

(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2011-217749

(P2011-217749A)

(43) 公開日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z C C A	4 B O 6 3
C 4 O B 50/06 (2006.01)	C 4 O B 50/06	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 S	
G O 1 N 33/533 (2006.01)	G O 1 N 33/533	
審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-109520 (P2011-109520)	(71) 出願人	510041142
(22) 出願日	平成23年5月16日 (2011.5.16)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(62) 分割の表示	特願2007-527684 (P2007-527684)		ティ オブ ミシガン
	の分割		アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー
原出願日	平成17年6月8日 (2005.6.8)		ヒューロン パークウェイ 1600
(31) 優先権主張番号	60/578,406		2階
(32) 優先日	平成16年6月9日 (2004.6.9)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	11/145,861	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成17年6月6日 (2005.6.6)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	チナイヤン アルール
			アメリカ合衆国 ミシガン州 プリマス
			プリマス バレー ドライブ 51300
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 疾患に対する体液性応答のファージ・マイクロアレイ・プロファイリング法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌（たとえば、前立腺癌、肺癌、または乳癌）のファージ・マイクロアレイ・プロファイリングのための方法および組成物ならびに疾患の診断、特徴付け、および治療のために有用な新規マーカーを提供する。

【解決手段】 疾患を有する被検体の mRNA から得られた cDNA を含む複数のファージ・クローンからなるファージ・ライブラリーから、疾患特異的クローンを濃縮し、疾患を有する患者由来の血清に曝露して、血清と反応するクローンを同定する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 複数のファージ・クローンを含むファージ・ライブラリーであって、該ファージ・クローンのそれぞれが、疾患を有する被験体のmRNA試料から得られたcDNAを含むファージ・ライブラリーを提供する工程；

b) 非疾患特異的ファージ・クローンを除去するために該ファージ・ライブラリーを対照IgGに結合させる工程、続いて該ファージ・ライブラリーを疾患特異的ファージ・クローンについて濃縮するために該ファージ・ライブラリーを疾患特異的IgGに結合させる工程、これにより濃縮されたファージ・ライブラリーを作製する工程を含む、該ファージ・ライブラリーを、該疾患に特異的なcDNA酸を含むファージ・クローンについて濃縮する工程；

c) 免疫グロブリンに結合したファージ・ライブラリーを作製するために、該濃縮されたファージ・ライブラリーを、該疾患を有する患者由来の血清に曝露する工程；および、

d) 該疾患を有する該患者由来の該血清と反応するファージ・クローンを同定する工程を含む方法。

【請求項2】

曝露する工程が、濃縮されたファージ・ライブラリーを、疾患を有さない対照被験体由来の血清に曝露する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

疾患を有する患者由来の血清と反応するが、該疾患を有さない対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンを同定する工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

【請求項4】

同定する工程が、免疫グロブリンに結合したファージ・ライブラリーを、疾患を有する患者由来の血清に由来する免疫グロブリンに結合する第1の免疫グロブリンおよびファージ・カプシドタンパク質に結合する第2の免疫グロブリンに接触させる工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】

同定する工程が、第1および第2の免疫グロブリンを第3および第4の免疫グロブリンに曝露する工程をさらに含み、該第3の免疫グロブリンは、該第1の免疫グロブリンに結合し、かつ該第3の免疫グロブリンは第1の標識を含み、並びに該第4の免疫グロブリンは、該第2の免疫グロブリンに結合し、かつ該第4の免疫グロブリンは第2の標識を含む、請求項4記載の方法。

【請求項6】

第1および第2の標識が、蛍光色素であり、かつ該第1の標識が、該第2の標識とは異なる波長の蛍光を放射する、請求項5記載の方法。

【請求項7】

標識されたファージ・ライブラリーをイメージ・スキャナに曝露して、疾患を有する患者由来の血清と反応するが、該疾患を有さない対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンを同定する工程をさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項8】

疾患を有する患者由来の血清と反応するが、該疾患を有さない対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンに含まれる遺伝子を同定する工程をさらに含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

疾患が、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、および糖尿病からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項10】

癌が、前立腺癌、乳癌、および肺癌からなる群より選択される、請求項7記載の方法。

【請求項11】

濃縮されたファージ・ライブラリーが、固体表面に整列されている、請求項1記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 1 2】

疾患特異的IgGが、該疾患を有する患者の血清から精製される、請求項1記載の方法。

【請求項 1 3】

工程b)が、2回またはそれ以上繰り返される、請求項1記載の方法。

【請求項 1 4】

工程b)が、5回またはそれ以上繰り返される、請求項1記載の方法。

【請求項 1 5】

疾患が癌であり、かつ該疾患を有する患者由来の血清と反応するが、該疾患を有さない対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンが腫瘍抗原をコードするcDNAである、請求項3記載の方法。

10

【請求項 1 6】

以下を含む、癌を検出するための方法：

a) 癌を有することが疑われる被験体に由来する試料を提供する工程；並びに、

b) BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン (ubiquitin) 1、核小体タンパク質3 (NOL3)、 α -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8 (HSPA70) からなる群より選択される腫瘍抗原に対する体液性応答の有無を検出し、これにより癌を検出する工程。

【請求項 1 7】

癌が前立腺癌、肺癌、および乳癌からなる群より選択される、請求項16記載の方法。

20

【請求項 1 8】

検出する工程が、腫瘍抗原に対する自己抗体の存在を検出する工程を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 1 9】

工程c) 被験体に対する予後を提供する工程をさらに含む、請求項16記載の方法。

【請求項 2 0】

以下を含む、被験体における癌の存在を検出するためのキット：

a) BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3 (NOL3)、 α -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8 (HSPA70) からなる群より選択される腫瘍抗原の存在を特異的に検出することができる試薬；並びに

30

b) 該被験体における癌の存在を検出するための該試薬を使用するための説明書。

【請求項 2 1】

試薬が、腫瘍抗原または該腫瘍抗原に対する自己抗体に特異的な抗体である、請求項20記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、疾患診断のための組成物および方法に関する。特に、本発明は、癌（たとえば、前立腺癌、肺癌、または乳癌）のファージ・マイクロアレイ・プロファイリングのための方法および組成物を提供する。本発明は、疾患（たとえば、癌）の診断、特徴付け、および治療のために有用な新規マーカーをさらに提供する。

