

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 538818

(P2002 - 538818A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 9/64		C 1 2 N 9/64	A 4 B 0 5 0
C 0 7 K 16/38		C 0 7 K 16/38	4 B 0 6 3
	16/40	16/40	4 B 0 6 4
C 1 2 N 9/99		C 1 2 N 9/99	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/37		C 1 2 Q 1/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 56数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 605726(P2000 - 605726)

(86) (22)出願日 平成12年1月26日(2000.1.26)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月31日(2001.8.31)

(86)国際出願番号 PCT/US00/01937

(87)国際公開番号 W000/55308

(87)国際公開日 平成12年9月21日(2000.9.21)

(31)優先権主張番号 09/266,957

(32)優先日 平成11年3月12日(1999.3.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ハイブリテック インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 92196 - 9000 カリフォル
ニア州 サン ディエゴ (ピーオー ボッ
クス 269006) キャロル ロード 7330

(72)発明者 ミコライクジク、 スティーブン
アメリカ合衆国 92117 カルフォルニア州
サンディエゴ コンラド アヴェニュー
4052

(72)発明者 サエディ、 モハマド
アメリカ合衆国 92126 カルフォルニア州
サンディエゴ ヘンドリックス 7898

(74)代理人 弁理士 松永 宣行

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 前立腺腫瘍組織におけるヒトカリクレイン2とプロテアーゼインヒビター - 6の新規な複合体および該複合体の利用方法

(57)【要約】

本発明は、h K 2 と P I - 6 の新規な複合体と該新規な複合体の利用方法を提供する。本発明のh K 2 と P I - 6 の新規な複合体は、前立腺癌の組織において亢進したレベルで存在する。したがって、本発明のh K 2 と P I - 6 の複合体は前立腺癌を検出するための血清マーカーとして利用できる。前記複合体は前立腺癌の組織を検出するための免疫組織化学的マーカーとしても利用できる。本発明によると、本発明のh K 2 と P I - 6 の複合体は、免疫組織化学的な手法により患者の組織の試料において、および/または試験管内のイムノアッセイ法の手法により患者の液体の試料において検出される。前立腺癌の存在を検出するための診断用キットおよび診断方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 P I - 6 と h K 2 とからなる、単離され実質的に精製された複合体。

【請求項2】 前記複合体は P I - 6 と完全な h K 2 とからなり、非還元条件下でのポリアクリルアミドゲル技術により測定された約 6 4 k D a の分子量を有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項3】 前記複合体は P I - 6 と h K 2 の断片からなり、還元条件下でのポリアクリルアミドゲル技術により測定された約 5 0 k D a の分子量を有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項4】 前記 h K 2 の断片は 1 4 5 番のアルギニンで切断された h K 2 である、請求項3に記載の複合体。

【請求項5】 前立腺の組織から単離された請求項1に記載の複合体。

【請求項6】 前立腺腫瘍の試料で亢進したレベルで存在する請求項1に記載の複合体。

【請求項7】 P I - 6 と h K 2 からなる複合体と特異的に免疫反応する抗体。

【請求項8】 前記抗体はポリクローナル抗体である、請求項7に記載の抗体。

【請求項9】 前記抗体はモノクローナル抗体である、請求項7に記載の抗体。

【請求項10】 試料中の P I - 6 と h K 2 とからなる複合体を検出、測定する方法であって、(a) 検出されるべき h K 2 / P I - 6 複合体と特異的に結合するある量の試薬と前記 h K 2 / P I - 6 複合体を含む三重複合体が形成できる条件下で、前記試薬を試料と反応させるステップと、(b) 前記三重複合体の存在を検出し、前記三重複合体の量を測定するステップとからなる方法。

【請求項11】 前記試薬は抗体である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記抗体はモノクローナル抗体である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記試薬は抗体で、該抗体は固相に結合している、請求項

10に記載の方法。

【請求項14】 前記試薬は抗体で、該抗体は検出可能な標識を含み、または検出可能な複合体を形成するために検出可能な標識と結合する、請求項10に記載の方法。

【請求項15】 前記試料は哺乳類の組織の試料である、請求項10に記載の方法。

【請求項16】 前記試薬は抗体である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記(b)のステップにおける前記複合体は、検出可能な標識を含み、または検出可能な複合体を形成するために検出可能な標識と結合し、第2の試薬により検出される、請求項15に記載の方法。

【請求項18】 前記第2の試薬は抗体である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 前記哺乳類の組織はヒトの前立腺の組織である、請求項15に記載の方法。

【請求項20】 前記ヒトの前立腺の組織は前立腺癌の組織である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記試料はヒトの生理的な液体の試料である、請求項10に記載の方法。

【請求項22】 前記ヒトの生理的な液体は血清、精漿、尿および血液からなるグループから選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 生物学的な液体の試料中のhK2/P I - 6複合体を検出するためのイムノアッセイ法であって、(a) hK2/P I - 6複合体のあるエピトープを認識する第1の抗体と、hK2/P I - 6複合体の別のエピトープを認識する第2の抗体とを準備すること、(b) 第1の抗体が前記複合体と結合し、第1の抗体とhK2/P I - 6複合体とを含む第1の複合体が形成できる条件下で、第1の抗体を前記試料と反応させること、(c) 第2の抗体がhK2/P I - 6複合体と結合し、第1の抗体と第2の抗体とhK2/P I - 6複合体とを含む第2の複合体が形成できる条件下で、第2の抗体を第1の複合体と反応させること、(d) 前記試料中に含まれるhK2/P I - 6複合体の測定値として、第2の複合体を検出、測定することを含む、イムノアッセイ法。

【請求項24】 前記第1および第2の抗体はそれぞれhK2/PI-6複合体と特異的に免疫反応する抗体である、請求項23に記載のイムノアッセイ法。

【請求項25】 前記第1および第2の抗体のうち、一方はhK2に対する抗体で、他方はPI-6に対する抗体である、請求項23に記載のイムノアッセイ法。

【請求項26】 前記第1および第2の抗体のうち、一方は固相に結合し、他方は検出可能な標識で標識された、請求項23に記載のイムノアッセイ法。

【請求項27】 試料中のPI-6とhK2からなる複合体を検出、測定するための診断キットであって、検出可能に標識されまたは検出可能な標識に結合し、前記複合体と特異的に結合する、既知量の試薬を含むキット。

【請求項28】 前記試料はヒトの生理的な液体である、請求項27に記載の診断用キット。

【請求項29】 前記試薬は前記複合体と特異的に結合する抗体を含む、請求項27に記載の診断用キット。

【請求項30】 前記抗体を結合させることが可能な固相を含む、請求項29に記載の診断用キット。

【請求項31】 前記試料は哺乳類の組織の試料である、請求項27に記載の診断用キット。

【請求項32】 前記哺乳類の組織の試料はヒトの前立腺の組織の試料である、請求項31に記載の診断用キット。

【請求項33】 前記抗体はモノクローナル抗体である、請求項29に記載の診断用キット。

【請求項34】 試料中のPI-6とhK2からなる複合体を検出、測定するための診断用キットであって、前記キットは、検出可能に標識されまたは検出可能な標識と結合し、前記複合体と特異的に結合する既知量の第1の試薬と、固相の支持体に結合し、前記複合体と特異的に結合する既知量の第2の試薬とを含むキット。

【請求項35】 前記第1の試薬は前記複合体と特異的に免疫反応する抗体

を含み、前記第2の試薬は前記複合体と特異的に免疫反応する抗体を含む、請求項34に記載のキット。

【請求項36】 前記第1および第2の試薬のうち、一方はhK2と特異的に免疫反応する抗体を含み、他方はPI-6と特異的に免疫反応する抗体を含む、請求項34に記載のキット。

【請求項37】 前立腺癌の有無を決定するための診断方法であって、(a) PI-6とhK2とからなる複合体と特異的に結合するある量の試薬とPI-6とhK2とを含む三重複合体が形成できる条件下で、前記PI-6とhK2とからなる複合体を含むヒトから得られた試料と前記試薬を反応させること、(b) 前記試料中の前記三重複合体の量を決定し、該三重複合体の量を前記ヒトの前立腺癌の有無と関連づけることを含む、診断方法。

【請求項38】 前記試料は生理的な液体の試料である、請求項37に記載の診断方法。

【請求項39】 前記試薬は抗体を含む、請求項37に記載の診断方法。

【請求項40】 前記試料は哺乳類の組織の試料である、請求項37に記載の診断方法。

【請求項41】 前記哺乳類の組織の試料は前立腺の組織の試料である、請求項40に記載の診断方法。

【請求項42】 前立腺癌の有無を決定するための診断方法であって、(a) PI-6と特異的に結合するある量の試薬とPI-6を含む二重複合体が形成できるのに十分な条件下で、PI-6を含むヒトから得られた試料と前記試薬を反応させること、(b) 前記試料中の前記複合体の量を測定し、該複合体の量を前記ヒトでの前立腺癌の有無と関連づけることを含む、診断方法。

【請求項43】 前記試料は前立腺の組織の試料である、請求項42に記載の診断方法。

【請求項44】 前記試薬は抗体を含む、請求項42に記載の診断方法。

【請求項45】 遊離hK2と遊離PI-6とhK2/PI-6複合体とを含む組織標本中のhK2/PI-6複合体を検出し測定するための方法であって、(a) 遊離hK2に特異的な第1の抗体と遊離PI-6に特異的な第2の抗体

とhK2 / PI - 6複合体を認識し結合する第3の抗体とを準備すること、(b)遊離hK2と遊離PI - 6の全てがそれぞれ第1および第2の抗体によりブロックされる条件下で、第1および第2の抗体を前記組織標本と反応させること、(c)前記組織標本に含まれるhK2 / PI - 6複合体と第3の抗体が結合して第3の抗体とhK2 / PI - 6複合体とを含む三重複合体が形成できる条件下で、第3の抗体を前記組織標本と反応させること、(d)前記三重複合体の存在を検出し前記三重複合体の量を測定することを含む方法。

【請求項46】 前記第3の抗体は、遊離hK2だけでなくhK2 / PI - 6複合体をも認識し結合するhK2に対する抗体である、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記第3の抗体は、遊離PI - 6だけでなくhK2 / PI - 6複合体をも認識、結合するPI - 6に対する抗体である、請求項45に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】****発明の背景**

本発明は、一般的には前立腺に、具体的には、前立腺において形成される、ヒトカリクレイン2 (hK2) とプロテアーゼインヒビター - 6 (PI-6) の複合体および該複合体の利用方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

本明細書では、参照文献の番号はかっこ書きで示される。本発明に関する先行技術をより完全に記載するために、参照により前記文献に開示された全内容が本明細書に取り込まれている。前記参照文献の書誌的事項は、本明細書の最後、請求の範囲の前に列記される。

【0003】

ヒトカリクレインのファミリーの3つのメンバーがこれまでに同定されており、hK1、hK2およびhK3と命名されている(1)。その全てが配列同一性の高いセリンプロテアーゼである。前記カリクレインのうち2つ、hK2およびhK3は、ほとんど前立腺のみに存在する((2)に詳細に総説されている)。hK3は、より一般的には前立腺特異抗原(prostate specific antigen、PSA)として知られており、前立腺の血清マーカーとして利用されている。最近ではhK2は、前立腺癌のマーカーとしての可能性と、前立腺癌の生物学において役割を果たしている可能性とについての研究の焦点になってきた(2)。

【0004】

hK2は、前立腺の組織に局在すること(3、4)、配列同一性が80%あること(5、6)およびアンドロゲンにより調節されること(7、8)のような多くの点でPSAと似ている。生化学的な観点からは、hK2は強いトリプシン様活性を示すのに対して、PSAは弱いキモトリプシン様活性を示す点でhK2とPSAは異なる。しかし、本当のカリクレインとは異なり、hK2はほとんどキ

ニノゲナーゼ様活性がなく(9、10)、前立腺で発現するキニノゲナーゼとして主に機能するわけではないらしい。

【0005】

hK2の生理的な役割は未確定であるが、いくつかの活性は記載されている。hK2はPSAの酵素前駆体型(pPSA)を活性化すること(11-13)およびhK2の酵素前駆体型を活性化すること(自己活性化、14)が示された。この点で、hK2は他のヒト組織カリクレインであるhK1およびPSAと比べて独特である。hK2によるpPSAの活性化は、PSA活性の調節にhK2が役割を果たす可能性があることを示唆するため、特に興味深い。

【0006】

hK2特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的な研究により、hK2が正常組織に比べて前立腺癌腫でより高く発現することが示された(15)。これはPSAの逆であり、PSAは正常組織に比べてより未分化な癌化上皮でより低く発現する傾向がある。

