

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-43496

(P2011-43496A)

(43) 公開日 平成23年3月3日(2011.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 13/08 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/08	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 6
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 30 O L (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-172140 (P2010-172140)	(71) 出願人	309040701 ワイス・エルエルシー
(22) 出願日	平成22年7月30日 (2010.7.30)		
(62) 分割の表示	特願2009-144509 (P2009-144509) の分割		アメリカ合衆国 07940 ニュージャ ージー州 マジソン、ファイブ ジラルダ ファームズ (番地なし)
原出願日	平成13年11月28日 (2001.11.28)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	60/253, 539	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成12年11月28日 (2000.11.28)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100156100 弁理士 西野 満
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100156155 弁理士 水原 正弘
1. フロッピー			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の診断および治療に有用な F K B P 核酸およびポリペプチドの発現分析

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 対象が前立腺癌に罹患しているかどうかを評価する方法を提供する。

【解決手段】 対象が前立腺癌に罹患しているかどうかを評価する方法であって、 a) 対象からのサンプル中の F K B P マーカーの発現のレベル、および、 b) 対照サンプル中のマーカーの発現の正常レベル、を比較することを含み、対象からのサンプル中のマーカーの発現レベルと正常レベルの間の有意な差が、対象が前立腺癌に罹患していることを示すものである方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象が前立腺癌に罹患しているかどうかを評価する方法であって、

- a) 対象からのサンプル中の F K B P 5 4 マーカーの発現のレベル、および
  - b) 対照サンプル中の F K B P 5 4 マーカーの発現の正常レベル、
- を比較することを含み、対象からのサンプル中のマーカーの発現レベルと正常レベル間の差が少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍またはそれ以上であることが、対象が前立腺癌に罹患していることを示すものである方法。

## 【請求項 2】

サンプル中の F K B P 5 4 マーカーの発現レベルが、前立腺癌に罹患していない対象における F K B P 5 4 マーカーの発現の正常レベルと、少なくとも 2 倍だけ差がある、請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

サンプル中の F K B P 5 4 マーカーの発現レベルが、前立腺癌に罹患していない対象における F K B P 5 4 マーカーの発現の正常レベルと、少なくとも 3 倍だけ差がある、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

サンプル中の F K B P 5 4 マーカーの発現レベルを、F K B P 5 4 マーカーに対応するタンパク質のサンプル中での存在を検出することにより評価する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

タンパク質に特異的に結合する試薬を用いてタンパク質の存在を検出する、請求項 4 記載の方法。

20

## 【請求項 6】

試薬が、抗体、および抗体誘導体から成る群から選択される、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

サンプル中の F K B P 5 4 マーカーの発現のレベルを、転写されたポリヌクレオチドまたはその部分のサンプル中での存在を検出することにより評価する方法であって、転写されたポリヌクレオチドが F K B P 5 4 マーカー配列を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

転写されたポリヌクレオチドが m R N A である、請求項 7 記載の方法。

30

## 【請求項 9】

転写されたポリヌクレオチドが c D N A である、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 10】

検出のステップが、転写されたポリヌクレオチドを増幅することをさらに含む、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 11】

サンプル中の F K B P 5 4 マーカーの発現のレベルを、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で F K B P 5 4 マーカーとアニールするもしくはポリヌクレオチドの部分とアニールする（ここで、ポリヌクレオチドは F K B P 5 4 マーカー配列を含む）転写されたポリヌクレオチドのサンプル中での存在を検出することにより評価する、請求項 1

40

## 【請求項 12】

対象における前立腺癌の進行をモニターする方法であって、

- a) 第 1 の適当な時点で対象サンプルにおいて F K B P 5 4 マーカーの発現を検出すること；
  - b) その後の適当な時点でステップ ( a ) を反復すること；および、
  - c) ステップ ( a ) と ( b ) において検出された発現のレベルを比較し、そしてそれより、対象における前立腺癌の進行をモニターすること、
- を含む方法。

## 【請求項 13】

50

F K B P 5 4 マーカーが転写されたポリヌクレオチドまたはその部分に対応し、ポリヌクレオチドが F K B P 5 4 マーカー配列を含む、請求項 1 ~ 1 2 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 4】

サンプルが対象から得られる細胞を含むものである、請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 5】

細胞が、前立腺から採取されるものである、請求項 1 ~ 1 4 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 6】

細胞が、血液から採取されるものである、請求項 1 4 記載の方法。

10

【請求項 1 7】

対象において前立腺癌を阻害する治療の有効性を評価する方法であって、

- a) 治療の少なくとも一部を対象に提供する前に対象から得た第 1 サンプルにおける F K B P 5 4 マーカーの発現；
- b) 治療の部分を提供後に対象から得た第 2 サンプルにおける F K B P 5 4 マーカーの発現；

を比較することを含み、第 2 サンプルにおける F K B P 5 4 マーカーの発現が、第 1 サンプルに対して少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍またはそれ以上低いレベルであることが、治療が対象において前立腺癌を阻害するのに有効であることを示すものである方法。

20

【請求項 1 8】

試験化合物が細胞において前立腺癌を誘発する潜在的能力を評価する方法であって、

- a) 試験化合物の存在および不在下に細胞の別個の部分標本を維持すること；および、
  - b) 部分標本のそれぞれにおける F K B P 5 4 マーカーの発現を比較すること、
- を含み、試験化合物の存在下に維持した部分標本における F K B P 5 4 マーカーの発現が、試験化合物の不在下に維持した部分標本に対して少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍またはそれ以上高いレベルであることが、試験化合物が細胞において前立腺癌を誘発する潜在的能力を有することを示すものである方法。

【請求項 1 9】

前立腺癌を治療するのに有用な化合物を同定する方法であって、

- a) 試験化合物の存在下における細胞中の F K B P 5 4 マーカーの発現レベルを測定すること；および、
  - b) ステップ ( a ) において測定された発現を、試験化合物の不在下での細胞中の F K B P 5 4 マーカーの発現と比較すること、
- を含み、試験化合物の存在下での F K B P 5 4 マーカーの発現レベルが、試験化合物の不在下でのその発現レベルよりも低い場合に、化合物が前立腺癌を治療するのに有用なものである方法。

30

【請求項 2 0】

発現レベルを、F K P 5 4 マーカーの m R N A のレベルを測定することにより決定する、請求項 1 9 記載の方法。

40

【請求項 2 1】

発現レベルを、F K B P 5 4 マーカーのタンパク質のレベルを測定することにより決定する、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 2】

細胞が前立腺癌細胞である、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 3】

前立腺癌を治療するのに有用な化合物を同定する方法であって、

- a) F K B P 5 4 マーカーの活性を測定すること；および、
- b) ステップ ( a ) において測定された活性を、試験化合物の不在下での F K B P 5 4 マーカーの活性のレベルと比較すること、

50

を含み、試験化合物の存在下での F K B P 5 4 マーカーの活性が、試験化合物の不在下でのその活性レベルよりも低い場合に、化合物が前立腺癌を治療するのに有用なものである方法。

【請求項 2 4】

細胞が前立腺癌細胞である、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

前立腺癌に罹患している対象におけるアンドロゲン除去治療の有効性を決定する方法であって、

a) 適当な第 1 時点で、F K B P 5 4 マーカーの発現レベルを対象において検出すること

b) 対象がアンドロゲン除去治療を開始した後のその後の適当な時点で、ステップ ( a ) を反復すること ; および、

c) ステップ ( a ) と ( b ) において検出された F K B P 5 4 マーカーの発現のレベルを比較すること、

を含み、発現レベルの低下が、アンドロゲン除去治療が高い効力を有するものであることを示すものである方法。

【請求項 2 6】

前立腺癌の治療用の医薬の製造における、F K B P 5 4 マーカーに対応するポリヌクレオチドに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 2 7】

前立腺癌の治療および / または予防用の医薬の製造における、F K B P 5 4 マーカーの発現を減少させる化合物の使用。

【請求項 2 8】

化合物が、F K B P 5 4 マーカーの m R N A の発現を減少させる、請求項 2 7 記載の使用。

【請求項 2 9】

化合物が、F K B P 5 4 マーカータンパク質の発現を減少させる、請求項 2 7 記載の使用。

【請求項 3 0】

前立腺癌の治療用の医薬の製造における、抗 - F K B P 5 4 抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 0 0 年 1 1 月 2 8 日に出願された、「前立腺癌の診断および治療に有用な F K B P 5 4 核酸およびポリペプチドの発現分析」という標題の合衆国仮特許出願第 6 0 / 2 5 3 , 5 3 9 号の利益を主張する。前記出願の教示するところは、本明細書中に引用により組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

前立腺癌は、癌に関連する死亡の 2 番目に最も一般的な原因であり、そして本年だけでも推定 3 7 , 0 0 0 人を死亡させる。雄の哺乳動物においてもっばら見出される前立腺はいくつかの調節性ペプチドを産生する。前立腺は、基質細胞および上皮細胞からなり、後者の群は、円柱状の分泌細胞および基底の非 - 分泌細胞からなる。これらの基底細胞ならびに基質細胞の増殖により、一の一般的な前立腺疾患である良性の前立腺増殖 ( B P H ) が引き起こされる。他の一般的な前立腺疾患は、致命的な病態生理学的前立腺癌の最も一般的なものである前立腺癌 ( C a P ) である。前立腺癌には、前立腺の周辺領域における上皮細胞の悪性の形質転換が関与している。前立腺癌および良性の前立腺増殖は、年とったヒトの男性において高発症率を有する 2 つの一般的な前立腺疾患である。5 5 歳を越す 4 人の男性当たり約 1 人が、いくつかの形態または他の形態の前立腺疾患に罹患している。

。

10

20

30

40

50

## 【0003】

今日まで、正常、良性、および癌の前立腺により合成および分泌される種々の物質が、種々の前立腺疾患の病因の理解を得るためのおよび前立腺疾患の診断における腫瘍マーカーとして用いられている。正常な前立腺により分泌される3つの主なタンパク質またはペプチドは、前立腺酸ホスファターゼ (PAP)、前立腺特異的抗原 (PSA)、およびヒト精子血漿インヒピン (HSPI) としても知られる前立腺インヒピン (PIIP) である。PSAおよびPAPは共に前立腺疾患の検出における腫瘍マーカーとして研究されているが、両者は良性の前立腺増殖 (BPM) を有する前立腺において高まったレベルを示すので、いずれのマーカーも特異的ではなく、それゆえ使用が制限されている。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

利用可能な知識はあるものの、前立腺癌疾患の基礎である遺伝学的基礎およびその進行に関わっている可能性のあるアンドロゲン調節性遺伝子についてはほとんど知られていない。アンドロゲンは前立腺癌の生理において腫瘍な役割をはたすことが知られているが、ホルモン調節の完全な複雑さについては完全には解明されておらず、そしてもっとアンドロゲンに関連するプロセスは解明されている。これらのプロセスの多くは、解明されていない、前立腺癌に関連するいくつかの分子が関与している。加えて、該疾患の病因に未だ関係づけられていないいくつかの公知の分子が存在する可能性がある。従って、前立腺疾患に関連している未公知のタンパク質およびそれらをコードしている遺伝子を同定する必要がある。前立腺癌の病因に未だ関係づけられていない公知の分子、特に前立腺癌の診断、予防、および治療のための標的として役立つものを同定する必要もある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

本発明は、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞 (例えば、LNCaP細胞株) におけるアンドロゲン誘導性の多くの遺伝子の発見に部分的に基くものである。これらの遺伝子は、前立腺疾患の検出、診断、および予測に適したマーカーとして役立つ。本発明により、前立腺癌の検出および診断のための方法およびスクリーニングアッセイが提供される。第1のスクリーニングアッセイは、前立腺癌に係する遺伝子の発現レベルの変化を検出するものである。特に、本発明により、前立腺疾患の検出、診断および予測のための遺伝子マーカーとしての、FK-結合タンパク質 (FKBP) 例えば、FKBPD54などのイムノフィリンの使用が提供される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0006】

【図1】図1Aは、1mlの培地を用いて24ウェルのプレートに、20,000細胞/ウェルにて蒔いたLNCaP細胞の増殖およびPSA産生におけるジヒドロテストステロン (DHT) の影響を示している棒グラフである。細胞を示すようにDHTで処理し、次いで細胞の増殖を3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (MTT) アッセイにより3日目に測定した。図1Bは、1x10<sup>6</sup>細胞/ウェルにて175cm<sup>2</sup>のフラスコ中に蒔いたLNCaP細胞の増殖およびPSA産生におけるDHTの影響を示すグラフである。細胞を、翌日10nMのDHTを用いてもしくは用いずに処理し、次いでRNAの調製およびPSAの分析のために回収した。

【図2】図2は、RNAサンプル調製、Affymetrix Genechipハイブリダイゼーションおよび分析のための方法を示すフローチャートである。

【図3】図3Aは、アンドロゲン処置に対するPSAの発現特性を示す棒グラフである。mRNAのフリークエンシー (frequencies) をY軸にとり、各時点でのDHTアンドロゲン処置および非処置細胞をX軸にプロットした。図3Bは、アンドロゲン処置に対するFKBP54の発現特性を示す棒グラフである。mRNAのフリークエンシー (frequencies) をY軸にプロットし、各時点でのDHTアンドロゲン処置および非処置細胞をX軸にブ

10

20

30

40

50

ロットした。

【図4】図4Aは、PSAの定量RT-PCR分析を示している棒グラフである。コピー数をY軸にプロットし、そして各時点でのDHTアンドロゲン処置および非処置細胞をX軸にプロットした。図4Bは、FKBP54の定量RT-PCR分析を示している棒グラフである。コピー数をY軸にプロットし、そして各時点でのDHTアンドロゲン処置および非処置細胞をX軸にプロットした。

【図5】図5は、GREe1bLucレポーター構築物で一時的にトランスフェクトしたCOS-1細胞、およびFKBP54をコードしている0.1μgの発現ベクター（黒色のバー）または空のベクター（白色のバー）を用いたFKBP54によるアンドロゲンレセプター（AR）の転写の活性化を示している棒グラフである。COS-1細胞を必要に応じて10<sup>-9</sup>Mの合成アンドロゲン、R1881を20日間用いて処理した。バーは、少なくとも3つの独立した実験±SDの平均を示す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

イムノフィリンは、シクロスポリンA（CsA）、FK506、およびラパマイシンなどの免疫抑制剤のレセプターとして役立つタンパク質である。イムノフィリンの公知のクラスには、シクロスポリン、およびFK506結合タンパク質、例えばFKBPなどが含まれる。シクロスポリンAはシクロフィリンに結合し、FK506およびラパマイシンはFKBPに結合する。これらのイムノフィリン-薬物複合体は、種々の細胞内シグナル伝達システムと相互作用する。イムノフィリンは、ペプチジル-プロリルイソメラーゼ（PPiase）またはロータマーゼ酵素活性を有することが知られている。ロータマーゼ活性は、イムノフィリンタンパク質のシスおよびトランス異性体の相互変換の触媒作用に役割を有することが決定されている。

【0008】

FKBP54は、イムノフィリンファミリーのメンバーであり、Smith et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 18365-18371により記載されているプロゲステロンレセプター複合体と関連している。本発明により、アンドロゲンの存在下でアップレギュレートされる（増加したmRNAおよびタンパク質発現/活性化/アゴナイズ）またはダウンレギュレートされる（低下したmRNAおよびタンパク質発現/抑制/アンタゴナイズ）、FKBP54などのイムノフィリンの使用が提供される。

【0009】

遺伝子クラスター分析を用いて、FKBP54の発現パターンが、前立腺癌患者を診断するのに用いられている前立腺特異的抗原（PSA）のものと同様であることが見出された。本明細書に記載する本研究により、アンドロゲンの存在下でのFKBP54のアップレギュレーションが立証され、そして、前立腺疾患の検出、診断および予防のためのマーカーとして用いることができることが立証された。加えて、定量PCRを用いて、標的マーカーの遺伝子発現を確認した。FKBP54の転写レベルが、時間依存性の転写の増加を示して、アンドロゲンにより調節されることが見出された。発現されたFKBP54タンパク質のウェスタンブロット分析により、アンドロゲンの存在下での発現レベルの時間依存性の増加がさらに確認された。充実性腫瘍におけるFKBP54の存在も立証された。さらに、COS細胞における一時的な同時トランスフェクション研究により、アンドロゲンレセプターの活性化がFKBP54により高まることが示された。

【0010】

本発明の一の具体例により、対象からのサンプル中のFK-結合タンパク質、例えば、FKBP54マーカーの発現のレベルを対照サンプル中のマーカーの発現の正常レベルと比較することにより、対象が前立腺癌を患っているかどうかを評価する方法が提供される。ここで、対象からのサンプル中のマーカーの発現のレベルと正常レベルの間の有意な差が、対象が前立腺癌を患っていることを示す。好ましい具体例において、マーカーは、転写されるポリヌクレオチド、またはその部分に対応し得、この場合当該ポリヌクレオチドはマーカーを含む。好ましい具体例において、サンプル中のマーカーの発現レベルは、前

10

20

30

40

50

立腺癌を患っていない対象におけるマーカーの発現の正常レベルと少なくとも2つのファクターにより異なり、およびよりいっそう好ましい具体例においては、発現レベルは少なくとも3つのファクターにより異なる。他の好ましい具体例において、マーカーはまた、非前立腺癌細胞において有意には発現されない。

【0011】

他の好ましい具体例において、サンプルは、対象から得た細胞を含む。他の好ましい具体例において、サンプルにおけるマーカーの発現のレベルは、サンプル中の、マーカーに対応するタンパク質の存在を検出することにより評価する。特に好ましい具体例においては、タンパク質の存在を、タンパク質に特異的に結合する試薬を用いて検出する。さらにいっそう好ましい具体例においては、試薬は抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントを含む試薬のグループから選択される。他の好ましい具体例において、サンプル中の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サンプル中での存在を検出することにより評価するが、ここで転写されたポリヌクレオチドはマーカーを含む。特に好ましい具体例では、転写されるポリヌクレオチドはmRNAまたはcDNAである。他の特定の好ましい具体例において、検出のステップには、転写されるポリヌクレオチドを増幅することが含まれる。

10

【0012】

さらに他の好ましい具体例において、サンプル中のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現のレベルを、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でマーカーとアニールする、またはポリヌクレオチドの部分（ポリヌクレオチドはマーカーを含む）とアニールする転写されたポリヌクレオチドのサンプル中での存在を検出することにより評価する。マーカーの発現のレベルがマーカーの発現の対応する正常レベルと比較して有意に変化している場合、これは対象が前立腺癌を患っていることの指標となる。

20

【0013】

別の具体例において、本発明により、対象における前立腺癌の進行をモニターするための方法であって、まず初めにちょうどよい時点でFKBPマーカー、例えば、FKBP54マーカーの発現を検出すること、この検出ステップをその後のちょうどよい時点で反復すること、および2つの検出ステップにて検出された発現のレベルを比較すること、およびこの情報を用いて対象における前立腺癌の進行をモニターすることを含む方法が提供される。他の好ましい具体例において、マーカーは転写されたポリヌクレオチドまたはその部分（ポリヌクレオチドはマーカーを含む）に対応する。他の好ましい具体例において、サンプルは対象から得た細胞を含む。特に好ましい具体例において、細胞は皮膚または血液組織から回収する。

30

【0014】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための試験化合物の効力を評価する方法であって、試験化合物に暴露された、またはそこに維持された対象から得た第1サンプルにおけるFKBP54マーカーの発現を、対象から得た第2サンプル（第2サンプルは試験化合物に暴露していない）におけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現と比較することを含む方法であって、第2サンプルにおけるものと比較した第1サンプルにおけるマーカーの発現の有意に低いレベルが試験化合物が対象において前立腺癌を阻害することに関して有効であることを示すものである方法が提供される。好ましい具体例において、第1および第2サンプルは、対象から得た単一サンプルの部分である。好ましい具体例において、第1および第2サンプルは、対象から得た貯蔵サンプル（複数）の部分である。

40

【0015】

他の具体例では、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための治療の有効性を評価する方法であって、対象に治療の少なくとも一部を提供する前に対象から得られた第1サンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現を、治療の部分の提供後に対象から得た第2サンプルにおけるマーカーの発現と比較することを含む方法であって、第2サンプルにおけるマーカーの第1サンプルに対して有意に低いレベル

50

が、治療が対象において前立腺癌を阻害するのに有効である指標である方法が提供される。

【0016】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための組成物を選択する方法であって、対象からの細胞を含んでいるサンプルを得ること、サンプルの部分標本を複数の試験組成物の存在下に分けて維持すること、部分標本のそれぞれにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現を比較すること、およびその試験組成物を含んでいる部分標本におけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現の、他の試験組成物と比較してより低いレベルを誘導する試験組成物の一つを選択することを含む方法が提供される。

10

【0017】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害する方法であって、対象からの細胞を含んでいるサンプルを得ること、サンプルの部分標本を複数の試験組成物の存在下に分けて維持すること、部分標本のそれぞれにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現を比較すること、およびその試験組成物を含んでいる部分標本において、他の試験組成物と比較してより低いレベルのFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現を誘導する試験組成物の少なくとも一つを対象に投与することを含む方法が提供される。

【0018】

他の具体例において、本発明により、細胞に前立腺癌を誘発する試験化合物の潜在的な能力を評価する方法であって、試験組成物の存在下および不在下に細胞の部分標本を分けて維持すること、および部分標本のそれぞれにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現を比較することを含む方法であって、試験化合物の存在下に維持した部分標本において、試験化合物の不在下に維持した部分標本に対して有意に高まったFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現レベルがそれぞれ、試験化合物が細胞に前立腺癌を誘発する潜在能力を有することの指標であるところの方法が提供される。

20

【0019】

他の具体例において、本発明により、前立腺癌に罹患している対象を治療する方法であって、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーに対応するタンパク質を前立腺癌を患っている対象の細胞に提供することを含む方法が提供される。好ましい具体例において、タンパク質は、FKBPタンパク質、例えばFKBP54タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを含むベクターを細胞へ提供することにより細胞に提供される。

30

【0020】

他の具体例において、本発明により、前立腺癌に罹患している対象を、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーに対応するポリヌクレオチドに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドで治療する方法が提供される。

他の具体例において、本発明により、前立腺癌を進行させる危険のある対象において前立腺癌を阻害する方法であって、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーに対応する遺伝子の発現を阻害することを含む方法が提供される。

本発明の他の態様および利点は、以下の詳細な記載および請求の範囲から明らかである。

40

【0021】

図面の簡単な記載

図1は、1mlの培地を用いて24ウェルのプレートに、20,000細胞/ウェルにて蒔いたLNCaP細胞の増殖およびPSA産生におけるジヒドロテストステロン(DHT)の影響を示している棒グラフである。細胞を示すようにDHTで処理し、次いで細胞の増殖を3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド(MTT)アッセイにより3日目に測定した。

【0022】

図1Bは、1×10<sup>6</sup>細胞/ウェルにて175cm<sup>2</sup>のフラスコ中に蒔いたLNCaP

50

細胞の増殖および P S A 産生における D H T の影響を示すグラフである。細胞を、翌日 10 n M の D H T を用いてもしくは用いずに処理し、次いで R N A の調製および P S A の分析のために回収した。

図 2 は、R N A サンプル調製、Affymetrix Genechip ハイブリダイゼーションおよび分析のための方法を示すフローチャートである。

【 0 0 2 3 】

図 3 A は、アンドロゲン処置に対する P S A の発現特性を示す棒グラフである。m R N A のフリークエンシー (frequencies) を Y 軸にとり、各時点での D H T アンドロゲン処置および非処置細胞を X 軸にプロットした。

図 3 B は、アンドロゲン処置に対する F K B P 5 4 の発現特性を示す棒グラフである。m R N A のフリークエンシー (frequencies) を Y 軸にプロットし、各時点での D H T アンドロゲン処置および非処置細胞を X 軸にプロットした。

【 0 0 2 4 】

図 4 A は、P S A の定量 R T - P C R 分析を示している棒グラフである。コピー数を Y 軸にプロットし、そして各時点での D H T アンドロゲン処置および非処置細胞を X 軸にプロットした。

【 0 0 2 5 】

図 4 B は、F K B P 5 4 の定量 R T - P C R 分析を示している棒グラフである。コピー数を Y 軸にプロットし、そして各時点での D H T アンドロゲン処置および非処置細胞を X 軸にプロットした。

図 5 は、G R E e 1 b L u c レポーター構築物で一時的にトランスフェクトした C O S - 1 細胞、および F K B P 5 4 をコードしている 0 . 1 μ g の発現ベクター ( 黒色のバー ) または空のベクター ( 白色のバー ) を用いた F K B P 5 4 によるアンドロゲンレセプター ( A R ) の転写の活性化を示している棒グラフである。C O S - 1 細胞を必要に応じて 10 - 9 M の合成アンドロゲン、R 1 8 8 1 を 2 0 次間用いて処理した。バーは、少なくとも 3 つの独立した実験 ± S D の平均を示す。

【 0 0 2 6 】

( 発明の詳細な記載 )

本発明は、対象における選択されたマーカーの発現と前立腺癌の存在との間の新たに発見された関連、特に F K 結合タンパク質 ( F K B P )、例えば F K B P 5 4 などのイムノフィリンに関するものである。本明細書中、「 F K B P 5 4 」なる用語は、「 F K B P 5 1 」なる用語と同じ意義で用いられる。F K B P 5 4 は、イムノフィリンファミリーのメンバーである。他の F K 結合タンパク質には、制限されるものではないが、F K B P 1 2 (Hidalgo et al. (2000) Oncogene 19: 6680-6686, Genbank 受入番号 AF3222070)、F K B P 1 2 . 6 (Deivanayagam et al. (2000) Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallog 56: 266-271, 受入番号 L37086)、および F K B P 5 2 (Yamamoto-Yamaguchi et al. (2001) Exp Hematol 29: 582-588, Genbank 受入番号 M88279) が含まれる。