40

【0002】

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2004年6月9日に出願された仮出願第60/578,406号に対する優先権を主張する。

【0003】

本発明は、部分的にNIH助成金第PSOCA69568号によって資金を提供された。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

50

【0004】

発明の背景

65歳を超える9人の男性のうちの1人を苦しめている前立腺癌（PCA）は、男性の癌関連死の主な原因であり、肺癌に次いで2番目である（Abate-Shen and Shen, *Genes Dev* 14 : 2410 [2000]（非特許文献1）； Ruijter et al., *Endocr Rev*, 20 : 22 [1999]（非特許文献2））。American Cancer Societyは、2001年に約184,500人のアメリカ人男性が、前立腺癌であると診断され、39,200人が、死亡するであろうと推定している。

【0005】

前立腺癌は、典型的には直腸指診および/または前立腺特異的抗原（PSA）スクリーニングで診断される。高い血清PSAレベルは、PCAの存在を示し得る。PSAは、前立腺細胞のみによって分泌されるので、前立腺癌のためのマーカーとして使用されている。健康な前立腺は、安定量 - 典型的には1ミリリットルあたり4ナノグラム以下、または「4」またはそれ未満のPSA読み出し - を産生するが、癌細胞は、癌の重症度に対応する増大した量を産生する。4~10のレベルは、患者が前立腺癌を有するという医師の疑いを提起し得、一方、50を上回る量は、腫瘍が体の他の場所に広がったことを示し得る。

【0006】

PSAまたは指診により、癌が存在するという強い可能性を示すときは、経直腸超音波（TRUS）を使用して前立腺をマッピングし、任意の疑わしい区域を示す。前立腺の種々のセクターの生検を使用して、前立腺癌が存在するかどうかを決定する。治療選択肢は、癌の病期に依存する。低グリーソン数を有し、かつ腫瘍が前立腺外に広がっていない10年またはそれ未満の平均余命を有する男性は、経過観察（治療なし）によって治療されることが多い。より侵襲性の癌のための治療選択肢には、前立腺が完全に除去される（神経を残す技術の有無にかかわらず）根治的前立腺切除術（RP）などの外科的治療、および体外から前立腺に線量を向ける外部ビームを介して、または局所的に癌細胞を殺すために前立腺内に移植された低線量放射性種を経て適用される放射線が含まれる。抗アンドロゲンホルモン療法もまた、単独で、または外科手術もしくは放射と組み合わせて使用される。ホルモン療法は、下垂体がテストステロン産生を刺激するホルモンを産生するのを遮断する黄体形成ホルモン放出ホルモン（LH-RH）類似体を使用する。患者は、死ぬまで、LH-RH類似体の注入を受けなければならない。

【0007】

外科的およびホルモン治療は、限局性PCAのためには有効であることが多いが、進行疾患では、本質的に不治である。アンドロゲン除去は、進行PCAのための最も一般的な療法であり、アンドロゲン依存的な悪性細胞の大量のアポトーシスおよび一時的な腫瘍退縮を引き起こす。しかし、ほとんどの場合、腫瘍は、激しく再出現し、アンドロゲン・シグナルに依存せずに増殖し得る。

【0008】

前立腺特異的抗原（PSA）スクリーニングの出現により、PCAが早期に検出されるようになり、PCA関連した死亡者数が有意に減少した。しかし、癌特異的死亡率に対するPSAスクリーニングの影響は、いまだ未知であり、前向き無作為化スクリーニング研究の結果も未決定である（Etzioni et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 91 : 1033 [1999]（非特許文献3）； Maattanen et al., *Br. J. Cancer* 79 : 1210 [1999]（非特許文献4）； Schroder et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 90 : 1817 [1998]（非特許文献5））。血清PSA試験における主な限界は、特にPSA検出の中間範囲（4~10ng/ml）における前立腺癌感度および特異性の欠如である。血清PSAレベルの上昇は、良性前立腺肥大症（BPH）および前立腺炎などの非悪性状態を有する患者において検出されることが多く、検出される癌の侵襲性についての情報はほとんど提供されない。血清PSA試験が増加したことと時を同じくして、行われる前立腺針生検数の劇的な増加があった（Jacobsen et al., *JAMA* 274 : 1445 [1995]（非特許文献6））。これにより、不確かな前立腺針生検が急増した（Epstein and Potter J. *Urol.*, 166 : 402 [2001]（非特許文献7））。したがって、PSAスクリーニングを補うか、または取って代わるさらなる血清および組織生物マーカーの開発が必要である。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Abate-Shen and Shen, Genes Dev 14 : 2410 [2000]

【非特許文献2】Ruijter et al., Endocr Rev, 20 : 22 [1999]

【非特許文献3】Etzioni et al., J. Natl. Cancer Inst., 91 : 1033 [1999]

【非特許文献4】Maattanen et al., Br. J. Cancer 79 : 1210 [1999]

【非特許文献5】Schroder et al., J. Natl. Cancer Inst., 90 : 1817

【非特許文献6】Jacobsen et al., JAMA 274 : 1445 [1995]

【非特許文献7】Epstein and Potter J. Urol., 166 : 402 [2001]

10

【発明の概要】

【0010】

本発明は、疾患診断のための組成物および方法に関する。具体的には、本発明は、癌（たとえば、前立腺癌、乳癌、または肺癌）のファージ・マイクロアレイ・プロファイリングのための方法および組成物を提供する。本発明は、疾患（たとえば、癌）の診断、特徴付け、および治療のために有用な新規マーカーをさらに提供する。