【0007】

hK2は、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA)の2本鎖の活性型を生成するために、Lys¹⁵⁸で一本鎖のuPAを切断することによりuPAを活性化することが示されている(12、16)。hK2はPAI-1と試験管内で迅速に複合体を形成することと、hK2は複合体形成の間に約6モルのPAI-1を不活性化することが最近報告された(17)。したがって、前立腺癌におけるhK2レベルの亢進はウロキナーゼの活性化により、あるいはウロキナーゼの主要なインヒビターであるPAI-1の不活性化により、生物学的な役割を果たす可能性がある。

【0008】

生理学的にはhK2は、血清中でのACTとの複合体(18)または精漿中でのPCIとの複合体(19)として同定された。しかし、hK2が前立腺において何らかの組織特異的な複合体を形成するかどうかはこれまで知られていなかった。そこで前立腺、特に前立腺癌におけるhK2の役割を研究する必要がある。

。

【0009】

発明の概要

本発明は、前立腺の組織の抽出物におけるPI-6として知られるセリンプロテアーゼインヒビターとhK2とからなる複合体の発見を基礎とする。PI-6は最初に胎盤の組織において報告され、トロンビンと試験管内で複合体が形成できることから、胎盤トロンビンインヒビターと呼ばれた(20)。PI-6は、細胞質に局在することから、細胞質アンチプロテアーゼ(cytoplasmic antiprotease、CAP)とも呼ばれる(21)。PI-6は上皮および内皮細胞に発現し、腎臓、心臓、骨格筋および血小板を含む多数のヒト組織および細胞で記載されている(22-24)。前立腺では報告されていない。これまでの全ての場合においてPI-6は細胞質に局在するらしい。

【0010】

前立腺におけるhK2とPI-6の複合体(hK2/PI-6複合体)の発見は、1)PI-6自体がこれまで前立腺の組織において未報告のセリンプロテアーゼインヒビターファミリーの新規でかつ比較的最近になって記載されたメンバーである点、2)PI-6は細胞内にあると考えられていることから、細胞外にあると考えられるhK2との複合体形成のためには、新規な経路があるかあるいはおそらく発癌の過程で変化した経路があるかのいずれかであることが示唆される点、という少なくとも2つの大きな点で、hK2とACTとの複合体およびhK2とPCIとの複合体についてのこれまでの報告に比べて独自性がある。

【0011】

理論に縛られることは望むところではないが、前立腺のPI-6がhK2と複合体を形成するという発見は、PI-6が前立腺において何らかの役割を果たすかもしれないことを示唆する。PI-6は、hK2の調節について生物学的な意義があり、前立腺癌の生物学において役割を果たすかもしれない、hK2の組織特異的なインヒビターに該当する。

【0012】

hK2/PI-6複合体は良性または正常な前立腺の組織に比べて前立腺癌で亢進していることが、本発明の発見である。PI-6のレベルは前立腺癌におい

て亢進していることも、本発明の発見である。そこで、hK2またはPI-6単独のレベルおよび前記複合体の両方が、前立腺癌の新規なマーカーかもしれない。

【0013】

したがって本発明の1つの局面は、PI-6とhK2とからなる単離され実質的に精製された複合体を提供する。該複合体に含まれるhK2は完全な(intact)hK2でもhK2の断片でもかまわない。本発明の複合体は、前立腺腫瘍の組織においてレベルが亢進している。

【0014】

本発明の別の局面は、PI-6とhK2とからなる複合体と特異的に免疫反応する抗体を提供する。該抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもかまわない。

【0015】

本発明の更なる局面は、試料中のPI-6とhK2とからなる複合体を検出、測定する方法を提供する。この方法は、(a)検出されるべき複合体と特異的に結合するある量の試薬とhK2/PI-6複合体とを含む三重複合体が形成できる条件下で、前記試薬を前記試料と反応させる(contact)こと、(b)前記三重複合体の存在を検出または前記三重複合体の量を測定すること、というステップを含む。

【0016】

好ましい実施態様では、前記試薬は抗体を含む。検出されるべき試料は、哺乳類の組織の試料、特に前立腺の組織の試料か、それとも血清、精漿、尿および血液を含むがこれらに限定されない、ヒトの生理的な液体の試料かでもよい。

【0017】

本発明のさらに別の局面は、生物学的な液体の試料におけるhK2/PI-6複合体を検出するためのイムノアッセイ法を提供する。該イムノアッセイ法は、(a)hK2/PI-6複合体のあるエピトープを認識する第1の抗体および前記複合体の別のエピトープを認識する第2の抗体を準備すること、(b)第1の抗体が前記複合体と結合し、第1の抗体およびhK2/PI-6複合体を含む第

1の複合体が形成できる条件下で、第1の抗体を試料と反応させること、(c)第1の抗体、第2の抗体およびhK2/PI-6複合体を含む第2の複合体が形成できる条件下で、第2の抗体を前記第1の複合体と反応させること、(d)試料中のhK2/PI-6複合体の測定値として前記第2の複合体を検出、測定すること、というステップからなる。

【0018】

本発明の実施態様によると、第1の抗体および第2の抗体は、hK2/PI-6複合体と特異的に免疫反応する抗体である。第1の抗体と第2の抗体のうちの一方はhK2に対する抗体で、他方はPI-6に対する抗体とすることが代替策である。

【0019】

本発明の更なる局面は、試料中のhK2とPI-6とからなる複合体を検出、測定するための診断用キットを提供することである。該キットは前記複合体と特異的に結合する既知量の試薬を含み、該試薬は検出可能に標識されあるいは検出可能な標識と結合する。

【0020】

本発明の実施態様によると、前記試料はヒトの生理的な液体またはヒトの前立腺の組織の試料であり、前記試薬は前記複合体と特異的に結合する抗体を含む。

【0021】

本発明は、試料中のhK2とPI-6とからなる複合体を検出、測定するための診断用キットを提供する。該キットは、前記複合体と特異的に結合する既知量の第1の試薬であって、検出可能に標識されあるいは検出可能な標識と結合する第1の試薬と、前記複合体と特異的に結合する既知量の第2の試薬であって、固相の支持体に結合する第2の試薬とを含む。

【0022】

本発明の実施態様によると、第1の試薬は前記複合体と特異的に免疫反応する抗体を含み、第2の試薬は前記複合体と特異的に免疫反応する抗体を含む。第1と第2の試薬のうちの一方はhK2と特異的に免疫反応する抗体を含み、他方はPI-6と特異的に免疫反応する抗体を含むとすることが代替策である。

【0023】

本発明は、前立腺癌の有無を決定するための診断方法であって、(a) P I - 6 と h K 2 とからなる複合体と特異的に結合するある量の試薬と P I - 6 と h K 2 とを含む三重複合体が形成できるのに十分な条件下で、前記複合体を含むヒト由来の試料と前記試薬を反応させること、(b) 前記試料中の前記三重複合体の量を測定し、該三重複合体の量を前記ヒトでの前立腺癌の有無と関係づけることを含む、診断方法を提供する。

【0024】

本発明の実施態様によると、前記試料は生理的な液体の試料または前立腺の組織の試料である。前記試薬は抗体を含む。

【0025】

本発明は前立腺癌の有無を決定するための診断方法を提供する。その方法は、(a) P I - 6 と特異的に結合するある量の試薬と P I - 6 を含む二重複合体が形成できるのに十分な条件下で、P I - 6 を含むヒト由来の試料であって、前立腺の組織の試料、血清、精漿、尿および血液からなるグループから選択される試料と前記試薬を反応させること、(b) 前記試料中の複合体の量を測定し、該複合体の量を前記ヒトでの前立腺癌の有無と関係づけることを含む。

【0026】

本発明の実施態様によると、前記試料は前立腺の組織の試料で、前記試薬は抗体を含む。

【0027】

本発明は添付された請求の範囲において完全な射程が確定され、以下の好ましい実施態様において説明される。

【0028】

上記およびその他の本発明の特長とその実現方法は、以下の説明を添付図面とともに参照することによって、より明解となり最も良く理解されるであろう。これらの図面は本発明の典型的な実施態様のみを表すのであり、したがってその射程を限定するものではない。これらの図面は具体性と詳細を付け加えるのに役立つ。

【0029】

発明の詳細な説明

本発明の1つの局面は、PI-6とhK2とからなり、単離され実質的に精製された複合体を提供することである。ここで用いられる「実質的に精製された (substantially purified)」という用語は、PI-6とhK2とからなる複合体であって、自然状態で会合 (associated) している他のタンパク質、脂肪、炭水化物等の物質が実質的に除去されている複合体を指す。本発明の実質的に精製されたhK2 / PI-6複合体は、非還元的条件下でのポリアクリルアミドゲルで単一の主要なバンドになる。前記複合体はSDS-PAGE技術により測定された約64kDaの分子量を有する。特定の会合状態 (form) のhK2の純度はアミノ末端のアミノ酸配列分析によっても測定できる。

【0030】

本発明の目的のためには、hK2という用語は完全なhK2ポリペプチドとhK2ポリペプチドの断片とを含む。例えば、本発明の1の実施態様において、hK2とPI-6との複合体に含まれるhK2ポリペプチドは、hK2ポリペプチド配列の145番目のアルギニンで切断された (clipped) ものであってもよい。切断されたhK2を含むhK2 / PI-6複合体が還元条件下でのポリアクリルアミドゲルを経て精製されるとき、前記複合体はPI-6に共有結合したhK2断片とPI-6とを含む。PI-6と共有結合しない切断された断片は、還元および変性条件下で前記複合体から分離される。例えば、1の実施態様では、hK2 / PI-6複合体はhK2の145-237番のアミノ酸配列の断片とPI-6とからなる。前記複合体は還元条件下のポリアクリルアミドゲル技術により測定された約50kDaの分子量を有する。本発明の複合体に含まれるhK2は該hK2配列の他の部位で切断されてもかまわないことを理解すべきである。そこで、本発明の目的のためには、hK2 / PI-6複合体に用いられるhK2という用語は、切断された断片が前記複合体のPI-6と共有結合する限りにおいて、完全なhK2のどの位置で切断されたhK2断片でも含まれる。

【0031】

PI-6は前立腺腫瘍に存在することが本発明の発見である。hK2/PI-6複合体は亢進したレベルで前立腺腫瘍に存在することも本発明の発見である。hK2/PI-6複合体の量が正常または良性の組織に存在する複合体の量よりも高いとき、前記複合体のレベルは亢進しているとする。

【0032】

本発明のhK2/PI-6複合体は、ここで説明される方法、すなわち、精製されあるいはほぼ精製されたタンパク質の試験管内での調製によって、そしてタンパク質精製の分野の当業者に知られた他のいかなる方法によっても、前立腺の組織から単離することができる。精製されたhK2/PI-6複合体は抗体作成に用いられる。したがって、本発明の1の局面は、本発明のhK2/PI-6複合体と特異的に免疫反応し結合する抗体を提供する。ここで用いられる「特異的に免疫反応する(specifically immunoreactive)」あるいは「特異的な」という用語は、本発明の抗体が本発明のhK2/PI-6複合体のみを認識し結合し、遊離hK2や遊離PI-6とは結合しないことを指す。

【0033】

異なるエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体の混合物から本質的になる抗体が、個別のモノクローナル抗体調製物とともに提供される。モノクローナル抗体は、本発明の複合体または本発明の複合体の部分を含む抗原から、当業者に周知の方法により作成される(E. ハーロー(Harlow)ら、抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー研究所、1988年)。一般には、この方法は、例えば適合するミエローマの株細胞と融合された初代培養の脾臓細胞から抗体産生融合細胞株を作成すること、および該融合細胞を大量培養においてか、あるいは使用されたミエローマ細胞株が由来しまたは適合する動物種においてかのいずれかで増殖させることに関する。かかる抗体は、動物への接種により産生されたものと比較すると多くの利点を有するが、それは、かかる抗体の特異性と感度が高く、免疫学的にみて比較的「純度が高い」からである。免疫学的に活性のある抗体断片、例えば、f(ab)断片は、本発明の射程内にあり、部分的に

ヒト化したモノクローナル抗体も同様である。

【0034】

所望の場合には、ポリクローナル抗体は、例えば抗体が作成されたポリペプチドまたはペプチドが結合するマトリクスに結合し溶出することにより、さらに精製することが可能である。当業者は免疫学の分野においてポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の精製および/または濃縮のための様々な共通技術のことを知っている。(例えば、引用により取り込まれたコリガン(Coligan)ら、免疫学の最新のプロトコール(Current Protocols in Immunology)、ユニット9、ワイリーインターサイエンス(Wiley Interscience)、1991年、を参照せよ。)

【0035】

本発明において用いられる「抗体」という用語は、完全な分子とともに、Fab、F(ab')₂およびFvのような、その断片を含む。これらの抗体断片は、その抗原または受容体と選択的に結合できる能力を保持し、以下の通り定義される。

(1) Fabとは、抗体分子の1価の抗原結合断片を含み、完全な1本の軽鎖と1本の重鎖の部分とができるように抗体全体を酵素パピインで消化して作成できるものをいう。

(2) Fab'とは、完全な軽鎖1本と1本の重鎖の部分とができるように抗体全体をペプシンで処理した後、還元して得られる抗体分子の断片をいう。抗体1分子あたり2個のFab'断片が得られる。