【 0 0 2 7 】

F K 結合タンパク質マーカー、例えば F K B P 5 4 マーカーの発現の相対レベルは、対象における前立腺癌に関する素因を示すものであり、および / または対象における前立腺癌の存在および存在の可能性を診断するものであることが見出された。本発明により、F K B P マーカー、例えば、F K B P 5 4、サンプルまたは対象における前立腺癌の存在または不在を検出するための方法、および F K B P マーカー、例えば、F K B P 5 4 を用いてサンプルまたは対象における前立腺癌の発症を予測する方法が提供される。本発明により、F K B P マーカー、例えば、F K B P 5 4 を用いて前立腺癌を治療し得る方法も提供される。

【 0 0 2 8 】

本発明は少なくとも部分的には、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞からのサンプルにおいて差別的に発現される遺伝子マーカー、F K B P 5 4 の同定に基く。6 8 0 0 の公知遺伝子のパネルを、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞における発現に関して調べた ( 実施例

10

20

30

40

50

1を参照されたい)。疾患を患っている組織と正常組織の間で統計学的に有意な ( $p < 0.05$ ) 差を有するこれらの遺伝子を同定した。この差異的発現は、発現の低下または発現の増加のいずれかとして認められた。アンドロゲン依存性前立腺癌細胞におけるこれらの選択された遺伝子の発現は、実施例1に記載するようにGeneChip分析により評価した。FKBP54は、LNCaP前立腺癌細胞において増加することが見出された。LNCaP細胞の増殖およびPSAの産生は、天然のアンドロゲンレセプター (AR) リガンド、に反応性があり、DHT、LNCaPは遺伝子発現特性の適当なモデルである (例えば、Kokontis et al. (1994) *Cancer Res.* 54: 1566-1573; Schuurmans et al (1991) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40: 193-197; Swinnen et al. (1994) *Molec. Cell. Endocrinol.* 104: 153-162; Clutjens et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 6379-6388; Henttu et al. (1992) *Endocrinology* 130: 766-772; Murtha et al. (1993) *Biochem.* 32: 6459-6464; Swinnen et al. (1996) *Endocrinol.* 137: 4468-4474を参照されたい)。

10

**【0029】**

内部対照として、前立腺癌に関与していることが当該分野で公知の前立腺特異的抗原 (PSA) 遺伝子を、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞をスクリーニングするのに含めた。PSAはアンドロゲン依存性前立腺癌細胞において発現が有意に増すことが見出された。

**【0030】**

従って、本発明はFKBP遺伝子 (例えば、FKBP54のDNAまたはcDNA)、対応するmRNA転写産物、およびコードされるポリペプチドの、進行性の前立腺癌の存在または危険性に関するマーカーとしての使用に関する。FKBPマーカー、例えばFKBP54は疾患の程度および/または重篤度を関連づけるのに有用である。FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーは、前立腺癌の治療に、または癌の治療の効力を評価するのにも有用であり得る。加えて、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーは、マーカーの発現および疾患状態を変更する化合物または薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイに用いることもできる。

20

**【0031】**

一態様において、本発明により、その量および活性が前立腺癌の存在に関連する、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーが提供される。本発明のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーは核酸分子 (例えば、DNA, cDNA、またはRNA) またはポリペプチドであってよい。FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーは、非前立腺癌組織と比較して、前立腺癌組織における量または活性に関して増加するか低下するかのいずれかである。例えば、「FKBP54」 (受入番号U42031) と指定される遺伝子は、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞サンプルにおいて発現レベルが増加する。この遺伝子に関する増加または低下したmRNAの存在、およびこの遺伝子に関して増加または低下したタンパク質産物のレベルは、前立腺癌のマーカーとして役立つ。好ましくは、本発明のマーカーの増加および低下したレベルは、適当な対照サンプル (例えば、前立腺癌に罹患していないサンプル) と比較して統計学的に有意な等級の増加か、または低下である。特に好ましい具体例において、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーは対照サンプルに対して少なくとも2 -、3 -、4 -、5 -、6 -、7 -、8 -、9 -、または10 - 倍またはそれ以上増加しているか低下している。同様に、当業者は、好ましい検出法は、生じる検出値が当該方法の最小検出値を越すものである方法であることを認識するであろう。

30

40

**【0032】**

本発明のRNAまたはタンパク質マーカーの相対量の測定は、当業者に公知のいずれかの方法によるものであってよい (Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, および *Current protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照されたい)。RNA検出に関する典型的な方法には、標識されたプローブ (例えば、相補的な核酸分子) のハイブリダイゼーションおよびプローブの検出 (例えば、ノーザンブ

50

ロッキング)が後に続く細胞または組織サンプルからのRNAの抽出が含まれる。タンパク質検出に関する典型的な方法には、タンパク質サンプルに対する標的タンパク質に特異的な標識されたプローブ(例えば抗体)のハイブリダイゼーションおよびプローブの検出が後に続く細胞または組織サンプルからのタンパク質の抽出が含まれる。標識群は、ラジオアイソトープ、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。特異的タンパク質および核酸分子の検出は、当業者に周知の多くの他の方法の中で、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、直接配列決定、または定量PCR(核酸分子の場合)により評価されてもよい。

#### 【0033】

所定の具体例において、FKBPの遺伝子自体(例えば、FKBP54 DNAまたはcDNA)を前立腺癌のマーカーとして供してよい。例えば、FKBP54遺伝子に対応する核酸の、遺伝子の全部または部分の欠失などによる不在は疾患と関連し得る。同様に、FKBP54遺伝子に対応する核酸の、遺伝子の重複などによる増加も疾患と関連し得る。

10

#### 【0034】

本発明のFKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子の全部または部分のコピーの存在または数の検出は、当該分野で公知のいずれかの方法を用いて行ってよい。典型的には、細胞または組織サンプルからのトータルのDNAを抽出し、標識したプローブ(例えば相補的DNA分子)とハイブリダイズさせ、ついでプローブを検出するサザン分析によりDNAまたはcDNAの存在および/または量を評価するのが簡便である。標識群は、ラジオアイソトープ、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。DNAの検出および/または定量の他の有用な方法には、当該分野の専門家には公知のように、直接配列決定、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、および定量PCRが含まれる。

20

#### 【0035】

本発明はまた、前記前記の分子と構造上異なる(例えば、変化した核酸またはアミノ酸配列を有する)が、前記の分子と同じ特性(例えばコードされたアミノ酸配列または非必須アミノ酸残基のみ変化したもの)を有する核酸およびタンパク質分子も包含される。そのような分子には対立変種が含まれ、およびサブセクションIにより詳細に記載する。

#### 【0036】

他の態様において、本発明により、その量または活性が前立腺癌の重篤度に関連するFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーが提供される。このFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーは、前立腺癌の重篤度の程度にポジティブまたはネガティブのいずれかにて関連して、前立腺癌組織において量または活性が増加または低下する。さらに他の態様において、本発明により、その量または活性が患者において前立腺癌を進行させる危険性と関連するFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーが提供される。FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーは、対象における前立腺癌の進行の見込みと直接関連して、活性または量が増加または低下する。

30

#### 【0037】

本発明のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーが固体支持体上に簡便に提供されてよいことも当業者には認識される。例えば、mRNAなどのポリヌクレオチドはアレイ(例えば、ハイブリダイゼーション分析のためのGeneChipアレイ)へと、樹脂(カラムクロマトグラフィーのためのカラムに包むことができる樹脂)へと、またはマトリックス(例えば、ノーザンブロット分析のためのニトロセルロースマトリックス)へと結合させてよい。マーカーに対して相補的な分子を、共有または非共有いずれかにて固定することにより、サンプル中の各マーカーの存在または活性の別個の分析が可能となる。アレイにて、例えばFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーのパネルの各メンバーに相補的なポリヌクレオチドはそれぞれアレイ上の異なる公知の位置へと別個に結合されてよい。アレイは、例えば、対象からの前立腺細胞サンプルから抽出したポリヌクレオチドとハイブリダイズさせてよい。サンプルからのポリヌクレオチドのアレイ上のいずれかの位置のアレイとのハイブリダイゼーションは検出することができ、そしてこうして、サンプル

40

50

ル中のマーカーの存在または量を確認することができる。好ましい具体例では、「GeneChip」アレイを用いる(Affymetrix)。同様に、ウェスタン分析を、対象からのタンパク質サンプルにハイブリダイズした異なるFKBPポリペプチド(例えば、FKBP54)マーカーに特異的な固定した抗体上で行ってよい。加えて、定量PCRを用いて、標的マーカーの発現を確認した。FKBP54の転写レベルは、時間依存性の転写の増加を示して、アンドロゲンにより調節されることが見出された。発現されたFKBP54のウェスタンプロット分析により、アンドロゲンの存在下での発現レベルにおける時間依存性の増加がさらに確認された。充実性腫瘍におけるFKBP54の存在も立証された。さらに、COS細胞中での一時的な同時トランスフェクションは、アンドロゲンレセプターの活性化がFKBP54により高められることを示した。

10

**【0038】**

全FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカータンパク質または核酸分子を支持体に結合させる必要がないこと、検出の目的のために(例えばハイブリダイゼーションのために)十分な長さのマーカーの一部、例えば長さにして7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、100またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸部分が検出目的に関して十分であり得ることが当業者には明らかであろう。

**【0039】**

本発明のFKBP、例えばFKBP54核酸およびタンパク質マーカーは、対象の組織または細胞から単離されてよい。好ましい具体例において、組織は前立腺細胞または組織である。しかし、体液(例えば、血液、尿、胆汁、血清、リンパ液、唾液、粘液、および膿)を含む他の組織サンプルおよび他の組織サンプルも、本発明のマーカーが単離されてよい源または本発明のマーカーの存在、活性、および/または量を評価してよい源として供してもよい。マーカー自体の1またはそれ以上を含んでいる組織サンプルを本発明の方法に用いてよく、および当業者は、そのようなサンプルが簡便に得られ、貯蔵され、および/または保存され得る方法を認識するであろう。

20

**【0040】**

本発明以前にいくつかのマーカー、例えばPSAが、前立腺癌と関連していることが公知であった。これらのマーカーは、本発明のマーカーと一緒に含まれない。しかし、これらのマーカーは、本発明の方法、パネル、およびキットにおいて本発明のマーカーと組み合わせて簡便に用いられてよい。

30

**【0041】**

他の態様において、本発明により、患者が前立腺癌に罹患しているかどうかを評価するのに有用な抗体を産生する単離ハイブリドームを作製する方法が提供される。この方法において、本発明のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーに対応するタンパク質を(例えば、発現される細胞からの精製により、またはタンパク質をコードしている核酸の転写および翻訳によりインビボまたはインビトロで公知の方法を用いて)単離する。脊椎動物、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、またはヒツジなどの哺乳動物を、単離されたタンパク質またはタンパク質フラグメントを用いて免疫化する。脊椎動物は、少なくともさらに1回、単離タンパク質またはタンパク質フラグメントで、脊椎動物が該タンパク質またはタンパク質フラグメントに対して強い免疫反応を示すように、任意に(および好ましくは)免疫化されてよい。脾臓細胞を免疫化した脊椎動物から単離し、そして当該分野で周知の種々の方法のいずれかを用いて免疫化した細胞株と融合させてハイブリドームを形成する。この方法で作製されたハイブリドームを次いで、常套法を用いてスクリーニングし、タンパク質またはタンパク質フラグメントと特異的に結合する抗体を産生する1またはそれ以上のハイブリドームを同定する。本発明は、この方法により作製されたハイブリドームおよびそのようなハイブリドームを用いて作製された抗体をも含む。

40

**【0042】**

本発明により、対象における前立腺癌または前立腺癌を進行させる危険性を評価する方法が提供される。これらの方法には、対象からサンプル(例えば、前立腺癌細胞または血

50

液細胞を含んでいるサンプル)を単離すること、前立腺癌を有しないことが公知の対象由来の第2サンプルに対する該サンプルにおける本発明のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの存在、量、および/または活性を検出することが含まれる。2つのサンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーのレベルを比較し、そして、試験サンプルにおけるマーカーの有意な増加が、対象における前立腺癌の存在または存在の危険性を示す。

【0043】

本発明により、対象における前立腺癌の重篤度を評価する方法も提供される。これらの方法には、対象からサンプル(例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル)を単離すること、前立腺癌を有しないことが公知の対象由来の第2サンプルに対して該サンプルにおける本発明のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの存在、量、および/または活性を検出することが含まれる。2つのサンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーのレベルを比較し、そして、試験サンプルにおけるマーカーの有意な増加が、対象における前立腺癌の重篤度合いに関連する。

10

【0044】

本発明により、対象において前立腺癌の重篤度を評価する方法も提供される。これらの方法には、対象からサンプル(例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル)を単離すること、前立腺癌を有しないことが公知の対象由来の第2サンプルに対して、サンプルにおける本発明のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの存在、量、および/または活性を検出することが含まれる。2つのサンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーのレベルを比較し、そして、試験サンプルにおけるマーカーの有意な増加は対象における前立腺癌の重篤度と関連する。

20

【0045】

本発明により、対象において治療する(即ち、前立腺癌を阻害する)方法も提供される。これらの方法には、対象からサンプル(例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル)を単離すること、前立腺癌を有しないことが公知の対象由来の第2サンプルに対して、サンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの存在、量、および/または活性を検出することが含まれる。2つのサンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーのレベルを比較し、そして、試験サンプルにおける1またはそれ以上のマーカーの対照サンプルに対する有意な増加または低下を観察する。発現または活性が有意に低下するマーカーに関しては、その発現されるマーカータンパク質を患者に投与してよく、または、低下したマーカーに対応するmRNAまたはDNAを誘導することにより処置して(例えば、遺伝子治療による)、それにより対象におけるマーカータンパク質のレベルを増す。発現または活性が有意に増加するマーカーに関しては、増加したマーカーに対するmRNAまたはDNAアンチセンスを投与してよく(即ち、遺伝子治療による)、またはマーカータンパク質に特異的な抗体を投与してよく、それにより対象におけるマーカータンパク質のレベルを低下させる。この方法にて、対象は前立腺癌を処置し得る。

30

【0046】

本発明により、対象における進行前立腺癌を予防する方法も提供される。これらの方法には、発現または活性が有意に低下するマーカーに関しては、対象におけるマーカータンパク質のレベルを増すためのそのマーカータンパク質の投与または低下したマーカーに対応するmRNAまたはDNAの誘導(例えば、遺伝子治療による)が含まれる。発現または活性有意に増加するマーカーに関しては、増加したマーカーに対するmRNAまたはDNAアンチセンスを投与してよく(即ち、遺伝子治療による)、またはマーカータンパク質に特異的な抗体を投与してよく、それにより対象におけるマーカータンパク質のレベルを低下させる。この方法にて、対象は前立腺癌を予防し得る。

40

【0047】

本発明により、対象における前立腺癌症状の治療または療法を評価する方法も提供される。これらの方法には、処置または治療を受けている前立腺癌に罹患している対象由来の

50

サンプル（例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいる）を単離すること、該症状のための処置または治療を全く受けていない前立腺癌に罹患している対象由来の第2サンプルに対する、およびまた、前立腺癌に罹患していない対象由来の第3サンプルに対する第1サンプルにおける本発明のFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの存在、量、および/または活性を検出することが含まれる。3つのサンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーのレベルを比較し、そして他のサンプルに対する第1サンプルにおけるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの有意な増加または低下を観察し、次いで、前立腺癌の存在または存在の危険性、または重篤度と関連付ける。前立腺癌がサンプルにおいて緩解または緩和されたことを評価することにより、前立腺癌を治療する治療または療法の能力をさらに決定する。

10

**【0048】**

本発明により、対象におけるアンドロゲン-依存性前立腺癌を診断する方法も提供される。該方法には、前立腺癌に罹患している対象由来のサンプル（例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル）を単離すること、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの、アンドロゲンの存在下および不在下での発現のレベルを測定すること、およびアンドロゲンの存在下および不在下でのFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現の差を比較することが含まれる。前立腺癌細胞は、アンドロゲンの不在下と比較してアンドロゲンの存在下でマーカーの発現が増加する場合、アンドロゲン依存性である。

**【0049】**

本発明により、前立腺癌に罹患している対象におけるアンドロゲン除去治療の効力を決定する方法も提供される。該方法には、対象サンプルにおいて第1のちょうどよい時点でFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現レベルを検出すること、および対象がアンドロゲン除去処置を開始した後に生じるその後のちょうどよい時点でFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現レベルを検出することが含まれる。第1および第2の時点で検出されるFKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーの発現のレベルを比較する。発現レベルの低下はアンドロゲン除去治療が低下効力を有することを示す。

20

**【0050】**

本発明により、前立腺癌の治療のための医薬組成物も提供される。これらの組成物には、（例えば、非前立腺癌細胞サンプルに対して前立腺癌細胞サンプルにおいて量または活性が低下するマーカーに関して）本発明のマーカータンパク質および/または核酸が含まれてよく、そして以下に記載するように処方することができる。別法として、これらの組成物には、（例えば、非前立腺癌細胞サンプルに対して前立腺癌細胞サンプルにおいて量または活性が増加するマーカーに関して）本発明のマーカータンパク質に特異的に結合する抗体および/または本発明のマーカー核酸に相補的なアンチセンス核酸分子が含まれてよく、そして本明細書中に記載するように処方することができる。

30

**【0051】**

本発明により、サンプル（例えば、前立腺癌の危険性のある対象由来のサンプル）における前立腺癌の存在を評価するためのキットであって、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーに対応するタンパク質に特異的に結合する抗体を含むキットも提供される。

40

**【0052】**

本発明により、対象（例えば、前立腺癌の危険性のある対象）由来のサンプルにおいて前立腺癌の存在を評価するためのキットであって、FKBPマーカー、例えばFKBP54マーカーに対応する転写ポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸プローブを含むキットがさらに提供される。

**【0053】**

本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための複数の化合物のそれぞれの適性を評価するためのキットがさらに提供される。そのようなキットには、試験されるべき複

50

数の化合物、および F K B P マーカー、例えば F K B P 5 4 マーカーの発現を評価するための試薬が含まれる。

【 0 0 5 4 】

本発明の前記組成物および方法に対する変更は、常套法に従い、当該分野の専門家には容易に理解されるであろうし、および本発明により包含されることになる。

本発明の理解を容易にするために、多くの用語および語句を以下に定義する。

【 0 0 5 5 】

本明細書中に用いられるように、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」なる用語は交換して用いることができ、そして、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはその類似体いずれか、あらゆる長さのヌクレオチドの重合形態を含む。ポリヌクレオチドはいずれの三次元構造をとってもよく、そして、公知または非公知のいずれの機能をなしてもよい。以下は、ポリヌクレオチドの無制限の例である。遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、メッセンジャー RNA (mRNA)、トランスファー RNA、リボソーム RNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、あらゆる配列の単離 DNA、あらゆる配列の単離 RNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、変更されたヌクレオチド、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体から成ってよい。存在する場合には、核酸構造に対する変更は、重合体の会合の前後になされてよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断されてよい。重合化後に、標識成分との結合によるなどしてポリヌクレオチドはさらに変更されてよい。該用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を含む。他が特記されない限り、または所望されない限り、ポリヌクレオチドである本発明のいずれの具体例も、二本鎖形態、および二本鎖形態を生じることが公知のもしくは予想される 2 つの相補的な一本鎖形態のそれぞれが包含される。

10

20

【 0 0 5 6 】

ポリヌクレオチドは、4 つのヌクレオチド塩基：アデニン (A) ; シトシン (C) ; グアニン (G) ; チミン (T) ; およびポリヌクレオチドが RNA の場合のグアニンに代わるウラシル (U) の特異的な配列から成る。ここで、「ポリヌクレオチド配列」なる用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表記のことである。このアルファベット表記は、中央処理装置を有するコンピューター中のデータベースに入力することができ、そして、機能性遺伝子および相同性検索などの生物学的情報のために用いることができる。

30

【 0 0 5 7 】

「遺伝子」には、転写および翻訳された後の特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる少なくとも一つのオープンリーディングフレームを含んでいるポリヌクレオチドが含まれる。本明細書中に開示するポリヌクレオチド配列のいずれかを用いて、それらが関連する遺伝子のより大きなフラグメントまたは完全長のコーディング配列を同定してよい。より大きなフラグメント配列を単離する方法が当該分野の専門家に公知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

【 0 0 5 8 】

「遺伝子産物」には、遺伝子が転写および翻訳されるときに作製されるアミノ酸 (例えば、ペプチドまたはポリペプチド) が含まれる。

40

ポリヌクレオチドの操作に関する内容において用いられる場合の「プローブ」には、目的のサンプル中に存在する標的を、標的とハイブリダイズすることにより検出するための試薬として提供されるオリゴヌクレオチドが含まれる。たいてい、プローブは、標識、またはハイブリダイゼーション反応の前後に標識が結合することができる手段から成る。適当な標識には、制限されるものではないが、ラジオアイソトープ、蛍光色素、化学ルミネセンス化合物、色素、および酵素を含むタンパク質が含まれる。

【 0 0 5 9 】

「プライマー」には、一般に、標的とハイブリダイズすることにより目的のサンプル中に存在する標的または「鋳型」に結合し、そしてその後、標的に相補的なポリヌクレオチドの重合化を進める、遊離 3' - OH 基を一般に有する短いポリヌクレオチドが含まれる

50

。「ポリメラーゼ鎖反応」(「PCR」)は、複製コピーが標的のポリヌクレオチドから成るところの、「上流」および「下流」プライマーから成る「プライマーの対」もしくは「プライマーのセット」、およびDNAポリメラーゼ、典型的には熱安定ポリメラーゼ酵素などの重合化触媒を用いる反応である。PCRのための方法は当該分野で周知であり、および例えば、MacPherson et al., IRL Press at Oxford University Press (1991)において教示されている。PCRまたは遺伝子クローニングなどの、ポリヌクレオチドの複製コピーを作製する全ての方法を、本明細書中まとめて「複製」と呼ぶ。プライマーは、サザンまたはノーザンブロット分析などのハイブリダイゼーション反応におけるプローブとしても用いることができる(Sambrook, J., Fritsh, E. F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照されたい。)。 10

#### 【0060】

「cDNA」なる用語には、逆転写酵素などの酵素でcDNAへと作製される、細胞または生物体に存在するmRNA分子である相補的DNAが含まれる。「cDNAライブラリー」には、逆転写酵素を用いてcDNAに変換され、次いで「ベクター」(外来DNAの付加後複製し続けることができる他のDNA分子)へと挿入される、細胞または生物体に存在するmRNA分子の集まりが含まれる。ライブラリーのための典型的なベクターには、細菌に感染するバクテリオファージ、ウイルス(例えば、ラムダファージ)が含まれる。ライブラリーは次いで、目的の特定のcDNA(およびつまりmRNA)に関してプローブすることができる。 20

#### 【0061】

「遺伝子送達媒体」には、宿主細胞に1またはそれ以上のポリヌクレオチドを挿入することができる分子が含まれる。遺伝子送達媒体の例は、リポソーム、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含む生物学的適合性ポリマー；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖類；リポ多糖類；人工ウイルスエンベローブ；金属粒子；および細菌、バキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスおよびウイルスベクター、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクター、および種々の真核および原核生物宿主における複製および/または発現に関して開示されている、当該分野で典型的に用いられる他の組換え媒体である。遺伝子送達媒体は、挿入されたポリヌクレオチドの複製、遺伝子治療、ならびに単にポリペプチドおよびタンパク質の発現のために用いられてよい。 30

#### 【0062】

「ベクター」には、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞へ、および/または宿主細胞の間に送達する自己複製核酸分子が含まれる。この用語には、核酸分子の細胞への挿入に主として機能するベクター、核酸の複製に主に機能する複製ベクター、およびDNAまたはRNAの転写および/または翻訳に機能する発現ベクターが含まれることを意図する。前記の機能の1つ以上を提供するベクターも意図する。

#### 【0063】

「宿主細胞」には、ベクターのための、もしくは外来核酸分子、ポリヌクレオチド、および/またはタンパク質の挿入のためのレシピエントであり得る、またはレシピエントであったあらゆる個々の細胞または培養細胞が含まれることを意図する。単細胞の子孫が含まれることも意図する。子孫はもとの親細胞に対して、自然の、偶発的な、または意図的な変異のために、(形態学的に、または遺伝子もしくは全相補DNAにおいて)必ずしも完全に同一でなくてよい。細胞は真核細胞のものもしくは原核細胞のものであってよく、および制限されるものではないが、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞、および哺乳動物細胞、例えばネズミ、ラット、サル、またはヒトの細胞が含まれる。 40

#### 【0064】

「遺伝子的に変更された」なる用語には、細胞の遺伝子型または表現型を変更する外来遺伝子または核酸配列を含んでいるおよび/または発現している細胞またはその子孫が含まれる。この用語には、細胞の内在性ヌクレオチドに対するいずれかの添加、欠失、または破壊が含まれる。 50