【0011】

したがって、いくつかの態様において、本発明は、複数のファージ・クローンを含むファージ・ライブラリーであって、ファージ・クローンのそれぞれが、疾患（たとえば、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、および糖尿病）mRNA試料から得られたcDNAを含むファージ・ライブラリーを提供する工程；非疾患特異的ファージを除去するためにファージ・ライブラリーを対照IgGに結合させる工程、続いてファージ・ライブラリーを疾患特異的ファージ・クローンについて濃縮するためにファージ・ライブラリーを疾患特異的IgGに結合させる工程、これにより濃縮されたファージ・ライブラリーを作製する工程を含む、ファージ・ライブラリーを、疾患に特異的なcDNAを含むファージ・クローンについて濃縮する工程；免疫グロブリンに結合したファージ・ライブラリーを作製するために、濃縮されたファージ・ライブラリーを、疾患患者由来の血清、および任意で非罹患対照被験体由来の血清に曝露する工程；および疾患患者由来の血清と反応するファージ・クローンを同定する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、本方法は、疾患被験体由来の血清と反応するが、非罹患対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンを同定する工程をさらに含む。いくつかの態様において、同定する工程は、免疫グロブリンに結合したファージ・ライブラリーを、疾患を有する患者由来の血清に由来する免疫グロブリンに結合する第1の免疫グロブリンおよびファージ・カプシドタンパク質に結合する第2の免疫グロブリンと接触させる工程を含む。いくつかの態様において、同定する工程は、第1および第2の免疫グロブリンを第3および第4の免疫グロブリンに曝露する工程をさらに含み、第3の免疫グロブリンは、第1の免疫グロブリンに結合し、かつ第3の免疫グロブリンは、第1の標識を含み、並びに第4の免疫グロブリンは、第2の免疫グロブリンに結合し、かつ第4の免疫グロブリンは、第2の標識を含む。いくつかの態様において、第1および第2の標識は、蛍光色素であり、かつ第1の標識は、第2の標識とは異なる波長の蛍光を放射する。いくつかの態様において、本方法は、標識されたファージ・ライブラリーをイメージ・スキャナに曝露して、疾患患者由来の血清と反応するが、非罹患対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンを同定する工程をさらに含む。いくつかの態様において、本方法は、疾患患者由来の血清と反応するが、非罹患対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンに含まれる遺伝子を同定する工程をさらに含む。いくつかの態様において、疾患は、前立腺癌、肺癌、または乳癌である。ある態様において、濃縮されたファージ・ライブラリーは、固体表面上に整列されている。いくつかの態様において、疾患特異的IgGは、疾患を有する患者の血清から精製される。いくつかの好ましい態様において、濃縮する工程は、2回またはそれ以上、および好ましくは5回またはそれ以上繰り返される。好ましい態様において、疾患は、癌であり、かつ癌患者由来の血清と反応するが、非癌対照被験体由来の血清と反応しないファージ・クローンが腫瘍抗原を

20

30

40

50

コードするcDNAを含む。ある態様において、本発明は、上記方法によって同定される腫瘍抗原を提供する。

【0012】

さらなる態様において、本発明は、以下の工程を含む癌（たとえば、前立腺癌、乳癌、または肺癌）を検出するための方法を提供する：癌を有することが疑われる被験体（たとえば、ヒト）に由来する試料（たとえば、血液試料または腫瘍試料を含むが、これらに限定されるわけではない）を提供する工程；および腫瘍抗原（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン（ubiquilin）1、核小体タンパク質3（NOL3）、 α -2-糖タンパク質1、または熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70））に対する体液性応答の有無を検出し、これにより癌を検出する工程。いくつかの態様において、検出工程は、抗体に試料を曝露する工程、および腫瘍抗原に結合する抗体を検出する工程を含む。その他の態様において、検出工程は（たとえば、自己抗体特異抗体に試料を曝露し、抗体に結合する自己抗体特異抗体を検出することによって）、腫瘍抗原に対する自己抗体の存在を検出する工程を含む。いくつかのさらなる態様において、本方法は、被験体に対する予後を提供する工程をさらに含む。いくつかの態様において、癌を検出する工程は、癌の病期または癌のサブタイプを検出する工程をさらに含む。

10

【0013】

さらにその他の態様において、本発明は、以下を含む、被験体における癌（たとえば、前立腺癌、肺癌、または乳癌）の存在を検出するためのキットを提供する：腫瘍抗原（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3（NOL3）、 α -2-糖タンパク質1、または熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70））の存在を特異的に検出することができる（たとえば、検出するのに十分な）試薬；および被験体における癌の存在を検出するための試薬を使用するための説明書。いくつかの態様において、試薬は、腫瘍抗原特異抗体である。その他の態様において、試薬は、腫瘍抗原に対する自己抗体に特異的な抗体である。ある態様において、説明書は、インビトロ診断法における標識化のための食物および薬物投与に必要とされる説明書を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明のいくつかの態様のファージ-マイクロアレイ・プロファイリング法の模式的概要を提供する。

30

【図2】前立腺癌の体液性免疫応答候補の教師付き解析およびバリデーションを示す。図ABは、22個のエピトミック・バイオマーカーの多重解析に基づいた、受信者動作特性（ROC）曲線を示す。AUC、曲線下面積。図2Bは、ELISAによって確認した3つの代表的クローンの免疫応答性を示す。図2Cは、代表的ファージ-エピトープクローン（5'-UTR_BMI1）に対する体液性免疫応答の滴定曲線を示す。

【図3】体液性免疫応答候補の遺伝子発現メタ分析を示す。図3Aは、129個の血清試料全体で評価した4つのインフレーションのファージ-エピトープクローンに関する体液性免疫応答のヒートマップ図を示す。図3Bは、ONCOMINEに収容された公的に利用できるDNAマイクロアレイデータを使用して評価したインフレーションのファージ-エピトープクローンの相対的遺伝子発現レベルを示す。図3Cは、前立腺癌におけるタンパク質レベルでの体液性免疫応答候補の過剰発現の免疫プロットバリデーションを示す。