(3) F(ab')₂とは、抗体全体を酵素ペプシンで処理し、その後還元処理はしないで得られる抗体の断片をいう。F(ab')₂は2個のFab'断片が2本のジスルフィド結合でつながった2量体である。

(4) Fvとは、軽鎖の可変部と重鎖の可変部とを含み、2本の鎖として発現される遺伝子工学的に作成された断片をいう。

(5) 1本鎖抗体(single chain antibody、SCA)とは、遺伝的に融合した1本鎖分子として、適当なポリペプチドリンカーにより連結された軽鎖の可変部と重鎖の可変部とを含む、遺伝子工学的に作成された分子

をいう。

【0036】

これらの断片の作成方法は当業者に知られている。(例えば、引用によりここに取り込まれたハーロー(Harlow)とレーン(Lane)、抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー研究所、ニューヨーク、1988年、を参照せよ。)

【0037】

本発明で用いられる「エピトープ」という用語は、抗体の抗原結合部位(paratope)が結合する抗原上のいかなる抗原決定基を意味する。エピトープの決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖のような化学的に活性のある分子表面の原子団からなり、通常は、特異的な三次元構造上の特長とともに特異的な荷電状態の特長を有する。

【0038】

本発明のhK2/PI-6複合体は前立腺癌の組織において亢進していることから、前記複合体は前立腺癌を検出するための血清マーカーとして利用できる。前記複合体は、前立腺癌の組織を検出するための免疫組織化学的なマーカーとしても利用できる。本発明によると、本発明のhK2/PI-6複合体は患者の組織の試料中に免疫組織化学的な手法により検出でき、および/または患者の液体の試料中に試験管内イムノアッセイ法により検出できる。本発明の複合体を患者の試料中で測定することは、著しい診断上の有用性があるうえ、前立腺癌患者の指標となり、または癌の進行と関連する可能性がある。

【0039】

患者の組織標本における抗原検出のための免疫組織化学的方法は当業者に周知であり、ここで詳細に説明する必要はない。例えば、抗原の免疫組織化学的検出法は、テラー(Taylor)、アーカイブ オブ パソロジー アンド ラボラトリー メディシン(Arch. Pathol. Lab. Med.) 102 巻113頁(1978年)に一般的に説明されている。簡単には、本発明の文脈においては、前立腺に関する問題ありと疑われた患者から得られた組織標本は、

本発明の複合体を認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体と反応させられる。その後、該抗体と結合した部位は、標準的な免疫組織化学的な手法で前記組織標本を選択的に染色することにより、決定される。

【0040】

別の実施態様においては、組織標本で本発明のhK2/P I - 6複合体を検出、測定するために、hK2またはP I - 6のいずれかに特異的な抗体が用いられる。この実施態様によると、免疫組織化学的な手法は、(a)遊離hK2に特異的な第1の抗体と、P I - 6に特異的な第2の抗体と、本発明のhK2/P I - 6複合体を認識し結合する第3の抗体とを準備すること、(b)全ての遊離hK2およびP I - 6がそれぞれ第1および第2の抗体でブロックされる条件下で、第1および第2の抗体を組織標本と反応させること、(c)組織標本に含まれる前記複合体と第3の抗体が結合でき、第3の抗体とhK2/P I - 6複合体とを含む三重複合体が形成する条件下で、第3の抗体を組織標本と反応させること、および(d)前記三重複合体の存在を検出し、前記三重複合体の量を測定すること、というステップを含む。

【0041】

本発明の実施態様によると、前記第3の抗体は、遊離hK2だけでなく本発明のhK2/P I - 6複合体をも認識、結合する抗hK2抗体であってもよい。前記第3の抗体は、遊離P I - 6だけでなくhK2/P I - 6複合体をも認識し結合する抗P I - 6抗体であるとするのが代替策である。

【0042】

前立腺の組織の試料のように、hK2/P I - 6複合体が試料中で最多量の(dominant)hK2複合体である場合には、遊離hK2を認識する抗体と、遊離hK2およびhK2複合体の両方を認識する抗体とだけが、hK2/P I - 6複合体を検出する目的で利用できることを理解すべきである。この場合には、P I - 6に対する抗体を利用する必要はない。

【0043】

hK2またはP I - 6に対する抗体は、ここに説明された方法および当業者に共通に知られている方法により、hK2またはP I - 6を抗原に用いて作成でき

る。遊離hK2または遊離PI-6のみを認識する抗体は、hK2とPI-6との複合体形成によりブロックされるエピトープを認識する抗体である。遊離hK2または遊離PI-6およびhK2/PI-6複合体の両方を認識する抗体は、hK2とPI-6との複合体形成によりブロックされないエピトープを認識する抗体である。hK2またはPI-6の抗体の特長は、ウェスタンブロット法または当業者に知られたいかなる他の方法によっても決定される。

【0044】

本発明の1の実施態様においては、組織標本とは、患者の前立腺から得られた組織標本をいう。前立腺の組織は、正常な前立腺の組織でも、癌化した前立腺の組織でも、良性の前立腺の過形成組織でもかまわない。

【0045】

イムノアッセイ法により患者の液体の試料中の抗原物質を試験管内で検出する一般的な方法もまた当業者に周知であり、ここで繰り返すことを要しない。例えば、イムノアッセイ法は、パターソン(Paterson)ら、インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー(Int. J. Can.) 37巻659頁(1986年)およびブーシェル(Burchell)ら、インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー(Int. J. Can.) 34巻763頁(1984年)に一般的に説明されている。本発明の1の実施態様によると、生物学的な試料中で本発明の複合体を検出するためのイムノアッセイ法は、(a)検出されるべきhK2/PI-6複合体と特異的に結合するある量の試薬とhK2/PI-6複合体とを含む三重複合体が形成できる条件下で、前記試薬を試料と反応させること、(b)前記試料中のhK2/PI-6複合体の量の測定値として、前記三重複合体の存在を検出し、前記三重複合体の量を測定すること、というステップを含む。

【0046】

本発明の目的のためには、前記生物学的な試料は、本発明のhK2/PI-6複合体を含むいかなるヒトの生理的な液体の試料であってもよい。前記ヒトの生理的な液体の試料には、血清、精漿、尿および血液が含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

本発明の目的のためには、本発明により提供される抗原に対し要求される特異性がある限り、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方が利用できる。好ましくはモノクローナル抗体が利用される。

【0048】

モノクローナル抗体は、液相でも、固相の担体に結合した状態でも利用できる。モノクローナル抗体は、多くの異なる担体に結合されて本発明のhK2/PI-6複合体の測定に利用できる。周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱が含まれる。前記担体の性質は、本発明の目的のためには可溶性でも不溶性でもかまわない。不溶性の担体の例にはビーズとマイクロタイタープレートが含まれるが、これらに限定されない。当業者はモノクローナル抗体用の他の適当な担体のことを知っており、ルーチンの実験作業によってこれを確かめることができる。

【0049】

さらに、これらのイムノアッセイ法でのモノクローナル抗体は、さまざまな方法で検出可能に標識できる。例えば、本発明のモノクローナル抗体は低分子ハプテンと結合できる。これらのハプテンは第2の反応により特異的に検出できる。例えば、アビジンと反応するビオチンまたはジニトリフェノールとピリドキサーールとフルオレセインのような、特異的な抗ハプテン抗体と反応できるハプテンを利用することが普通である。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、酵素、放射性同位元素、蛍光物質または金属、化学発光物質または生物発光物質のような検出可能な標識と結合されてもよい。さらに、これらの標識を所望の分子に結合することは、当業者に共通の標準的な技術を用いてなされる。

【0050】

前記抗体を検出可能に標識できる方法の1つは酵素と結合することである。この酵素は、その後基質に曝されたときには、例えば、吸光光度または蛍光の測定手段により検出可能な化学的な成分(moiety)を生成するように、基質と反応する(ELISAシステム)。検出可能な標識として利用できる酵素の例は

、西洋ワサビペルオキシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、デルタ - 5 - ステロイドイソメラーゼ、イーストアルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ - グリセロールリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、アルカリフォスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼである。

【0051】

E L I S Aシステムの感度を向上させるために、以上に説明された手法は、アビジン - ペルオキシダーゼ複合体と反応するビオチン化抗体を用いて、修正されてもよい。

【0052】

抗原の量は抗体を放射性同位元素で標識することによっても測定できる。放射性同位元素の存在は、ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターを使用して測定できる。特に有用な同位元素は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{36}Cl 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{67}Ga および ^{90}Y である。

【0053】

抗原の測定は、抗体を蛍光物質で標識することによっても行うことができる。蛍光で標識された分子が適当な波長の光に曝されるとき、色素の蛍光によってその存在を検出することができる。蛍光標識物質の最も重要なものには、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、フィコエリスリン (phycoerythrin)、フィコシアニン (phycocyanin)、アロフィコシアニン (allophycocyanin)、o - フィタルデヒド (o-phthalaldehyde) およびフルオレスカミン (fluorescamine) がある。

【0054】

Eu (ユーロピウム、europium) その他のランタニドのような蛍光発光性金属原子もまた利用可能である。これらはD P E AまたはE D T Aのような

金属をキレートする原子団によって所望の分子に結合させることができる。

【0055】

抗体を検出可能に標識する別の方法は、化学発光物質と結合させることである。化学発光物質でタグづけられた(chemiluminescent-tagged)免疫グロブリンの存在は、化学反応の過程で発生する発光を検出することにより測定できる。特に有用な化学発光標識物質の例は、ルミノール(luminol)、イソルミノール(isoluminol)、芳香族アクリジニウムエステル(aromatic acridinium ester)、イミダゾール(imidazole)、リジニウム塩(ridinium salt)およびシュウ酸エステル(oxalate ester)である。

【0056】

同様に、生物発光物質もまた標識として利用可能である。生物発光は生物学的なシステムでみられ、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を上昇させる特殊なタイプの化学発光である。生物発光分子の存在は発光を検出することにより測定される。標識の目的のために重要な生物発光物質は、ルシフェリン(luciferin)、ルシフェラーゼ(luciferase)およびエクオリン(aquorin)である。

【0057】

本発明のhK2/PI-6複合体の試料中での定性的および/または定量的な測定は、直接または間接的フォーマットのいずれかでの、競合または非競合的なイムノアッセイ法により達成できる。かかるイムノアッセイ法の例には、ラジオイムノアッセイ法(RIA)とサンドイッチ型(免疫定量的(immunometric))アッセイ法がある。本発明のモノクローナル抗体を用いる抗原の検出は、生理的な試料についての免疫組織化学的アッセイ法を含めた、順方向、逆方向または同時のいずれかのモードで行われるイムノアッセイ法を利用してなされる。当業者は、過度の実験作業を伴わないで、他のイムノアッセイ法を知り、または容易に見つけることができる。

【0058】

「免疫定量的イムノアッセイ法」または「サンドイッチ型イムノアッセイ法」

には、同時サンドイッチ型、順方向サンドイッチ型および逆方向サンドイッチ型のイムノアッセイ法が含まれる。これらの用語は、当業者には良く理解されている。当業者は、現在知られておりまたは将来開発されるその他のアッセイ法の変法および形式においても、本発明による抗体が有用であることも認識している。これらは本発明の射程内に含まれることが意図されている。

【0059】

本発明の1の実施態様によると、遊離hK2または遊離PI-6に特異的な抗体は、本発明のhK2/PI-6複合体をヒトの生理的な液体の試料中で検出または測定するための本発明のイムノアッセイ法においても利用できる。例えば、hK2またはPI-6に対する抗体は、本発明のサンドイッチ型アッセイ法において利用できる。したがって本発明の1の実施態様は、hK2/PI-6複合体を検出するためのイムノアッセイ法を提供し、そのアッセイ法は、(a) hK2/PI-6複合体のあるエピトープを認識する第1の抗体と前記複合体の別のエピトープを認識する第2の抗体とを準備すること、(b) 第1の抗体がhK2/PI-6複合体と結合し、第1の抗体と前記複合体とを含む第1の複合体が形成できる条件下で、第1の抗体を試料と反応させること、(c) 第2の抗体がhK2/PI-6複合体に結合し、第1の抗体と第2の抗体と前記複合体とを含む第2の複合体が形成できる条件下で、第2の抗体を前記第1の複合体と反応させること、(d) 前記試料中に含まれるhK2/PI-6複合体の測定値として前記第2の複合体を検出、測定すること、というステップを含む。

【0060】

前記第1および第2の抗体は、本発明のhK2/PI-6複合体と特異的に免疫反応する抗体であってもよい。前記第1の抗体はhK2に特異的な抗体であり、前記第2の抗体はPI-6に特異的な抗体であったり、その逆であるとするのが代替策である。前記第1および第2の抗体のうち的一方が固相の支持体に結合し、他方が検出させ(detecting)または検出可能な標識でここで説明される方法により標識されることが好ましい。当業者は、本発明の教示を考慮して、本発明のhK2/PI-6複合体に特異的な抗体またはhK2に対する抗体およびPI-6に対する抗体を用いて、過度の実験作業を伴うことなく適当な