## 【 0 0 6 5 】

本明細書に用いられる「発現」なる用語には、ポリヌクレオチドを mRNA へ転写し、そしてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へと翻訳する方法が含まれる。ポリヌクレオチドがゲノム DNA から誘導される場合に、適当な真核生物の宿主が選択されるなら、発現には mRNA のスプライシングが含まれてよい。発現に必要とされる調節エレメントには、RNA ポリメラーゼに結合するプロモーター配列、およびリボソームの結合のための転写開始配列が含まれる。例えば、細菌発現ベクターには、lac プロモータなどのプロモーター、および翻訳開始のためのシャイン・ダルガルノ配列および開始コドン AUG が含まれる (Sambrook, J., Fritsch, E. F., および Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。同様に真核生物発現ベクターには、RNA ポリメラーゼ II のための異種もしくは同種プロモーター、下流ポリアデニル化シグナル、短いコドン AUG、およびリボソームの脱離のための終止コドンが含まれる。そのようなベクターは、市場入手することができるか、当該分野の専門家に周知の方法、例えばベクターを構築するために以下に記載する方法にて、記載される配列により、または組み立てることができる。

10

## 【 0 0 6 6 】

遺伝子に対して用いられる「差異的に発現された」には、遺伝子から転写される mRNA または遺伝子によりコードされるタンパク質産物の差異的な発現が含まれる。差異的に発現された遺伝子は、正常または対照細胞の発現レベルと比較して過剰発現されるか、または発現が不足してよい。一態様において、対照サンプルにおいて検出される発現レベルよりも、2.5 倍、好ましくは 5 倍、または好ましくは 10 倍高いか、または低い差が含まれる。「差異的に発現された」なる用語には、対照細胞中にてサイレントである場合に発現される、または対照細胞において発現される場合に発現されない、細胞または組織におけるヌクレオチド配列も含まれる。

20

## 【 0 0 6 7 】

「ポリペプチド」には、2 またはそれ以上のサブユニットのアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチドミメティクスから成る化合物が含まれる。サブユニットはペプチド結合により結合してよい。他の具体例において、サブユニットは、例えば、エステル、エーテルなどの他の結合により結合してよい。本明細書中に用いられるように、「アミノ酸」なる用語には、グリシン含む天然および/または非天然または合成アミノ酸、および D または L 両光学異性体、およびアミノ酸類似体ならびにペプチドミメティクスのいずれかが含まれる。3 またはそれ以上のアミノ酸のペプチドが一般にオリゴペプチドと呼ばれる。3 またはそれ以上のアミノ酸から成るペプチド鎖を、ポリペプチドまたはタンパク質と呼ぶ。

30

## 【 0 0 6 8 】

「ハイブリダイゼーション」には、1 またはそれ以上のポリヌクレオチドを反応させて、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化された複合体を形成する反応が含まれる。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対形成、フーグスティーン型結合により、またはいずれかの他の配列特異的様式にて起こり得る。複合体は、二本鎖構造を形成している 2 本鎖、多重鎖複合体を形成している 3 またはそれ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイジング鎖、またはこれらのいずれかの組み合わせを含んでよい。ハイブリダイゼーション反応は、より拡張型のプロセスにおいては、PCR 反応の開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素分解などステップを含んでよい。

40

## 【 0 0 6 9 】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーには、いずれかの 2 つの核酸分子が互いにハイブリダイズする困難性が含まれる。ストリンジェント条件下で互いに対して少なくとも 60%、65%、70%、75% 同一の核酸分子は互いにハイブリダイズを維持し、一方、低パーセント同一性の分子はハイブリダイズを維持することはできない

50

。高いストリンジェントハイブリダイゼーション条件の無制限の例は、 $6 \times$  塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中約 45 にてのハイブリダイゼーションの後、 $0.2 \times$  SSC、 $0.1\%$  SDS 中 50 にて、好ましくは 55 にて、より好ましくは 60 にて、およびいっそう好ましくは 6 にて 1 回またはそれ以上洗浄を行うことである。

#### 【0070】

ハイブリダイゼーションが 2 つの一本鎖ポリヌクレオチドの間で逆平行の配置で生じる場合、反応は「アニーリング」と呼ばれ、そしてこれらのポリヌクレオチドは「相補的」と記載される。二本鎖ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが第 1 のポリヌクレオチドの鎖の一つと第 2 のものとの間で生じ得る場合、他方のポリヌクレオチドに対して「相補」または「相同」であり得る。「相補性」または「相同性」(1 つのポリヌクレオチドが他方に対して相補的である程度)は、一般に認められている塩基対形成の法則に従い、互いに結合する水素結合することが期待される反対側の鎖中の塩基の割合に関して定量できる。

10

#### 【0071】

「抗体」には、抗原上に存在するエピトープに結合することができる免疫グロブリン分子が含まれる。本明細書中に用いられるように、該用語は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体などの完全な免疫グロブリン分子のみならず、抗イディオタイプ抗体、変異体、フラグメント、融合タンパク質、二重特異性抗体、ヒト化タンパク質、および必要とされる特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子変異体が含まれる。

#### 【0072】

本明細書中、「前立腺癌」(CaP)なる用語は、男性において一般に発生する用語に関して、当業者に認識される使用を意味する。「前立腺癌」なる用語は、前立腺の触診可能な腫瘍の発生、およびまた、前立腺における顕微鏡にて検出可能な腫瘍性細胞または形質転換細胞の両方を意味する。後者の場合、当該細胞学的に検出可能な前立腺癌は、患者も医者も癌細胞の存在を検出できない点において無症候性であり得る。癌細胞は 70 歳または 80 歳まで生きている男性の前立腺において一般に見出されるが、これらの男性の全てが前立腺癌を進行させるわけではない。前立腺癌が前立腺と離れた遠位の部位に転移する現象においては、疾患は転移性癌(MC)と記載し、臓器でおさまっている前立腺癌からこの症状を区別する。CaPによる死亡は、離れた部位、通常中軸骨格への前立腺癌の転移による分散により起こる。

20

30

#### 【0073】

本明細書中に用いられるように、「マーカー」なる用語には、前立腺癌に罹患した対象においてまたは前立腺癌に関与する細胞において、存在するかもしれない、または量もしくは活性が増加もしくは低下したポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子が含まれる。マーカーの量または活性の相対的变化は、前立腺癌の発生または発生の危険性と関連する。

#### 【0074】

本明細書中に用いられるように、「マーカーのパネル」なる用語には、各メンバーの量または活性が前立腺癌の発生または発生の危険性と関連している、マーカー群が含まれる。所定の具体例においては、マーカーのパネルには、前立腺癌に罹患した対象または前立腺癌に関与する、細胞において量または活性が増加または低下するマーカーのみ含まれてよい。他の具体例において、マーカーのパネルには、前立腺癌の発生または発生の危険性に関連する特定の組織タイプに存在するマーカーのみが含まれてよい。

40

本発明の種々の態様を、以下のサブセクションにより詳細に記載する。

#### 【0075】

##### I. 単離核酸分子

本発明の一態様は、それ自体が本発明の遺伝子マーカー(例えば、mRNA)であるか、または本発明のポリペプチドマーカーをコードする単離核酸分子またはそのフラグメントに関する。本発明の他の態様は、サンプル中の本発明のマーカーをコードしてい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フラ

50

グメントならびに本発明のマーカ-をコードする核酸分子の増幅または変異のためのPCRプライマーとして用いるためのヌクレオチドフラグメントに関する。本明細書中に用いる「核酸分子」なる用語には、DNA分子（例えばcDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）およびヌクレオチド類似体を用いて作製されるDNAまたはRNAの類似体が含まれることを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0076】

「単離核酸分子」なる用語には、天然の核酸源中に存在する他の核酸分子から分離される核酸分子が含まれる。例えば、ゲノムDNAに関して、「単離された」なる用語には、ゲノムDNAが本来関連している染色体から分離される核酸分子が含まれる。好ましくは、「単離された」核酸分子は、核酸が由来する生物体のゲノムDNA中の核酸に本来隣接している配列（即ち、核酸の5'および3'末端に位置する配列）から分離される。例えば、種々の具体例において、本発明の単離されたマーカ-核酸分子、または本発明のポリペプチドマーカ-をコードしている核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNA中の核酸分子に本来隣接する約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含むことができる。さらに、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子は、組換え法により作製される場合、他の細胞物質または培養培地から実質上遊離し得、または化学的に合成された場合、ケミカルプレカ-サーまたは他の化学物質から実質上遊離し得る。

10

【0077】

本発明の核酸分子、例えば、FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子の一つのヌクレオチド配列を有する核酸分子にまたはその部分は、本明細書中に提供される常套の分子生物学的技術および配列情報を用いて単離することができる。FKBP遺伝子、例えばFKBP54の一つの核酸配列の全部または部分をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、本発明のマーカ-遺伝子または本発明のポリペプチドマーカ-をコードしている核酸分子を、常套のハイブリダイゼーション法およびクローニング法（例えば、Aambrook, J., Fritsch, E.F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されている）を用いて単離することができる。

20

【0078】

本発明の核酸は、cDNA、mRNA、またはそれとは別にゲノムDNAを鋳型および適当なオリゴヌクレオチドプライマーとして用い、常套のPCR増幅法に従い増幅することができる。そのように増幅された核酸は、適当なベクター中にクローニングすることができ、そして、DNA配列分析により特定することができる。さらに、マーカ-ヌクレオチド配列に対応しているオリゴヌクレオチドまたは本発明のマーカ-をコードしているヌクレオチド配列は、常套法により、例えば自動DNA合成装置を用いて調製することができる。

30

【0079】

他の好ましい具体例において、本発明の単離核酸分子には、本発明のマーカ-、即ち、FKBP54のヌクレオチド配列またはこれらのヌクレオチド配列の部分に相補的な核酸分子が含まれる。そのようなヌクレオチド配列に相補的な核酸分子は、該ヌクレオチド配列にハイブリダイズしてそれにより安定な二本鎖を形成することができるほどにヌクレオチド配列に対して十分相補的なものである。

40

【0080】

本発明の核酸分子はさらに、本発明のマーカ-核酸の核酸配列の部分、本発明のマーカ-ポリペプチドをコードしている遺伝子、例えば、プローブまたはプライマーとして用いられることができるフラグメントのみから成ることができる。プローブ/プライマーは、典型的には、実質上精製されたオリゴヌクレオチドを含む。該オリゴヌクレオチドは典型的には、ストリンジェント条件下で、マーカ-核酸または本発明のマーカ-ポリペプチドをコードしている核酸の少なくとも約7または15、好ましくは約20または25、より

50

好ましくは約50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、400またはそれ以上の連続した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が含まれる。

【0081】

本発明のマーカー遺伝子またはマーカーポリペプチドをコードしている核酸分子のヌクレオチド配列に基づくプローブを用いて、本発明のマーカー遺伝子および/またはマーカーポリペプチドに対応する転写産物またはゲノム配列を検出することができる。好ましい具体例において、プローブはそれに結合した標識群を含み、例えば、標識群はラジオアイソトープ、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。そのようなプローブを、本発明のマーカーポリペプチドを誤発現する（例えば、過剰発現または発現不足）、または本発明のマーカー遺伝子のより多くのもしくはもっと少ないコピーを有する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として用いることができる。例えば、対象由来の細胞のサンプル中のマーカーポリペプチドをコードしている核酸のレベルを検出してよく、マーカーポリペプチドをコードしているmRNA転写産物の量を測定してよく、または本発明のマーカー遺伝子の変異または欠失の存在を評価してよい。

10

【0082】

本発明はさらに、遺伝子コードの縮重のためにFKBP遺伝子、例えばFIB54遺伝子の核酸配列とは異なり、そしてFKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子によりコードされるタンパク質と同じタンパク質をコードする核酸分子を包含する。

【0083】

FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子のヌクレオチド配列に加えて、FKBP遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に変化を生じるDNA配列多形が個体群（例えばヒト個体群）の中に存在し得ることが当業者には認識されるであろう。FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子におけるそのような遺伝子多形は、天然対立変種により個体群中の個体間に存在し得る。対立変種は、所定の遺伝子座に二者択一的に生じる遺伝子の群の一つである。加えて、遺伝子の全発現レベルに（例えば調節または破壊により）影響し得るRNA発現レベルに影響するDNAの多形も存在し得る。本明細書中に用いられるように、「対立変種」なる用語には、所定の座で生じる核酸配列、または該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが含まれる。本明細書中に用いられるように、「遺伝子」および「組換え遺伝子」なる用語は、本発明のマーカーポリペプチドをコードしているオープンリーディングフレームを含む核酸分子を意味する。

20

30

【0084】

本発明のFKBP遺伝子、例えばFKBP54マーカー遺伝子またはFKBP、例えばFKBP54マーカータンパク質をコードしている遺伝子の天然の対立変種および相同物に対応する核酸分子は、FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子に対するその相同性に基いて、本明細書に開示するcDNAまたはその部分をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、常套のハイブリダイゼーション法に従い、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で単離することができる。本発明のマーカー遺伝子の天然対立変種および相同物に対応する核酸分子は、本発明のマーカー遺伝子またはマーカータンパク質をコードしている遺伝子と同じ染色体または座に対するマッピングによっても単離することができる。

40

【0085】

他の具体例において、本発明の単離核酸分子は、長さにして少なくとも15、20、25、30、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、またはそれ以上のヌクレオチドであり、マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子の核酸配列に対応している核酸分子に対してストリンジェント条件下でハイブリダイズする。本明細書中に用いられる「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」なる用語は、互いに少なくとも60%

50

相同なヌクレオチド配列が互いに典型的にハイブリダイズしたまま留まる、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する条件を記載することを意図する。好ましくは、該条件は互いに対して約少なくとも70%、より好ましくは少なくとも約80%、いっそうより好ましくは少なくとも約85%または90%相同な配列が、互いに典型的にハイブリダイズしたまま留まるような条件である。そのようなストリンジेंट条件は当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。ストリンジेंटハイブリダイゼーション条件の好ましい、無制限の例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約65にてのハイブリダイゼーションの後、0.2×SSC、0.1%SDS中50にて、好ましくは55にて、よりいっそう好ましくは60にて、およびいっそうより好ましくは65にての1回またはそれ以上の洗浄を行うことである。好ましくは、FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子の一つの配列にストリンジेंट条件下でハイブリダイズする本発明の単離核酸分子。本明細書中に用いられるように、「天然に生じる」核酸分子には、天然に生じるヌクレオチド配列(例えば、天然のタンパク質をコードする)を有するRNAまたはDNA分子が含まれる。

#### 【0086】

個体群中に存在し得る、本発明のマーカータンパク質およびマーカータンパク質をコードしている遺伝子の天然に生じる対立変種に加えて、当業者は、本発明のマーカータンパク質またはマーカータンパク質をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列に変異を誘導し、それによりこれらのタンパク質の機能活性を変更することなくコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させることができることをさらに認識するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換を導くヌクレオチドの置換をなすことができる。「非-必須」アミノ酸残基は、生物活性を変更することなくタンパク質の野生型配列から変更され得た残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は生物活性に必要である。例えば、遺伝子の対立変種または相同物の間(例えば、異なる種由来の遺伝子の相同物間)に保存されているアミノ酸残基は特に変化に従わないことが予想される。

#### 【0087】

従って、本発明の更なる態様は、活性に必須でないアミノ酸分子の変化を含む本発明のマーカータンパク質をコードしている核酸分子に関する。そのようなタンパク質は、FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子によりコードされるマーカータンパク質からアミノ酸配列が異なっているが、生物活性は保持する。一の実例において、タンパク質は、本発明のマーカータンパク質に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の相同性を含む。

#### 【0088】

本発明のマーカータンパク質に相同なタンパク質相同物をコードしている単離核酸分子は、1またはそれ以上のアミノ酸置、付加、または欠失がコードされるタンパク質に導入されるように、マーカータンパク質をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列に1またはそれ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を誘導することにより作製することができる。変異は、部位指向性突然変異誘発およびPCRによる突然変異誘発などの常套法により、本発明のFKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子に導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換を、1またはそれ以上の予測される非必須アミノ酸残基にてなす。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖(例えば、リジン、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)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(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-分枝側鎖(例えば、トレオニン、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)を有するアミノ酸が含まれる。別法として、変異は

10

20

30

40

50

本発明の遺伝子のコーディング配列の全部または部分に沿って、飽和突然変異によるなどして無作為に導入することができ、そして、生じた変異体を生物学的活性に関してスクリーニングして、活性を保持する変異体を同定することができる。突然変異誘発の後で、コードされるタンパク質を組換え発現させることができ、そしてタンパク質の活性を測定することができる。

#### 【0089】

本発明の別の態様は、本発明のマーカー遺伝子およびマーカータンパク質をコードしている遺伝子に対してアンチセンスである単離核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードしている「センス」核酸に相補的な、例えば、二本鎖のcDNA分子のコーディング鎖に相補的もしくはmRNA配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸はセンス核酸に対して水素結合することができる。アンチセンス核酸は、FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子の全コーディング鎖、またはその部分のみに対して相補的であり得る。一具体例において、アンチセンス核酸分子は、本発明のヌクレオチド配列のコーディング鎖の「コーディング領域」に対してアンチセンスである。「コーディング領域」なる用語は、アミノ酸へと翻訳されるコドンを含んでいるヌクレオチド配列の領域を含む。他の具体例において、アンチセンス核酸分子は、本発明のヌクレオチド配列のコーディング鎖の「非コーディング領域」に対してアンチセンスである。「非コーディング領域」なる用語には、アミノ酸に翻訳されない、コーディング領域に隣接する5'および3'配列が含まれる(即ち、5'および3'非翻訳領域とも呼ばれる)。

10

20

#### 【0090】

本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンおよびクリックの塩基対形成の法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は本発明の遺伝子に対応するmRNAの全コーディング領域に相補的であり得るが、より好ましくは、コーディングまたは非コーディング領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さにして約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の方法を用いて化学合成および酵素ライゲーション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)は、天然に生じるヌクレオチドを用いて、または分子の生物学的安定性を増すためもしくはアンチセンスおよびセンス核酸の間に形成される二本鎖の物理的安定性を増すために設計された種々の変更ヌクレオチドを用いて化学的に合成することができ、例えばチオリン酸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作製するのに用いることができる変更ヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、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-ガラクトシルキューオシン、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-マンノシルキューオシン、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)、ウィプトキソシン(wybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、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-ジアミノプリンが含まれる。別に、アンチセンス核酸は、核酸をアンチセンスの方向でサブクローンした発現ベクターを用

30

40

50

いて生物学的に作製することができる(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するように目的の標的核酸に対してアンチセンスの方向である)。

#### 【0091】

本発明のアンチセンス核酸分子は、それらが本発明のマーカートンパク質をコードしている細胞内mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするかまたはそれに結合し、それによって、例えば転写および/または翻訳を阻害することによりタンパク質の発現を阻害するように、典型的に対象へ投与され、またはインサイチュで作製される。ハイブリダイゼーションは、安定な二本鎖を形成するための常套のヌクレオチド相補性によるものであり得、または例えば、DNA二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用によるものであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例には、組織部位(例えば、皮膚)における直接の注射が含まれる。別法として、アンチセンス核酸分子は、標的選択細胞に対して変更して、次いで全身に投与することができる。例えば、全身投与のためには、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞の表面において発現されるレセプターまたは抗原に特異的に結合するように、例えば細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に対してアンチセンス核酸分子を結合させることにより変更することができる。アンチセンス核酸分子は、本明細書中に開示する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を強いp o l I Iまたはp o l I I Iプロモーターの対照下に置いたベクター構築物が好ましい。

10

20

#### 【0092】

さらに他の具体例においては、本発明のアンチセンス核酸分子は - アノマー核酸分子である。 - アノマー核酸分子は、通常の ユニットとは違って鎖が互いに平行に走っている、相補的RNAと特徴的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids. Res. 15: 6625-6641)。アンチセンス核酸分子は、2' - o - メチルリボヌクレオチド(Inoue et al. (1987) REBS Lett. 215: 327-330)またはキメラRNA DNA類似体(Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215: 327-330)をも含み得る。

#### 【0093】

さらに他の具体例において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それらが相補的な領域を有するところの一本鎖核酸、例えばmRNAなどを分解することができる、リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。つまり、リボザイム(例えば、ハンマーヘッド型リボザイム(Haselhoff and Gerlach (1988) Nature 334: 585-591)に開示されている))を用いて、本発明のFKBP54遺伝子のmRNA転写産物を触媒分解して、それによりこのmRNAの翻訳を阻害することができる。マーカートンパク質をコードしている核酸に対して特異性を有するリボザイムを、本明細書中に開示する本発明の遺伝子のヌクレオチド配列に基いて設計することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、マーカートンパク質をコードしているmRNAにおける分解されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なテトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体を構築することができる。例えば、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を参照されたい。別法として、本発明の遺伝子から転写された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. D. and Szostak, J. W. (1993) Science 261: 1411-1418を参照されたい。

30

40

#### 【0094】

別法として、FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子の発現は、これらの遺伝子の調節領域(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をターゲティングし、標的細胞において遺伝子の転写を妨げる3重らせん構造を形成することにより阻害することができる。一般的には、Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, C. et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36;およびMaher, L. J. (1992) Bioassays 14(12): 807-15を参照されたい。

50

## 【0095】

さらに別の態様では、本発明の核酸分子を塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で変更して、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変更して、ペプチド核酸を作製することができる(Hyrup B. et al. (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23を参照されたい)。本明細書に用いられる「ペプチド核酸」または「PNAs」なる用語は、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り置換され、および4つの天然の核酸塩基のみ保持されている核酸ミメティクス、例えばDNAミメティクスを意味する。PNAの中性骨格は、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを許容することが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup B. et al. (1996) 既出; Perry-O'Keefe et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675に開示されている常套の固相ペプチド合成プロトコールを用いて行うことができる。

10

## 【0096】

PNAは治療および診断における適用に用いることができる。例えば、PNAは、例えば転写または翻訳停止を誘導することもしくは複製を阻害することによる遺伝子発現の配列特異的変更のための、アンチセンスまたはアンチ遺伝子試薬として用いることができる。FKBP、例えばFKBP54の核酸分子のPNAは、遺伝子における単一塩基対変異の分析(例えばPNA指向性PCRクランピングによる)において;他の酵素(例えば、S1ヌクレアーゼ(Hyrup B. (1996) 既出)と組み合わせて用いられる場合の「人工制限酵素」として;またはDNAの配列決定または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として(Hyrup B. (1996) 既出; Perry-O'Keefe 既出)用いることもできる。

20

## 【0097】

他の具体例において、PNAは(例えば、その安定性または細胞の取り込みを高めるために)、PNAへ脂肪親和性基または他のヘルパー基を結合することにより、PNA-DNAキメラの形成により、またはリポソームまたは当該分野で公知の他の薬物送達法の使用により変更することができる。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組み合わせるとよい本発明の核酸分子のPNA-DNAキメラを作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RNaseHおよびDNAポリメラーゼ)がDNA部分と相互作用することを許容し、一方、PNA部分は高い結合アフィニティおよび特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核酸塩基間の結合の数、および配向に関して選択される適当な長さのリンカーを用いて結合させることができる(Hyrup B. (1996) 既出)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup B. (1996) 既出およびFinn P. J. et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24(17): 3357-63に記載されるように行うことができる。例えば、DNA鎖は常套のホスホールアミダイトカップリング化学反応を用いて固体支持体上にて合成することができ、および変更されたヌクレオシド類似体、例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホールアミダイトをPNAおよびDNA 5'末端間に用いることができる(Mag, M. et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17: 5973-88)。PNAモノマーを次いで段階を追って結合させて、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を作製する(Finn P. J. et al. (1996) 既出)。別法として、キメラ分子は、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを用いて合成することができる(Peterser, K.H. et al. (1975) Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124)。

30

40

## 【0098】

他の具体例では、オリゴヌクレオチドには、(例えばインピボで宿主細胞レセプターを標的するための)ペプチドなどの他の付随基、または細胞膜(Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556; Lemaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652; PCT公開第WO88/09810を参照されたい)または血液-脳関門(例えば、PCT公開第WO89/10134を参照されたい)を横切る輸送を促進する試薬が含まれてよ

50

い。加えて、オリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーション - 誘発分裂試薬(例えば、Kroli et al. (1988) Bio-Techniques 6: 958-976を参照されたい。)または挿入試薬(例えば、Zon(1988) Pharm. Res. 5: 539-549を参照されたい。)を用いて変更することができる。この目的のために、オリゴヌクレオチドは他の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、転移剤、またはハイブリダイゼーション - 誘発分裂試薬など)に結合させてよい。最終的に、オリゴヌクレオチドは、標識が他の試薬(例えば、酵素標識のための基質)の添加により検出され、またはヌクレオチドのハイブリダイゼーションの際、すぐに検出されるように(例えば、放射能活性標識または蛍光標識(例えば、米国特許第5,876,930に開示される分子ビーコン))、検出できるように標識されてよい。

【0099】

#### II. 単離タンパク質および抗体

本発明の一態様は、単離マーカータンパク質およびその生物学的に活性な部分、ならびに抗-マーカータンパク質抗体を増大させるための免疫原としての使用に適したポリペプチドフラグメントに関する。一具体例において、天然のマーカータンパク質を、常套のタンパク質精製法を用いて適当な精製スキームにより細胞または組織源から単離することができる。他の具体例では、マーカータンパク質は、組換えDNA法により作製する。組換え発現に代えて、マーカータンパク質またはポリペプチドは、常套のペプチド合成法を用いて化学的に合成することができる。

【0100】

「単離された」または「精製された」タンパク質または生物学的に活性なその部分は、マーカータンパク質が由来する細胞または組織源からの細胞物質または他の混在タンパク質を実質上含まず、または化学的に合成された場合、ケミカルプレカーサーまたは他の化学物質を実質上含まない。「細胞物質を実質上含まない」には、タンパク質が単離もしくは組換え作製された細胞の細胞内成分からタンパク質が分離されているところのマーカータンパク質調製物が含まれる。一具体例において、「実質上細胞物質を含まない」なる用語には、少なくとも約30%(乾燥重量にて)の非マーカータンパク質(本明細書中、「混在タンパク質」とも呼ぶ)、より好ましくは約20%未満の非マーカータンパク質、さらにいっそう好ましくは約10%未満の非マーカータンパク質、およびより好ましくは約5%未満の非マーカータンパク質を有するマーカータンパク質調製物が含まれる。マーカータンパク質または生物学的に活性なその部分が組換え作製される場合、好ましくは培養培地を含まず、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の約20%未満、より好ましくは約10%未満、および最も好ましくは約5%未満を示す。