40

【図4】血清のトレーニング・コホートにおけるバイオバニングおよびエピトープ・プロファイリングのために使用した、前立腺癌患者の臨床情報および病理学情報の表を示す。

【図5】血清のバリデーション・コホートにおけるエピトープ・プロファイリングのために使用した、前立腺癌患者の臨床情報および病理学情報の表を示す。

【図6】ホルモン不応性前立腺癌患者の臨床情報および病理学情報の表を示す。

【図7】KNNモデルの予測精度の表を示す。

【図8 - 1】トレーニング試料セットについての分類予測を要約する表を示す。

【図8 - 2】図8-1の続きを示す図である。

50

【図 8 - 3】図8-2の続きを示す図である。

【図 9 - 1】独立したテスト試料セットについての分類予測の表を示す。

【図 9 - 2】図9-1の続きを示す図である。

【図 10】PSAレベルが4ng/ml未満である前立腺癌血清の分類予測の表を示す。

【図 11】インフレーションのファージ-エピトープクローンのタンパク質配列の表を示す。

【図 12 - 1】エピトープ・タンパク質配列アライメントについて、有意なタンパク質一覧の表を示す。

【図 12 - 2】図12-1の続きを示す図である。

【図 13】本発明のいくつかの態様において肺癌のエピトミック・バイオマーカーを同定するために使用したアプローチの模式図を示す。

【図 14】テストセットにおける免疫応答プロファイルの性能を示す。

【図 15】体液性免疫応答プロファイルおよび患者の生存を示す。

【図 16】UBQLN1の特徴付けを示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

定義

本発明の理解を容易にするために、多くの用語および表現を下記に定義する。

【0016】

本明細書に使用される「エピトープ」という用語は、特定の抗体と接触する抗原の一部を指す。

【0017】

宿主動物を免疫するためにタンパク質またはタンパク質の断片が使用される場合は、タンパク質の多くの領域が、タンパク質上の所与の領域または三次元構造に対して特異的に結合する抗体の産生を誘導し得る；これらの領域または構造を「抗原決定基」と称する。抗原決定基は、無処置の抗原（すなわち、免疫応答を誘発するために使用される「免疫原」）と抗体に対する結合に関して競合し得る。

【0018】

「特異的結合」または「特異的に結合」という用語は、抗体とタンパク質またはペプチドとの相互作用に関して使用される場合は、相互作用がタンパク質上の特定の構造（すなわち、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存的であることを意味し；言い換えると、抗体は、タンパク質全般ではなく特異的なタンパク質構造を認識して結合する。たとえば、抗体がエピトープ「A」に特異的な場合、標識された「A」および抗体を含む反応中に、エピトープAを含むタンパク質（または遊離の、標識されていないA）が存在すると、抗体に結合する標識されたAの量が減少する。

【0019】

本明細書に使用される「非特異的結合」および「バックグラウンド結合」という用語は、抗体とタンパク質またはペプチドとの相互作用に関して使用される場合は、特定の構造の存在に依存しない相互作用を指す（すなわち、抗体は、エピトープなどの特定の構造ではなくタンパク質全般に結合する）。

【0020】

本明細書に使用される「被験体」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類等を含むが、これらに限定されるわけではない、特定の治療のレシピエントである任意の動物（たとえば、哺乳動物）を指す。典型的には、「被験体」および「患者」という用語は、本明細書において、ヒト被験体に関して交換可能に使用される。

【0021】

本明細書に使用される「癌を有することが疑われる被験体」という用語は、癌を示す1つもしくは複数の症候（たとえば、顕著なしこりまたは腫瘍）を示すか、または癌についてスクリーニングがなされる（たとえば、定期的健康診断時に）被験体を指す。癌を有することが疑われる被験体は、1つまたは複数の危険因子を有してもよい。癌を有することが疑われる被験体は、一般に癌についての試験がなされていない。しかし、「癌を有する

10

20

30

40

50

ことが疑われる被験体」は、最初の診断（たとえば、腫瘍を示すCTスキャンまたは増大したPSAレベル）を受けたが、癌の病期は不明であるような個体を包含する。本用語は、かつて癌を有した人々（たとえば緩解期の個体）をさらに含む。

【0022】

本明細書に使用される「癌のリスクがある被験体」という用語は、特定の癌発症の1つまたは複数のリスク因子を有する被験体を指す。リスク因子は、性別、年齢、遺伝素因、環境曝露、癌の既往、癌以外の疾患の既往、および生活様式を含むが、これらに限定されるものではない。

【0023】

本明細書に使用される「被験体における癌を特徴付けること」という用語は、良性、前癌性、または癌性組織の存在、癌の病期、および被験体の予後を含むが、これらに限定されるわけではない、被験体の癌試料の1つまたは複数の特性を同定することを指す。癌は、本明細書に開示された癌マーカーを含むが、これらに限定されるわけではない1つもしくは複数の癌マーカーまたは腫瘍抗原遺伝子の発現の同定により特徴付けることができる。

10

【0024】

本明細書に使用される「被験体における前立腺組織を特徴付けること」という用語は、前立腺組織試料の1つまたは複数の特性の同定（たとえば、癌性組織の存在、おそらく癌になりつつある前癌性組織の存在、および転移する可能性が高い癌性組織の存在を含むが、これらに限定されるわけではない）を指す。いくつかの態様において、組織は、本明細書に開示した癌マーカーを含むが、これらに限定されるわけではない1つまたは複数の癌マーカー遺伝子および腫瘍抗原遺伝子の発現を同定することによって特徴付けられる。

20

【0025】

本明細書に使用される「癌マーカー遺伝子」という用語は、発現レベルが、単独でまたは他の遺伝子と組み合わせ、癌または癌の予後に相関される遺伝子を指す。相関は、遺伝子の発現が増大されること、または減少されることのいずれに関連していてもよい。たとえば、遺伝子の発現が、癌の指標であり得るか、または遺伝子発現の欠損が、癌患者の予後不良に相関し得る。癌マーカー発現は、例示的に下記実施例に記述したものを含むが、これらに限定されるわけではない、任意の適切な方法を使用して特徴付けられ得る。

【0026】

本明細書に使用される「発現レベルを特異的に検出する試薬」という用語は、1つまたは複数の遺伝子（たとえば、本発明の癌マーカーを含むが、これらに限定されるわけではない）の発現を検出するために使用される試薬を指す。適切な試薬の例は、関心対象の遺伝子に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、関心対象の遺伝子を特異的に増幅することが可能なPCRプライマー、および関心対象の遺伝子により発現されたタンパク質に特異的に結合することができる抗体を含むが、これらに限定されるわけではない。その他の非限定の例は、下記の記述および実施例に見いだすことができる。