サンドイッチ型アッセイ法を設計することができる。

【0061】

本発明の1の局面は、P I - 6とh K 2とからなる複合体を試料中に検出、測定するための診断用キットを提供する。前記キットは、前記複合体と特異的に結合し、検出可能に標識されまたは検出可能な標識と結合する、既知量の試薬を含む。本発明の目的のためには、前記試料は、血清、精漿、尿および血液を含むがこれらに限定されない、ヒトの生理的な液体の試料であってもよい。前記試料は患者の前立腺由来の組織標本であってもよい。前記試薬は本発明のh K 2 / P I - 6複合体と特異的に結合する抗体であってもよい。前記試薬はモノクローナル抗体であることが好ましいが、ポリクローナル抗体でも利用できる。

【0062】

本発明の別の実施態様では、診断用キットは2種類の既知量の試薬を含み、一方の試薬はh K 2 / P I - 6複合体のあるエピトープを認識し、他方の試薬はh K 2 / P I - 6複合体の別のエピトープを認識する。好ましくは、一方の試薬は検出可能な標識で標識され、他方の試薬は固相の支持体に結合する。本発明のある実施態様では、両方の試薬はそれぞれ本発明のh K 2 / P I - 6複合体と特異的に免疫反応する抗体を含む。本発明の別の実施態様では、一方の試薬はh K 2に特異的な抗体を含み、他方の試薬はP I - 6に特異的な抗体を含む。

【0063】

本発明の別の局面は、前立腺癌の有無を決定するための診断方法を提供する。前記方法は、(a) P I - 6とh K 2とからなる複合体と特異的に結合する既知量の試薬とP I - 6とh K 2とを含む三重複合体が形成できる条件下で、前記複合体を含むヒト由来の試料と前記試薬を反応させること、(b) 前記試料中の前記三重複合体の量を測定して前記三重複合体の量を前記ヒトにおける前立腺癌の有無と関連づけること、というステップを含む。

【0064】

本発明の1の実施態様では、前記試料は、血清、精漿、尿および血液を含むがこれらに限定されない、ヒトの生理的な液体の試料であってもよい。本発明の別の実施態様では、前記試料は患者の前立腺由来の組織標本であってもよい。本発

明の目的のためには、前記試薬は本発明のh K 2 / P I - 6 複合体を特異的に認識する抗体である。前記抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもかまわない。

【0065】

P I - 6 が前立腺癌の組織に存在することが本発明の発見である。P I - 6 が前立腺癌においてh K 2 との複合体として亢進したレベルで存在することも本発明の発見である。よって、P I - 6 あるいは複合体を形成する何らかの特定の会合状態のP I - 6 が前立腺癌との関連を示す可能性がある。したがって、P I - 6 または複合体を形成するP I - 6 の何らかの特定の会合状態を検出し定量することが、前立腺その他の組織の試料に癌があることを決定するうえで重要である。例えば、P I - 6 は前立腺癌の組織を検出するための免疫組織学的マーカーとして利用できる。本発明のP I - 6 は、ここに説明した免疫組織化学的手法により、患者の組織の試料において検出できる。

【0066】

したがって、本発明の1の局面は、前立腺癌の有無を決定するための診断方法であって、(a) P I - 6 と特異的に結合するある量の試薬とP I - 6 とを含む二重複合体が形成できる条件下で、P I - 6 を含むヒト由来の試料と前記試薬を反応させること、(b) 前記試料中の前記複合体の量を測定し、前記複合体の量を前記ヒトにおける前立腺癌の有無と関連づけること、というステップを含む診断方法を提供することである。

【0067】

本発明の目的のためには、前記試料は前立腺その他の組織であってもよい。1の実施態様では、前記試薬はP I - 6 に特異的な抗体を含む。

【0068】

以下の実施例は本発明の射程を例示することを意図するものであり、これを限定することを意図するものではない。かかる実施例は利用されるものの典型であるが、当業者に知られた他の手順が代わりに用いられてもよい。実際、本分野の通常の知識を有する者はここでの教示にもとづいて過度の実験作業を伴うことなく更なる実施態様を容易に想到し作出することが可能である。

【0069】

【実施例】

実施例 1

前立腺の組織におけるhK2 / P I - 6 複合体の解析

材料と方法

材料

PAI - 1はオンコジーン・リサーチ・プロダクツ (Oncogene Research Products、カリフォルニア州、San Diego) から入手した。ACTはエチンズ (アテネ) ・リサーチ (Athens Research、ジョージア州、Athens) から入手した。精製された組み換えhK2は、過去の記載どおり、シリアンハムスター癌腫細胞株AV12で発現され、マウスhK2特異的なモノクローナル抗体HK1G586 . 1を用いて免疫アフィニティ精製された (14, 26)。HK1G586 . 1はPSAとは無視できる程度の交差反応性しか示さないことが示されている (18, 26)。PF1D215はPSAを抗原として作成されたモノクローナル抗体であるが、hK2とも交差反応する。PSM773はPSAに特異的なモノクローナル抗体で、hK2とは交差反応しない。上記の抗体はハイブリテック (Hybritech、カリフォルニア州、San Diego) で開発された。

【0070】

方法

前立腺の組織の抽出とSDS PAGE

前立腺切除手術で摘出された組織は、液体窒素中で凍結され、粉碎され、プロテアーゼインヒビターのカクテル (コンプリート、ベーリンガー・マンハイム) を含むPBSバッファー中でホモジネートにされた。SDS PAGEは4 - 20%の勾配のノベックス (Novex) ミニゲル上で行われた。それぞれのレーンには5 µgの全タンパク質を含む抽出上清溶液がロード (load)、すなわち試料としてゲルに適用または負荷された。試料はウェスタンブロットにはニトロセルロースに、N末端配列決定にはPVDFに、エレクトロブロットされた。一次抗体HK1G586 . 1およびPF1D215 . 2は5 µg / mlで用いら

れ、2次抗体(ヤギ抗マウスHRP、1:50,000、ジャクソン・イミュノリサーチ研究所、Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州、West Grove)が前記プロットを調べる、すなわち抗体を用いて抗原を検出する(probe)ために用いられた。免疫反応シグナルは、ECLウルトラ(アマシャム、英国、Buckinghamshire)を用いて製造者の指示書に従って検出された。

【0071】

hK2複合体の標準試料の調製

hK2とACT、PCI、PAI-1との試験管内での複合体は、過去の記載どおり、hK2を過剰のインヒビターとインキュベートして調製された(17)。

【0072】

N末端配列解析

N末端解析はPEアプライド・バイオシステムズ製モデル492アミノ酸シーケンサーで行われた。PVDF上にプロットされたタンパク質のバンドはクーマシーブリリアントブルーR-250により可視化され、切り出されて前記シーケンサーに適用、すなわちアプライされた。

【0073】

内部配列決定用の試料は、まず2mM DTTで還元され、SDS-PAGEの前にヨードアセトアミド(iodoacetamide)でアルキル化された。クーマジー染色されたバンドはゲルから切り出され、小片に刻まれ、50%アセトニトリル/0.2M 炭酸水素ナトリウムで30分間2回洗浄し、スピードバック(speed vac)で完全に乾燥された。乾燥したゲルスライス1μgのシーケンシング用トリプシン(プロメガ、Promega)を含む0.2M 炭酸水素ナトリウム50μlで再構成(reconstitution)された。試料は37°Cで20時間消化された。

【0074】

結果

良性および癌性の前立腺の組織はホモジネートにされ抽出された。上清溶液は

非還元 SDS - PAGE に供され、ウェスタンブロット法で解析された (図 1) 。図 1 のレーン 1 と 2 は前記 h K 2 特異的モノクローナル抗体 h K 1 G 5 8 6 . 1 で調べられ、良性の前立腺の組織と腫瘍のそれぞれにおける遊離 h K 2 および複合体形成した h K 2 を示す。33 K のバンドは h K 2 で、64 K のバンドは h K 2 の複合体を表す。複合体を形成する h K 2 のレベルは腫瘍由来の抽出物のほうが高い。この複合体の泳動度は 64 k D a の分子質量を表し、これは A C T および P C I との既知の生理的な h K 2 の複合体より低い (図 2 参照)。

【0075】

レーン 3 と 4 は P S A および P S A との複合体を検出するために P S M 7 7 3 で調べられた。露出時間を延長しても、検出可能なより高分子質量の P S A の複合体は全く観察されなかった。これらの抽出物中の h K 2 および P S A のイムノアッセイ法測定により、良性組織と腫瘍について類似した値が得られた。P S A の全量はタンパク質 1 m g あたり約 10 μ g で、h K 2 の全量はタンパク質 1 m g あたり約 0 . 3 μ g であった。全タンパク質 5 μ g がそれぞれのレーンにロードされた。よって、かなりのレベルの h K 2 が前立腺の組織において複合体を形成していて、この複合体は前立腺腫瘍では亢進している。これに対し、より高いレベルの P S A は、圧倒的に遊離の、すなわち複合体を形成しない状態にある。図 1 はさらに前記の 64 k D a の h K 2 の複合体が前立腺の組織の抽出物に見られる主要なカリクレイン複合体であることを表す。

【0076】

h K 2 との複合体中のインヒビターを同定するのに十分な材料を得るために、約 50 g の前立腺組織が抽出された。h K 2 特異的なモノクローナル抗体である H K 1 G 5 8 6 . 1 を含む免疫アフィニティカラムを通すことにより、h K 2 および h K 2 との複合体が抽出物から精製された。図 2 は、試験管内で調製された h K 2 複合体の標準試料とともに泳動された、前記アフィニティカラムから溶出した精製 h K 2 の会合状態のウェスタンブロットのプロフィールを示す。レーン 1 は精製された組み換え h K 2 を示し、レーン 2、3 および 4 はそれぞれ A C T、P C I および P A I - 1 と h K 2 との複合体を含む。これらの h K 2 複合体の泳動度は、これらのインヒビターの分子質量の相違のために異なる。例えば、

レーン2はACTと反応、すなわちインキュベートされて90 kDaの複合体を形成するhK2であり、レーン3はPCIとインキュベートされて75 kDaの複合体を形成するhK2であり、レーン4はPAI-1とインキュベートされて66 kDaの複合体を形成するhK2である。

【0077】

レーン5は組織から抽出された精製hK2の会合状態を示す。HK1G586.1で調べると、64 kDaのかすかなバンドが33 kDaおよび22 kDaの強いバンドとともに検出される。22 kDaはhK2の試料に共通して存在し、レーン1-4のhK2の標準試料でかすかなバンドととして見られる。このバンドは145番のアルギニンでの切断によって生じたhK2の断片である。よって、HK1G586.1のエピトープはこの切断点のN末端側にあることが示される。

【0078】

レーン6は、該レーンがPF1D215で調べられた点を除いてレーン5と同様である。PF1D215はPSAの断片に対して作成されたが、hK2とも交差反応する。レーン6はレーン4とは異なるパターンのバンドを示す。30 kDaとかすかな64 kDaのバンドが検出されるが、10 kDaと50 kDaの2つの新規なバンドが検出される。hK2とACTとの複合体と同じ位置に泳動されるかすかなバンドも検出される。

【0079】

図2におけるバンドの正体は、同一試料のプロットをN末端配列決定することにより決定された。図3では、遊離hK2を約10 µg含む濃縮精製された組織由来のhK2がこのレーンにロードされた。PVDF上のそれぞれのバンドは切り出されて、9サイクルのN末端配列決定に供された。バンド1と2はhK2の断片である。バンド1は、146番のセリンから始まるhK2の配列に相当するSLQXVSLHLという配列で始まる。分子質量が10 kDaであることとあわせると、バンド1はhK2の146-237番の断片であることを示す。バンド2はhK2のN末端配列で始まるので、hK2の1-145番の残基の断片であることと矛盾しない。33 kDaのバンド3も前記N末端配列で始まり、完全

なhK2であることと矛盾しない。

【0080】

図2のレーン6でみられた50kDaのバンドに相当するバンド4は、SLQXVSLHLという配列で始まる。これは、バンド1と同じ配列であり、バンド4がインヒビターと共有結合で連結されたhK2の10kDa断片であることを示唆する。しかし、第2の配列が存在しなかったことは、前記インヒビターのN末端がブロックされていたことを示す。セルピン(serpín)と共有結合を形成するhK2の活性セリンは189番の残基であり、前記145番の切断点よりC末端側である。このことは、PF1D215.2がhK2の146-237番の10kDa断片を認識することおよび前記インヒビターと共有結合した146-237番のhK2からなる前記50kDaの複合体を検出することを示す、図2のレーン6の結果と矛盾しない。

