2.4

20

30

【0062】

【表 2】

第 1 表 (表 1 の続)

インスリン様成長因子 2 (ゾマトメジン A)	NM_000612	GO と TMSC	卵巣	28.5	3.2
リラキシン(H1)	NM_006911	GO と TMSC	前立腺	4.6	7.8
ニューロペプチド Y	NM_000905	GO と TMSC	前立腺	4.7	5.2
MIC-1	NM_004864	GO と TMSC	前立腺	6.7	3.5
ムチン 2, 腸管/気管	NM_002457	GO のみ	膵臓	8.8	5.3
インターロイキン 18	NM_001562	GO のみ	胃腸	3.8	2.6
インディアンハリネズミホモログ (ショウジョウバエ)	none	GO のみ	胃腸	4.7	2.4
脂肪質分化関連蛋白質	NM_001122	GO のみ	腎臓	9.6	2.6
血管内皮成長因子受容体	NM_002019	GO のみ	腎臓	3.8	2.4
αフェトプロテイン	NM_001134	GO のみ	肝臓	7.6	7.6
ヒポクレチン(オレキシン)受容体 1	NM_001525	GO のみ	肝臓	5.4	5.4
インターロイキン 1, β	NM_000576	GO のみ	肺、他	33.5	33.5
ニューロチンシン受容体 1(高親和性)	NM_002531	GO のみ	肺、他	10.3	10.3
プラスミノーゲンアクチベーター 阻害剤 1 型	NM_000602	GO のみ	肺、他	43.4	5.4
エフリン-B 2	NM_004093	GO のみ	肺、他	3.5	2.8
インターロイキン 1, β	NM_000576	GO のみ	肺、他	3.1	2.2
エビレグリン	NM_001432	GO のみ	肺、他	4.2	2.1
ガクタチン 7	NM_002307	GO のみ	肺, SCC	39.7	34.6
ブラコフィリン 1	NM_000299	GO のみ	肺、SCC	7.9	7.9
WNT7A	NM_004625	GO のみ	卵巣	6.2	6.2
E2F 転写因子 3	NM_001949	TMSC のみ	乳房, ER-	10.8	6.6
FLJ20244	Hs.351792	TMSC のみ	乳房, ER-	3.7	3.7
炭水化物スルホトランスフェラーゼ 2	NM_004267	TMSC のみ	乳房, ER-	7.9	2.0
セリンヒドロラーゼ様	NM_014509	TMSC のみ	乳房	17.5	17.5
FLJ13927	Hs.343963	TMSC のみ	乳房	6.6	11.6
マンマグロブリン A	NM_002411	TMSC のみ	乳房	9.0	8.9
チトクロム C オキシダーゼ 寄託 Viic	NM_004374	TMSC のみ	乳房	3.5	2.9
マンマグロブリン B	NM_002407	TMSC のみ	乳房	14.2	2.6

10

20

【 0 0 6 3 】

【表 3】

第 1 表 (表 2 の続)

ディフェンシン, α 6, Paneth 細胞特異的	NM_001926	TMSC のみ	胃腸	20.5	5.7
プロリン 4-ヒドロキシラーゼ	NM_000918	TMSC のみ	胃腸	4.3	4.3
ディフェンシン, α 5, Paneth 細胞特異的	NM_021010	TMSC のみ	胃腸	3.8	3.9
内皮細胞特異的分子 1	NM_007036	TMSC のみ	腎臓	6.6	6.5
セレブロシドスルホトランスフェラーゼ	NM_004861	TMSC のみ	腎臓	9.9	6.3
パニン 1	NM_004666	TMSC のみ	腎臓	4.9	4.9
TNF-γ 上科, メンバー 17	NM_001192	TMSC のみ	肝臓	4.2	3.1
骨形成蛋白質 6	NM_001718	TMSC のみ	肺, AdCa	3.1	3.1
Zic 科メンバー-3 内臓遊走 1	NM_003413	TMSC のみ	肺、他	6.5	6.5
achaete-scute 複合体様 1 (ショウジョウバエ)	NM_004316	TMSC のみ	肺、他	55.2	5.7
achaete-scute 複合体様 1 (ショウジョウバエ)	NM_004316	TMSC のみ	肺、他	28.9	5.1
オバルブミン	NM_002640	TMSC のみ	肺、他	4.6	4.6
TSS 候補 3	NM_003311	TMSC のみ	肺、他	10.8	4.3
TSS 候補 3	NM_003311	TMSC のみ	肺、他	7.1	2.4
転写因子 A, ミトコンドリア	NM_003201	TMSC のみ	肺、他	3.4	2.1
リンパ球抗原 6 複合体, 座位 D	NM_003695	TMSC のみ	肺, SCC	50.7	14.5
オバルブミン	NM_002639	TMSC のみ	肺, SCC	68.1	5.5
オバルブミン	NM_002639	TMSC のみ	肺, SCC	29.3	3.4
GPI-固定転移蛋白質	NM_014400	TMSC のみ	肺、SCC	5.0	2.5
メラノーマ抗原, 科 A.5	NM_021049	TMSC のみ	肺、SCC	4.8	2.2
カリクレイン 6(ニューロシン, 酵素)	NM_002774	TMSC のみ	卵巣	15.2	2.1
メンテリン	NM_005823	TMSC のみ	卵巣	23.0	2.1
膵臓蛋白質様(ラット)	NM_006508	TMSC のみ	膵臓	3.3	13.3
前立腺特異的膜抗原	NM_004476	TMSC のみ	前立腺	3.9	4.9
前立腺特異的膜抗原	Hs.283946	TMSC のみ	前立腺	4.2	4.2
前立腺特異的膜抗原	NM_004476	TMSC のみ	前立腺	3.9	3.6
一心ホモログ 2(ショウジョウバエ)	NM_005069	TMSC のみ	前立腺	10.6	2.7