【0101】

「実質上ケミカルプレカーサーまたは他の化学物質を含まない」なる用語には、タンパク質が、タンパク質の合成に関与するケミカルプレカーサーまたは他の化学物質から単離されているマーカータンパク質調製物が含まれる。一具体例において、「実質上ケミカルプレカーサーまたは他の化学物質を含まない」なる用語には、約30%未満(乾燥重量にて)のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質、より好ましくは約20%未満のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質、いっそうより好ましくは約10%未満のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質、および最も好ましくは約5%未満のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質を有するタンパク質調製物が含まれる。

【0102】

本明細書に用いられるように、マーカータンパク質の「生物学的に活性な部分」には、マーカータンパク質のアミノ酸配列に対して十分相同なもしくはそれから誘導されたアミノ酸配列であって、全長のマーカータンパク質よりも少数のアミノ酸を含み、およびマーカータンパク質の少なくとも一活性を示すアミノ酸配列から成るマーカータンパク質のフラグメントが含まれる。典型的には、生物学的に活性な部分は、マーカータンパク質の少なくとも一活性を有するドメインまたはモチーフから成る。マーカータンパク質の生物学的に活性な部分は、長さにして例えば、10、25、50、100、200、またはそれ

10

20

30

40

50

以上のアミノ酸であるポリペプチドであり得る。マーカートンパク質の生物学的に活性な部分は、マーカートンパク質媒介性の活性を調節する試薬を開発するための標的として用いることができる。

#### 【0103】

好ましい具体例において、マーカートンパク質はFKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子によりコードされる。他の具体例において、マーカートンパク質はFKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子によりコードされるマーカートンパク質と実質上相同であり、およびマーカートンパク質の機能活性を保持するが、天然の対立変種または突然変異誘発のためにアミノ酸配列が異なっている（前記のサブセクションIで詳細に記載のごとく）。従って、他の具体例において、マーカートンパク質は、FKBP遺伝子、例えばFKBP54遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上相同なアミノ酸配列を含むタンパク質である。

10

#### 【0104】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、配列を最適の比較のために並べる（例えば、最適の整列のために第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列中にギャップを導入し、そして非相同配列を比較効果のために無視することができる）。好ましい具体例において、比較のために並べられる引用配列の長さは、引用配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、いっそうより好ましくは少なくとも60%、およびさらにいっそう好ましくは少なくとも70%、80%、または90%である。対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを次いで比較する。第1配列中の位置が第2配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占有されている場合、分子はその位置で同一である（本明細書中に用いられるように、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と同意義である）。2つの配列間のパーセント同一性は、配列が共有する同じ位置の数に関して相関関係にあるものであり、2つの配列の最適の整列のために導入されるのが必要なギャップの数および各ギャップの長さを考慮する。

20

#### 【0105】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数理的なアルゴリズムを用いて行うことができる。好ましい具体例において、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>より入手可能)中のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman-Wunsch(J. Mol. Biol. (48): 444-453(1970))アルゴリズムを用いて、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、および16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重量(gap weight)および1、2、3、4、5、または6の長さ重量(length weight)を用いて決定した。さらに他の好ましい具体例では、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>にて入手可能)中のGAPアルゴリズムを用いて、NWSgapdna.CMPマトリックスおよび40、50、60、70、または80のギャップ重量および1、2、3、4、5、または6の長さ重量を用いて決定する。他の具体例では、2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE.Meyers-W.Miller(CABIOS, 4: 11-17(1989))のアルゴリズムを用いて、PAM120重量残基表(weight residue table)、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを用いて決定する。

30

40

#### 【0106】

本発明の核酸およびタンパク質配列は、例えば他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定するために、公のデータベースに対して検索を行うための「質問配列」としてさらに用いることができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTおよびXBLASTアルゴリズム(バージョン2.0)を用いて行うことができる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア=100、単語長(word

50

length) = 12 を用いて行い、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア = 50、単語長 = 3 を用いて行い、本発明のマーカータンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためのギャップ整列を得るために、Gapped BLASTをAltschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402に記載されているように用いることができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを用いる場合、個々のプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを用いることができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

#### 【0107】

本発明により、キメラまたは融合マーカータンパク質も提供される。本明細書中に用いるように、マーカータンパク質または「融合タンパク質」は、非-マーカータンパク質に作用的に結合したマーカータンパク質を含む。「マーカータンパク質」には、FKBP54によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれるが、「非-マーカータンパク質」には、マーカータンパク質と実質上相同でないタンパク質、例えばマーカータンパク質と異なる、および同一もしくは異なる生物体から誘導されるタンパク質に対応しているアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれる。マーカータンパク質において、タンパク質はマーカータンパク質の全部または一部に対応し得る。好ましい具体例において、マーカータンパク質は、マーカータンパク質の少なくとも一つの生物学的に活性な部分から成る。融合タンパク質において、「作用的に結合した」なる用語は、マーカータンパク質および非マーカータンパク質が互いにインフレームで融合していることを示すことを意図する。非マーカータンパク質は、マーカータンパク質のN末端またはC末端に融合することができる。

#### 【0108】

例えば、一具体例において、融合タンパク質は、マーカータンパク質のC末端に融合したGST-マーカータンパク質である。そのような融合タンパク質は、組換えマーカータンパク質の精製を容易にすることができる。

#### 【0109】

他の具体例において、融合タンパク質は、そのN末端に異種構造シグナル配列を含んでいるマーカータンパク質である。所定の宿主細胞(例えば、哺乳動物の宿主細胞)において、異種構造シグナル配列の使用によりマーカータンパク質の発現および/または分泌を増すことができる。そのようなシグナル配列は当該分野で周知である。

#### 【0110】

本発明のマーカータンパク質は、本明細書に記載されているように、医薬組成物中に組み込むことができ、およびインビボで対象に投与することができる。マーカータンパク質を用いて、マーカータンパク質基質の生物学的利用能に影響を及ぼすことができる。マーカータンパク質の使用は、例えば、(i)マーカータンパク質をコードしている遺伝子の異常な変更または変異；(ii)マーカータンパク質をコードしている遺伝子の誤調節；および(iii)マーカータンパク質の異常な翻訳後の変更により引き起こされる疾患(例えば前立腺癌)の処置のために、治療的に有用であり得る。

#### 【0111】

さらに、本発明のマーカータンパク質を免疫原として用いて、対象において抗-マーカータンパク質抗体を産生すること、マーカータンパク質リガンドを精製すること、およびスクリーニングアッセイにおいてマーカータンパク質のマーカータンパク質基質との相互作用を阻害する分子を同定することができる。

#### 【0112】

好ましくは、本発明のマーカータンパク質もしくは融合タンパク質は、常套の組換えDNA法により作製される。例えば、異なるタンパク質配列をコードしているDNAフラグメントを常套法に従い、例えばライゲーションのためのプラント末端または付着末端、適当な末端を提供するための制限酵素消化、適当な付着末端の付着、望ましくない連結を防ぐためのアルカリホスファターゼ処理および酵素によるライゲーションを用いることにより

10

20

30

40

50

、インフレームで連結する。他の具体例においては、融合遺伝子は、自動DNA合成装置を含む常套法により合成することができる。別法として、後にアニールおよび再増幅される2つの連続する遺伝子フラグメント間に相補的張出部分を生じるアンカープライマーを用いて遺伝子フラグメントのPCR増幅を行い、キメラ遺伝子配列を作製することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照されたい。)。さらに、融合部分(例えば、GSTポリペプチド)をすでにコードする多くの発現ベクターが市場入手可能である。マーカータンパク質をコードしている核酸を、融合部分がマーカータンパク質にインフレームで結合するように、そのような発現ベクターにクローニングすることができる。

#### 【0113】

シグナル配列を用いて、目的の分泌タンパク質または他のタンパク質の分泌および単離を容易にすることができる。シグナル配列は典型的には、分泌の間に1またはそれ以上の切断現象にて成熟タンパク質から一般的に切断される疎水性アミノ酸のコアにより特徴づけられる。そのようなシグナルペプチドは、分泌経路を経る際の成熟タンパク質からのシグナル配列の切断を許容するプロセシング部位を含む。つまり、本発明は、シグナル配列を有する前記ポリペプチド、ならびにシグナル配列がタンパク質分解により切断されたポリペプチド(即ち、切断産物)に関する。一具体例において、シグナル配列をコードしている核酸配列を、通常は分泌されないかまたはそれ以外には単離するのが困難なタンパク質などの目的のタンパク質に対して、発現ベクターにおいて作用的に結合させることができる。シグナル配列は、発現ベクターを形質転換する真核生物の宿主からのタンパク質などのタンパク質の分泌を指向し、そしてシグナル配列はその後または同時に切断される。タンパク質は次いで、当業者に認識される方法により細胞体媒質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、例えばGSTドメインを有する精製を容易にする配列を用いて、目的のタンパク質に結合させることができる。

#### 【0114】

本発明はさらに、マーカータンパク質に対してアゴニスト(ミメティクス)として、またはアンタゴニストとして機能する、本発明のマーカータンパク質の変種に関する。マーカータンパク質の変種は、マーカータンパク質の突然変異誘発、例えば不連続の点突然変異または先端の切断により作製することができる。マーカータンパク質のアゴニストは、マーカータンパク質の天然に生じる形態の実質上同一のまたはサブセットの生物学的活性を保持し得る。マーカータンパク質のアンタゴニストは、例えばマーカータンパク質の活性を競合的に変更することにより、マーカータンパク質の天然に生じる形態の活性の1またはそれ以上を阻害することができる。つまり、機能が制限された変種を用いる処置により、特定の生物効果を引き出すことができる。一具体例において、タンパク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対象の処置は、マーカータンパク質の天然に生じる形態での処置に対して、対象における副作用が少ない。

#### 【0115】

マーカータンパク質アゴニスト(ミメティクス)またはマーカータンパク質アンタゴニストいずれかとして機能するマーカータンパク質の変種は、マーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性に関するマーカータンパク質の変異体、例えば先端切断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り同定することができる。一具体例において、マーカータンパク質の変種の多様なライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発により作製され、そして多様な遺伝子ライブラリーによりコードされる。マーカータンパク質の変種の多様なライブラリーは、例えば、潜在的なマーカータンパク質配列の縮重セットが別個のポリペプチドとして、または別に、本明細書中のマーカータンパク質配列のセットを含んでいる大きな融合タンパク質のセットとして(例えば、ファージディスプレイのために)発現され得るように、遺伝子配列中に合成オリゴヌクレオチド混合物を酵素ライゲートすることにより作製することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列からの潜在的なマーカータンパク質変種のライブラリーを作製するために用いることができる種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DN

10

20

30

40

50

A合成装置にて行うことができ、そして、合成遺伝子を次いで適当な発現ベクターにライゲートする。遺伝子の縮重セットの使用により、潜在的なマーカートンパク質配列の所望のセットをコードしている配列の全てを1の混合物中に提供することが可能となる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である(例えば、Narang, S.A. (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を参照されたい)。

**【0116】**

加えて、本発明のマーカートンパク質に対応しているタンパク質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、マーカートンパク質の変種のスクリーニングおよびその後の選択のためのマーカートンパク質フラグメントの多様な群を作製することができる。一具体例において、コーディング配列のフラグメントのライブラリーは、ニックングが分子当たり約1回だけ起こる条件下でヌクレアーゼを用いてマーカートンパク質コーディング配列の二本鎖PCRフラグメントを処理すること、二本鎖DNAを変性すること、DNAを還元して、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により、還元された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および生じたフラグメントのライブラリーを発現ベクターにライゲートすることにより作製することができる。この方法により、N-末端、C-末端、およびマーカートンパク質の種々のサイズの内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

10

20

**【0117】**

点突然変異および先端切断により作製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するための、および選択された特性を有する遺伝子産物に関してcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの方法が当該分野で公知である。高処理量分析に適用できる、巨大な遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広範に用いられる方法には、複製可能な発現ベクターに遺伝子ライブラリーをクローニングすること、生じたベクターのライブラリーで適当な細胞を形質転換すること、および、所望の活性の検出により産物を検出した遺伝子をコードしているベクターの単離が容易となる条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることが含まれる。ライブラリーにおける機能変異の頻度を高める新規な方法である繰り返しアンサンブル突然変異誘発(recur sive ensemble mutagenesis)(REM)をマーカートン変種を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせる用いることができる(Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3): 327-331)。

30

**【0118】**

単離されたマーカートンパク質またはその部分もしくはフラグメントを免疫原として用いて、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための常套法を用いて、マーカートンパク質に結合する抗体を作製することができる。全長のマーカートンパク質を用いることができ、または別法として、本発明により、免疫原としての使用のためのこれらのタンパク質の抗原性ペプチドフラグメントが提供される。マーカートンパク質の抗原性ペプチドは、FKBP54遺伝子によりコードされるアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を含み、および該ペプチドに対して作製された抗体がマーカートンパク質と特異的な免疫複合体を形成するように、マーカートンパク質のエピトープを包含する。好ましくは、抗原性ペプチドは少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、よりいっそう好ましくは少なくとも20アミノ酸残基、および最も好ましくは少なくとも30アミノ酸残基から成る。

40

**【0119】**

抗原性ペプチドにより包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面上に位置づけられるマーカートンパク質の領域、例えば親水性領域ならびに高い抗原性を有する領域である。

50

## 【0120】

マーカータンパク質免疫原を典型的に用いて、適当な対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）を該免疫原で免疫価することにより抗体を調製する。適当な免疫原調製物は、例えば、組換え発現されたマーカータンパク質または化学合成されたマーカーポリペプチドを含み得る。調製物は、フロイントの完全または不完全アジュバントなどのアジュバント、または同様の免疫刺激剤をさらに含み得る。適当な対象の免疫原性マーカータンパク質調製物での免疫化により、ポリクローナル抗マーカータンパク質抗体反応が誘導される。

## 【0121】

従って、本発明の別の態様は、抗 - マーカータンパク質抗体に関する。本明細書中に用いる「抗体」なる用語には、イムノグロブリン分子、およびイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、マーカータンパク質などの抗原と特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子が含まれる。イムノグロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例には、抗体をペプシンなどの酵素で処理することにより生じ得る F ( a b ) および F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメントが含まれる。本発明により、マーカータンパク質に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が提供される。本明細書中に用いる「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」なる用語には、特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の一種のみを含む抗体分子群が含まれる。モノクローナル抗体組成物は、従って、典型的には、それが免疫反応するところの特定のマーカータンパク質に対して単一の結合アフィニティを示す。

10

20

## 【0122】

ポリクローナル抗 - マーカータンパク質抗体は、適当な対象を本発明のマーカータンパク質で免疫化することにより、前記のように調製することができる。免疫化された対象における抗 - マーカータンパク質抗体の力価は、固定されたマーカータンパク質を用いて酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) を用いるなどの常套法により、時間中モニターすることができる。所望により、マーカータンパク質に対して指向される抗体分子は哺乳動物から（例えば、血液、または腫瘍組織サンプルから）単離することができ、およびさらに、タンパク質 A クロマトグラフィーなどの周知の方法により精製して、I g G フラクシオンを得ることができる。免疫化後の適当な時間において、例えば抗 - マーカータンパク質抗体力価が最も高い時点で、抗体産生細胞を対象から得、およびそれを用いて Kohler and Milstein (1975) (Nature 256:495-497) により初めに記載されたハイブリドーマ法 ( Brown et al. (1981) J. Immunol. 127: 539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255: 4980-83; Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2927-31; および Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29: 269-75 も参照されたい。 )、より近年のヒト B 細胞ハイブリドーマ法 ( Kozbor et al. (1983) Immunol Today 4: 72)、E B V - ハイブリドーマ法 ( Cole et al. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)、またはトリオーマ法などの常套法によりモノクローナル抗体を調製することができる。

30

## 【0123】

モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製するための方法は周知である（一般的には、R .H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E.A. Ierner (1981) Yale J. Biol. med., 54: 387-402; M.L. Gefter et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3: 231-36 を参照されたい。 )。簡単には、永久細胞株（典型的には、骨髄腫）を、前記のようにマーカータンパク質免疫原で免疫化した哺乳動物からのリンパ球（典型的には脾臓細胞）と融合し、そして生じたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、本発明のマーカータンパク質に結合するモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを同定する。

40

## 【0124】

リンパ球と永久細胞株を融合するのに用いられる多くの周知の方法のいずれかを、抗マ

50

ーカータンパク質モノクローナル抗体を作製するために適用することができる(例えば、G . Galfre et al. (1977) Nature 266: 55052; Gefter et al. Somatic Cell Genet. 上に既出; Lerner, Yale J. Biol. Med., 上に既出; Kenneth, Monoclonal Antibodies, 上に既出を参照されたい。)。さらに、当業者は、これもまた有用であるそのような方法の多くの変更があることを認識するであろう。典型的には、永久細胞株(例えば、骨髄腫細胞株)はリンパ球と同じ哺乳動物種から得る。例えば、ネズミのハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫化したマウスからのリンパ球をマウス永久細胞株と融合させることにより作製することができる。

#### 【0125】

好ましい永久細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含んでいる培養培地(「HAT」培地)に対して感受性のあるマウス骨髄腫細胞株である。多くの骨髄腫細胞株のいずれか、例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653、またはSp2/O-Ag14骨髄腫株を常套法に従い融合パートナーとして用いることができる。これらの骨髄腫株は、ATCCから入手可能である。典型的には、HAT-感受性マウス骨髄腫細胞をポリエチレングリコール(「PEG」)を用いてマウスの脾臓細胞に融合する。融合から生じたハイブリドーマ細胞を次いで、非融合および非再生性融合骨髄腫細胞を殺すHAT培地を用いて選択する(非融合脾臓細胞は、それらは形質転換されないので数日後に死亡する)。本発明のモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を、マーカートンパク質に結合する抗体に対してハイブリドーマ培養上清を常套のELISAアッセイを用いてスクリーニングすることにより、検出する。

#### 【0126】

モノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマを調製することに代えて、モノクローナル抗-マーカートンパク質抗体は、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)をマーカートンパク質でスクリーニングし、それによりマーカートンパク質に結合する免疫グロブリンライブラリーのメンバーを単離することにより、同定および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製およびスクリーニングするためのキットが市場入手可能である(例えば、ファルマシア組換えファージ抗体システム、カタログ番号27-9400-01;および、ストラタジーンSurfZAP(登録商標)ファージディスプレイキット、カタログ番号240612)。加えて、抗体ディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするのに特に適用しやすい方法および試薬の例は、例えば、Ladner et al. 米国特許第5,223,409号; Kang et al. PCT国際公開WO92/18619; Dower et al. PCT国際公開WO91/17271; Winter et al. PCT国際公開WO92/20791; Markland et al. PCT国際公開WO92/15679; Breitling et al. PCT国際公開WO93/01288; McCafferty et al. PCT国際公開WO92/01047; Garrard et al. PCT国際公開WO92/09690; Ladner et al. PCT国際公開WO90/02809; 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; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; Clarkson et al. (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc. Acad Res. 19: 4133-4137; Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982; およびMcGafferty et al. Nature (1990) 348: 552-554に見出すことができる。

#### 【0127】

さらに、組換え抗-マーカートンパク質抗体、例えば、ヒトおよび非ヒト部分を含んでいるキメラおよびヒト化モノクローナル抗体などであって、常套の組換えDNA法を用いて作製することができるものは、本発明の範囲内にある。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA法により、例えば、Robinson et al. 国際出願PCT/US86/02269; Akira, et al. 欧州特許出願184,187; Taniguchi, M., 欧州特許出願173,494; Neuberger et al. PCT国際公開WO86/01533; Cabilly et al. 米国特

10

20

30

40

50

許第4,816,567; Cabilly et al. 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 84: 3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nixhimura et al. (1987) Canc. 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, S.L. (1985) Science 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) Bio Techniques 4: 214; Winter 米国特許5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321: 552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239: 1534; Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141: 4053-4060に開示されている方法を用いて産生することができる。

#### 【0128】

完全ヒト抗体が、ヒトの対象の治療的処置のために特に望ましい。そのような抗体は、内在性の免疫グロブリン重および軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重および軽鎖遺伝子は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産生することができる。トランスジェニックマウスは選択される抗原、例えば、本発明のマーカ-に対応しているポリペプチドの全部または部分などで、通常の方法で免疫化する。抗原に対して指向されるモノクローナル抗体は、常套のハイブリド-マ法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り包含されるヒト免疫グロブリントランス遺伝子はB細胞の分化の間に配置転換し、次いでクラススイッチング(class switching)および体細胞変異を受ける。つまり、このような方法を用いて、治療上有効なIgG、IgA、およびIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの方法の概説に関しては、Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13: 65-93を参照されたい。)。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの方法およびそのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な考察に関しては、米国特許5,625,126;米国特許5,633,425;米国特許5,569,825;米国特許5,661,016;および米国特許5,545,806を参照されたい。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)などの会社が、本明細書に記載するものと同様の方法を用いて、選択される抗原に対して指向されるヒト抗体を提供するのを請け負うことができる。

#### 【0129】

選択されたエピト-ブを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる方法を用いて作製することができる。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、同じエピト-ブを認識している完全ヒト抗体の選択を誘導する(Jespers et al., 1994, Bio/technology 12: 899-903)。

#### 【0130】

抗-マーカ-タンパク質抗体(例えば、モノクローナル抗体)を用いて、アフィニティクロマトグラフィーまたは免疫沈降法などの常套法により、本発明のマーカ-タンパク質を単離することができる。抗マーカ-タンパク質抗体により、細胞からの天然のマーカ-タンパク質および宿主細胞中で発現された組換え産生されたマーカ-タンパク質の精製を促すことができる。さらに、抗マーカ-タンパク質抗体を用いて、マーカ-タンパク質の発現の豊富さおよびパターンを評価するために(細胞溶解物または細胞上清中で)マーカ-タンパク質を検出することができる。抗マーカ-タンパク質抗体を診断において用いて、臨床試験法の一部として組織中のタンパク質レベルをモニターすること、例えば、所定の治療管理の有効性を決定することができる。検出は、検出可能な物質に対して抗体をカップリングすること(即ち、物理的に結合することにより)促進することができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射能活性物質が含まれる。適当な酵素の例には、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ、適当な補欠分子団の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ヒオチンが含まれ、適当な蛍光物質の例には、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、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイ

10

20

30

40

50

ン、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが含まれ、発光物質の例には、ルミノールが含まれ、生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびアクオリンが含まれ、および適当な放射能活性物質の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ が含まれる。

#### 【0131】

##### III. 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の他の態様は、本発明のマーカートンパク質（またはその部分）をコードしている核酸を含んでいるベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中に用いられる、「ベクター」なる用語には、それが結合している他の核酸を輸送することができる核酸分子が含まれる。ベクターのタイプは、追加のDNAセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖DNAループを含む「プラスミド」である。ベクターの他のタイプは、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムにライゲートすることができるウイルスベクターである。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自律的に複製することができる（例えば、細菌の複製起源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統合し、そしてそれにより宿主ゲノムと共に複製される。さらに、所定のベクターは、それらが作用的に結合するところの遺伝子の発現を指向することができる。そのようなベクターは本明細書中「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA法において有用な発現ベクターはプラスミドの形態であることが多い。本明細書において、プラスミドはベクターの最も一般的に用いられる形態であるので、「プラスミド」および「ベクター」は互いに交換して用いることができる。しかし、本発明は、同等の機能を果たすそのような他の形態の発現ベクター、例えばウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルスなど）を含むことを意図する。

#### 【0132】

本発明の組換え発現ベクターには、宿主細胞での核酸の発現に適した形態の本発明の核酸が含まれ、これは、組換え発現ベクターが、発現のために用いられる宿主細胞に基いて選択される1またはそれ以上の調節配列であって、発現されるべき核酸配列に作用的に結合するものを含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作用的に結合する」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を（例えば、インビトロ転写/翻訳システムにおいて、またはベクターが宿主細胞へ導入された場合、宿主細胞において）許容する方法で調節配列に結合することを意味するものとする。「調節配列」なる用語には、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が含まれるものとする。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology; Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に開示されている。調節配列には、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構造発現を指向するもの、および所定の宿主細胞でのみヌクレオチド配列の発現を指向するもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現のレベルなどの要因に依存し得ることが当業者には認識されるであろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入して、それにより、本明細書に開示するような核酸によりコードされる、融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチド（例えば、マーカートンパク質、マーカートンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を産生することができる。

#### 【0133】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞におけるマーカートンパク質の発現のための設計することができる。例えば、マーカートンパク質は、イー・コリ(E. coli)などの細菌細胞、昆虫細胞において（バキュロウイルス発現ベクターを用いて）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現させることができる。適当な宿主細胞は、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)にさらに論じられている。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で転写および翻訳させることができる。

【0134】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質の発現を指向している構造的もしくは誘導性プロモーターを含んでいるベクターを用いて、イー・コリにて最も頻繁に行われる。融合ベクターは、その中にコードされるタンパク質に対して、大抵組換えタンパク質のアミノ末端に対して多くのアミノ酸を付加する。そのような融合タンパク質は典型的には3つの目的を果たす：1) 組換えタンパク質の発現を増加させること、2) 組換えタンパク質の溶解度を増すこと、および3) アフィニティ精製においてリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製において役立つこと。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解切断部位を融合部分と組換えタンパク質の結合部に導入して、融合タンパク質の精製の後で融合部分から組換えタンパク質を分離することを可能にする。そのような酵素およびその同種の認識配列には、ファクターXa、トロンピンおよびエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはタンパク質Aを標的組換えタンパク質に融合するpGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. およびJohnson, K.S. (1988) Gene 67: 31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway NJ)が含まれる。