【0081】

図2のかすかな64kDaのバンドに相当するバンド5は、hK2のN末端配列を含んでいた。この分子質量は完全なhK2より高いため、このバンドはブロックされたインヒビターが結合した完全なhK2を含む可能性がある。バンド5のすぐ上の濃いバンドは配列決定によりヒト血清アルブミンと決定された。そして最後に、バンド6は完全なhK2とACTとの2つの配列が含まれ、これはACTに結合する完全なhK2であることを示す。

【0082】

図3の配列は、圧倒的多数のhK2が145番のアルギニンで切断され、またブロックされたインヒビターと結合したhK2の多数(50kDa)も切断されていることを示す。各バンドのhK2の相対的な百分率は、配列解析の際に測定された全バンドのピコモルの合計にもとづいて計算された。バンド1は、このプロット上で配列決定されたhK2全体の73%に相当する、48ピコモルの前記10kDaのhK2断片を含む。前記22kDaのバンド2は84%、すなわちバンド1よりも11%多いhK2を含む。増加分の22kDaのhK2断片はおそらく50kDaの切断されたhK2の複合体から由来したと考えられたが、それは、10kDaの断片だけがインヒビターと結合しているからである。要約

すると、プロットの配列解析から、約73%のhK2は145番のアルギニンで切断され、13%は完全なhK2で、約11%はブロックされたインヒビターと結合し、約2%はACTとの複合体である。

【0083】

ブロックされたインヒビターには完全なhK2との複合体(64kDa)および切断されたhK2断片との複合体(50kDa)の両方が存在したことから、インヒビターの正体を確証するためには、前記複合体をトリプシンで消化して内部のペプチド断片の配列決定をする必要があった。図3と同一の精製された組織のhK2を3つのレーンで泳動し、SDS-PAGEから50kDaのバンドを切り出し、トリプシンで消化した。トリプシン処理された断片はキャピラリーC18逆相HPLCマイクロプロッターにより分離され、自動的にPVDFにプロットされた。50kDaのバンドのトリプシン消化物の分解能を示すクロマトグラムが図4である。表示されたそれぞれのピークについて配列決定がなされた。内部配列のデータベース検索から、50kDa複合体に存在する他のタンパク質はPI-6であった。前記PI-6タンパク質の質量の70%以上を含む、全部で24本のPI-6のペプチド断片が同定された。予想どおり、PI-6のブロックされたN末端のペプチド断片またはPI-6の341番の活性部位の残基以後の断片は検出されなかった。hK2の断片は2、5、15、18および19番のピークであると同定された。これは、hK2の145-237番の領域から理論的に可能な7本のトリプシン処理断片のうちの5つに該当する。hK2の1-145番の領域由来のトリプシン断片はみつからなかったが、これは、図3の50kDaのバンドについての配列情報と矛盾しない。未同定配列は検出されなかった。

【0084】

考察

これらの結果は、hK2と細胞質セリンプロテアーゼインヒビターPI-6との新規な前立腺での複合体が存在することを証明する。これはhK2の組織特異的なインヒビターの最初の証拠であり、前立腺におけるhK2活性と機能の調節に関係する。前記インヒビターが、癌関連のプロテアーゼとの関連でこれまで報

告されたことのない、比較的最近発見された細胞質インヒビターである、PI-6と同定されたことにも注目せざるを得ない。

【0085】

前記図3は、hK2/PI-6複合体が内在性のhK2の約10%に相当することを示す。図1は、hK2/PI-6複合体が良性組織に比べて腫瘍では亢進していることを示す。

【0086】

hK2は前立腺癌と高い連関があることが示されているため、hK2の組織インヒビターの発見は重要である。hK2は前立腺癌患者の血清で亢進している。hK2は良性の組織に比べて未分化な前立腺の組織の上皮で亢進している。hK2はuPAを活性化し、PAI-1を不活性化することが示されている。hK2はIGFB3を切断し不活性化するため、転移した細胞の増殖を促進する環境を提供する。hK2はPSAの活性化に関与するかもしれない。

【0087】

hK2とPI-6の相互作用の理由は不明である。hK2はLNCaP細胞から分泌されることが示されており、細胞外プロテアーゼであると考えられている。hK2とPI-6との間の反応は、不完全な腫瘍細胞崩壊性(oncolytic)経路の一部としての細胞内での異常なhK2活性化か、あるいは損傷または壊死した腫瘍組織由来のPI-6の漏出かによってもたらされるのかもしれない。いずれの場合でも、hK2/PI-6複合体の存在は前立腺癌の検出のための貴重なマーカーとなることが証明されそうである。

【0088】

hK2/PI-6複合体は正常な精漿には検出されなかったこと(データ示さず)は特記すべきであるが、それは、このインヒビターが組織特異的で、前立腺の腺内腔へという正常なPSAとhK2の分泌経路の一部ではないことを示すからである。hK2/PI-6複合体の精漿でのレベルは前立腺癌患者では検出可能となるのかもしれない。

【0089】

図2と図3はこれらの組織でのhK2の75%が145番のアルギニンで切断

されていることを示す。ウェスタンブロットにより解析された粗抽出物中の64 kDa複合体の正確な評価のためには、ジスルフィド結合で保持された単一の33 kDaのポリペプチドとしてhK2を完全な状態で維持するために、図1のようにゲルを非還元条件下で泳動することが必要である。セルピンと共有結合を形成するhK2の活性セリンは189番の残基で、これは145番の切断点のC末端側である。図2のレーン5で、PF1D215.1は、hK2の146-237番の10 kDaの断片を認識し、PI-6に共有結合したhK2の146-237番の断片からなるPI-6の50 kDaの複合体を検出することが示された。PF1D215は免疫アフィニティ精製されたhK2にのみ用いられたが、それは、このモノクローナル抗体は組織の粗抽出物中に20ないし50倍高いレベルで含まれるPSAと交差反応するからである。

【0090】

切断されたhK2は不活性であることが示されていることから、hK2/PI-6複合体は切断の前に形成された可能性が高い。同様に感受性の高い部位を145番の残基に有するPSAは、還元条件下でのウェスタンブロットにより、ほとんど切断されないことが示された(データ示さず)。

【0091】

hK2は大部分が切断されているという観察は精漿と前立腺の組織の抽出物においてこれまでに記載されていた(19)。前記組織の抽出物においてはより高い分子質量のhK2の複合体は少量が検出されていたが、これらの研究ではその正体は同定されていなかった。

【0092】

hK2/PI-6複合体の発見は、hK2の存在によってだけでなくPI-6の同定によっても興味深い。PI-6はアンチトロンビンIII、PAI-1、PAI-2、マスピン(maspin)等のようなオバルブミンファミリーの他のセルピンのメンバーと相同性がある(20、27)。PI-6はヒト胎盤、腎臓、心臓、骨格筋および血小板を含む多数の組織に存在する。PI-6は細胞質に局在することが示されているため、その最も可能性の高い生理的役割は内部でのタンパク質分解による損傷に対しての細胞内での保護であると予想される。し

かし、いかなる特異的な役割も内在性のプロテアーゼ複合体も同定されていない。細胞内プロテアーゼインヒビターとして機能できるが、細胞外インヒビターとして分泌もされるPAI-2とは異なり、PI-6はもっぱら細胞内に存在するらしい。PI-6を強制的に分泌されるためにプロモーターの改変を試みたところ、PI-6を不活性化したが、これはおそらく糖鎖付加(glycosylation)のためである。

【0093】

PI-6はトリプシン、ウロキナーゼおよび第2因子(factor II)を強く阻害し、キモトリプシン様プロテアーゼにも阻害活性を有することが示されている(28)。しかし、本研究において、キモトリプシン様のPSAは組織の抽出物中でPI-6と複合体を形成した形跡はなかった。

【0094】

実施例2

前立腺の組織におけるPI-6の解析

hK2とPI-6の両方に関して、本研究から多くの疑問が生じる。PI-6のレベル自体は良性の組織と比較して腫瘍では変動するのか、そして、このインヒビターは発癌と関連するのか。これらの疑問に答えるために、PI-6抗体が作成され、良性または正常の組織に対する腫瘍でのPI-6の発現が比較された。この研究は、これらの知見を病変の進行段階表作成(staging)および患者の予後と関連づけるうえで有用である。

【0095】

材料と方法

PI-6の発現と精製

PNIDで形質転換されたBL2Ide3細胞は、LB+カナマイシン(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)中でOD₆₀₀が0.7になるまで増殖され、1mMのIPTGで2時間誘導された。前記細胞は5000回転10分(JA14)の遠心により回収された(NB9347:88)。

【0096】

大腸菌の培養500mlからの細胞ペレットは、プロテアーゼインヒビターカ

クテルを添加した20mlの超音波処理バッファー(300mM NaCl、50mM リン酸ナトリウム pH8.0、2mM メルカプトエタノール)に再懸濁された。再懸濁された細胞は、15秒間4回超音波処理された。上清と細胞破砕片は9000回転20分(JA20)の遠心により分離された。

【0097】

前記上清は、(超音波処理バッファーで)前洗浄されたコバルト樹脂と4°C 30分間インキュベートされた。前記樹脂は2000回転5分間(JA20)の遠心により回収された。前記樹脂は20mlの洗浄バッファー(300mM NaCl、50mM リン酸ナトリウム pH6.0、10% グリセロール、2mM 2-メルカプトエタノール)で4°C 20分間振盪した後遠心して回収することを3回繰り返して洗浄された。PI-6は400mM イミダゾールを添加した洗浄バッファーで2回溶出された。上清は、4°C 20分間振盪した後、2000回転5分間(JA20)で遠心して回収された。

【0098】

発現および精製段階の全ての分画はSDSゲル上で確認された。発現されたPI-6の大半は不溶性らしい。可溶性分画はコバルト樹脂により約90%精製された。精製されたタンパク質は2mM メルカプトエタノールを添加したPBSに対して透析された。精製されたPI-6の濃度は、凍結乾燥されたPI-6との濃度比較にもとづいて、ケミ・イメージャー分析(Chemical Image Analysis)で測定された。500mlの大腸菌培養からの収量は約1mgであった。

【0099】

超音波処理後のペレットは、1% トリトンX-100、1M NaClおよび8M 尿素で順次洗浄された。不溶性分画は8M 尿素でのみ可溶性であった。

【0100】

PI-6に対する抗体の作成

抗PI-6ポリクローナル抗体(PI-6)は、当業者に共通に知られた方法によって、ウサギに精製PI-6を注入して作成された。

hK2 / PI - 6 複合体の形成

1. 用いられた材料:

精製hK2 : 10 ng / μ l

PI - 6 : 大腸菌から精製された180 ng / μ l

2. 反応液の組成:

6 μ l 精製hK2 (30 ng) + 14 μ l PBS

6 μ l PI - 6 (540 ng) + 14 μ l PBS

6 μ l PI - 6 (540 ng) + 6 μ l 精製hK2 (30 ng) + 8 μ l

PBS

【0101】

反応液は室温で1時間インキュベートされた後、20 μ lのローディングバッファーが反応液のそれぞれに添加された。反応液は3分間煮沸され、それぞれ20 μ lずつ4 - 20%のSDSゲルの2つのレーンにロードされた。ウェスタンブロット法を行った後に、HK1G568.1 (5 μ g / ml) または PI - 6 (2 μ g / ml) が一次抗体として用いられた。両方のセットについて二次抗体は1 : 5,000に希釈された。

【0102】

結果

図5は、hK2 / PI - 6 複合体を本発明の抗PI - 6抗体とhK2抗体で調べたウェスタンブロットである。この図は、精製されたPI - 6が精製されたhK2と複合体を形成したことを示す。この複合体は、抗PI - 6ポリクローナル抗体および抗hK2モノクローナル抗体 (HK1G586.1) の両方で認識された。PI - 6は、hK2の酵素的な不活性型である酵素前駆体とは複合体を形成しなかった (データ示さず)。

【0103】

図6は、前立腺の組織の抽出物を抗PI - 6で調べたウェスタンブロットを示す。前記抗PI - 6抗体は、大腸菌で発現されたPI - 6でウサギを免疫して作成された。良性 (B) と癌性 (C) の両方の組織抽出物は、3つの異なる組織から得られた。前記ウェスタンブロットは、前記抗PI - 6抗体がPI - 6だけで

なく、hK2 / PI - 6複合体その他の、一見してPI - 6を含む複合体と考えられるものも認識したことを示す。前記ウェスタンブロットは、hK2 / PI - 6複合体のレベルが良性組織に比べて癌では高いことも示す。

【0104】

ゲルの下部の大きなバンドは遊離PI - 6の分子量と矛盾しない。このゲルは、PI - 6が前立腺の組織にかなりのレベルで存在し、いくつかの他のタンパク質と複合体を形成しているらしいことを証明している。hK2 / PI - 6複合体のレベルが良性組織より癌性組織で高いという事実は、PI - 6が発癌に伴ういくつかの過程の調節に役割を果たすかもしれないことを示す。