30

【0027】

本明細書に使用される「非癌性対照と比較して減少されたか、または増大された発現を検出すること」という用語は、非癌性前立腺対照試料におけるレベルと比較した遺伝子の発現レベル（たとえば、mRNAまたはタンパク質のレベル）を測定することを指す。遺伝子発現は、本明細書に記述したものを含むが、これらに限定されるわけではない任意の適切な方法を使用して測定することができる。

40

【0028】

本明細書に使用される「該試験化合物の非存在下と比較して、該試験化合物の存在下における該細胞試料における遺伝子発現の変化を検出すること」という用語は、試験化合物の非存在下と比較して、試験化合物の存在下において変化した（たとえば、増大したかまたは減少した）発現レベルを測定することを指す。遺伝子発現は、本明細書に記述したものを含むが、これらに限定されるわけではない任意の適切な方法を使用して測定することができる。

50

【0029】

本明細書に使用される「腫瘍抗原」という用語は、腫瘍細胞によって発現される免疫原性エピトープ（たとえば、タンパク質）を指す。タンパク質は、非腫瘍細胞によって発現されてもよいが、腫瘍細胞によって発現されるときにのみ免疫原性であってもよい。または、タンパク質は、腫瘍細胞によって発現されるが、正常細胞に発現されなくてもよい。例示的な腫瘍抗原は、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、および仮想的タンパク質XP_373908を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0030】

本明細書に使用される「自己抗体」という用語は、宿主によって産生され（免疫化の有無にかかわらず）、かつ宿主抗原（たとえば、腫瘍抗原）に向けられた抗体を指す。

10

【0031】

本明細書に使用される「癌ワクチン」という用語は、腫瘍特異性の免疫応答を誘発する組成物（たとえば、腫瘍抗原およびサイトカイン）を指す。応答は、ある部位（たとえば、腫瘍から遠く離れている部位）に癌ワクチン組成物を投与することによって、被験体自身の免疫系により誘発される。好ましい態様において、免疫応答により、体の至る所で腫瘍細胞（たとえば、原発性および転移性腫瘍細胞）の根絶を生じる。

【0032】

本明細書に使用される「該被験体における癌を検出するために該キットを使用するための説明書」という用語は、被験体由来の試料中の癌の検出および特徴付けのためのキットに含まれる試薬を使用するための説明書を含む。いくつかの態様において、説明書は、インビトロ診断用品のラベルにおいて米国食品医薬品局（FDA）が要求する意図された使用の説明をさらに含む。本明細書に使用される「癌発現プロファイル・マップ」という用語は、特定の型の組織（たとえば、原発性、転移性、および前癌性の組織）における遺伝子の発現レベルの提示を指す。マップは、図面による提示（たとえば、紙上もしくはコンピュータスクリーン上）、物理的提示（たとえば、ゲルもしくはアレイ）またはコンピュータメモリーに保存されたデジタル提示で示してもよい。各マップは、特定の型の組織（たとえば、原発性、転移性、および前癌性）に対応し、したがって、患者試料と比較するための鑄型を提供する。好ましい態様において、マップは、同じ型の組織を有する複数の患者由来の組織試料を含むプールされた試料から作製される。

20

【0033】

本明細書に使用される「コンピュータメモリー」および「コンピュータメモリー装置」という用語は、コンピュータプロセッサによって読取り可能な任意の記憶媒体を指す。コンピュータメモリーの例は、RAM、ROM、コンピュータチップ、デジタルビデオディスク（DVD）、コンパクトディスク（CD）、ハードディスクドライブ（HDD）、および磁気テープを含むが、これらに限定されるわけではない。

30

【0034】

本明細書に使用される「コンピュータ読取り可能な媒体」という用語は、情報（たとえば、データおよび指示）をコンピュータプロセッサに格納し、および提供するための任意の装置またはシステムを指す。コンピュータ読取り可能な媒体の例は、DVD、CD、ハードディスクドライブ、磁気テープ、およびネットワーク上のストリーミングメディアのためのサーバーを含むが、これらに限定されるわけではない。

40

【0035】

本明細書に使用される「プロセッサ」および「中央処理装置」または「CPU」という用語は、交換可能に使用され、コンピュータメモリー（たとえば、ROMまたはその他のコンピュータメモリー）からプログラムを読取ることができ、およびプログラムに従い工程セットを実行する装置を指す。

【0036】

本明細書に使用される「癌の病期」という用語は、癌の進行レベルの定性的または定量的評価を指す。癌の病期を決定するために使用される基準は、腫瘍の大きさ、腫瘍が体の他の部位へ広がっているかどうか、および癌がどこに広がっているか（たとえば、同じ臓

50

器もしくは体の同じ領域内または他の臓器へ)を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0037】

本明細書に使用される「予後を提供すること」という用語は、被験体の今後の健康(たとえば、予想される罹患率または死亡率、癌に冒される可能性、および転移のリスク)に対する癌の存在の影響に関する情報(たとえば、本発明の診断法により決定されるような)を提供することを指す。

【0038】

本明細書に使用される「前立腺特異的抗原不全」という用語は、前立腺癌療法(たとえば、外科手術)後の患者において高い前立腺特異的抗原レベルが生じることを指す。本明細書に使用される「前立腺特異的抗原不全を生じるリスク」という用語は、被験体が前立腺癌療法後に前立腺特異的抗原不全を生じる相対的リスク(たとえば、可能性の割合または相対スコア)を指す。

10

【0039】

本明細書に使用される「術後腫瘍組織」という用語は、被験体から摘出された(たとえば、手術時)癌性組織(たとえば、前立腺組織)を指す。

【0040】

本明細書に使用される「癌と診断された被験体」という用語は、試験されて、癌性細胞を有することが見いだされた被験体を指す。癌は、生検、X線、血液検査、および本発明の診断法を含むが、これらに限定されるわけではない任意の適切な方法を用い診断することができる。

20

【0041】

本明細書に使用される「最初の診断」という用語は、最初の癌診断(たとえば、癌性細胞の有無)の結果を指す。最初の診断は、前立腺特異的抗原不全のリスクの癌の病期に関する情報を含まない。