10

【0135】

精製される融合タンパク質は、マーカー活性アッセイにおいて(例えば、以下に詳細に記載する直接アッセイまたは競合アッセイなど)、または例えばマーカータンパク質に特異的な抗体を作製するのに用いることができる。

20

適当な誘導性非-融合イー・コリ発現ベクターの例には、pTrc(Amann et al., (1988) Gene 69: 301-315)およびpET11d(Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990)60-89)が含まれる。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存する。pET11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現されるウイルスRNAポリメラーゼ(T7gn1)により媒介されるT7gn10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、宿主株BL21(DE3)またはHMS174(DE3)により、lacUV5プロモーターの転写対照下にT7gn1遺伝子を含んでいる内在性プロファージから供給される。

30

【0136】

イー・コリ中での組換えタンパク質の発現を最大にする一つの方法は、組換えタンパク質をタンパク質分解により分解する能力を損なわせた宿主細菌中でタンパク質を発現させることである(Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128)。他の方法は、各アミノ酸の個々のコドンがイー・コリ中で選択的に利用されるものとなるように、発現ベクターに挿入されるべき核酸の核酸配列を変更することである(Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118)。本発明の核酸配列のそのような変更は常套のDNA合成法により行うことができる。

40

【0137】

他の具体例において、マーカータンパク質発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母エス・セレビジエ(*S.cerevisiae*)における発現のためのベクターの例には、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picZ(Invitrogen Corp, San Diego, CA)が含まれる。

【0138】

別法として、本発明のマーカータンパク質を、バキュロウイルス発現ベクターを用いて

50

昆虫細胞中で発現させることができる。培養昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）中でのタンパク質の発現に利用できるバキュロウイルスベクターには、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）が含まれる。

【0139】

さらに他の具体例では、本発現の核酸は、哺乳動物の発現ベクターを用いて哺乳動物中で発現させる。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8（Seed, B. (1987) Nature 329: 840）およびpMT2PC（Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195）が含まれる。哺乳動物細胞中で用いられる場合、発現ベクターのコントロール機能がウイルス調節エレメントによりしばしば提供される。例えば、一般に用いられるプロモーターは、ポリオマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス40から誘導される。原核生物細胞および真核生物細胞のための他の適当な発現系に関しては、Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989のチャプター16および17を参照されたい。

10

【0140】

他の具体例において、組換え哺乳動物発現ベクターが、特定の細胞タイプにおいて好ましく核酸の発現を指向することができる（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公知である。適当な組織特異的プロモーターの無制限の例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert et al (1987) Genes Dev. 1: 268-277）、リンパ球特異的プロモーター（Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275）、特にT細胞レセプターのプロモーター（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）、神経特異的プロモーター（例えば、神経繊維プロモーター；Byrne and Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA86: 5473-5477）、膵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、乳清プロモーター；米国特許第4,873,316および欧州出願公開第264,166）が含まれる。発生段階で調節されるプロモーター、例えばネズミのhoxプロモーター（Kessel and Gruss (1990) Science 249: 374-379）およびフェトプロテインプロモーター（Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537-546）も包含される。

20

30

【0141】

本発明により、アンチセンス配向で発現ベクターにクローン化された本発明のDNA分子を含んでいる組換え発現ベクターがさらに提供される。つまり、DNA分子は、FKBP54遺伝子に対応している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）発現を許容する方法で調節配列に作用的に結合する。種々の細胞タイプにおけるアンチセンスRNA分子の持続的な発現を指向する、アンチセンス配向でクローン化された核酸に作用的に結合する調節配列アンチセンスRNA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、ファージミド、または減毒化されたウイルスの形態であり得、そこで、核酸は、その活性をベクターを導入する細胞タイプにより決定することができる高い効率の調節領域の調節下に産生される。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節に関する考察に関しては、Weintraub, H. et al., 遺伝子分析のための分子的手段としてのアンチセンスRNA、レビュー - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986を参照されたい。

40

【0142】

本発明の別の態様は、組換え発現ベクター内の例えばFKBP遺伝子、FKBP54遺伝子などの本発明の核酸分子、またはそれが宿主細胞のゲノムの特定の部位に相同的に結合するのを許容する配列を含んでいる本発明の核酸分子が導入されるところの宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」なる用語は本明細書中、交換して用いられる。そのような用語が特定対象細胞のみならず、そのような細胞の継代または潜在的な

50

継代をも意味することが理解される。所定の変更が、変異または環境による影響のために後の世代に生じる可能性があり、そのような継代は実際親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書中に用いられる用語の範囲内に含まれる。

【0143】

宿主細胞はいずれかの原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、本発明のマーカートンパク質は、イー・コリなどの細菌細胞、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）中で発現させることができる。他の適当な宿主細胞が当該分野の専門家に公知である。

【0144】

ベクターDNAは、常套の形質転換法またはトランスフェクション法により原核生物細胞または真核生物細胞に導入することができる。本明細書中に用いる「形質転換」および「トランスフェクション」なる用語は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈降、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む、外来核酸（例えばDNA）を宿主細胞に導入するための当該分野で認識される種々の方法を意味するものとする。宿主細胞を形質転換するもしくはトランスフェクションするための適当な方法は、Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)および他の研究室マニュアルに見出すことができる。

10

【0145】

哺乳動物細胞の適当なトランスフェクションに関して、用いられる発現ベクターおよびトランスフェクション法により、細胞群の一部のみが外来DNAをそのゲノムに統合し得ることが公知である。これらの統合物を同定および選択するために、選択可能なマーカ（例えば、抗生物質に対する抵抗性）をコードする遺伝子が、目的の遺伝子と共に宿主細胞へ一般的に導入される。好ましい選択可能なマーカには、薬物、例えばG418、ヒグロマイシン、およびメトトレキサートなどに対する抵抗性を付与するものが含まれる。選択可能なマーカをコードしている核酸は、マーカートンパク質をコードしているものと同じベクターにて宿主細胞に導入することができ、または別個のベクターにて導入することができる。導入された核酸で安定に形質転換された細胞は、薬物選択により同定することができる（例えば、選択可能なマーカ遺伝子を導入した細胞は、他の細胞が死ぬ場合でも生存する）。

20

30

【0146】

本発明の宿主細胞、例えば原核生物宿主培養細胞または真核生物宿主培養細胞を用いて、マーカートンパク質を産生させる（即ち、発現させる）ことができる。従って、本発明により、本発明の宿主細胞を用いてマーカートンパク質を産生するための方法がさらに提供される。一具体例において、該方法は（マーカートンパク質をコードしてい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、本発明のマーカートンパク質が産生されるよう、適当な培地中で培養することを含む。他の具体例において、該方法は、培地または宿主細胞からマーカートンパク質を単離することをさらに含む。

【0147】

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作製することもできる。例えば、一具体例において、本発明の宿主細胞は、マーカートンパク質コーディング配列が導入された受精卵母細胞または胎児幹細胞である。そのような宿主細胞を次いで用いて、本発明のマーカートンパク質をコードしている外来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、または本発明のマーカートンパク質をコードしている外来配列が変更された相同組換え動物を作製することができる。そのような動物は、マーカートンパク質の機能および/または活性を研究するのに、およびマーカートンパク質の活性のモジュレーターを同定および/または評価するのに有用である。本明細書に用いられる「トランスジェニック動物」は、動物の細胞の1またはそれ以上がトランス遺伝子を含むところの非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラットもしくはマウスなどの齧

40

50

歯動物である。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。トランス遺伝子は、トランスジェニック動物を発生させる細胞のゲノムへ統合され、および成熟した動物のゲノムに残っているゲノムに統合され、それによりトランスジェニック動物の1またはそれ以上の細胞タイプまたは組織中でコードされた遺伝子産物の発現を指向する外来DNAである。本明細書中に用いられるように、「相同組換え動物」は、内在FKBP54遺伝子が、内在遺伝子および動物の細胞、例えば動物の発生前の動物の胎児細胞に導入された外来DNA分子の間の相同組換えにより変更されている非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスである。

#### 【0148】

本発明のトランスジェニック動物は、マーカーをコードしている核酸を例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染により受精卵母細胞の雄性生殖核に導入し、そして擬似妊娠させた雌のフォスター動物にて卵母細胞を発生させることにより作製することができる。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルをトランス遺伝子に含めて、トランス遺伝子の発現効力を増すこともできる。組織特異的調節配列を、特定細胞に対してマーカータンパク質の発現を指向するためにトランス遺伝子に作用的に結合させることができる。胎児の操作およびマイクロインジェクションによりトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物を作製するための方法は当該分野で常套のものとなっており、例えば、共にLeder et al.による米国特許第4,736,866および4,870,009、Wagner et al.による米国特許第4,873,191およびHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)に開示されている。同様の方法が他のトランスジェニック動物の産生のために用いられる。トランスジェニック創設動物(transgenic founder animal)は、そのゲノム中の本発明のトランス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本発明の遺伝子に対応しているmRNAの発現に基いて同定することができる。トランスジェニック創設動物を次いで用いて、トランス遺伝子を含んでいる更なる動物を繁殖させることができる。さらに、マーカータンパク質をコードしているトランス遺伝子を含んでいるトランスジェニック動物を、他のトランス遺伝子を含んでいる他のトランスジェニック動物にさらに交配させることができる。

#### 【0149】

相同組換え動物を作製するために、遺伝子を変化させる、例えば機能的に破壊する欠失、付加または置換が導入された、本発明の遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製する。遺伝子はヒトの遺伝子であり得るが、より好ましくはヒトFKBP、例えばFKBP54の非ヒト相同物である。例えば、マウスの遺伝子を用いて、相同組換え核酸分子、例えばマウスのゲノムにおける本発明の内在遺伝子を変更するのに適したベクターを構築することができる。好ましい具体例において、相同組換えに際して、本発明の内在遺伝子が機能的に破壊される(すなわち、もはや機能タンパク質をコードしない;「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる)ように相同組換え核酸分子を設計する。別法として、相同組換え核酸分子は、相同組換えに際して、内在遺伝子の変異または変更されるが、機能タンパク質はなおコードするように設計することができる(例えば、上流の調節領域を変更して、それにより内在マーカータンパク質の発現を変更することができる。)。相同組換え核酸分子においては、本発明の遺伝子の変更された部分にその5'および3'末端にて本発明の遺伝子の追加的核酸配列が隣接して、相同組換え核酸分子により保持される外来遺伝子と、細胞、例えば胎児幹細胞中の内在遺伝子の間で相同組換えが起こるのを可能とする。追加の隣接核酸配列は、内在遺伝子との相同組換えを成功させるのに十分な長さである。典型的には、種々のキロベースの隣接DNA(5'および3'両末端における)を相同組換え核酸分子に含める(例えば、相同組換えベクターの記載に関しては、Thomas, K.R. and Capecchi, M. R. (1987) Cell 51: 503を参照されたい。)。相同組換え核酸分子は、例えば胎児幹細胞株などの細胞中に(例えば、エレクトロポレーションにより)導入し、次いで導入された遺伝子が内在遺伝子と相同組換えした細胞を選択する(例えば、Li,

10

20

30

40

50

E. et al. (1992) Cell 69: 915を参照されたい)。選択された細胞を次いで動物(例えばマウス)の胚盤胞に注射し、集合キメラを作製することができる(例えば、Bradley, A. in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed.(IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152を参照されたい。)。キメラ胎児を次いで適当な擬似妊娠させた雌のフォスター動物に移植し、次いで胎児を出産させることができる。その生殖細胞中に相同組換えDNAを有している子孫を用いて、動物の全細胞がトランス遺伝子の生殖細胞による伝達により相同組換えされたDNAを含んでいる動物を繁殖させることができる。相同組換え核酸分子、例えばベクター、または相同組換え動物を構築するための方法は、Bradley, A. (1991) Current Opinoin in Biotechnology 2: 823-829、およびLe Mouellec et alによるPCT国際公開WO90/11354、Smithies et alによるWO91/01140; Zijlstra et alによるWO92/0968;およびBerns et alによるWO93/04169にさらに記載されている。

10

#### 【0150】

他の具体例において、トランス遺伝子の調節性の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産生することができる。そのようなシステムの一つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼシステムである。cre/loxPリコンビナーゼシステムに関する記載に関しては、例えば、Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236を参照されたい。リコンビナーゼシステムの他の例は、サッカロマイセスセレビジエのFLPリコンビナーゼシステムである(O'Gorman et al. (1991) Science 251: 1351-1355)。cre/loxPリコンビナーゼシステムを用いてトランス遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードしているトランス遺伝子を含んでいる動物が所望される。そのような動物は、「ダブル」トランスジェニック動物の構築により、例えば、選択されたタンパク質をコードしているトランス遺伝子を含んでいるものと、レコンビナーゼをコードしているトランス遺伝子を含んでいる他方との2のトランスジェニック動物を交配することにより提供することができる。

20

#### 【0151】

本明細書中に開示する非ヒトトランスジェニック動物のクローンを、Wilmut, I. et al. (1997) Nature 385: 810-813およびPCT国際公開第WO97/07668およびWO97/07669に開示されている方法に従い作製することもできる。簡単には、トランスジェニック動物由来の細胞、例えば体細胞を単離し、そして増殖サイクルを誘発するよう誘導し、そしてG<sub>0</sub>相へ入らせることができる。静止期の細胞を次いで、例えば電気パルスの使用により、静止期の細胞を単離した同種の動物由来の摘出卵母細胞に融合することができる。再構築された卵母細胞を、桑実胚または胚盤胞へと発生するように培養し、そして次いで擬似妊娠させた雌のフォスター動物に移す。この雌のフォスター動物の子孫は、細胞、例えば体細胞を単離したところの動物のクローンである。

30

#### 【0152】

##### IV. 医薬組成物

本発明の核酸分子、即ち、本発明のFKBP54、マーカータンパク質のフラグメントおよびマーカータンパク質の抗体(本明細書中、「活性化化合物」とも呼ぶ)は、投与に適した医薬組成物中に組み込むことができる。そのような組成物は典型的には、核酸分子、タンパク質、または抗体および医薬上許容されるキャリアからなる。本明細書中に用いる「医薬上許容されるキャリア」なる用語には、医薬投与に用いることができるいずれかおよび全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等浸透剤および吸収遅延剤などを含むものとする。医薬活性物質のためのそのような媒質および剤の使用は当該分野で周知である。いずれかの常套の媒質または剤が活性化化合物と不適合である場合を除き、組成物におけるその使用が意図される。補助的活性化化合物も組成物に組み込むことができる。

40

#### 【0153】

本発明には、本発明のマーカーに対応しているポリペプチドまたは核酸の発現または活

50

性を調節するための医薬組成物を調製するための方法が含まれる。そのような方法には、本発明のマーカースに対応しているポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節する剤と共に、医薬上許容されるキャリアを処方することが含まれる。そのような組成物は、追加の活性剤をさらに含むことができる。つまり、本発明には、本発明のマーカースに対応しているポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節する剤および1またはそれ以上の追加の活性化合物と共に医薬上許容されるキャリアを処方することにより、医薬組成物を調製する方法がさらに含まれる。

#### 【0154】

本発明により、(a)マーカースに結合する、または(b)マーカースの活性に調節(例えば、刺激または阻害)効果を有する、またはより詳細には、(c)マーカースのその天然の基質(例えば、ペプチド、タンパク質、ホルモン、補因子、または核酸)の1またはそれ以上との相互作用に調節効果を有する、または(d)マーカースの発現に調節効果を有するモジュレーター、即ち、候補物質または試験化合物または剤(例えば、ペプチド、ペプチドミメティクス、ペプトイド、小分子または他の薬物)を同定するための方法(本明細書中「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる)も提供される。そのようなアッセイは典型的には、マーカースと1またはそれ以上のアッセイ成分との間の反応から成る。他の成分は試験化合物自体、または試験化合物とマーカースの天然結合パートナーとの組み合わせのいずれかであってよい。

#### 【0155】

本発明の試験化合物は、天然および/または合成化合物のシステマティックライブラリーを含むいずれかの利用可能な源から得てよい。試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプトイドライブラリー(ペプチドの機能を有するが、酵素による分解に対しては抵抗性があるが、生物活性は保持する新規非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー；Zucker mann et al., 1994, J. Med. Chem. 37: 2678-85を参照されたい)；場所に関してアドレス可能な(spatially addressable)パラレル固相もしくは液相ライブラリー；デコンボリューションを要する合成ライブラリー法；「1-ビーズ1-化合物」ライブラリー法；およびアフィニティクロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を含む当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くの方法のいずれかにより得てもよい。生物学的ライブラリー法およびペプトイドライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つの方法はペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小分子ライブラリーに対して適用できる(Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145)。

#### 【0156】

本発明の医薬組成物は、投与のその意図される経路と適合し得るように処方される。投与の経路の例には、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口(例えば吸入)、経皮(局所)、粘膜経由、および直腸投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下適用に用いられる溶液または懸濁液には以下の成分を含めることができる：注射用の水、塩水溶液、固定油、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などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗細菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミネート酢酸などのキレート化剤；アセテート、シトレート、またはフォスフェートなどのバッファー、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの緊張調整剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または複合投与バイアルに封入することができる。

#### 【0157】

注射可能な使用に適した医薬組成物には、滅菌水溶液(水溶性の場合)または、滅菌注射可能溶液または分散剤の即席調製のための分散剤および滅菌粉末が含まれる。静脈内投与に関して、適当なキャリアには、生理的塩水、静菌水、Cremophor EL(登録商標)(BASF, Parsippany, NJ)またはリン酸緩衝塩水(PBS)が含まれる。全ての場合に、組成物は無菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度まで液体であるべきである。それは製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の混入

10

20

30

40

50

活性から保護されなければならない。キャリアは、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など）、および適当なその混合物を含んでいる溶媒または分散剤であり得る。適当な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用により、分散剤の場合に所望の粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の活性の予防は、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、チメロサルなどの種々の抗細菌剤および抗真菌剤により達成することができる。多くの場合に、例えば、砂糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含めることが好ましい。注射可能組成物の長期吸収は、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などの剤を組成物中に含めることにより成し遂げることができる。

10

**【0158】**

滅菌注射可能溶液は、活性化合物（例えば、マーカータンパク質のフラグメントまたは抗マーカータンパク質抗体）を所望の量で適当な溶媒中に、前記の成分の1または組み合わせと共に混合し、所望によりその後フィルターによる滅菌を行うことにより調製することができる。一般には、分散剤は、活性化合物を、塩基性分散媒質、および前記からの所望の他の成分を含む滅菌ビヒクルに混合することにより調製する。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、前もって滅菌濾過した溶液から活性成分およびいずれかの追加の所望の成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥である。

**【0159】**

経口組成物には一般に、不活性希釈剤または食用キャリアが含まれる。それらは、ゼラチンカプセルに封入することができ、または錠剤へと圧縮することができる。経口治療投与のために、活性化合物は賦形剤と混合することができ、そして錠剤、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、液体キャリア中の化合物を口に入れ、ガラガラ音をたて、そして吐き出すもしくは飲み込むところのうがい薬としての使用のための液体キャリアを用いて調製することもできる。医薬上用いることができる結合剤、および/またはアジュバント物質を組成物の部分として含めることができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは以下の成分または同様の性質の化合物のいずれかを含むことができる；ミクロクリスタリンセルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；スターチまたはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、プライモゲル(Primogel)、またはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロート(Sterotes)などの潤滑剤；コロイド状シリコンジオキシドなどの滑剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ調味料などの風味剤。

20

30

**【0160】**

吸入による投与に関しては、組成物は、適当な推進剤、例えば二酸化炭素などのガスを含む圧縮容器またはディスペンサーまたは噴霧器からエアゾルスプレーの形態で送達される。

**【0161】**

全身投与は、粘膜経由または経皮手段によってもなし得る。粘膜経由または経皮投与のためには、浸透されるべきバリアに適した浸透剤を処方用いる。そのような浸透剤が一般に公知であり、および例えば、粘膜経由投与に関しては、洗浄剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。粘膜経由投与は、鼻腔スプレーまたは坐薬の使用により行うことができる。経皮投与に関しては、活性化合物を当該分野で一般的に公知の軟膏、塗り薬、ゲル、またはクリームに処方する。

40

**【0162】**

化合物は、直腸送達のための（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの常套の坐薬基剤を用いた）坐薬または停留浣腸の形態で調製することもできる。

**【0163】**

一具体例において、活性化合物は、化合物を体からの早期の排泄から保護するキャリア

50

、例えばインプラントおよびマイクロカプセル封入送達システムを含む調節性放出処方などを用いて調製する。生物分解可能な、生物使用可能なポリマー、例えばエチレンビニリアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などを用いることができる。そのような処方の調製法は当該分野の専門家に明らかであろう。材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Incから市場入手可能であり得る。リポソーム懸濁液（感染細胞に標的されるリポソームをウイルス抗原に対するモノクローナル抗体と共に含んでいる）を医薬上許容されるキャリア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に開示されるような当該分野の専門家に公知の方法に従い調製することができる。

【0164】

投与の簡便および投与量の均一化のために、投与単位にて経口もしくは非経口組成物を調製するのが特に好都合である。本明細書中に用いられる投与単位製剤には、治療されるべき対象のための単位投与製剤として適した物理的に別個の単位が含まれ、各単位は、所望の医薬キャリアと組み合わせて所望の治療効果を生じるよう算定された予め決定された量の活性化化合物を含む。本発明の投与単位製剤に関する詳細は、活性化化合物独自の特性および達成される特定の治療効果、および個人の治療のためにそのような活性化化合物を配合することに関する当該分野に本来的に存在する制限によりおよびそれらに直接依存して、決定される。

【0165】

そのような化合物の毒性および治療効果は、培養細胞または実験動物において、例えばLD50（集団の50%に対して致命的な投与量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な投与量）を測定することに関する常套の医薬法により決定することができる。毒性および治療の有効量間の投与量の比率は、治療的指標であり、比LD50/ED50として表現することができる。大きな治療指標を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いてもよいが、非感染細胞に対して引き起こし得るダメージを最小限に押さえ、そしてそれにより副作用を減じるために、そのような化合物を冒された組織の部位へ標的する送達システムを設計するには注意を要する。

【0166】

培養細胞アッセイおよび動物試験から得られたデータを、ヒトにおける使用のために所定の範囲の投与量を処方するのに用いることができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、ほとんど毒性を有さない、もしくは無毒性のED50を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いられる投与製剤および用いられる投与経路に依存して、この範囲内で変化してよい。本発明の方法に用いられるいずれの化合物に関しても、治療有効投与量は、培養細胞アッセイからまず見積もることができる。投与量は、培養細胞中で決定されるようなIC50（即ち、症状の最大の障害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するべく動物モデルにおいて処方されてよい。そのような情報を用いて、ヒトにおいて有用な投与量をより精密に決定することができる。血漿におけるレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定されてよい。

【0167】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入することができ、および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、静脈注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照されたい）または定位注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057を参照されたい）により対象に送達することができる。遺伝子治療ベクターの医薬調製物には、許容される希釈剤中の遺伝子治療ベクターを含めることができ、または遺伝子送達ビヒクルを包埋する緩徐放出マトリックスを含めることができる。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を組換え細胞からそのまま産生することができ、医薬調製物には、遺伝子送達システムを産生する1またはそれ以上の細胞を含めることができる。

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

10

20

30

40

50

## 【0168】

## V. コンピューター読み取り可能媒体およびアレイ

本発明のマーカールを含んでいるコンピューター読み取り可能媒体も提供される。本明細書に用いられる、「コンピューター読み取り可能媒体」には、コンピューターにより直接読み取られ得るおよび評価され得る媒体が含まれる。そのような媒体には、制限されるものではないが、フロッピーディスク、ハードディスク貯蔵媒体、および磁気性テープなどの磁気性貯蔵媒体；CD-ROMなどの光学貯蔵媒体；RAMおよびROMなどの電子貯蔵媒体；および磁気/光学貯蔵媒体などのこれらのカテゴリーのハイブリッドが含まれる。当業者は、どのようにすれば、現在公知のコンピューター読み取り可能媒体のいずれかを用いて、本発明のマーカールをその上に記録させたコンピューター読み取り可能媒体を含む製品を作製することができるかを、容易に認識するであろう。

10

## 【0169】

本明細書中、「記録される」には、コンピューター読み取り可能媒体上に情報を貯蔵するためのプロセスが含まれる。当業者は、コンピューター読み取り可能媒体上に情報を記録するための現在公知の方法のいずれかを適用して、本発明のマーカールを含んでいる製品を容易に作製することができる。

## 【0170】

種々のデータ処理プログラムおよびフォーマットを用いて、コンピューター読み取り可能媒体上に本発明のマーカール情報を貯蔵することができる。例えば、マーカールに対応している核酸配列はワード処理テキストファイルにて表すことができ、WordPerfectおよびMicrosoft Wordなどの市場入手可能なソフトウェアにフォーマットすることができ、またはASCIIファイルの形態で表すことができ、DB2、Sybase、Oracleなどのデータベースアプリケーションに貯蔵することができる。いかなる数のデータ処理構成フォーマット（例えば、テキストファイルまたはデータベース）をも、本発明のマーカールをその上に記録させたコンピューター読み取り可能媒体を得るために採用してよい。