【0105】

図7は、前立腺の組織の抽出物のウェスタンブロットを示す。レーン1はhK2の会合状態を検出するためにHK1G586.1で調べられた。レーン1では、図1と同様に、遊離hK2と64kDaの複合体がみられた。レーン2は抗PI - 6抗体で調べられた。レーン2では、遊離PI - 6は約42kDaで検出され、等量のhK2 / PI - 6複合体が抗hK2抗体でみられたのと同じ64kDaの泳動度でみられた。

【0106】

繰り返すと、PI - 6が前立腺の組織に存在することは本発明の発見である。PI - 6が癌と関連するかもしれないことも本発明の発見である。PI - 6が同定された内在性のプロテアーゼと複合体を形成するとの発見は、PI - 6が促進的か抑制的かのいずれかで(either pro or con)、腫瘍細胞崩壊性の過程に関与する可能性を示唆する。

【0107】

以上は本発明の射程を例示するつもりであって、限定するつもりのもではない。実際、本技術分野における通常の知識を有する者は、ここでの開示にもとづき過度の実験作業を要することなく、更なる実施態様を想到し作出することが容易にできる。

【0108】

本発明は、その本質的特長を逸脱することなく、他の特定の様式で具現化でき

る。記載された実施態様は、すべての点で例示的であって制限的ではないと解されるべきである。したがって本発明の射程は、以上の説明によってではなく、添付された請求の範囲によって示される。該請求の範囲の均等物の意味と範囲に属する全ての変更は前記請求の範囲の射程に包含される。

【0109】

参考文献

1. バーク、T.、ブラッドショー、R. A.、カルレテロ、O. A.、チャオ、J.、チャオ、L.、クレメンツ、J. A.、ファーネストック、M.、フリッツ、H.、ゴーチエ、F.、マクドナルズ、R. J.、マーゴリアス、H. S.、モリス、B. J.、リチャーズ、R. I. およびスキクリ、A. G. (Berg, T., Bradshaw, R. A., Carretero, O. A., Chao, J., Chao, L., Clements, J. A., Fahnestock, M., Fritz, H., Gauthier, F., MacDonal ds, R. J., Margolius, H. S., Morris, B. J., R ichards, R. I., and Scicli, A. G.)、組織(腺)カリクレイン遺伝子ファミリーのメンバーの共通の命名法。(A common nomenclature for members of the tissue (glandular) kallikrein gene families.)、エージェント アンド アクションズ サプリメンツ (Agents Actions Suppl.)、38巻19-25頁、1992年。

【0110】

2. リッテンハウス、H. G.、フィンレー、J. A.、ミコライジック、S. D. およびパルチン、A. W. (Rittenhouse, H. G., Finl ay, J. A., Mikolajczyk, S. D. および Partin, A. W.)、ヒトカリクレイン2 (hK2) と前立腺特異抗原 (PSA) : 2つの近縁だが別個の前立腺のカリクレイン。(Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): Two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate.)、ク

リチカル レビューズ オブ クリニカル ラボラトリー サイエンス (C r i t Rev Clin Lab Sci)、35巻275 - 368頁、1998年。

【0111】

3. シャドレーヌ、P.、パラディ、G.、トランブレ、R. およびデューブ、J. (Chapdelaine、P.、Paradis、G.、Tremblay、R.、and Dube、J.)、前立腺特異抗原と関連したヒト腺性カリクレインmRNAの前立腺における高レベル発現。(High level of expression in the prostate of a human glandular kallikrein mRNA related to prostate-specific antigen.)、FEBSレター (FEBS Lett.)、236巻205 - 208頁、1988年。

【0112】

4. モリス、B. J. (Morris、B. J.)、ヒト前立腺で発現するカリクレイン遺伝子。(A kallikrein gene expressed in human prostate.)、クリニカル アンド エクスペリメンタル ファーマコロジー アンド フィジオロジー (Clin. Exp. Pharm. Phys.)、16巻345 - 351頁、1989年。

【0113】

5. ブリドン、D. およびダウエル、B. (Bridon、D. and Dowell、B.)、分子モデリングを用いた前立腺特異抗原とヒト腺性カリクレインの構造比較。(Structural comparison of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein using molecular modeling.)、ウロロジー (Urology)、45巻801 - 806頁、1995年。

【0114】

6. ビーヒネン、M. (Vihinen、M.)、前立腺特異抗原とヒト腺性カ

リクレインの構造のモデリング。(Modeling of prostate specific antigen and human glandular kallikrein structures)、BBRC、204巻1251-1256頁、1994年。

【0115】

7. ヤング、C. Y.、アンドリュース、P. E.、モンゴメリー、B. T. およびチンダル、(D. J. Young、C. Y.、Andrews、P. E.、Montgomery、B. T.、and Tindall、D. J.)、ヒト前立腺特異腺性カリクレインの組織特異的およびホルモン性の調節。(Tissue-specific and hormonal regulation of human prostate-specific glandular kallikrein)、バイオケミストリー(Biochemistry)、31巻818-824頁、1992年。

【0116】

8. クレメンツ、J. (Clements、J.)、腺性カリクレインファミリーの酵素：組織特異的およびホルモン性の調節。(The glandular kallikrein family of enzymes: tissue specific expression and hormonal regulation.)、エンドクリン レビューズ(Endocrine Reviews)、10巻393-419頁、1989年。

【0117】

9. デペルテス、D.、マルソー、F.、フレネット、G.、ラズール、C.、トランブレイ、R. R. およびデューブ、J. Y. (Deperthes、D.、Marceau、F.、Frenette、G.、Lazure、C.、Tremblay、R. R.、and Dube、J. Y.)、ヒトカリクレインhK2はキニノゲナーゼ活性が低く、前立腺特異抗原(hK3)は全く活性がない。(Human kallikrein hK2 has low kininogenase activity while prostate-specific Antigen (hK3) has none.)、バイオキミカ

エ ビオフィジカ アクタ (Biochim Biophys Acta)、
1343巻102-106頁、1997年。

【0118】

10. ブルジョワ、L.、ブリヤール、L.、ブリヤール-ブールデ、M.、デ
ペルテス、D.、ジュリアーノ、M.A.、ジュリアーノ、L.、トランブレ
、R.R.、デューブ、J.Y. およびゴーチエ、F. (Bourgeois、
L.、Brillard-Bourdet、M.、Deperthes、D.、
Juliano、M.A.、Juliano、L.、Tremblay、R.R
.、Dube、J.Y.、and Gauthier、F.)、ヒト組織カリク
レインhK1およびhK2の基質特異性を研究するためのセルピン由来のペプチ
ド基質。(Serpine-derived peptide substrates for investigating the substrate s
pecificity of human tissue kallikrei
ns hK1 and hK2.)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミ
ストリー (J. Biol Chem)、272巻29590-29595頁、1
997年。

【0119】

11. クマール、A.、ミコライジック、S.D.、ゲール、A.S.、ミラー
、L.S. およびセディ、M.S. (Kumar、A.、Mikolajczyk
k、S.D.、Goel、A.S.、Millar、L.S.、and Sae
di、M.S.)、前立腺特異抗原の前駆体型の哺乳類細胞による発現とヒトカ
リクレイン2による成熟活性型への変換。(Expression of pr
o form of Prostate-specific antigen
by mammalian cells and its conversio
n to mature, active form by human kal
likrein 2.)、キャンサー リサーチ (Cancer Res.)、
印刷中、1997年。

【0120】

12. タカヤマ、T.K.、フジカワ、K. およびデビィ、E.W. (Taka

yama, T. K., Fujikawa, K., and Davie, E. W.)、前立腺特異抗原前駆体型の解析 - トリプシンとヒト腺性カリクレインによる活性化。(Characterization of the precursor of prostate-specific antigen-activation by trypsin and by human glandular kallikrein.)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、272巻21582 - 21588頁、1997年。

【0121】

13. ロブグレン、J.、ラヤコスキー、K.、カープ、M.、ルンドウォール、A. およびリーリヤ、H. (Lovgren, J., Rajakoski, K., Karp, M., Lundwall, A., and Lilja, H.)、ヒト腺性カリクレイン2による前駆体型前立腺特異抗原の活性化。(Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2.)、バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Comm.)、238巻549 - 555頁、1997年。

【0122】

14. ミコライジック、S. D.、ミラー、L. S.、マーカー、K. M.、グロウエ、L. S.、ゲール、A. S.、カス、M. M. J.、クマール、A. およびセディ、M. S. (Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Marker, K. M., Grauer, L. S., Goel, A. S., Cass, M. M. J., Kumar, A., and Saedi, M. S.)、217番のアラニンは前立腺特異的なヒトカリクレイン2の触媒機能と自己活性化のために重要である。(Ala217 is important for the catalytic function and autoactivation of prostate-specific human kallikrein 2.)、ヨーロッパン ジャーナル オブ バイオケミ

ストリー (Eur. J. Biochem.)、246巻440-446頁、1997年。

【0123】

15. ダーソン、M. F.、パルチェリ、A.、ロッシュ、P.、リッテンハウス、H. G.、ウォルフアート、R. L.、ヤング、C. Y. F.、クレー、G. G.、チンダル、D. J. およびボストウィック、D. G. (Darson, M. F., Parcellli, A., Roche, P., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L., Young, C. Y. F., Klee, G. G., Tindall, D. J., and Bostwick, D. G.)、前立腺上皮内新生物および腺癌におけるヒト腺性カリクレイン2 (hk2) の発現：新規な前立腺癌マーカー。(Human Glandular Kallikrein 2 (hk2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker.)、ウロロジー (Urology)、49巻(6号)857-862頁、1997年。

【0124】

16. フレネッテ、G.、トランブレイ、R. R.、ラズール、C. およびデュープ、J. Y. (Frenette, G., Tremblay, R. R., Lazure, C., and Dube, J. Y.)、前立腺カリクレイン (hk2) は1本鎖ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを活性化するが、前立腺特異抗原 (hk3) は活性化しない。(Prostatic kallikrein (hk2), but not prostate-specific antigen (hk3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator.)、インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー (Int. J. Cancer)、71巻897-899頁、1997年。

【0125】

17. ミコライジック、S. D.、ミラー、L. S.、クマール、A.、および

セディ、M.S. (Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Kumar, A. and Saedi, M.S.), ヒトカリクレイン2 (hK2) はプラズミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) を不活性化し複合体を形成する。(Human kallikrein 2 (hK2) inactivates and complexes with plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).)、インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー、(Int J Cancer)、印刷中、1999年。

【0126】

18. グロウエ、L.S., フィンレー、J.A., ミコライジック、S.D., プサテリ、K.D. およびウォルフアート、R.L. (Grauer, L.S., Finlay, J.A., Mikolajczyk, S.D., Pusateri, K.D., and Wolfert, R.L.), ヒト腺性カリクレイン、hK2の前駆体型およびプロテアーゼインヒビターとの複合体としての前立腺癌腫血清中での検出。(Detection of human glandular kallikrein, hK2, as its precursor form and in complex with protease inhibitors in prostate carcinoma serum.)、ジャーナル オブ アンドロロジー (J Androl)、19巻407-411頁、1998年。

【0127】

19. デペルテス、D., シャドレーヌ、P., トランブレイ、R.R., ブルネ、C., バートン、J., エベール、J., ラズール、C. およびデューブ、J.Y. (Deperthes, D., Chapdelaine, P., Tremblay, R.R., Brunet, C., Berton, J., Hebert, J., Lazure, C., and Dube, J.Y.), ヒト精漿における前立腺カリクレインhK2、別名hGK-1、の単離。(Isolation of prostatic kallikrein hK2, also known as hGK-1, in human seminal plasm

a.)、バイオキミカ エ ビオフィジカ アクタ (Biochim Biophys Acta)、1245巻311-316頁、1995年。

【0128】

20. モーゲンシュターン、K. A.、ヘンゼル、W. J.、ベーカー、J. B.、ワン、S.、パスツージン、A. およびキーシエル、W. (Morgens tern, K. A., Henzel, W. J., Baker, J. B., Wong, S., Pastuszyn, A., and Kisiel, W.)、サル 腎臓上皮株細胞由来の細胞内セリンプロテアーゼインヒビターの単離と解析。(Isolation and characterization of an intracellular serine proteinase inhibitor from a monkey kidney epithelial cell line.)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J Biol Chem)、268巻21560-21568頁、1993年。

【0129】

21. スコット、F. L.、コーリン、P. B.、バード、C.、チェルッチ、L.、ヘイマン、J. A. およびバード、P. (Scott, F. L., Coughlin, P. B., Bird, C., Cerruti, L., Hayman, J. A., and Bird, P.)、プロテイナーゼインヒビター6は分泌されないことから、新規なタイプの細胞性セルピンであることが示唆される。(Proteinase inhibitor 6 cannot be secreted, which suggests it is a new type of cellular serpin.)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J Biol Chem)、271巻1605-1612頁、1996年。