【0042】

本明細書に使用される「生検組織」という用語は、試料が癌性組織を含有するかどうか決定する目的で被験体から摘出された組織(たとえば、前立腺組織)の試料を指す。いくつかの態様において、被験体は、癌を有することが疑われるので、生検組織が摘出される。次いで生検組織が癌の有無について試験される(たとえば、顕微鏡観察による)。

30

【0043】

本明細書に使用される「断定的でない生検組織」という用語は、組織学的検査により、癌の有無が決定されなかった生検組織を指す。

【0044】

本明細書に使用される「非ヒト動物」という用語は、齧歯類、非ヒト霊長類、ヒツジ、ウシ、反芻動物、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、鳥類などのような脊椎動物を含むが、これらに限定されない、全ての非ヒト動物を指す。

【0045】

本明細書に使用される「疾患」という用語は、被験体における標準状態からの何らかの逸脱を指す。好ましい態様において、本発明の方法および組成物は、免疫反応(たとえば、生得のタンパク質に対する免疫グロブリンの作製)が、疾患を有する被験体および疾患を有さない被験体において異なる疾患の診断および治療に有用である。本発明は、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、および糖尿病を含むが、これらに限定されるわけではない非常に多くの疾患での使用を見いだす。

40

【0046】

本明細書に使用される「標識」という用語は、検出可能な(好ましくは、定量化可能な)効果を提供するために使用することができ、かつ核酸もしくはタンパク質に付着することができる任意の原子または分子を指す。標識は、色素;³²Pなどの放射標識;ビオチンなどの結合部分;ジゴキシゲニンなどのハプテン;発光性、リン光性、または蛍光発生物分;質量タグ;および単独または蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)によって発光スペクト

50

ルを抑制、もしくは変化させることができる部分と組み合わせた蛍光色素を含むが、これらに限定されるわけではない。標識は、蛍光、放射能、比色、重量測定、X線回折または吸収、磁気、酵素活性、質量による影響を受ける質量または挙動の特徴（たとえば、MALDI飛行時間型質量分析）などによって検出可能なシグナル提供し得る。標識は、荷電された部分（陽電荷または負電荷）であってもよく、または代わりに、電荷中性であってもよい。標識は、標識を含む配列が検出可能な限り、核酸もしくはタンパク質配列を含むか、または核酸もしくはタンパク質配列からなることができる。

【0047】

「siRNA」という用語は、低分子干渉RNAを指す。いくつかの態様において、siRNAは、約18~25ヌクレオチド長の二重鎖または二本鎖領域を含み；siRNAは、それぞれの鎖の3'末端に約2つ~4つの不對ヌクレオチドを含むことが多い。siRNAの二重鎖または二本鎖領域の少なくとも一方の鎖は、標的RNA分子に対して実質的に相同であるか、または実質的に相補的である。標的RNA分子に対して相補的な鎖は、「アンチセンス鎖」であり；標的RNA分子に対して相同な鎖は、「センス鎖」であり、siRNAアンチセンス鎖に対してもまた相補的である。siRNAは、さらなる配列を含んでいてもよく；このような配列の非限定的な例は、連結配列またはループ、並びにステムおよびその他の折りたたみ構造を含む。siRNAは、無脊椎動物において、および脊椎動物において、RNA干渉を引き起こす際に、並びに植物において、転写後遺伝子サイレンシングの間の配列特異的RNA分解を引き起こす際に、重要な中間体として機能すると思われる。

10

【0048】

「RNA干渉」または「RNAi」という用語は、siRNAによる遺伝子発現のサイレンシングまたは減少を指す。これは、その二重鎖領域が、サイレンシングされた遺伝子の配列に対して相同であるsiRNAによって開始される、動植物における配列特異的、転写後遺伝子サイレンシングの過程である。遺伝子は、生物に対して内因性もしくは外因性であっても、染色体内に組み込まれて存在しても、またはゲノムに組み込まれていないトランスフェクション・ベクター内に存在してもよい。遺伝子の発現は、完全に、または部分的にのいずれかで阻害される。RNAiは、標的RNAの機能を阻害するとも考えられ得；標的RNAの機能は、完全または部分的であり得る。

20

【0049】

本明細書に使用される「遺伝子導入系」という用語は、核酸配列を含む組成物を細胞または組織へ送達する任意の手段を指す。たとえば、遺伝子導入系は、ベクター（たとえば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、および他の核酸に基づいた送達系）、裸の核酸の微量注入、重合体に基づいた送達系（たとえば、リボソームに基づいた、および金属粒子に基づいた系）、微粒子銃注入などを含むが、これらに限定されるわけではない。本明細書に使用される「ウイルス遺伝子導入系」という用語は、所望の細胞または組織への試料の送達を促進するための、ウイルスエレメント（たとえば、無処置のウイルス、改変されたウイルス、および核酸またはタンパク質などのウイルス構成要素）を含む遺伝子導入系を指す。本明細書に使用される「アデノウイルス遺伝子導入系」という用語は、アデノウイルス科（Adenoviridae）に属する無処置または変更されたウイルスを含む遺伝子導入系を指す。

30

40

【0050】

本明細書に使用される「部位特異的組換え標的配列」という用語は、組換え因子の認識配列および組換えが生じる位置を提供する核酸配列を指す。

【0051】

本明細書に使用される「核酸分子」という用語は、DNAまたはRNAを含むが、これらに限定されるわけではない任意の核酸を含む分子を指す。本用語は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、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、イノシン、N6-イソペンチルアデニン、1-メチルアデニン、1-

50

メチルプソイドウラシル、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-メチルアデニン、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、 β -D-マンノシルキユエオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、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-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キユエオシン、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、N-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、プソイドウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリンを含むが、これらに限定されるわけではないDNA並びにRNAの公知の任意の塩基類似体を含む配列を含む。