20

## 【0171】

本発明のマーカールをコンピューター読み取り可能形態にて提供することにより、種々の目的のためにマーカール配列情報に常規的にアクセスすることが可能となる。例えば、当業者は、コンピューター読み取り可能形態にて本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を用いて、データ貯蔵手段内に保存された配列情報と、標的配列または標的構造モチーフを比較することができる。検索手段を用いて、特定の標的配列または標的モチーフに適合する本発明の配列のフラグメントまたは領域が同定される。

30

## 【0172】

本発明は、本発明のマーカールを含むアレイをさらに含む。アレイを用いて、アレイ中の1またはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすることができる。一具体例において、アレイを用いて組織における遺伝子発現をアッセイして、アレイにおける遺伝子の組織特異性を確認することができる。この方法で、約8600までの遺伝子を発現に関して同時にアッセイすることができる。これにより、1またはそれ以上の組織において特異的に発現される遺伝子の一群を示している特性を明らかにすることが可能となる。

## 【0173】

そのような質的測定に加えて、本発明により遺伝子発現の定量が可能となる。つまり、組織特異性のみならず、組織中の遺伝子の一群の発現のレベルも確認できる。つまり、遺伝子をその組織発現自体およびその組織における発現のレベルに基いてグループ分けすることができる。これは、例えば、組織間または組織中の遺伝子発現の関連性を確認するのに有用である。つまり、一組織を混乱させることができ、そして第2の組織における遺伝子発現における効果を測定することができる。この内容において、一細胞タイプの他の細胞タイプにおける生物学的刺激に応じた効果を測定することができる。そのような刺激は、例えば、遺伝子発現のレベルでの細胞-細胞相互作用の効果を知るのに有用である。1の細胞タイプを治療するが、他の細胞タイプにおいては望ましくない効果を有する試薬が治療的に投与される場合、本発明により、望ましくない効果の分子基準を決定するための

40

50

アッセイが提供され、そしてそれゆえ、妨害剤(counteracting agent)を同時投与する、もしくは望ましくない作用を治療する機会が提供される。同様に、単細胞タイプ内でも、望ましくない生物学的効果を分子レベルで決定することができる。つまり、標的遺伝子以外の発現における試薬の効果を確認し、そして妨害することができる。

#### 【0174】

他の具体例において、アレイを用いてアレイ中の1またはそれ以上の遺伝子の発現の時間経過をモニターすることができる。これは、本明細書中に開示するような、例えば発生および分化、疾患の進行、細胞形質転換および老化などのインビトロプロセス、例えば痛みおよび食欲などの自律神経および神経プロセス、および例えば学習または記憶などの認識機能などの種々の生物学的状況において見出され得る。

10

#### 【0175】

アレイは、同一細胞または異なる細胞における他の遺伝子の発現における遺伝子発現の効果を確認するのにも有用である。これにより、例えば、最終的なもしくは下流の標的を調節することができない場合に、治療的介入のための代替分子標的の選択が提供される。

アレイは、正常細胞および病的細胞における1またはそれ以上の遺伝子のディファレンシャル発現パターンを確認するのにも有用である。これにより、診断または治療的介入のための分子標的として役立つ遺伝子の一群が提供される。

#### 【0176】

### VI. 診断医薬

本発明は、診断アッセイ、予防アッセイ、薬理遺伝学、および臨床試験をモニターすることを予防(診断)目的のために用いて、それにより個人を予防的に治療するところの診断医薬の分野にも関する。従って、本発明の一態様は、マーカータンパク質および/または核酸発現ならびにマーカータンパク質の活性を、生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞、組織)の内容物において測定して、それにより、個人が病気または疾患に罹患しているかどうかもしくは増加もしくは低下したマーカータンパク質の発現もしくは活性に伴う疾患を進行させる危険があるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。本発明により、個人が、マーカータンパク質、核酸の発現または活性に伴う疾患を進行させる危険性があるかどうかを決定するための予防(または診断)アッセイも提供される。例えば、マーカー遺伝子のコピーの数を生物学的サンプル中でアッセイすることができる。そのようなアッセイを予防または診断目的のために用いて、それにより、マーカータンパク質、核酸の発現または活性により特徴づけられるもしくはそれに伴う疾患(例えば、前立腺癌)の発症前に個人を予防的に治療することができる。

20

30

#### 【0177】

本発明の他の態様は、臨床試験におけるマーカーの発現または活性における試薬(例えば、薬物、化合物)の影響をモニターすることを含む。

これらおよび他の試薬を、以下のセクションにさらに詳細に記載する。

#### 【0178】

### 1. 診断アッセイ

生物学的サンプル中の本発明のマーカータンパク質または核酸の存在または不在を検出するための典型的な方法は、試験対象から生物学的サンプルを得ること、および生物学的サンプルを、タンパク質またはマーカータンパク質をコードする核酸化合物(例えば、mRNA、ゲノムDNA)を検出することができる化合物または試薬と接触させて、生物学的サンプル中のマーカータンパク質または核酸の存在を検出することが含まれる。本発明のマーカー遺伝子またはタンパク質に対応しているmRNAまたはゲノムDNAを検出するのに好ましい試薬は、本発明のmRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブである。本発明の診断アッセイにおける使用に適したプローブは、本明細書中に記載する。

40

#### 【0179】

マーカータンパク質を検出するのに好ましい試薬は、マーカータンパク質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有する抗体である。抗体は、ポリクローナ

50

ルまたはより好ましくはモノクローナルであり得る。完全抗体、またはそのフラグメント（例えば、F a b、またはF ( a b ' )<sub>2</sub>）を用いることができる。プローブまたは抗体に関して「標識された」なる用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に（例えば物理的結合により）結合させることによりプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識された他の試薬との反応性により、プローブまたは抗体を間接的に標識することが含まれるものとする。間接標識の例には、蛍光標識された二次抗体を用いる一次抗体の、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出できるビオチンを用いたDNAプローブの末端標識化の検出が含まれる。「生物学的サンプル」なる用語には、対象から単離された組織、細胞、および生物学的液体物、ならびに対象内に存在する組織、細胞、および液体物が含まれるものとする。つまり、本発明の検出法を用いて、生物学的サンプル中のマーカーmRNA、タンパク質、またはゲノムDNAをインビトロならびにインビボで検出することができる。例えば、マーカーmRNAの検出のためのインビトロ法には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。マーカータンパク質の検出のためのインビトロ法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降法、および免疫蛍光法が含まれる。マーカーゲノムDNAの検出のためのインビトロ法には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、マーカータンパク質の検出のためのインビボ法には、対象に標識された抗マーカー抗体を導入することが含まれる。例えば、抗体を放射能活性マーカーで標識することができ、対象におけるその存在および位置を常套の画像処理法により検出することができる。

10

20

#### 【0180】

一具体例において、生物学的サンプルは、試験対象からのタンパク質分子を含む。別法として、生物学的サンプルは、試験対象からのmRNA分子および試験対象からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、対象から常套法により単離された血清サンプルである。

#### 【0181】

他の具体例において、該方法は、対照の対象から対照生物学的サンプル（例えば、非前立腺癌細胞サンプル）を得ること、マーカータンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出することができ、その結果マーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を生物学的サンプル中で検出することができる化合物または試薬と対照サンプルを接触させること、およびマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの対照サンプル中の存在を、マーカータンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの試験サンプル中の存在と比較することをさらに含む。

30

#### 【0182】

本発明は、生物学的サンプルにおけるマーカーの存在を検出するためのキットも包含する。さらにキットには、生物学的サンプル中でマーカータンパク質またはmRNAを検出することができる標識された化合物または試薬；サンプル中のマーカーの量を測定するための手段；およびサンプル中のマーカーの量を標準と比較するための手段を含めることができる。化合物または試薬は適当な容器中に封入することができる。キットは、キットを用いてマーカータンパク質または核酸を検出するための指示書をさらに含むことができる。

40

#### 【0183】

##### 2. 予防アッセイ

本明細書中に記載する診断法をさらに用いて、異常なマーカーの発現または活性に伴う病気または疾患を有するもしくはそれを進行させる危険のある対象を同定することができる。本明細書中に用いられる、「異常」なる用語には、野生型のマーカー発現または活性からはずれるマーカーの発現または活性が含まれる。異常な発現または活性には、増加もしくは低下した発現または活性、ならびに野生型の発生段階における発現パターンまたは亜細胞発現パターンに従わない発現または活性が含まれる。例えば、異常なマーカー発現または活性は、マーカー遺伝子の変異により、マーカー遺伝子を発現不足となるもしくは

50

過剰発現される場合、およびそのような変異により、非機能性のマーカータンパク質または野生型の様式で機能しないタンパク質、例えば、マーカーリガンドと反応しないタンパク質もしくは非マーカータンパク質リガンドと相互作用するタンパク質が生じる場合が含まれるものとする。

#### 【0184】

本明細書に開示される、前記の診断アッセイまたは後述するアッセイなどのアッセイを用いて、マーカータンパク質の活性または核酸発現の誤調節に伴う疾患、例えば前立腺癌を有するもしくは進行させる危険性のある対象を同定することができる。別法として、該予防アッセイを用いて、マーカータンパク質の活性または核酸発現の誤調節に伴う疾患、例えば前立腺癌を有するもしくは進行させる危険性のある対象を同定することができる。つまり、本発明により、異常なマーカー発現または活性に伴う病気または疾患を同定するための方法であって、試験サンプルを対象から得、そしてマーカータンパク質または核酸（例えば、mRNAまたはゲノムDNA）を検出し、マーカータンパク質または核酸の存在が、異常なマーカーの発現または活性に伴う病気または疾患を有するもしくはそれを進行させる危険性のある対象を診断するものであるところの方法が提供される。本明細書中に用いるように、「試験サンプル」には、目的の対象から得られた生物学的サンプルが含まれる。例えば、試験サンプルは、生物学的液体物（例えば、血液）、細胞サンプル、または組織（例えば、皮膚）であり得る。

10

#### 【0185】

さらに、本明細書中に開示する予防アッセイを用いて、対象に試薬（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティクス、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬物候補など）を投与して、増加もしくは低下したマーカーの発現もしくは活性に伴う病気または疾患を治療することができるかどうかを決定することができる。例えば、そのような方法を用いて、対象が、前立腺癌などの疾患のための試薬で効果的に治療され得るかどうかを決定することができる。つまり、本発明により、増加もしくは低下したマーカーの発現または活性に伴う疾患のための試薬で対象を効果的に治療することができるかどうかを決定するための方法であって、試験サンプルを得、そしてマーカータンパク質または核酸の発現または活性を検出するところの方法（例えば、マーカータンパク質または核酸の発現または活性の存在度が、増加もしくは低下したマーカーの発現または活性に伴う疾患を治療するための試薬を投与することができる対象を診断するものとなる）が提供される。

20

30

#### 【0186】

本発明の方法をさらに用いて、マーカー遺伝子における遺伝子の変化を検出し、それにより、変化した遺伝子を有する対象が、マーカータンパク質の活性または核酸発現における誤調節により特徴づけられる疾患、前立腺癌などの危険性があるかどうかを決定することができる。好ましい具体例において、該方法は、対象からの細胞のサンプル中の、マーカータンパク質をコードしている遺伝子の完全性に影響を与えている少なくとも一つの変化により特徴づけられる遺伝子変化の存在または不在、またはマーカー遺伝子の誤発現を検出することが含まれる。例えば、そのような遺伝子変化は、1) マーカー遺伝子からの1またはそれ以上のヌクレオチドの欠失；2) マーカー遺伝子に対する1またはそれ以上のヌクレオチドの付加；3) マーカー遺伝子の1またはそれ以上のヌクレオチドの置換；4) マーカー遺伝子の染色体上での転位；5) マーカー遺伝子のメッセンジャーRNA転写のレベルの変化；6) マーカー遺伝子の、例えばゲノムDNAのメチル化パターンなどの異常な変更；7) マーカー遺伝子のメッセンジャーRNA転写産物の非野生型のスプライシングパターンの存在；8) マーカータンパク質の非野生型レベル；9) マーカー遺伝子の対立遺伝子の喪失；および10) マーカータンパク質の不適切な翻訳後の変更の存在を確認することにより検出することができる。本明細書中に記載するように、マーカー遺伝子の変化を検出するために用いることができる当該分野で公知の多数のアッセイが存在する。好ましい生物学的サンプルは、対象から常套手段により単離された組織または血液サンプルである。

40

50

## 【0187】

所定の具体例において、変化の検出には、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）、アンカーPCRまたはRACE PCRなどにおける（例えば、米国特許第4,683,195号および4,683,202号を参照されたい）、または別法として、ライゲーション鎖反応（LCR）における（例えば、Landegran et al. (1988) Science 241: 1077-1080; and Nakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 360-364を参照されたい）プローブ/プライマーの使用、ここで後者はマーカー遺伝子の点変異を検出するのに特に有用であり得る(Abravaya et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23: 675-682を参照されたい)、が含まれる。この方法は、対象から細胞のサンプルを回収すること、核酸（例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方）をサンプルの細胞から単離すること、マーカー遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じる条件下でマーカー遺伝子に特異的にハイブリダイズする1またはそれ以上のプライマーと核酸サンプルを接触させること、および増幅産物の存在または不在を検出すること、または増幅産物のサイズを検出すること、および対照サンプルに対して長さを比較することから成るステップを含み得る。PCRおよび/またはLCRが、予備的な増幅ステップとして、本明細書に記載する変異を検出するために用いられる方法のいずれかと組み合わせて用いることが望まれてよい。

10

## 【0188】

別の増幅法には、自律性配列複製(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-Technology 6: 1197)、またはいずれかの他の核酸増幅法の後で、当該分野の専門家に周知の方法を用いて、増幅された分子の検出を行うことが含まれる。これらの検出スキームは、そのような分子が非常に少数しか存在しない場合に、核酸分子を検出するのに特に有用である。

20

## 【0189】

別の具体例において、サンプル細胞からのマーカー遺伝子の変異は、制限酵素切断パターンの変化により同定することができる。例えば、サンプルおよび対照DNAを単離し、増幅し（任意）、1またはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、そしてフラグメントの長さのサイズをゲル電気泳動により決定し、そして比較する。サンプルおよび対照DNAの間のフラグメントの長さのサイズの差が、サンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの使用（例えば、米国特許第5,498,531を参照されたい）を用いて、リボザイム切断部位の発生または喪失により特定の変異の存在をスコアすることができる。

30

## 【0190】

他の具体例において、マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子における遺伝子変異は、サンプルと対照の核酸、例えばDNAまたはRNAを、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含んでいる高密度アレイにハイブリダイズさせることにより同定することができる(Cronin, M.T. et al. (1996) Human Mutation 7: 244-255; Kozal, M. J. et al. (1966) Nature Medicine 2: 753-759)。例えば、マーカーにおける遺伝子変異は、Cronin et al. 既出に記載されるような光により作製された(light generated) DNAプローブを含んでいる二次元アレイにて同定することができる。簡単には、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよび対照中の長いDNAを探查して、連続して部分的に重なっているプローブの線状アレイを作製することにより配列間の塩基の変化を同定することができる。このステップにより、点変異の同定が可能となる。このステップの後、検出される全変種または変異に相補的な、もっと小さな、特定化されたプローブを用いることにより、特定の変異を特徴付けることを可能とする第2のハイブリダイゼーションアレイにより行う。各変異アレイは、野生型遺伝子に相補的なものと変異遺伝子に相補的な他方との、パラレルなプローブセットからなる。

40

## 【0191】

50

さらに他の具体例では、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを用いてマーカー遺伝子を直接配列決定し、そして、対応している野生型（対照）配列とサンプルマーカーの配列を比較することにより、変異を検出することができる。配列決定反応の例には、Maxam and Gilbert((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560)またはSanger((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)により開発された方法に基くものが含まれる。マス スペクトロメトリーによる配列決定を含む(例えば、PCT国際公開第WO94/16101; Cohen et al. (1996) Adv. Chromatogr. 36: 127-162; およびGriffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159)、種々の自動配列決定法のいずれかを診断アッセイを行う場合に用いることができることも意図される((1995) Biotechniques 19: 448)。

#### 【0192】

マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子における変異を検出する他の方法には、切断試薬からの保護を用いて、RNA/RNAまたはRNA/DNAのヘテロ二本鎖のミスマッチ塩基を検出する方法が含まれる(Myers et al. (1985) Science 230: 1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野における方法は、野生型マーカー配列を含んでいる(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルから得た変異の可能性のあるRNAまたはDNAとハイブリダイズさせることにより形成されるヘテロ二本鎖を提供することにより始まる。二本鎖分子を、対照およびサンプル鎖の間の塩基対のミスマッチのために存在する二本鎖の一本鎖領域を切断する試薬で処理する。例えば、RNA/DNA二本鎖はRNaseで処理することができ、および、DNA/DNAハイブリッドはS1ヌクレアーゼで処理して、ミスマッチしている領域を酵素消化する。他の具体例において、ミスマッチ領域を消化するために、DNA/DNAまたはRNA/DNA二本鎖をヒドロキシルアミンまたはオスミウムテトロキシドで、およびピペリジンで処理することができる。ミスマッチ領域の消化後、生じた物質を次いで、変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離し、変異の部位を決定する。例えば、Cotton et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85: 4397; Saleeba et al. (1992) Methes Enzymol 217: 286-295を参照されたい。好ましい具体例では、対照DNAまたはRNAを検出のために標識することができる。

#### 【0193】

さらに他の具体例では、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1またはそれ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復酵素」)を、細胞のサンプルから得たマーカーcDNA中の点変異を検出およびマッピングするために規定されたシステムにおいて用いるものである。例えば、イー・コリのmutY酵素はG/AミスマッチにてAを切断し、そして、ヒーラー細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチにてTを切断する(Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15: 1657-1662)。典型的な具体例に従い、マーカー配列、例えば野生型マーカー配列に基くプローブを、試験細胞からのcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズさせる。二本鎖をDNAミスマッチ修復酵素で処理して、そして、切断産物が存在する場合はそれを電気泳動プロトコルなどから検出することができる。例えば、米国特許第5,459,039号を参照されたい。

#### 【0194】

他の具体例において、電位泳動の移動度の変化を用いて、マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子における変異を検出する。例えば、一本鎖立体構造多型(SSCP)を用いて、変異体および野生型核酸の間の電気泳動の移動度の差を検出してよい(Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA: 86: 2766, Cotton (1993) Mutat. Res. 285: 125-144; およびHayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79も参照されたい)。サンプルおよび対照のマーカー核酸の一本鎖DNAフラグメントは変性し、そして復元する。一本鎖核酸の二次構造は、配列により変化し、結果的に生じる塩基泳動の移動度の変化により、一つの塩基の変化さえも検出することができる。DNAフラグメントは、標識プローブで標識されてよく、または検出されてよい。アッセイの感度を、RNA(DNAよりもむしろ)を用いることにより高めてよく、この場合、

10

20

30

40

50

二次構造は配列の変化に対してより感受性となる。好ましい具体例において、対象たる方法は、電気泳動の移動度の変化に基いて、二本鎖のヘテロ二本鎖分子を分離するヘテロ二本鎖分析を用いる(Keen et al. (1991) Trends Genet 7:5)。

#### 【0195】

さらに他の具体例において、変性剤の勾配を含んでいるポリアクリルアミドゲル中の変異体または野生型フラグメントの移動を、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を用いてアッセイする(Myers et al. (1985) Nature 313: 495)。DGGEを分析の方法として用いる場合、DNAを、それが完全には変性しないことを確実にするために、例えば約40bpの高融点のGCに富むDNAのGCクランプをPCRにより添加することにより、変更する。さらなる具体例において、変性剤の勾配の代わりに温度勾配を用いて、対照とサンプルDNAの移動度の差を同定する(Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265: 12753)。

10

#### 【0196】

点変異を検出するための他の方法の例には、制限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拡張が含まれる。例えば、公知の変異が中央に位置しているオリゴヌクレオチドプライマーを調製し、そして次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的DNAにハイブリダイズさせてよい(Saiki et al. (1986) Nature 324: 163); Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:6230)。そのような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドをPCRにより増幅された標的DNAまたは多くの異なる変異体にハイブリダイズさせ、その場合、オリゴヌクレオチドはハイブリダイジング膜に結合させ、そして、標識した標的DNAとハイブリダイズさせる。

20

#### 【0197】

別法として、選択的PCR増幅に基く対立遺伝子特異的増幅法を、本発明と組み合わせ用いてよい。特定の増幅のためのプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、(増幅がディファレンシャルハイブリダイゼーションに基づくように)分子の中央に目的の変異を有してよく(Gibbs et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17: 2437-2448)、またはプライマーの3'末端に目的の変異を有してよく、この場合は、適当な条件下でミスマッチによりポリメラーゼの伸長が妨げられ得もしくは減じられ得る(Prossner (1993) Tibtech 11: 238)。加えて、変異の領域に新規な制限部位を誘導して、切断に基く検出を得ることが望まれ得る(Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。所定の具体例において、増幅は、増幅のためのTaqリガーゼを用いて行われてもよいことが認識される(Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189)。そのような場合、ライゲーションは5'配列の3'末端において完全なマッチが存在する場合にのみ起こり、増幅の存在または不在を調べることにより、特定の部位における公知の変異の存在を検出することが可能となる。

30

#### 【0198】

本明細書に開示する方法は、例えば、本明細書中に開示する少なくとも一つのプローブ核酸または抗体試薬を含んでいる予め封入された診断キットであって、例えば、マーカー遺伝子が関与している疾患または病気の症状またはファミリーヒストリーを示している対象を診断するために臨床場面において通常用いられ得るものを利用することにより、行ってよい。

40

さらに、マーカーを発現するあらゆる細胞タイプまたは組織を、本明細書に開示する予防アッセイに用いてよい。

#### 【0199】

### 3. 臨床試験中の効果のモニタリング

マーカータンパク質の発現または活性における試薬(例えば、薬物)の影響(例えば、前立腺癌の調節)をモニターすることは、基礎的な薬物スクリーニングのみならず、臨床試験においても適用することができる。例えば、本明細書に開示するスクリーニングアッセイにより決定される試薬の、マーカー遺伝子の発現、タンパク質レベルを増すもしくはは

50

マーカーの活性をアップレギュレートする効力を、低下したマーカー遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートされたマーカー活性を示している対象の臨床試験においてモニターすることができる。別法として、スクリーニングアッセイにより決定される試薬の、マーカー遺伝子の発現、タンパク質レベルを低下させるもしくはマーカーの活性をダウンレギュレートさせる効力を、増加したマーカー遺伝子の発現、タンパク質レベルまたはアップレギュレートしたマーカー活性を示している対象の臨床試験においてモニターすることができる。そのような臨床試験において、マーカー遺伝子、および好ましくは例えばマーカーに関連する疾患（例えば前立腺癌）に關与している他の遺伝子の発現または活性を、「リードアウト」または特定細胞の表現型のマーカーとして用いることができる。

10

**【0200】**

例えば、および制限するものでなく、マーカーの活性を調節する試薬（例えば、化合物、薬物または小分子）（例えば、本明細書中に記載するスクリーニングアッセイにおいて同定される）での処理により細胞内で調節される、マーカー遺伝子および本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子を含んでいる遺伝子を同定することができる。つまり、マーカーに関連する疾患（例えば、前立腺癌）における試薬の影響を例えば臨床試験で試験するために、細胞を単離し、そしてRNAを調製し、マーカーおよびマーカー関連疾患に關与する他の遺伝子の発現レベルをそれぞれ分析することができる。遺伝子発現のレベル（例えば遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載するようなノーザンブロット分析またはRP-PCRにより、または別法として、産生されたタンパク質の量を測定することにより、本明細書に記載する方法の一つにより、またはマーカーまたは他の遺伝子の活性レベルを測定することにより定量することができる。この方法において、遺伝子発現パターンを、試薬に対する細胞の生理的応を示すマーカーとして用いることができる。従って、この反応状態を、試薬で個人を治療する前および治療する間の種々の時点で測定してよい。

20

**【0201】**

好ましい具体例において、本発明により、試薬（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティクス、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または本明細書中に開示するスクリーニングアッセイにより同定される他の薬物候補）での対象の治療の有効性をモニターする方法であって、(i) 試薬の投与前に対象から投与前サンプルを得ること；(ii) マーカータンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの、投与前サンプル中での発現のレベルを検出すること；(iii) 対象から、1またはそれ以上の投与後サンプルを得ること；(iv) マーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの投与後サンプルにおける発現または活性のレベルを検出すること；(v) マーカータンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの前投与サンプル中での発現または活性のレベルを、投与後サンプルまたはサンプル（複数）中のマーカータンパク質、mRNA、またはゲノムDNAと比較すること；および、(vi) それに応じて、対象への試薬の投与を変更することから成るステップを含む方法が提供される。例えば、試薬の投与の増加が、検出されるよりも高いレベルへマーカーの発現または活性を増すのに、即ち、試薬の有効性を増すのに所望されてよい。別法として、試薬の投与の削減が、検出されるよりも低いレベルへマーカーの発現または活性を低下させるのに、即ち、試薬の有効性を低下させるのに所望されてよい。従って、そのような具体例において、観察できる表現型の反応がない場合でも、マーカーの発現または活性を試薬の有効性の指標として用いることができる。

30

40

**【0202】****4. 治療の方法：**

本発明により、異常なマーカーの発現または活性に伴う疾患の危険性のある（または罹患しやすい）またはそれらを有する対象を治療する、予防的および治療的方法が提供される。予防的および治療的治療法の両方に関して、そのような治療は薬理遺伝学の分野から得られる知識に基いて、特に調整または変更されてよい。本明細書中に用いる「薬理遺伝学」には、遺伝子配列決定、統計遺伝学、および臨床開発段階の、および市場における薬