【0130】

22. モーゲンシュターン、K. A.、スプレッシャー、C.、ホルト、L.、フォスター、D.、グラント、F. J.、チン、A. およびキーシエル、W. (Morgens tern, K. A., Sprecher, C., Holth, L

..、Foster、D.、Grant、F. J.、Ching、A.、and Kisiel、W.)、新規細胞内セリンプロテイナーゼインヒビターの相補DNAクローニングおよび反応速度論的解析：トリプシンとXa因子をプロテイナーゼのモデルとする作用機序。(Complementary DNA cloning and kinetic characterization of a novel intracellular serine proteinase inhibitor: mechanism of action with trypsin and factor Xa as model proteinases.)、バイオケミストリー(Biochemistry)、33巻3432-3441頁、1994年。

【0131】

23. リーウォルド、M.、モーゲンシュターン、K. A. およびシュリーフ、R. R. (Riewald、M.、Morgenstern、K. A.、and Schleeff、R. R.)、ヒト血小板における細胞質アンチプロテイナーゼ(CAP)の解析。CAPと内在性血小板タンパク質との相互作用の証拠。(Identification and Characterization of the cytoplasmic antiproteinase (CAP) in human platelets. Evidence for the interaction of CAP with endogenous platelet proteins.)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J Biol Chem)、271巻7160-7167頁、1996年。

【0132】

24. コーリン、P.、スン、J.、チェルッチ、L.、セーラム、H. H. およびバード、P. (Coughlin、P.、Sun、J.、Cerruti、L.、Salem、H. H.、and Bird、P.)、ヒト細胞内セリンプロテイナーゼインヒビターのクローニングと分子の解析。(Cloning and molecular characterization of a human intracellular serine proteinase

inhibitor.)、プロシーディング オブ ナショナルアカデミー
オブ サイエンス オブ ジ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Pr
oc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.)、90巻9417-942
1頁、1993年。

【0133】

25. クマール、A.、ゲール、A.、ヒル、T.、ミコライジック、S.、ク
ース-ライヒェル、K. およびセディ、M. (Kumar, A., Goel, A
.、 Hill, T., Mikolajczyk, S., Millar, L., K
uus-Reichel, K., and Saedi, M.)、ヒト腺性カリク
レイン、hK2、の哺乳類細胞における発現。(Expression of
human glandular kallikrein, hK2, in ma
mmalian cells.)、キャンサー リサーチ (Cancer Re
s.)、56巻5397-5402頁、1996年。

【0134】

26. フィンレー、J. A.、エバンス、C. L.、デイ、J. R.、ペイン、
J. K.、ミコライジック、S. D.、ミラー、L. S.、クース-ライヒェル
、K.、ウォルフアート、R. L. およびリッテンハウス、H. G. (Finl
ay, J. A., Evans, C. L., Day, J. R., Payne, J.
K., Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Kuus
-Reichel, K., Wolfert, R. L., and Rittenh
ouse, H. G.)、ヒト腺性カリクレイン (hK2) に特異的なモノクロー
ナル抗体の作成：前立腺特異抗原との交差反応が無視できる程度のhK2の二重
抗体イムノアッセイ法の開発。(Development of monoclonal antibodies specific for human glandular kallikrein (hK2): development of a dual antibody immunoassay for hK2 with negligible prostate-specific antigen cross-reactivity.)、ウロロジー (Urology)、51巻804-809頁、1998年。

【0135】

27. スプレッシャー、C. A.、モーゲンシュターン、K. A.、マシューズ、S.、ダーレン、J. R.、シュレーダー、S. K.、フォスター、D. C. およびキーシェル、W. (Sprecher, C. A., Morgenstern, K. A., Mathewes, S., Dahlen, J. R., Schrader, S. K., Foster, D. C., and Kisiel, W.)、セリンプロテイナーゼインヒビターのオバルブミンファミリーの2つの新規なメンバーの分子クローニング、発現および部分的解析。(Molecular cloning, expression, and partial characterization of two novel members of the ovalbumin family of serine proteinase inhibitors.)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、(J Biol Chem)、270巻29854 - 29861頁、1995年。

【0136】

28. リーウォルド、M.、およびシュリーフ、R. R. (Riewald, M. and Schleeff, R. R.)、ヒト細胞質アンチプロテイナーゼは、キモトリプシンおよびトリプシン - 様プロテアーゼを別個の反応部位残基を用いて迅速かつ効率的に中和する。(Human cytoplasmic antiproteinase neutralizes rapidly and efficiently chymotrypsin and trypsin-like proteases utilizing distinct reactive site residues.)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J Biol Chem)、271巻14526 - 14532頁、1996年。