30

40

【 0 0 6 4 】

表注：

T / C N = 腫瘍組織と相当する正常組織との発現比

T / O t h e r N = 腫瘍組織と“他の”正常組織との発現比

証拠 = 遺伝子が、GO 注釈及び配列分析 (GO と TMSC)、GO 注釈のみ (GO のみ)

50

又は配列分析のみ (T M S C のみ) により確認されたかどうか。

乳房, E R + = エストロゲン受容体陽性乳癌

乳房, E R - = エストロゲン受容体陰性乳癌

乳房, E R + / - = E R 状態が決められない乳癌

肺, A d C a = 肺腺癌 (a d e o c a r c i n o m a)

肺, S C C = 肺扁平上皮癌

肺, 他 = 扁平上皮癌又は腺癌以外の組織を持った肺癌

【 0 0 6 5 】

更に、この接近方法で発見した他の遺伝子の多くについて、幾つかの独立した方法を用いて腫瘍の過大発現が確認された。例えば前立腺癌 (図 2 B の強調部分) では、リラキシン - 1 (R L N 1) の高度な組織選択性発現である、分娩管を改造する際に含まれるインスリン科の小ペプチドホルモン (B a n i , G e n P h a r m a c o l 2 8 , 1 3 - 2 2 , 1 9 7 7) が、半定量的 R T - P C R により、9 の前立腺組織及び 1 9 の非前立腺組織中に確認された。P C R により測定された R L N - 1 の発現水準は、マイクロアレイハイブリダイゼーションで得られた結果 (図 3 A) と完全に一致した。これらの結果から、確認遺伝子は、前立腺癌組織では、非癌細胞に比べて、実際に過大発現したことが確認された。

10

【 0 0 6 6 】

正常前立腺組織に比べて、1 5 / 2 5 の前立腺癌で高度に発現したニューロペプチド Y (N P Y) については、各種解剖源の 2 2 9 の癌及び 3 6 の正常組織サンプルを含む組織マイクロアレイを市販の抗 - N P Y 抗体で汚染した。正常細胞組織では、神経及び少数の前立腺分泌上皮細胞に汚染が見られ、一方、高い N P Y 遺伝子発現を持つ前立腺癌では、これに応じて高水準の蛋白質発現が見られた (図 3 B) 。抗 N P Y 抗体は、T M A 上の他の解剖部位の癌、或いはこれらのアレイ上に含まれる他の非神経又は非神経性内分泌の正常組織を汚染しなかった。

20

【 0 0 6 7 】

その他の癌部位でも、他の蛋白質候補に対して向けた抗体を用いて、同様に一定の結果が得られた。転写分析から予測されるように、M U C - 2 に特異的な抗体は、結腸癌中で選択的な発現を示し、一方、マスピン (m a s p i n) に特異的な抗体は、結腸、食道、肺及び膵臓の癌中で正常組織部位に比べて高い発現を示した (図 4 A ~ 4 C) 。幾つかの乳管癌中では、正常乳管組織に比べて低いマスピン発現が見られた。これは、乳癌中の腫瘍サプレッサーとして意図した役割と一致する (S a g e r 等、A d v E x p M e d B i o l 4 2 5 , 7 7 - 8 8 , 1 9 9 7) 。しかし、有意に高い水準のマスピン蛋白質を有する乳癌の例も観察された (図 5 A 、 5 B) 小シリーズの乳房腫瘍では、マスピン発現は、腫瘍のエストロゲン受容体状態と相関することが見いだされた。これは、E R 陰性癌でのマスピン遺伝子過大発現についての最近の報告と一致する (M a r t i n 等、C a n c e r R e s 6 0 , 2 2 3 2 - 8 , 2 0 0 0) 。