50

物に対する遺伝子発現の分析などの遺伝子技術の適用が含まれる。より詳細には、該用語は、どのようにして対象の遺伝子により薬物に対するその反応が決定されるか（例えば、対象の「薬物反応表現型」、または「薬物反応遺伝子型」）に関する研究を意味する。つまり、本発明の別の態様により、本発明のマーカー分子または個人の薬物反応の遺伝子型に基づくマーカーモジュレーターのうちいずれかで、個人の予防的または治療的処置を調整するための方法が提供される。薬理遺伝学により、臨床医または主治医は、治療から最も利益を得るであろう対象に対して予防的または治療的処置を標的し、そして、毒性薬物に関連する副作用を受けるであろう対象の治療は避けることができる。

#### 【0203】

##### 5. 予防法

一態様において、本発明により、増加または低下したマーカーの発現または活性に伴う病気または症状（例えば、前立腺癌）を、対象に、マーカータンパク質、またはマーカータンパク質の発現もしくは少なくとも一つのマーカータンパク質の活性を調節する試薬を投与することにより、対象において予防する方法が提供される。増加もしくは低下したマーカーの発現または活性により引き起こされるもしくは起因する疾患の危険にある対象は、例えば、本明細書中に記載する診断または予防アッセイのいずれかまたはその組み合わせにより同定することができる。予防薬の投与は、病気または疾患が予防されるように、または別に、その進行が遅延するように、差別的なマーカータンパク質の発現に特徴的な症状が現れる前に行うことができる。マーカー異常のタイプ（例えば、発現レベルの増加または低下）に依存して、例えば、マーカータンパク質、マーカータンパク質アゴニスト、またはマーカータンパク質アンタゴニスト試薬を、対象を治療するのに用いることができる。適当な試薬は、本明細書中に記載するスクリーニングアッセイに基づいて決定することができる。FKBPマーカーを調節する試薬の例は、出典明示により本明細書中に組み込む米国特許第5,362,718に記載されているCCI-779および類似体、FK506、FK506のマコリド(macrolides)、およびラパマイシン(Domont, F. et al., 「免疫抑制マクロリドFK-506およびラパマイシンは、ネズミのT細胞においてレシプロカルアントゴニストとして作用する、J. Immunol. 144: 1418-1424(1990)、ラパマイシンの合成類似体およびFK506 (R.S. Coleman et al., 「免疫抑制剤FK506のディグレーションおよび操作」：潜在的合成中間体の調製」Heterocycles, 28, pp. 157-161 (1989)および本明細書において出典明示により組み込む米国特許6,200,985)などであり得る。

#### 【0204】

##### 6. 治療法

本発明の他の態様は、治療目的のためにマーカータンパク質の発現または活性を調節する方法に関する。従って、典型的な具体例において、本発明の調節法は、細胞を、マーカータンパク質、または該細胞に伴うマーカータンパク質活性の活性の1またはそれ以上を調節する試薬と接触させることを含む。マーカータンパク質の活性を調節する試薬は、本明細書中に記載するような試薬、例えば、核酸またはタンパク質、マーカータンパク質の天然に生じる標的分子（例えばマーカータンパク質基質）、マーカータンパク質抗体、マーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト、マーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニストのペプチドミメティクス、または他の小分子であり得る。一具体例において、試薬は1またはそれ以上のマーカータンパク質活性を刺激する。そのような刺激剤の例には、活性マーカータンパク質、および細胞中に誘導されているマーカータンパク質をコードしている核酸分子が含まれる。他の具体例において、試薬は1またはそれ以上のマーカータンパク質の活性を阻害する。そのような阻害剤の例には、アンチセンスマーカータンパク質核酸分子、抗-マーカータンパク質抗体、およびマーカータンパク質インヒビターが含まれる。これらの調節法は、インビトロで（例えば、細胞を試薬と共に培養することにより）または別法としてインビボで（例えば、試薬を対象に投与することにより）行うことができる。そのようにして、本発明により、マーカータンパク質または核酸分子の異常な発現または活性により特徴づけられる病気または疾患に罹患している個人を治

10

20

30

40

50

療する方法が提供される。一具体例において、該方法は、試薬（例えば、本明細書に開示されるスクリーニングアッセイにより同定される試薬）またはマーカータンパク質の発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）試薬の組み合わせを投与することを含む。他の具体例において、該方法は、マーカータンパク質または核酸分子を治療として投与して、低下した、もしくは異常なマーカータンパク質の発現または活性を補うことを含む。

#### 【0205】

マーカータンパク質の活性の刺激は、マーカータンパク質が異常にダウンレギュレートしている場合、および/または増加したマーカータンパク質の活性が有利な効果を持つと考えられる場合に望ましい。例えば、マーカータンパク質の活性の刺激は、マーカータンパク質がダウンレギュレートされる場合および/または増加したマーカータンパク質の活性が有利な効果を持つと考えられる場合に望ましい。同様にマーカータンパク質の活性の阻害は、マーカータンパク質が異常にアップレギュレートしている場合および/または低下したマーカータンパク質の活性が有利な効果を持つと考えられる場合に望ましい。

10

#### 【0206】

### 7. 薬理遺伝学

本発明のマーカータンパク質および核酸分子ならびに試薬、または本明細書に開示するスクリーニングアッセイにより同定されるような、マーカータンパク質の活性（例えばマーカー遺伝子の発現）に刺激または阻害効果を持つモジュレーターを個人に投与して、異常なマーカータンパク質活性に伴うマーカー関連疾患（例えば、前立腺癌）を（予防的または治療的に）治療することができる。そのような治療と組み合わせ、薬理遺伝学（即ち、個人の遺伝子タイプと外来化合物または薬物に対するその個人の反応の間の関連性に関する研究）を考慮してよい。治療の代謝における差が、薬理的に活性な薬物の投与量と血液濃度との関連性を変化させることにより、重度の毒性と治療の失敗を導く可能性がある。従って、主治医または臨床医は、マーカー分子を投与するかマーカーモジュレーターを投与するかを決定するのに、ならびに、マーカー分子またはマーカーモジュレーターでの治療の投与量および/または治療管理を調整するのに、関連する薬理学的研究において得られた知識を用いることを考慮し得る。

20

#### 【0207】

薬理遺伝学は、罹患した人において変化した薬物の性質および異常な活性による、薬物に対する反応における临床上明らかな遺伝的变化を扱う。例えば、Eichelbaum, M. et al. (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11): 983-985 およびLinde, M.W. et al. (1997) Clin. Chem. 43(2): 254-266を参照されたい。一般に、薬理遺伝学的症状に関して2つのタイプを分別することができる。薬物が体に作用する方法を変化させている単一のファクター（変化した薬物活性）として遺伝する遺伝的性状または体が薬物に作用する方法を変化させている単一のファクター（変化した薬物代謝）として遺伝する遺伝的性状。これらの薬理遺伝学的疾患は、まれな遺伝子欠損として、または天然に生じる多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損（G6PD）は、主な臨床合併症が酸化剤（抗-マラリア、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）の摂取後およびソラマメ消費後の出血である、一般的な遺伝性酵素症である。

30

40

#### 【0208】

薬物反応を予測する遺伝子を同定するための、「ゲノムの全域に渡る関連性」として知られる一つの薬理遺伝学的方法は、既に公知の遺伝子関連マーカーから成るヒトゲノムの高分解能マップ（例えば、それぞれ2つの変種を有する、ヒトのゲノムにおける60,000-100,000の多型もしくは可変部位から成る「複対立」遺伝子マーカーマップ）に主に基く。そのような高分解能の遺伝子マップを、統計学的に有意な数の、フェーズII/III薬物試験に参加している対象のそれぞれのゲノムのマップと比較して、特に認められる薬物反応または副作用に関連するマーカーを同定することができる。別法として、そのような高分解能マップは、ヒトゲノムにおける数千万の公知の単一ヌクレオチド多型（SNP）の組み合わせから作製することができる。本明細書に用いられる、「SN

50

「P」は、DNAの伸張中の単一のヌクレオチド塩基に生じる共通の変化である。例えば、SNAはDNAの約1000塩基当たり1つ生じ得る。SNPは、疾患のプロセスに関与している可能性があるが、大部分は疾患に関連していない可能性がある。そのようなSNPの発生に基く遺伝子マップを用いて、個人を、その個々のゲノムにおけるSNPの特定のパターンによって、遺伝的カテゴリーにグループ分けすることができる。そのような方法にて、そのような遺伝的に類似する個人の間で共通する可能性のある特性を考慮して、遺伝的に類似する個人から成るグループに対して投与管理を調整することができる。

#### 【0209】

別法として、「候補遺伝子法」と名づけられる方法を用いて、薬物反応を予測する遺伝子を同定することができる。この方法に従い、薬物標的をコードする遺伝子が公知である場合（例えば、本発明のマーカータンパク質）、その遺伝子の全共通の変種を集団においてかなり容易に同定することができ、および他に対する遺伝子の1バージョンを有することが特定の薬物反応に関連しているかどうかを決定することができる。

10

#### 【0210】

典型的な具体例として、薬物代謝酵素の活性が、薬物活性の強さおよび持続の両方の主要な決定要因である。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）およびシトクロームP450酵素CYP2D6およびCYP2C19）の遺伝子多型の発見により、薬物の通常および安全投与量を摂取した後に、なぜ幾人かの患者は期待される薬物効果を得ず、または激化した薬物反応および重篤な毒性を示すのかということに関する説明が提供された。これらの多型は集団において2つの表現型、強い代謝能力を有する人（EM）および弱い代謝能力を有する人（PM）にて表現される。PMの優勢は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードしている遺伝子は高度に多型であり、すべて機能的CYP2D6の不在に通じるいくつかの変異がPMにおいて同定されている。CYP2D6およびCYP2C19の弱い代謝能力を有する人は、通常の投与量を受けた場合に激化した薬物反応および副作用をかなりの頻度で経験した。代謝産物が活性な治療部分である場合、そのCYP2D6により形成される代謝産物モルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛効果に関して立証されているように、PMは治療反応を示さない。他の極端な例は、いわゆる、常套の投与量に対して反応しないいわゆる超迅速代謝能力を有する人である。近年、超迅速代謝能力を有する人の分子的基礎が、CYP2D6遺伝子の増幅によるものであることが確認された。

20

30

#### 【0211】

別法として、「遺伝子発現特性化」と呼ばれる方法を用いて、薬物反応を予測する遺伝子を同定することができる。例えば、薬物（例えば、マーカー分子または本発明のマーカーモジュレーター）を投与した動物の遺伝子発現により、毒性に関連する遺伝子経路が活性化されたかどうかの指標が提供され得る。

#### 【0212】

前記薬理遺伝学的手段の1以上から得られる情報を用いて、個人の予防もしくは治療的処置のための適当な投与量および治療管理を決定することができる。投与または薬物選択に適用する場合、この知識は、マーカー分子または本明細書に開示される典型的なスクリーニングアッセイの一つで同定されるモジュレーターなどのマーカーモジュレーターで対象を治療する場合に、有害な反応または治療の失敗を避けることができ、そしてすなわち、治療または予防効果を高めることができる。

40

#### 【0213】

本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、これらは制限するものとして解釈されるべきではない。本明細書中の全引用文献、特許文献および公開された特許出願の内容は、本明細書中に出典明示により組み込む。

#### 【0214】

実施例

実施例1：マーカーcDNAの同定および特定

(i) 方法および材料

50

## (a) 培養細胞

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、DU-145、PC-3、および Tsu-pr1 を ATCC から得た。LNCaP 癌細胞は空气中 5% CO<sub>2</sub> の湿った雰囲気中、10% の子牛血清 (Life Technologies, Inc, Rockville, MD)、3 mM の L-グルタミン、100 μg / ml のストレプトマイシンおよび 100 ユニット / ml のペニシリンを補充した RPMI 1640 培地中に維持した。他の株は、3 mM の L-グルタミン、100 μg / ml のストレプトマイシン、100 ユニット / ml のペニシリンおよび 10% の FCS を含んでいる DMEM 中、5% の CO<sub>2</sub> の湿った雰囲気中に維持した。ステロイドの効果を試験するために、細胞を 5% の FCS を含んでいる RPMI 1640 培地中デキストランコートされたチャーコール (Hyclone, Logan Utah) と共に、処置前 24 時間培養した。細胞を 10 nM の DHT の不在または存在下に、0、2、4、6、12、24、48、および 72 時間増殖させた。それらを各時点で回収および凍結した。200 μl の培地を各フラスコから PSA アッセイのために回収した。

10

## 【0215】

## (b) 細胞増殖アッセイ

LNCaP 細胞の増殖における DHT の効果を確認するために、3000 細胞 / ウェルにて細胞を 96 ウェルのプレートに、DHT での処置前 24 時間播種した。72 時間後、MTT を各ウェルに添加し、そして 37 °C にて 4 時間インキュベートした。インキュベーションの終わりに上清を除去し、100 μl の DMSO を各ウェルに添加して、細胞を溶解させた。プレートを次いで、プレートリーダーにおいて 570 nM にて読んだ。

20

## 【0216】

## (c) PSA ELISA

PSA の定量を、ELISA を用いて行った。簡単には、96 ウェルの Nunc プレートを 100 μl のヤギ抗-PSA (1 μg / ml、Scripps Laboratory, San Diego, CA) で一晚 4 °C にて覆った。プレートを水で 3 回洗浄し、100 μl のブロッキングバッファー (PBS、0.05% のトゥーン 20、1 μM の EDTA、0.25% の BSA および 0.05% の NaN<sub>3</sub>) と共に 1 時間室温にてインキュベートした。プレートを 3 回水で洗浄し、そして、マウス抗-ヒト PSA および Eu 標識抗-マウス IgG の 1:1 混合物と共にインキュベートした (10 ng / 抗体 各々 / ウェル 1<sup>1</sup> / 2 時間室温にて)。プレートを次いで 4 回水で洗浄した。100 μl の Delfia 増強 (Enhancement) 溶液 (PerkinElmer Wallac Inc (Norton, OH)) をプレートに添加し、Victor リーダーを製造業者の指示に従い用いて読んだ。

30

## 【0217】

## (d) RNA の抽出および精製

全 RNA を、Qiagen Rneasy Midi キットを製造業者の忠告に従い用いて LNCaP 細胞から単離した。ポリ A (+) 選択のために、Promega PolyA Tract キットを製造業者の方法に従い用いた。簡単には、LNCaP 細胞を遠心分離により集め、RNA を、バッファーおよび Qiagen キットから推奨された方法を用いて単離した。RNA 抽出の後、全サンプルを -80 °C にて凍結した。ポリ A (+) RNA の 1 μg を、GibcoBRL cDNA 合成キットを用いる二本鎖 cDNA の合成のための鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼプロモーターを組み込んでいる dT プライマーと共に用いた (プライミングのために 70 °C にて 10 分、Superscript II RT での第 1 鎖合成のために 37 °C にて 65 分、その後、イー・コリリガーゼ、イー・コリポリメラーゼ、および RNase H での第 2 鎖合成のために 15 . 8 °C にて 150 分)。二本鎖 cDNA は、De Angelis et al により開示される方法を用いて、Perseptives 常磁性 (paramagnetic) ビーズを用いて固相可逆固定 (SPRI) により精製した (De Angelis et al. (1995) Nuc. Acid Res. 23: 4742-4743 を参照されたい)。約 50 ng の二本鎖 cDNA をインビトロでの転写のための鋳型として用いて、標識された cRNA を作製した (16 時間 37 °C にて、Epicenter T7 RNA ポリメラーゼ、Enzo Laboratories bio-11-CTP、bio-11-UTP)。cRNA を常磁気性ビーズ (Bangs Laboratories) を用いて SPRI により精製し、次いで全モル濃度を 260 の吸収から測定した。ハイブリダイ

40

50

ゼーション前、10  $\mu$ g の標識 cRNA を、平均約 50 塩基長へと無作為に、94 °にて 40 mM トリス - 酢酸 pH 8.1、100 mM 酢酸カリウム、および 30 mM 酢酸マグネシウム中 35 分間加熱することにより断片化した。

#### 【0218】

細胞内 RNA から直接作製される材料に関し、細胞質 RNA を細胞から、Fabaloro et al の方法により抽出し ((1980) Methods Enzymol. 65: 718-749)、そしてポリ (A) RNA をオリゴ dT 選択ステップ (Promega PolyA tract mRNA Isolation System IV, Madison, WI) を用いて単離した。

#### 【0219】

##### (e) チップハイブリダイゼーションおよび分析

Affymetrix Genechip (登録商標) 法を用いて、LNCaP 細胞中での天然アンドロゲン DHT に応じた約 6000 全長のヒト遺伝子の発現をモニターした。図 2 は、サンプルの精製、ハイブリダイゼーション、および分析のために用いた一般スキームを示す。ハイブリダイゼーションカクテルは、10  $\mu$ g の断片化した cRNA、BSA 含有 2 x MES バッファー、ニシン精子 DNA、内部対照のための対照原核生物転写産物、およびビオチン化対照オリゴ 948 (チップの質の対照のため) を用いて作製した。DEPC - 水を 200  $\mu$ l の容積まで添加した。ハイブリダイゼーション前、ハイブリダイゼーションカクテルを 99 °へと 10 分間加熱し、次いで 37 °にてさらに 10 分間加熱し、その後、Hu6800 FL アレイ (Affymetrix GeneChips (登録商標)) に加えた。Hu6800 FL アレイは、6800 の公知の全長遺伝子、遺伝子当たり 20 のプローブ対にて約 250,000 25-mer のオリゴヌクレオチドプローブから成る。アレイハイブリダイゼーションは、一晚 45 °、50 rpm にて行った。ハイブリダイゼーション後、アレイを洗浄し、そして、製造業者の推奨および方法を用いて染色した (Affymetrix Expression Analysis Technical Manual)。非 - ストリンジェント洗浄バッファー (20 x SSPE、1.0 ml の 10% トウイーン 20、および水) を 20 °にて、およびストリンジェント洗浄バッファー (20 x SSPE、5 M NaCl、10% トウイーン 20、および水) を 50 °にて、洗浄ステップのために用いた。アレイを次いで、ストレプトアビジン結合フィコエリトリン (SAPE, Molecular Probes) で染色した後、ビオチン化抗 - ストレプトアビジンにより染色し、そして、シグナル増幅のために 25 °にて SAPE の第 2 ラウンドを行った。各染色ステップは 10 分間行った。全アレイを次いで、HP Genearray Scanner を用いて

10

20

30

#### 【0220】

##### (f) データのフィルタリングおよび統計値

初期データを、GeneChip (登録商標) により「存在」と指示される全遺伝子をフィルタリングすることにより減じた。2 - ウェイ ANOVA を次いで、統計学的コンピューティングパッケージ S - プラスにてこれらの遺伝子のそれぞれに関して複製データに関して行った。発現レベルに関して、2 つの実験係数 (治療および時間) の潜在的効果および両係数の相互作用を分散モデルの分析において評価し、そして、主な効果に関する p - 値 (P<sub>治療</sub>、P<sub>時間</sub>) および相互作用に関する p - 値 (P<sub>相互作用</sub>) を得た。治療係数および / または相互作用に関して統計学的に有意な (p - 値 < = 0.05) これらの遺伝子のみをふさわしいもの (the time being) と見なした。まず、ベースライン、およびこの p - 値標準を超した 705 遺伝子の実験的複製 mRNA 頻度に関して、平均を取った。各遺伝子から得られた平均頻度を次いで、ゼロの平均と 1 の標準偏差を有するべく全サンプルに関して標準化した。Kohonen et al により開発され (セルフ - オーガナイズングマップ (Self-Organizing Maps)、Second Extended Edition edition, Vol. 30. Nes York, 1997)、MATL

40

50

A B ツールボックスを用いて作製されたもとのセルフ - オーガナイズングマップ ( S O M ) アルゴリズムの変更バージョンを次いで、標準化した発現値に当てはめて、6 × 6 マトリックスの36クラスターを作製した(Tamayo et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA. 96: 2907-2912)。GenecardsおよびSwiss-Protなどのいくつかの公のデータベースを遺伝子の注釈のために用いた(例えば、Rebhan et al. GeneCard: 遺伝子、タンパク質、および疾患に関する百科辞典、Weizmann Institute of Science, Bioinformatics unit and Genome Center (Rehovot, Israel), 1997. World Wide Web URL: <http://bioinfo.weizmann.ac.il/card>,およびAppel et al. (1994) 生物学者のための情報修正ツールの新規作製: ExpASY WWW サーバーの例。Trends Biochem. Sci. 19: 258-260 World Wide Web URL: <http://www.expasy.ch/sprot/>を参照されたい)。

10

## 【 0 2 2 1 】

## ( g ) 定量 T a q m a n R T - P C R

GeneChip実験に用いた同じ全RNAサンプルを、Taqman(登録商標)EZ RT-PCRキット(PE Applied Biosystems)を用いて分析し、遺伝子発現の変化を確認した。全RNAサンプルを、50 ng / μ l の濃度へと希釈し、50 ngの全部を各反応のために用いた。PSAおよびFKBP54のためのプライマーおよび蛍光プローブを、Primer Express ソフトウェアを用いて設計し、プライマー選択のための製造業者の忠告に基き選択した。用いたプライマーは、100 n M濃度であり、以下のものであった。( a ) P S A - F ( 前方プライマー ) CGTGGCCAACCCCTGA ( 配列番号 1 )、P S A - R ( 逆プライマー ) CTTGGCCTGGTC ATTTCCAA ( 配列番号 2 )、および P S A - P ( プローブ ) CACCCCTATCAACCCCTATTGTAGTAA ACTTGA ( 配列番号 3 )。( b ) F K B P 5 4 - F ( 前方プライマー ) CTGTGACAAGGCCCTTGA ( 配列番号 4 )、F K B P 5 4 - R ( 逆プライマー ) CTGGGCTTCACCCCTCCTA ( 配列番号 5 )、F K B P 5 4 - P ( プローブ ) ACAAGCCTTCTCATTGGCACTGTCCA ( 配列番号 6 )。

20

## 【 0 2 2 2 】

製造業者が補充したRP-PCR成分の試薬混合物[(5 × TaqMan EZバッファー、酢酸マンガン(25 mM)、dATP(10 mM)、dCTP(10 mM)、dGTP(10 mM)、およびdUTP(20 mM)、rTth DNAポリメラーゼ(2.5 U / μ l)、AmpErase UNG(1U / μ l)、プライマー(最終濃度1 μ M)およびRNA(50 ng)]を用いて、製造業者の推奨に従いサンプルを調製した。加えて、標準曲線の作製およびその後のサンプルRNAの定量のために、GAPDH対照サンプルを調製した。GAPDHのためのプライマーおよびプローブはキットに含まれた(GAPDH前方および逆プライマー10 μ M、GAPDHプローブ5 μ M)。-アクチンも標準曲線の作製のために用いて、そして5 × 10<sup>6</sup>コピー ~ 5 × 10<sup>1</sup>コピーの範囲の両遺伝子のために希釈物を作製した。アッセイを、Perkin-Elmer/Applied Biosystems 7700Prismにて行い、そしてPCRサイクリングパラメータを製造業者の推奨に基き選択した。サンプルのRNAをGAPDHに対して正規化し、そして - アクチンを定量した。

30

## ( h ) ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析のために、LNCaP細胞を、培地を含んでいるチャーコールを除去した血清中1 × 10<sup>6</sup>細胞 / ウェルにて6 ウェルのプレートに撒いた。細胞をついで適当な量のアンドロゲン、例えば、10 n MのDHTで処理し、ついで、指定時間にて回収した。細胞を、400 mMのNaClを含んでいるMPER試薬(Pierce, Rockford, IL)中に回収した。タンパク質をBradford法(Bradford(1976) Anal. Bioch. 72: 248-254)により定量した。例えば30 μ gのタンパク質を12%のSDS PAGEゲル上で電気泳動し、そして、Bio Radトランスファー装置を用いてPVDF膜へ移した。PVDF膜をTBS-T(0.1%のトウイーン20を含むTBS)中、3%ミルクと共に15分間インキュベートした後、第1抗体、例えばウサギ抗-FKBP54抗体(Affinity Bioreagent, Inc)を添加した。一晚インキュベートした後、PVDF膜を3回TBS-Tで洗浄し、ついで2次抗体、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(Transduction Labs)と結合した抗-ウサギ-IgGと共に1時間インキュベートした。PVDF膜を次いで3回、TBS-Tで洗浄し、そしてタンパク質を、増強した化学ルミネセンス検出システム(Pierc

40

50

e)を用いることにより検出した。

( i ) 組織マイクロアレイの構築および分析

充実性腫瘍におけるFKBP54の存在を評価するために、組織マイクロアレイ分析を、多様なヒト正常(即ち、対照サンプル)および前立腺疾患標本(Clinomics, Inc.)において行った。10%の中性緩衝処理したホルマリンに固定した後、組織を選択し、整えて、次いでプロセッシングカセット中に置いた。カセットを次いでShandon Hypercenter(登録商標)組織プロセッサ上のプロセッシングバスケット中に入れ、その中で、組織をバッファのシリーズに、16時間のプロセッシングサイクルに渡って(10%中性緩衝処理ホルマリン、70%、95%、100%エタノール、キシレン、および溶融パラフィン包埋媒質)暴露した。全ステップは、58 でなければならないパラフィンステップを除いて40にて真空下で行った。プロセッシングの後、組織をカセットから取り出して、パラフィンブロック中に包埋した。生じたブロックを5 $\mu$ mに切断し、そしてスライドガラス上にのせた。スライドを58にて染色前の30分間加熱した。抗体 - FKBP54(Affinity Bioreagents)を、適当な希釈、例えば1:150の希釈へと、DAKO(登録商標)抗体希釈を用いてタイターした。試験標本の染色を、HIERをpH6.0クエン酸バッファ中で用いて、前処理なしで行った。組織を次いでVentana ES(登録商標)自動免疫組織学的染色器を用いて、標準的な間接免疫ペルオキシダーゼプロトコルを用いて、3,3'-ジミノベンズイジンをクロマゲンとして用いて染色した。免疫組織学的染色の格付けは、腫瘍および正常組織両方の上皮成分の細胞質染色の強度に基づく。染色の強度を、1+~4+スケールを用いてスコアし、1+はかすかな染色を示し、4+は強い染色(暗褐色の染色を示している)を示す。0のスコアは染色がないことを示す。