【図面の簡単な説明】

【図1】

前立腺の組織の抽出物のウェスタンブロットである。この図は、腫瘍の組織において良性の組織に比べてhK2/PI-6複合体がより高レベルであることを

示す一例である。

【図2】

hK2との複合体の標準試料と前立腺の組織の抽出物のウェスタンブロットである。

【図3】

前立腺の組織由来の精製hK2の会合状態のプロットのN末端配列である。

【図4】

ゲルから切り出された50kDaのhK2/PI-6複合体のバンドを、トリプシン消化で精製したペプチドの逆相HPLC溶出プロフィールである。

【図5】

本発明のウサギ抗PI-6ポリクローナル抗体とhK2抗体とで検出された、試験管内で形成されたhK2/PI-6複合体のウェスタンブロットである。

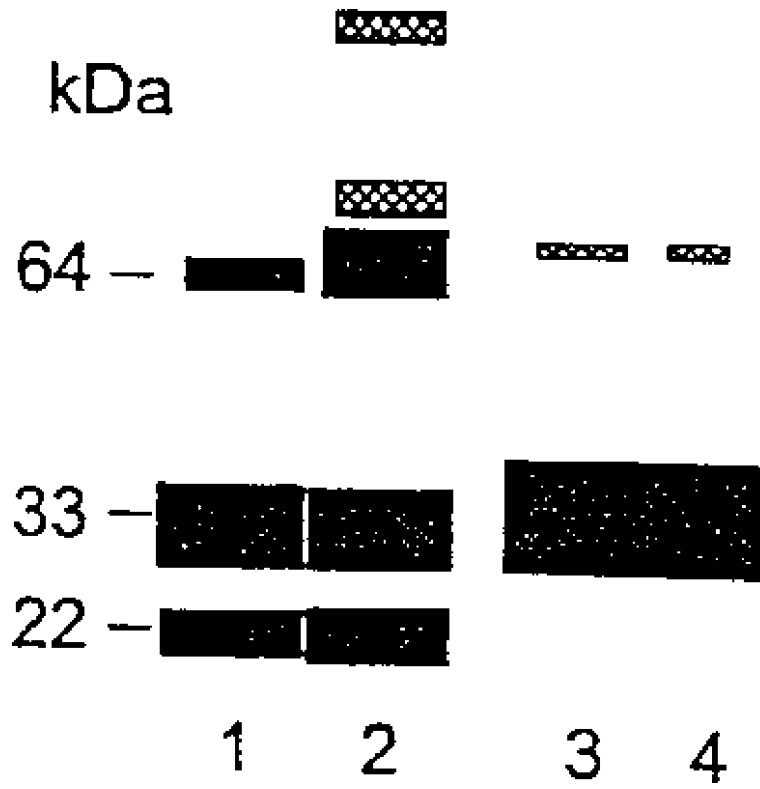
【図6】

本発明のウサギ抗PI-6ポリクローナル抗体で調べられた前立腺の組織の抽出物のウェスタンブロットである。

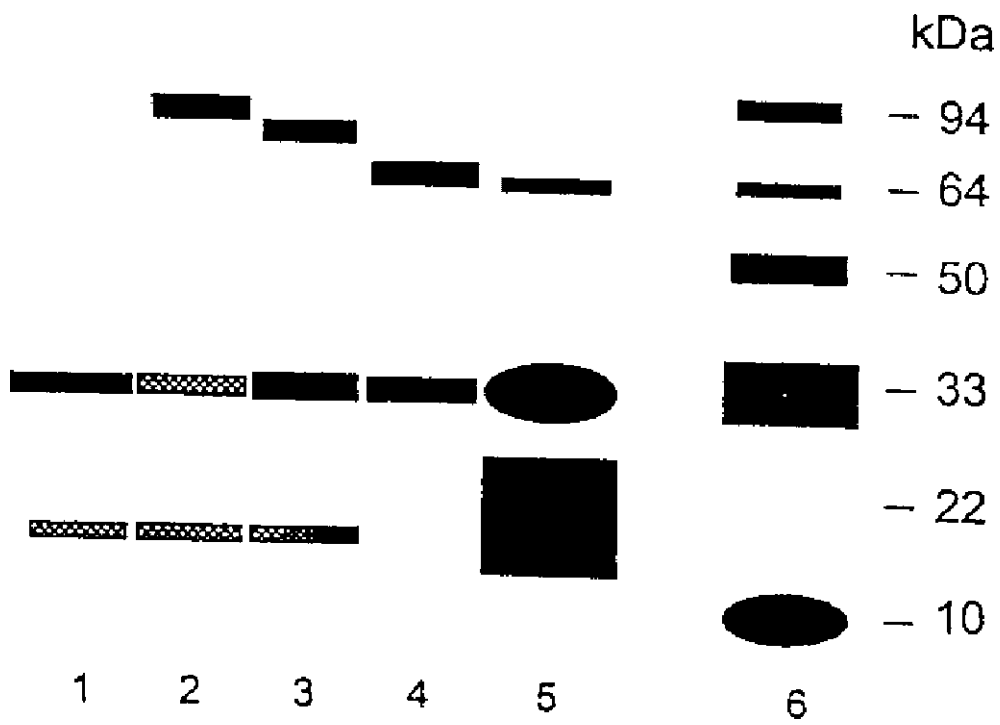
【図7】

本発明のウサギ抗PI-6ポリクローナル抗体および抗hK2抗体で検出された、前立腺の組織の抽出物中のhK2/PI-6複合体である。

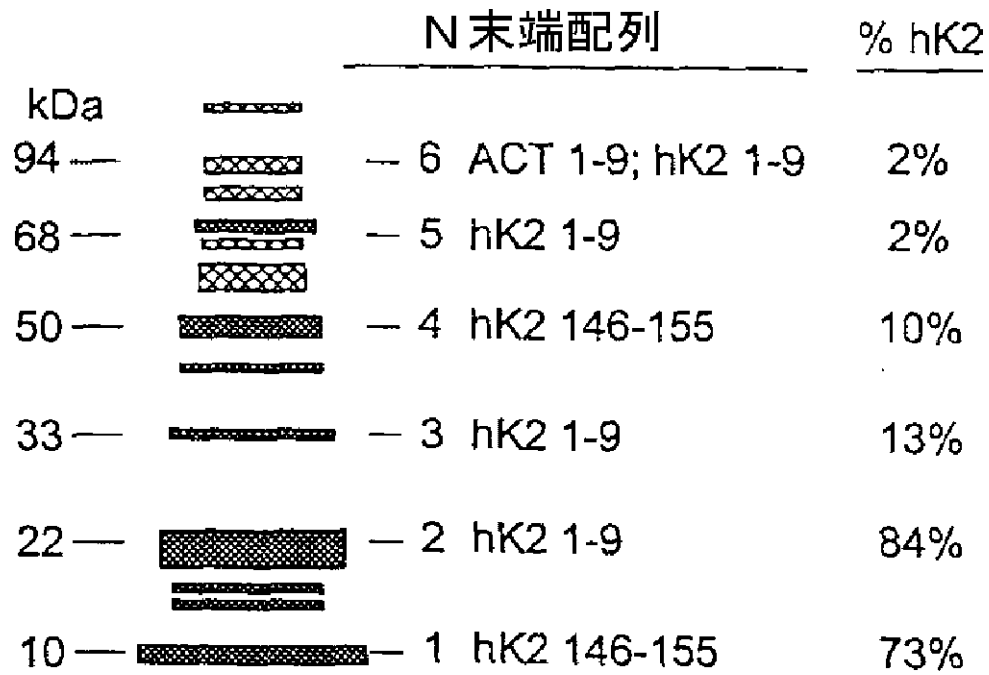
【図1】



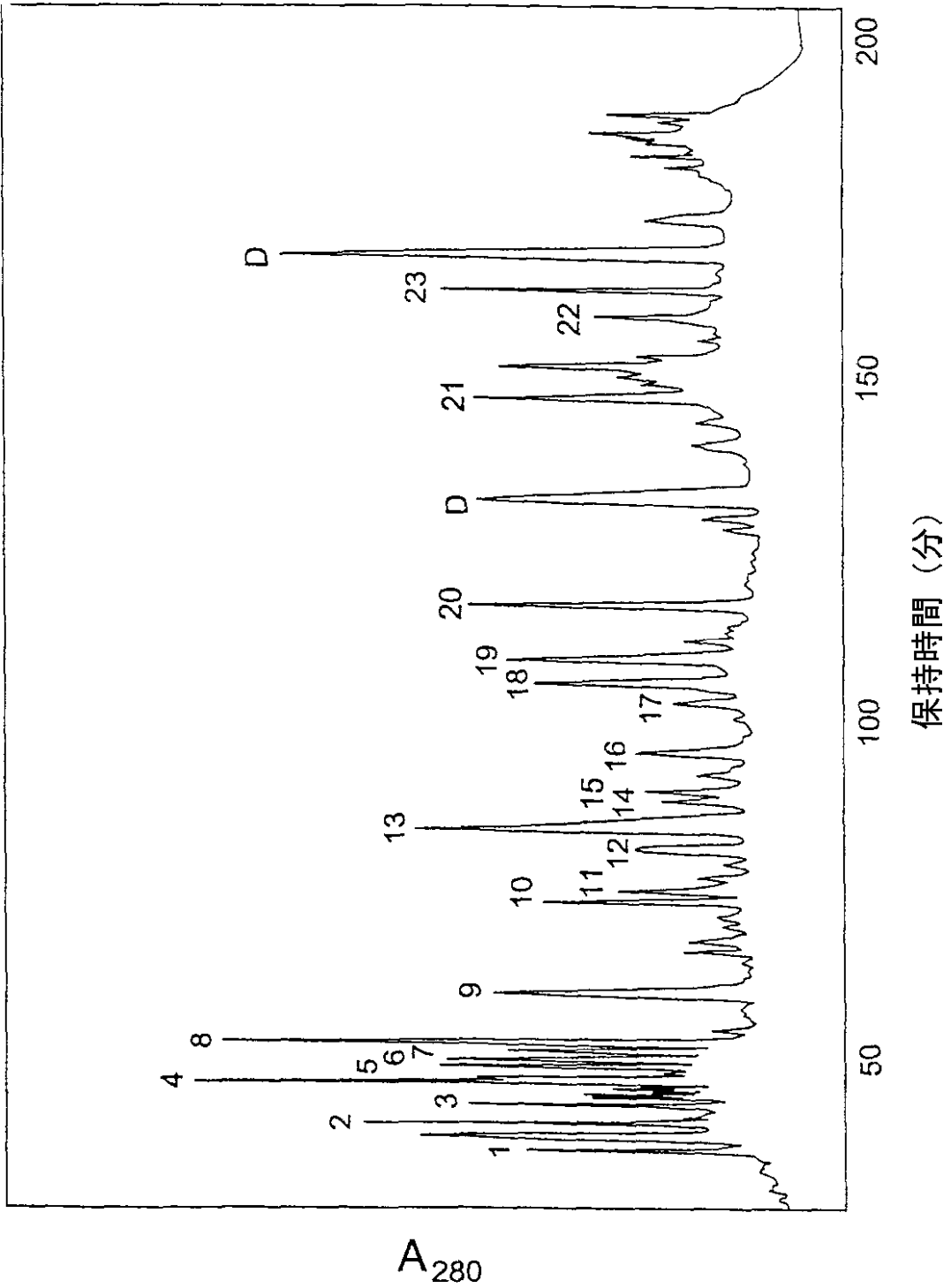
【図2】



【图3】

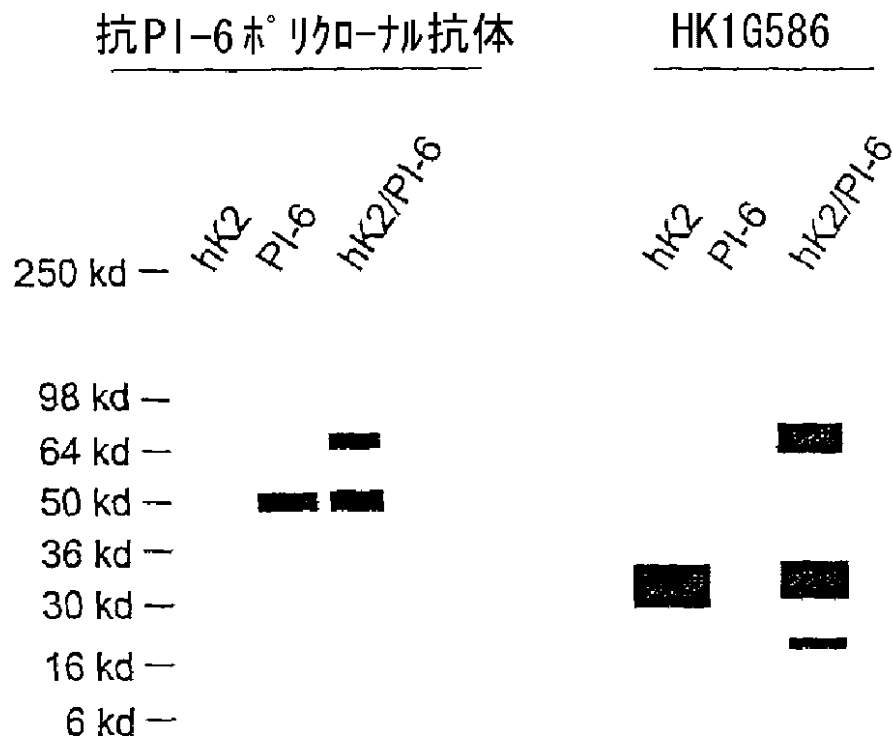


【图4】



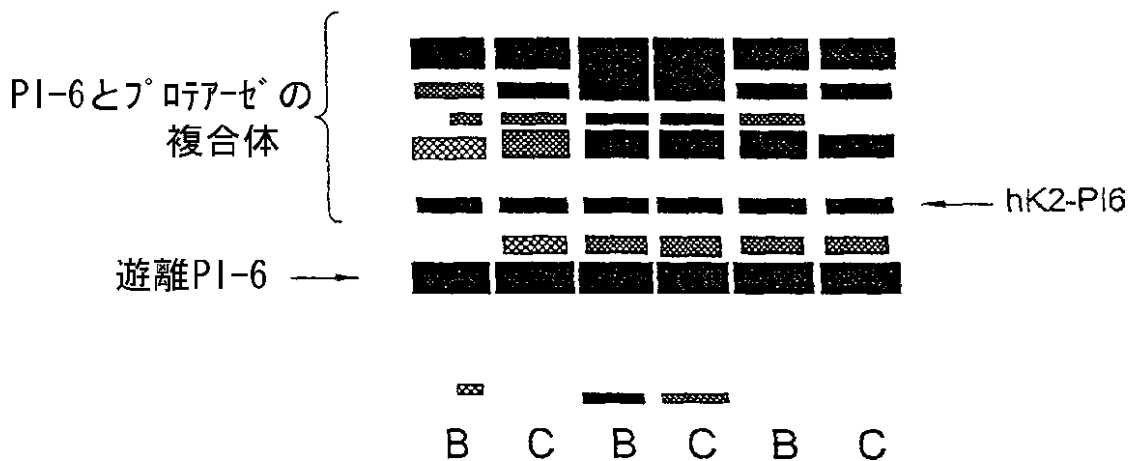
【図5】

抗PI-6ポリクローナル抗体はウェスタンブロット(NB9390-69)上のhK2とPI-6の複合体を認識する

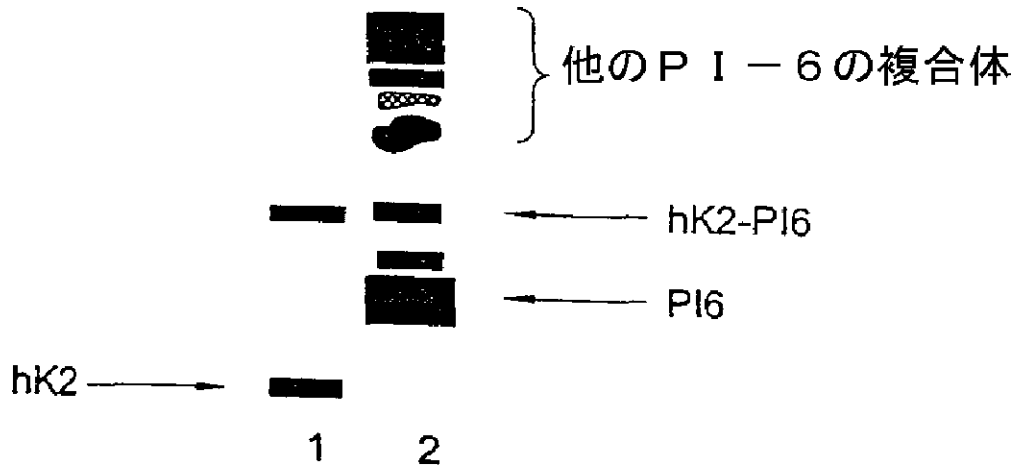


【図6】

ウサギ抗PI-6ポリクローナル抗体で調べられた前立腺の組織の抽出物のウェスタンブロット



【図7】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Inter. Appl. No. PCT/US 00/01937
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N9/64 G01N33/574	C07K14/81 G01N33/68
	C07K16/40 C12Q1/37	C07K16/38 G01N33/573
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIKOLAJCZYK S D ET AL: "Identification of a novel complex of human kallikrein 2 (hK2) and protease inhibitor-6 (PI6) in prostate cancer tissues." 90TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, USA; APRIL 10-14, 1999, vol. 40, March 1999 (1999-03), page 527 XP002138675 Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting March, 1999 ISSN: 0197-016X the whole document	1,2,5,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
E earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 May 2000	14/06/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Van der Schaal, C	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/01937

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GRAUER LANA S ET AL: "Detection of human glandular kallikrein, hK2, as its precursor form and in complex with protease inhibitors in prostate carcinoma serum." JOURNAL OF ANDROLOGY JULY-AUG., 1998, vol. 19, no. 4, July 1998 (1998-07), pages 407-411, XPO00907357 ISSN: 0196-3635</p>	
A	<p>SCOTT FIONA L ET AL: "Proteinase inhibitor 6 (PI-6) expression in human skin: Induction of PI-6 and a PI-6/proteinase complex during keratinocyte differentiation." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH DEC. 15, 1998, vol. 245, no. 2, 15 December 1998 (1998-12-15), pages 263-271, XPO02138676 ISSN: 0014-4827</p>	
A	<p>COUGHLIN PAUL ET AL: "Cloning and molecular characterization of a human intracellular serine proteinase inhibitor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 1993, vol. 90, no. 20, 1993, pages 9417-9421, XPO02138677 ISSN: 0027-8424</p>	
P,X	<p>MIKOLAJCZYK STEPHEN D ET AL: "Identification of a novel complex between human kallikrein 2 and protease inhibitor-6 in prostate cancer tissue." CANCER RESEARCH AUG. 15, 1999, vol. 59, no. 16, 15 August 1999 (1999-08-15), pages 3927-3930, XPO02138678 ISSN: 0008-5472 the whole document</p>	1-47

1

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト(参考)
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	D
	33/573		A
	33/577		B
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	21/08
Fターム(参考)	4B050 CC02 CC10 DD11 GG06 KK18 LL03 4B063 QA01 QA18 QQ36 QQ79 QQ95 QR48 QS33 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA14 4H045 AA11 BA41 CA41 DA55 DA76 DA89 EA51 FA71 FA72		

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2002538818A5	公开(公告)日	2007-03-08
申请号	JP2000605726	申请日	2000-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	HYBRITECH		
申请(专利权)人(译)	Hybritech公司		
当前申请(专利权)人(译)	Hybritech公司		
[标]发明人	ミコライクジクステイーブン サエディモハマド		
发明人	ミコライクジク、ステイーブン サエディ、モハマド		
IPC分类号	C12N9/64 C07K16/38 C07K16/40 C12N9/99 C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/8121 C12N9/6445 Y10S530/828 Y10S436/803		
FI分类号	C12N9/64.A C07K16/38 C07K16/40 C12N9/99 C12Q1/37 G01N33/53.D G01N33/573.A G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B050/CC02 4B050/CC10 4B050/DD11 4B050/GG06 4B050/KK18 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QQ95 4B063/QR48 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA55 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/FA72		
代理人(译)	松永信行		
优先权	09/266957 1999-03-12 US		
其他公开文献	JP2002538818A		

摘要(译)

本发明提供了hK2和PI-6的新型复合物以及使用该新型复合物的方法。本发明的hK2和PI-6的新型复合物以升高的水平存在于前列腺癌组织中。因此，本发明的hK2和PI-6的复合物可用作检测前列腺癌的血清标志物。该复合物也可用作检测前列腺癌组织的免疫组织化学标记物。根据本发明，通过免疫组织化学方法在患者的组织样品中和/或通过体外免疫测定方法在患者的液体样品中检测本发明的hK2和PI-6的复合物。有待完成。还提供了用于检测前列腺癌存在的诊断试剂盒和方法。