30

【 実施例 4 】

【 0 0 6 8 】

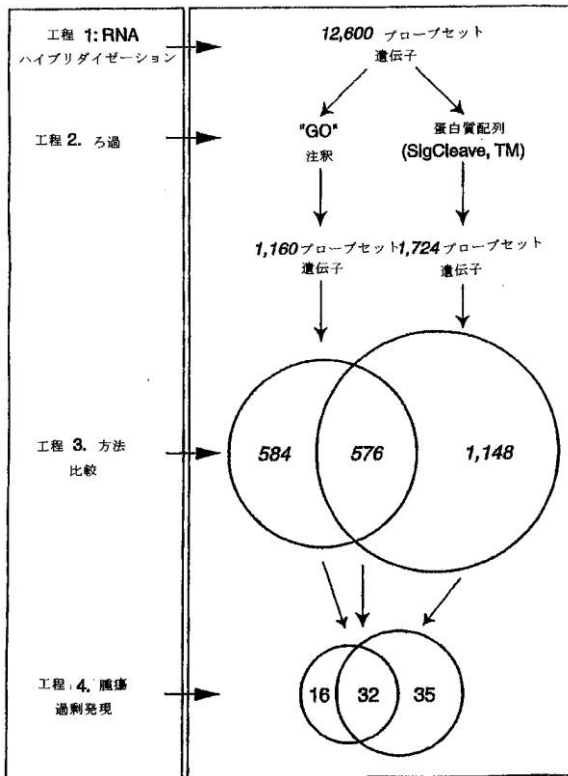
実施例 4 : 独立のデータセットでの遺伝子候補の過大発現

40

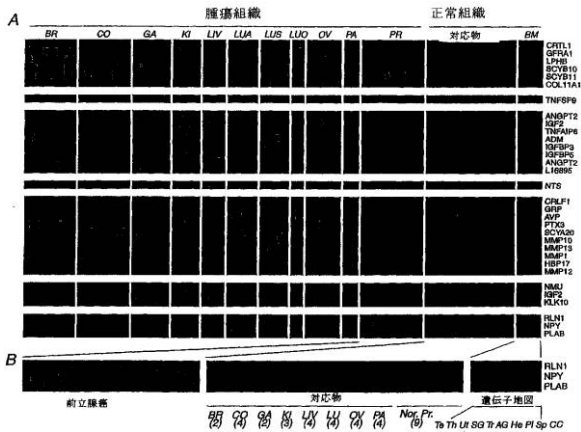
本例は、他の独立のデータセットでの遺伝子候補の過大発現を説明する。例えば B h a t t a c h a r j e e 等 (P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 8 , 1 3 7 9 0 - 5 , 1 9 9 1) の公的にアクセス可能なデータにより、1 7 の正常肺サンプル、1 2 7 の腺癌、2 1 の扁平上皮癌、2 0 の肺カルチノイド及び 6 の小細胞未分化癌を含む 2 0 3 の肺組織中で本発明の肺癌遺伝子候補について発現の分析が可能となった。この分析は、遺伝子発現と組織学サブタイプとの幾つかの顕著な相関関係を示した。例えば G R P / ボンベシンは、主として小細胞肺癌及びカルチノイドにおいて過大発現し、刊行された報告 (S u n d a y 等、P a t h o l 2 2 , 1 0 3 0 - 9 , 1 9 9 1) と一致し、腺癌では僅かに 2 / 1 2 7 であった。これに対し、マプシンは、扁平上皮癌の殆ど全てで発現したが、腺癌では少数で、またカルチノイドでは全く発現しなかった。これら結果の特