10

【0052】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチドの産生に必要なコード配列を含む核酸（たとえば、DNA）配列、前駆体、またはRNA（たとえば、rRNA、tRNA）を指す。ポリペプチドは、全長もしくは断片の望ましい活性または機能特性（たとえば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性など）が維持される限り、全長コード配列により、またはコード配列の任意の一部によりコードすることができる。また、本用語は、構造遺伝子のコード領域、およびその遺伝子が全長mRNAの長さに相当するように、いずれかの末端上の約1kbまたはそれ以上の距離の、5'末端および3'末端の両側の、コード領域に隣接した配列も包含する。コード領域の5'側に位置しmRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と称される。コード領域の3'側または下流に位置しmRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と称される。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNAおよびゲノム型の両方を包含する。遺伝子のゲノム型またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と称される非コード配列で中断されたコード領域を含む。イントロンは、核RNA（hnRNA）へ転写される遺伝子のセグメントであり；イントロンは、エンハンサーなどの調節エレメントを含んでいてもよい。イントロンは、核または一次転写産物から除去または「スプライシング」され；その結果イントロンは、メッセンジャーRNA（mRNA）転写産物内には存在しない。翻訳時にmRNAは、新生ポリペプチドのアミノ酸の配列または順番を特定するように機能する。

20

【0053】

本明細書に使用される「異種遺伝子」という用語は、その天然の環境にはない遺伝子を指す。たとえば、異種遺伝子は、別の種に導入されたある種由来の遺伝子を含む。異種遺伝子は、何らかの方法（たとえば、突然変異、複数コピーの付加、生得でない調節配列への連結など）で変更されている、生物に生得の遺伝子も含む。異種遺伝子配列は、典型的には、天然には染色体内の遺伝子配列に結合して見いだされないDNA配列または天然には見いだされない染色体の一部に結合しているDNA配列（たとえば、遺伝子が通常発現されない遺伝子座において発現された遺伝子）に連結している点で、異種遺伝子は、内因性遺伝子から区別される。

30

【0054】

本明細書に使用される「遺伝子発現」という用語は、遺伝子にコードされた遺伝情報が、RNA（たとえば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA）へ、遺伝子の「転写」を通じて（すなわち、RNAポリメラーゼの酵素作用を介して）変換される過程、およびタンパク質をコードする遺伝子については、mRNAの「翻訳」を通じてタンパク質へ変換される過程を指す。遺伝子発現は、この過程の多くの段階で調節することができる。「上方調節」または「活性化」は、遺伝子発現産物（すなわち、RNAまたはタンパク質）の産生を増大する調節を意味する一方、「下方調節」または「抑圧」は、産生を減少する調節を指す。上方調節または下方調節に関連している分子（たとえば、転写因子）は、それぞれ「アクチベーター」および「リプレッサー」と称されることが多い。

40

【0055】

ゲノム型の遺伝子は、イントロンを含むことに加え、RNA転写産物上に存在する配列の5

50

、および3'末端の両方に位置した配列も含んでいてもよい。これらの配列は、「フランキング」配列または領域と称される（これらのフランキング配列は、mRNA転写産物上に存在する非翻訳配列の5'または3'側に位置する）。5'側フランキング領域は、遺伝子の転写を制御または影響を及ぼすプロモーターおよびエンハンサーなどの調節配列を含んでもよい。3'側フランキング領域は、転写終結、転写後切断、およびポリアデニル化を指示する配列を含んでもよい。

【0056】

「野生型」という用語は、天然の供与源から単離された遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団において最も頻繁に観察されるものであり、したがって遺伝子の「正常」または「野生型」の形態は、任意に設計される。対照的に、「改変された」または「突然変異体」という用語は、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較して、配列および/または機能特性に改変（すなわち、変更された特徴）を示す遺伝子または遺伝子産物を指す。天然の突然変異体は単離することができ；これらは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較して、変更された特徴（変更された核酸配列を含む）を有するという事実により同定される点に留意されたい。

10

【0057】

本明細書に使用される「コードする核酸分子」、「コードするDNA配列」、および「コードするDNA」という用語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順番または配列を指す。これらのデオキシリボヌクレオチドの順番は、ポリペプチド（タンパク質）鎖に沿ったアミノ酸の順番を決定する。したがって、DNA配列は、アミノ酸配列をコードする。

20

【0058】

本明細書に使用される「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド」および「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド」という用語は、遺伝子のコード領域を含む核酸配列、または言い換えると、遺伝子産物をコードする核酸配列を指す。コード領域は、cDNA、ゲノムDNA、またはRNA形態で存在していてもよい。DNA形態で存在する際に、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一本鎖（すなわち、センス鎖）または二本鎖であることができる。適切な転写の開始および/または一次RNA転写産物の正確なプロセッシングができることが必要である場合、エンハンサー/プロモーター、スプライシング接合部、ポリアデニル化シグナルなどのような適切な制御エレメントは、遺伝子のコード領域に密接に近接して位置し得る。または、本発明の発現ベクターにおいて利用されるコード領域は、内因性エンハンサー/プロモーター、スプライシング接合部、介在配列、ポリアデニル化シグナルなど、または内因性および外因性の両方の制御エレメントの組み合わせを含んでいてもよい。

30

【0059】

本明細書に使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、長さが短い一本鎖ポリヌクレオチド鎖を指す。オリゴヌクレオチドは、典型的には、長さが200残基未満（たとえば、15~100残基）であるが、本明細書に使用される本用語は、より長いポリヌクレオチド鎖も包含する。オリゴヌクレオチドはしばしば、それらの長さで称される。たとえば、24残基のオリゴヌクレオチドは、「24mer」と称される。オリゴヌクレオチドは、自己ハイブリダイズまたは他のポリヌクレオチドとのハイブリダイズにより、二次構造および三次構造を形成することができる。このような構造は、二重鎖、ヘアピン、十字部、バンド（bend）、および三重鎖を含むが、これらに限定されるわけではない。

40

【0060】

本明細書に使用される「相補的」または「相補性」という用語は、塩基対則に関係したポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチド配列）に関して使用される。たとえば、配列「A-G-T」は、配列「T-C-A」に相補的である。相補性は、「部分的」であっても良く、ここでは核酸の塩基のいくつかのみが、塩基対則に従い対応されている。または、核酸間に「完全な」または「全」相補性が存在することもできる。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強さに関して有意な効果を有する。これは