10

20

( j ) COS細胞の一時的なトランスフェクション

FKBP54の、アンドロゲンレセプター(AR)の転写活性における効果を決定するために、COS1細胞を、FKBP54をコードしている発現ベクターとともにアンドロゲンレセプター反応エレメントを含んでいるレポーター構築物で一時的にトランスフェクトした。COS1細胞は、6ウェルのプレートに、10%のチャーコールを除去した子牛血清を含んでいる2mlのフェノレッド-フリーDMEM中ウェル当たり $2 \times 10^5$ 細胞の密度で撒いた。翌朝、培地を2mlのDMEMで置きかえた。100 $\mu$ lのDMEM中指定量のDNAを6 $\mu$ lのPLUS試薬(Gibco)と混合し、室温にてインキュベートし、一方、4 $\mu$ lのリポフェクトアミンを100 $\mu$ lのDMEMと混合した。30分のインキュベーションの後、2つの混合物を合わせ、各ウェルに滴下した。DNAと共に4時間インキュベートした後、10%のチャーコールを除去した子牛血清を含んでいる2mlのフェノールレッドフリーDMEMを添加し、細胞を指定の化学物質で、さらに24時間処理した後、回収した。

30

( k ) ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼの活性を、PromegaのSteady-Gloルシフェラーゼアッセイシステムを用いて測定した。簡単には、処置の24時間後、細胞を1mlのPBS中でのスクラッピングにより回収した。トータル100 $\mu$ lのPBS中各サンプルからの5 $\mu$ gを100 $\mu$ lのStable-Glo試薬(Promega)と混合し、そして、ルミネセンスをルミノメーター(Wallac, 1450 MicroBeth Counter)にて5分後に測定した。

40

( i i ) 結果

DHTはLNCaP細胞の増殖およびPSAの産生を刺激する。

LNCaP細胞は、それらがアンドロゲンに対する反応性を維持するがゆえに、腫瘍モデルとして広く用いられている(Horoszewicz et al. (1983). Cancer Res 43: 1809-1818)。例えば、その増殖能力、分化した分泌機能を発現する能力、および脂質の合成および蓄積などのプロセスを調節する能力、全てはアンドロゲン反応性を維持する。本培養条件においてLNCaPを用いてアンドロゲン調節性遺伝子を試験することができるかどうかを確認するために、LNCaPのアンドロゲン処理に対する反応を、セクション(a-c)に記載する方法を用いて試験した。細胞の増殖およびPSAの産生を試験した。

図1Aは、LNCaP細胞の増殖が、投与量依存様式で天然のアンドロゲンDHTによ

50

り刺激されたことを示す。10 nMのDHTを、その強い成長刺激作用のために、残りの実験のために選択した。PSAは、広く用いられる前立腺マーカーであり、それゆえ、マイクロアレイ実験の前に、本試験において試験した。DHT処置に反応して、PSAの産生は投与量依存様式で増加した(図1B)。PSAシグナルを12時間で検出し、次いで最大レベルを約48時間で認めた。これらの結果により、LNCaPがDHTに反応性があることが立証された。

#### 【0223】

##### Genechipハイブリダイゼーションおよび分析

Affimetrix Genechip(登録商標)を用いて、LNCaP細胞中での天然のアンドロゲンDHTに応じた約6000の全長のヒト遺伝子の発現をモニターした。図2は、サンプル調製、ハイブリダイゼーション、および分析に用いた一般スキームを示し、ハイブリダイゼーションの詳細は、セクション(e)に記載する。信用できるデータを得るために、トータルのRNAを、DHTで、セクション(d)に記載するように0、2、4、6、12、24、48、および72時間処置したもしくは処置しなかったLNCaP細胞から、対で調製した。cRNAを調製し、Affymetrixチップに対して、ここでも対でハイブリダイゼーションさせた。それゆえ、30サンプルのトータルに関する生物学的複製物のセットを、再現性を確保するために各実験に関して作製した。少なくとも1時点においてベースラインまたは実験のいずれかにおいて、およびいずれかの複製物において「存在」と指示されたこれらの遺伝子のみが、最初のデータ削減フィルターにパスした。チップ上に表された約6000の遺伝子の中から、4491がこの最初のフィルターにパスした(75%)。

#### 【0224】

##### 複製物の統計学的分析

再現性を評価するために、各時点での2つの複製物の平均頻度に対する偏差係数(CV)を比較した。結果は、全遺伝子を通じて、CVが25と35%の間で変化することを示した(データは示していない)。実験設計に基づき、偏差の2ウェイ分析(ANOVA)を用いて、~4500遺伝子の発現変化の統計学的有意性を決定した。95%の有意なレベルに基づく結果は、200の遺伝子がアンドロゲン治療単独により有意であり、431の遺伝子がアンドロゲン治療と時間の相互作用のために有意であり、および74の遺伝子が、治療係数と相互作用の両方のために有意であったことを示す。アンドロゲン調節性遺伝子のみを同定し、時間のみにより有意に調節された242の遺伝子は考慮しなかった。

#### 【0225】

##### セルフ-オーガナイズングマップを用いる発現特性の迅速分類

迅速分類のために、および候補遺伝子の潜在的な機能を理解するために、アンドロゲンおよび/またはアンドロゲンと時間の間の相互作用により調節されることが見出された705の遺伝子のANOVA分析による発現特性を、c and Tamayo et al.(既出)により開発されたセルフ-オーガナイズングマップ(SOM)アルゴリズムの適合を用いてクラスター化し、各遺伝子のmRNA頻度を治療/時間サブグループ内で平均し、そして、全サブグループに対して平均した頻度を、平均した頻度の平均がゼロおよび、1に等しい標準偏差に対して定められるように標準化した。各遺伝子に関して標準化したmRNAの頻度に基づき、6x6マトリックスの36のクラスターを作製し、視覚化した。

#### 【0226】

##### アンドロゲン調節遺伝子の同定

迅速分類のため、および候補遺伝子の潜在的機能を理解するために、アンドロゲンおよび/またはアンドロゲンと時間の間の相互作用により調節されることがみだされた705の遺伝子の発現特性を、Kohonen and Tamayo et al(既出)により開発されたセルフ-オーガナイズングマップ(SOM)アルゴリズムの適合を用いてクラスター化した。結果は、クラスター(1,1)が、アンドロゲン治療に際して同様の誘導性発現パターンを示す遺伝子を含み、クラスター(6,6)が、アンドロゲン処置に際して抑制性発現パターンを示す遺伝子を含むことを示した。アンドロゲンに反応して誘導される遺伝子はクラスタ

ー ( 1 , 1 ) に共にクラスター化され、および最も広く用いられる前立腺癌に関する診断マーカーである前立腺特異的抗原 ( P S A ) を含んだ。癌が存在する場合、高まった P S A レベルがしばしば検出された。アンドロゲン処理に反応して、P S A の発現 ( P 治療 = 0 . 0 0 0 0 、 P 時間 = 0 . 8 6 8 2 、 P 相互作用 = 0 . 3 2 8 2 ) は 1 2 時間で対照に対して 3 倍増加し、そして約 4 倍を誘導した場合、その高い発現を 7 2 時間維持した ( 図 3 A ) 。同様に、対照サンプルにおける F K B P 5 4 の発現 ( P 治療 = 0 . 0 0 0 2 、 P 時間 = 0 . 4 3 6 9 、 P 相互作用 = 0 . 3 8 1 8 ) は、時間経過を通じて比較的低いが一定のパターンを維持した。しかし、アンドロゲン処置に際して、F K B P 5 4 は 2 時間で迅速に 2 倍誘導され、そして 2 4 時間でピークに達し、その場合、ベースラインに対して約 4 倍過剰発現した。

10

【 0 2 2 7 】

R N A サンプルの定量 R T P C R 分析

定量 R T P C R を用いて、セクション ( g ) に記載した GeneChip 分析からの遺伝子発現の変化を確認した。定量 R T P C R の結果を、P S A 、および F K B P 5 4 に関する R N A レベルの変化を示している図 4 A 、および B に示す。

【 0 2 2 8 】

F K B P 5 1 の産生はアンドロゲンにより調節された。

F K B P 5 4 のタンパク質産生がアンドロゲンにより調節されることを立証するために、セクション ( h ) に記載するようにウェスタンブロット分析を行った。結果は、D H T が時間依存様式で F K B 5 4 の発現をアップレギュレートしたことを示す ( プロットは示していない ) 。同様に、合成アンドロゲン、R 1 8 8 1 は F K B P 5 4 の発現をアップレギュレートすることができ ( プロットは示していない ) 、F K B P 5 4 がアンドロゲンレセプターにより調節されることを示す。興味深いことに、タンパク質レベルは、転写よりも 1 2 時間後の 2 4 時間後に増し、タンパク質の合成が誘導に必要であることが示唆される。F K B P 5 4 の発現は種々のアンドロゲン誘導性前立腺癌株において研究され、そして、試験された全細胞株 ( T s u - p r 1 、 P C 3 、 P C 3 - m m 2 、 D U 1 4 5 、データは示していない ) に存在することが見出された。ホルモン依存株における F K B P 5 4 のレベルは、非処置 L N C a P 細胞よりも高かった。

20

【 0 2 2 9 】

表 1 に、ウェスタンブロット分析からのバンド密度値をまとめる。これらの結果は、D H T 暴露の 2 4 時間後に、F K B P 5 4 の発現レベルが約 2 倍に増し、そして、増し続けて、D H T 暴露の 7 2 時間後に約 4 倍となった。R 1 8 8 1 刺激にて、R 1 8 8 1 刺激の 2 4 時間後に F K B P 5 4 の発現の約 1 0 倍の増加があり、そして、R 1 8 8 1 暴露の 7 2 時間後に約 3 0 倍の増加があった。

30

【 0 2 3 0 】

【表 1】

表 1 . D H T および R 1 8 8 1 刺激での R K B P 5 4 の定量発現レベル

時間(hr)	D H T 刺激	R 1 8 8 1 刺激
0	8.5	1.8
2	9.0	5.3
6	9.8	5.9
12	8.0	5.0
24	12.0	20.1
48	23.0	27.2
72	30.2	34.4

40

【 0 2 3 1 】

加えて、いくつかの前立腺癌細胞は、ラパマイシン類似体、C C I - 7 7 9 に反応性が

50

あることが同定された（データは示していない）。本明細書中、出典明示により組み込む米国特許第5,362,718に記載される他のラパマイシン類似体も用いてよい。癌患者におけるFKBP54の存在は、これらの患者がCCI-779処置に十分に反応する可能性があることを示す。

FKBP54そのものが、それが固有のイソメラーゼ活性を有するために、小分子の潜在的な薬物標的でもあり得る。イソメラーゼ活性のインヒビターは、高処理フォーマットを用いて異性体特異的プロテアーゼとしてキモトリプシンを用いて、および吸収測定により放出される4-ニトロアニリンをモニターすることにより、容易にスクリーニングことができる。

#### 【0232】

抗-FKBP54を用いた、前立腺癌の免疫組織学的染色

正常な前立腺および50の標本を含む組織マイクロアレイからの前立腺癌の、抗-FKBP54抗体を用いた前立腺癌免疫組織学的染色を、セクション(i)に記載するように行った。明らかに、正常サンプルからの良性腺（即ち、対照）は、概して、FKBP54を発現せず（データは示していない）、一方、癌の領域は核および細胞質表皮エレメントにおいて、3~4+の範囲で変化する染色にて概してポジティブであった（データは示していない）。

#### 【0233】

FKBP54はAR転写活性を高める。

FKBP54の、アンドロゲンレセプター（AR）における効果を決定するために、セクション(j)に記載されるように、FKBP54をコードしている発現ベクターと共にアンドロゲンレセプター反応エレメントを含んでいるレポーター構築物で、COS-1細胞を一時的にトランスフェクトした。図5に示すように、FKBP54のトランスフェクションはレポーター活性に影響を持たなかったが、アンドロゲンの存在下で30%以上AR活性を増し、FKBP54がAR転写活性を増すことが立証された。

#### 【0234】

まとめて、これらの結果は、イムノフィリンFKBP54がアンドロゲン調節性であること（DHTおよびR1881両方により）、および正常組織に対して前立腺癌標本で高度に発現されることが見出されたことを示す。さらに、組織マイクロアレイの結果は、FKBP54の発現がGleasonスコアと関連することを示した。一時的な同時トランスフェクション試験により、アンドロゲンによるARの活性化がFKBP54により高められることが立証され、アンドロゲンレセプターにおけるFKBP54の機能的役割が示唆された。FKBP54候補物質ARGは、正常および病的非と前立腺の増殖、分化、および機能を導く分子機構を理解するのに有用であり得る。まとめて、これらの結果により、FKBP54を診断マーカーとして用いることができること、および前立腺腫瘍の増殖に重要であることが立証される。本明細書中に立証するような前立腺癌におけるFKBP54の関与およびFKBP54の発現（アップレギュレートされた、またはダウンレギュレートされた）を修正することにより、前立腺癌の進行を阻止する治療効果が提供され得る。この修正は、現存する薬物、ラパマイシンなど、または本発明のスクリーニング法により同定される新規な薬物のいずれかによるものであってよい。

#### 【0235】

実施例2：前立腺癌の治療に有用な化合物のスクリーニング

FKBP54のcDNAおよびタンパク質配列は、受入番号U42031にて、公のデータベースGenbankにて入手可能である。公開文献および配列データベースにより、当業者に、以下のスクリーニングアッセイに有用なトランスフェクトされた細胞株を調製するのに必要とされる遺伝子が提供される。

#### 【0236】

前立腺癌の治療に潜在的に有用な試験化合物を、テトラサイクリンの存在下で(Tet-onシステム、Clontechより入手可能)FKBP54を発現することができるベクターで安定的にトランスフェクトされた前立腺癌細胞（例えばWT LNCaP細胞）中で、FKB

10

20

30

40

50

P 5 4 を発現させることにより同定することができる。トランスフェクトされた W T L N C a P 細胞は、適当な条件下（例えば、10%；子牛血清（FCS）、3 mM の L - グルタミン、100  $\mu$ g / ml のストレプトマイシン、および 100 ユニット / ml のペニシリンを追加した R P M I 1 6 4 0 培地中 T 1 7 5 培養フラスコ中にて）培養することができる。ステロイドの効果を試験するために、細胞をデキストランでコートされたチャーコール（C T FCS）で前処理した 5% の FCS を含んでいる R P M I 1 6 4 0 培地中で 2 日間培養することができる。細胞を、必要に応じてテトラサイクリンと共に試験化合物の存在下にインキュベートし、そして細胞の増殖速度を測定することができる。T e t で処置された細胞において、T e t で処理しなかった細胞に対して差別的阻害活性を示す化合物が前立腺癌の治療のための潜在的な治療化合物であり、ゆえにさらなる確認のために選択される。

#### 【0237】

##### 実施例 3：FKBP マーカーの検出

FKBP マーカー、例えば、FKBP 5 4 の細胞の増殖における役割および腫瘍の阻害における効果を評価するために、FKBP 5 4 T e t - o n 発現ベクターで感染させた細胞の増殖速度を、T e t の存在または不在で測定する。変化した増殖により、FKBP 5 4 の、腫瘍細胞の増殖における役割を確認し、そして、イムノフィリンの治療における価値を確認する。FKBP 5 4 マーカーの存在および発現レベルは、Sambrook et al., (1989) 既出に記載されているような常套の分子生物学的方法を用いて評価することができる。

#### 【0238】

RNA 種の検出および定量的のために、FKBP 5 4 マーカーに対応している核酸を単離および増幅することができる。FKBP 5 4 核酸に特異的にハイブリダイズするプライマーの対を、Genebank 受入番号 U 4 2 0 3 1 から入手可能なこれらのマーカーのヌクレオチド配列に基づき設計することができる。プライマーは、選択的ハイブリダイゼーションを許容する条件下で単離核酸と接触させることができる。一度ハイブリダイズしたら、核酸：プライマー複合体を、PCR 増幅を用いる鋳型依存性の核酸合成を促進する 1 またはそれ以上の酵素と接触させることができる。増幅産物は、例えば、ゲル電気泳動および UV 光下にエチジウムブロマイドを用いる視覚化により検出することができる。別法として、増幅産物を、放射能または蛍光測定標識されたヌクレオチドで完全に標識することができる場合、増幅産物を次いで x 線フィルムに暴露し、または適当な誘導スペクトル下で視覚化した後、分離することができる。

#### 【0239】

FKBP マーカーの存在および発現レベルを検出するための他の方法には、FKBP 5 4 マーカータンパク質を E L I S A 免疫検出アッセイにより検出することが含まれる。例えば、抗 - FKBP 5 4 抗体を用いることにより、細胞サンプル中で発現された FKBP 5 4 マーカーの存在を検出する。抗 - FKBP 5 4 抗体をタンパク質アフィニティを示している選択された表面、例えばポリスチレンマイクロタイタープレート中のウェルなどの上に固定することができる。ついで、FKBP 5 4 マーカーを含んでいる可能性のある細胞サンプルをウェルに添加することができる。結合させ、および洗浄して、非特異的結合免疫複合体を除去した後、結合した抗体を検出してよい。検出は、検出可能な標識が結合する FKBP 5 4 マーカータンパク質の異なる領域に特異的な 2 次抗体の添加により達成することができる。

#### 【0240】

##### 実施例 4：充実性腫瘍における FKBP マーカーの検出

FKBP、例えば FKBP 5 4 が腫瘍の増殖の異なる段階で発効したかどうかを決定するために、RNA を、異なる Gleason グレードを有する正常前立腺および前立腺腫瘍から単離することができる。充実性腫瘍を、Gleason スコアリングシステムを用いてスコアした（例えば、本明細書中に出典明示により組み込まれる Bostwick (1994) Amer. J. Clin. Path. 102: S38-56 を参照されたい）。トータルの RNA を抽出し、これらの異なる腫瘍

段階におけるFKBP54の発現のレベルに関して、実施例1に記載するようにAffimetrixマイクロアレイを用いて試験することができる。

【0241】

同等の内容について

当該分野の専門家は、常規の実験をさらに行うことなく、本明細書中に開示する特定の具体例に対する多くの同等の内容を認識するであろうし、または確認することができるであろう。そのような同等の内容は添付の請求の範囲により包含されるものとする。

【図1】

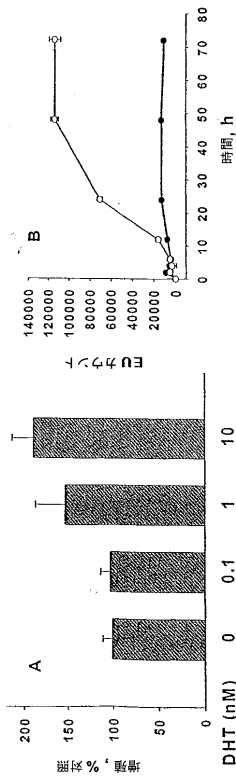


Figure 1

【図2】

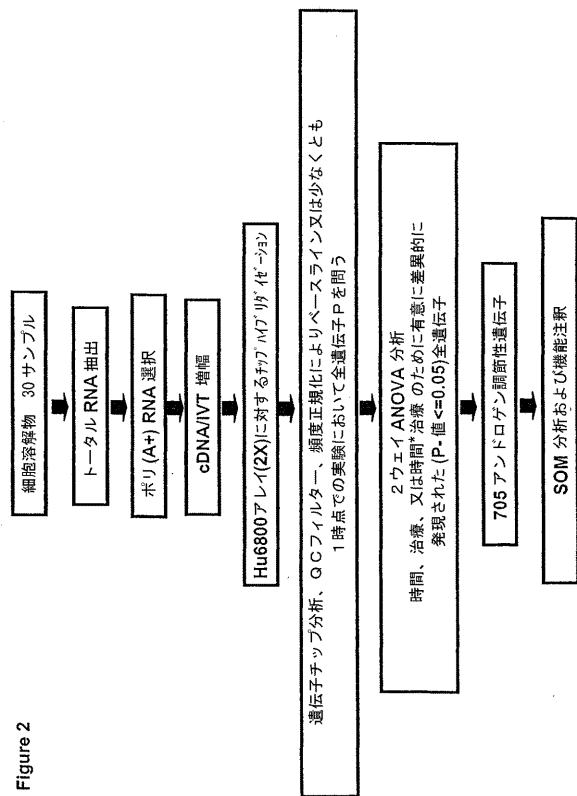
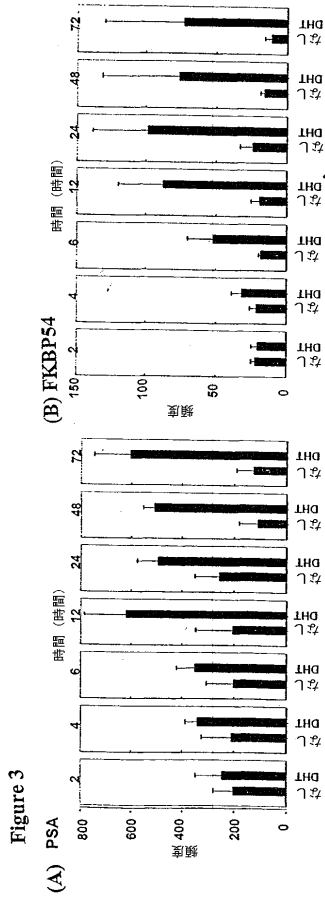
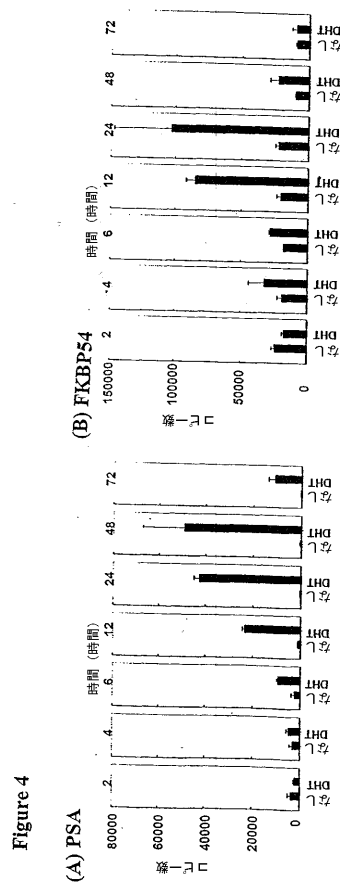


Figure 2

【 図 3 】

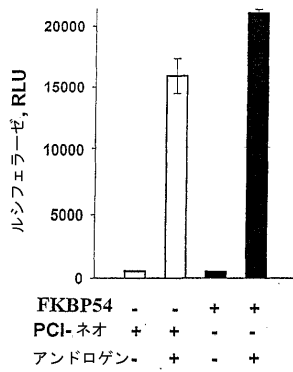


【 図 4 】



【 図 5 】

Figure 5



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	G
	C 0 7 K 16/28	

(72)発明者 キンバリー・エイ・ジリス

アメリカ合衆国 0 1 9 0 7 マサチューセッツ州スワンブスコット、ハンフリー・ストリート 2 0 3 番

(72)発明者 ジャン・イシャン

アメリカ合衆国 1 0 9 6 5 ニューヨーク州パール・リバー、ピラ・ロード 1 1 5 番

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA14 DA36 FB01 FB03  
 4B024 AA01 AA12 BA63 CA04 CA11 CA12 DA03 HA14 HA17  
 4B063 QA19 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR55 QR77  
 QS34 QX01  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB26 ZC02  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA28 EA51

专利名称(译)	fkbp核酸和多肽在前列腺癌诊断和治疗中的表达分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011043496A</a>	公开(公告)日	2011-03-03
申请号	JP2010172140	申请日	2010-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯, LLC		
[标]发明人	キンバリーエイジリス ジャンイシヤン		
发明人	キンバリー・エイ・ジリス ジャン・イシヤン		
IPC分类号	G01N33/68 A61K31/7088 A61P13/08 A61P35/00 C12Q1/68 C12Q1/04 G01N33/574 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/113 C07K16/28 A61K45/00 A61K48/00 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1 /6886 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/94		
CPC分类号	A61P13/08 C07K16/18 C12Q1/6886 C12Q2565/501 C12Q2600/158 G01N33/57434 G01N33/9493 G01N2500/00 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68 A61K31/7088 A61P13/08 A61P35/00 C12Q1/68.A C12Q1/04 G01N33/574.A G01N33/50.P G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15/00.G C07K16/28 C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA12 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063 /QR48 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QX01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZB26 4C086/ZC02 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA51		
代理人(译)	山田卓司 西野充		
优先权	60/253539 2000-11-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种评估受试者是否患有前列腺癌的方法。一种评估受试者是否患有前列腺癌的方法，其包括：a) 在来自受试者的样品中FKBP标志物的表达水平；和b) 在对照样品中该标志物的正常表达。并且来自受试者的样品中标志物的表达水平和正常水平之间的显著差异指示受试者患有前列腺癌。[选择图]无

表1. DHTおよびR1881刺激でのRKBP54の定量発現レベル

時間(hr)	DHT刺激	R1881刺激
0	8.5	1.8
2	9.0	5.3
6	9.8	5.9
12	8.0	5.0
24	12.0	20.1
48	23.0	27.2
72	30.2	34.4