50

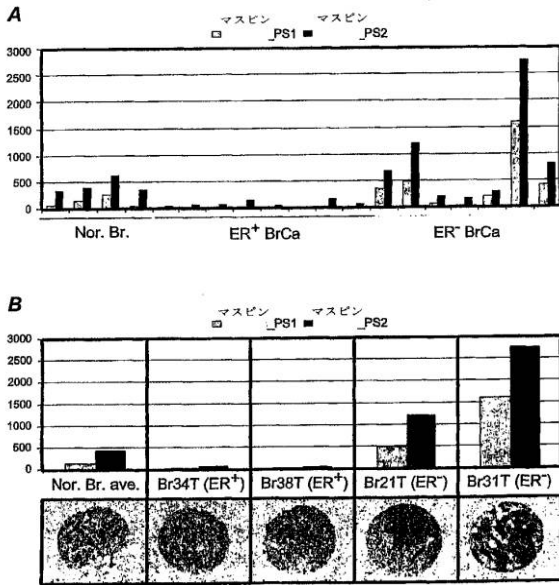
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/13709										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/48; G06F 19/00 US CL : 435/6; 702/19, 20 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6; 702/19, 20 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	JENSSSEN et al. A literature network of human genes for high-throughput analysis of gene expression. Nature Genetics. May 2001, Volume 28, pages 21-28, see entire document.	1-17										
Y	POULIOT et al. DIAN: A novel algorithm for genome ontological classification. Genome Research. 2001, Volume 11, pages 1766-1779, see entire document.	1-17										
Y	MASYS et al. Use of keyword hierarchies to interpret gene expression patterns. Bioinformatics. 2001, Volume 17, No. 4, pages 319-326, see entire document.	1-17										
Y	MASYS. Linking microarray data to the literature. Nature Genetics. May 2001, Volume 28, pages 9-10, especially page 10.	13										
Y	WELSH et al. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. Cancer Research. August 15, 2001, Volume 61, pages 5974-5978, see entire document, especially figure 1.	17										
Y	EMBOSS Database on Yahoo Search Engine. Author: Bleasby. Emboss Sigcleave program. Program completed 10 March 1999, see entire document.	10 and 12										
Y	EMBOSS Database on Yahoo Search Engine. Authors: Persson and Argos. Emboss Trap Program. Program completed 17 June 1999, see entire document.	8 and 12										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 05 September 2003 (05.09.2003)		Date of mailing of the international search report 17 NOV 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer - <i>Leticia D. Roberts for</i> Lori A. Clow Telephone No. 703-308-0196										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/13709

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-17

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/13709

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claim(s) 1-17, drawn to a method for identifying a biomarker that is diagnostic for the presence of cancer.

Group II, claim(s) 18-22, drawn to a method of diagnosing cancer in a mammal.

Group III, claim(s) 23-23, drawn to a method for monitoring the efficacy of a cancer treatment in a mammal.

Group IV, claim(s) 25-28, drawn to a method for diagnosing or identifying a predisposition to developing prostate cancer.

Group V, claim(s) 29, drawn to a method for diagnosing or identifying a predisposition to developing colon cancer.

Group VI, claim(s) 30, drawn to a method for diagnosing or identifying a predisposition to developing carcinoma.

In addition Group IV is directed to more than one invention. The secreted biomarkers recited in the claim lack unity of invention because they are structurally distinct. The claims of Group IV encompass detecting each of the eight secreted biomarkers individually thus resulting in eight different methods.

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of each of the methods is considered to be the specific steps recited to achieve the goal of the preamble. No methods shares the same specific steps or goals.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, Medline, Biosis, Caplus, Scirus

gene ontology, cancer biomarker, gene annotation, predicted amino acid sequence, diagnostic biomarker.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4B024 AA12 BA36 CA01 CA09 CA12 DA03 HA12 HA20
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ53 QQ58 QQ79 QR32 QR55 QR82
QS34

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005523727A5	公开(公告)日	2006-06-22
申请号	JP2004501910	申请日	2003-05-01
[标]申请(专利权)人(译)	艾伯爵EM LLC		
申请(专利权)人(译)	艾伯爵EM LLC		
[标]发明人	ガレットエムハンプトン ジョンバーナードウエルシュ		
发明人	ガレット・エム・ハンプトン ジョン・バーナード・ウエルシュ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/6809 C12Q1/6837 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G16B20/00 G16B25/00		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA12 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS34		
优先权	60/377402 2002-05-01 US 60/442853 2003-01-24 US		
其他公开文献	JP2005523727A		

摘要(译)

本发明提供了用于发现可用于诊断，预后和监测各种癌症的治疗效果的生物标志物的方法。本发明还提供了使用根据本发明鉴定的生物标志物诊断各种形式的癌症的方法。