50

、増幅反応、ならびに核酸間の結合に依存する検出法において特に重要である。

【0061】

「相同性」という用語は、相補性の程度を指す。部分的な相同性または完全な相同性（すなわち、同一性）が存在し得る。部分的相補配列は、部分的に完全な相補性の核酸分子が、「実質的に相同」である標的核酸にハイブリダイズすることを少なくとも阻害する核酸分子である。完全な相補配列の標的配列へのハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションアッセイ（サザンまたはノーザンプロット、液中ハイブリダイゼーションなど）を用いて試験することができる。実質的に相同である配列またはプローブは、完全に相同である核酸分子の標的への低ストリンジェンシー条件下での結合（すなわち、ハイブリダイゼーション）を競合および阻害する。これは、低ストリンジェンシー条件が、非特異的結合を可能にするものであることを意味するものではなく；低ストリンジェンシー条件は、2つの配列の互いへの結合が特異的（すなわち選択的）相互作用であることを必要とする。非特異的結合が存在しないことは、実質的に非相補的（たとえば、約30%未満の同一性）である第2の標的の使用により試験することができ；非特異的結合の非存在下では、プローブは第2の非相補的標的とハイブリダイズしない。

10

【0062】

cDNAまたはゲノムクローンなどの二本鎖核酸配列に関して使用される場合、「実質的に相同」という用語は、上記のような低ストリンジェンシー条件下で、二本鎖核酸配列のいずれかまたは両方の鎖にハイブリダイズすることができるプローブを指す。

20

【0063】

遺伝子は、一次RNA転写産物の選択的スプライシングによって生じる複数のRNA種を産生することができる。同じ遺伝子のスプライシング変種であるcDNAは、配列同一性または完全な相同性の領域（両方のcDNA上に同じエキソンまたは同じエキソンの一部が存在することを表す）および完全に非同一の領域（たとえば、cDNA 2が代わりにエキソン「B」を含むときに、cDNA 1上のエキソン「A」が存在することを表す）を含むであろう。2つのcDNAは配列同一の領域を含むので、これらは両方共、両方のcDNAに見いだされる配列を含む全遺伝子または遺伝子の一部に由来したプローブへハイブリダイズするであろう；したがって、これら2つのスプライシング変種は、このようなプローブと、および互いに実質的に相同である。

30

【0064】

一本鎖核酸配列について使用される場合、「実質的に相同」という用語は、上記のような低ストリンジェンシー条件下で、一本鎖核酸配列とハイブリダイズすることができる（すなわち、相補的である）プローブを指す。

【0065】

本明細書に使用される「ハイブリダイゼーション」という用語は、相補的核酸の対形成に関して使用される。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション強度（すなわち、核酸間の会合の強度）は、核酸間の相補性の程度、関連する条件におけるストリンジェンシー、形成されたハイブリッドの T_m 、および核酸内のG:C比などの因子により影響を受ける。その構造内に相補的核酸の対形成を含む単独の分子は、「自己ハイブリダイズされた」と称される。

40

【0066】

本明細書に使用される「 T_m 」という用語は、「融解温度」に関して使用される。融解温度は、二本鎖核酸分子の集団が一本鎖へと半分解離する温度である。核酸の T_m の計算式は当技術分野において周知である。標準の参考文献により示されるように、 T_m 値の単純な推定は、下記式により計算することができる： $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G + C)$ 、これは核酸が1M NaClの水溶液中にある場合（たとえば、Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, Nucleic Acid Hybridization [1985]を参照されたい）。その他の参考文献は、 T_m の計算に構造特性、並びに配列特性を考慮する、より洗練されたコンピュータ処理を含んでいる。

50

【0067】

本明細書に使用される「ストリンジェンシー」という用語は、核酸ハイブリダイゼーションが行われる温度、イオン強度、および有機溶媒などのその他の化合物の存在に関して使用される。「低ストリンジェンシー条件」下では、関心対象の核酸配列は、その正確な相補体、単独の塩基ミスマッチを伴う配列、密接に関連した配列（たとえば、90%またはそれ以上の相同性を有する配列）、および部分的な相同性のみを有する配列（たとえば、50~90%の相同性を有する配列）とハイブリダイズする。「中程度のストリンジェンシー条件」下では、関心対象の核酸配列は、その正確な相補体、単独の塩基ミスマッチを伴う配列、および密接な関連配列（たとえば、90%またはそれ以上の相同性）とハイブリダイズする。「高ストリンジェンシー条件下」では、関心対象の核酸配列は、その正確な相補体、および（温度などの条件に応じて）単独の塩基ミスマッチを伴う配列とハイブリダイズする。言い換えると、高ストリンジェンシー条件下では、温度を上昇させ、単独の塩基ミスマッチを伴う配列とのハイブリダイゼーションを除くことができる。

10

【0068】

核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、「高ストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブが使用される場合は、5×SSPE（43.8g/l NaCl、6.9g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、および1.85g/l EDTA、pHは、NaOHにより7.4に調節）、0.5% SDS、5×デンハート試薬、および100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAからなる溶液中42 での結合またはハイブリダイゼーション、続く0.1×SSPE、1.0% SDSを含む溶液による42 での洗浄と同等の条件を含む。

20

【0069】

核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、「中程度のストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブが使用されるときに、5×SSPE（43.8g/l NaCl、6.9g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、および1.85g/l EDTA、pHはNaOHにより7.4に調節）、0.5% SDS、5×デンハート試薬、および100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAからなる溶液中42 での結合またはハイブリダイゼーション、続く1.0×SSPE、1.0% SDSを含む溶液による42 での洗浄と同等の条件を含む。

【0070】

「低ストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブが使用される場合は、5×SSPE（43.8g/l NaCl、6.9g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、および1.85g/l EDTA、pHは、NaOHにより7.4に調節）、0.1% SDS、5×デンハート試薬[50×デンハートは500mlあたり、5gのFicoll（400型、Pharmacia）、5g BSA（フラクションV；Sigma）を含有する]、および100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAからなる溶液中42 での結合またはハイブリダイゼーション、続く5×SSPE、0.1% SDSを含む溶液による42 での洗浄と同等の条件を含む。

30

【0071】

当技術分野では、低ストリンジェンシー条件を含む多くの同様の条件を使用することができることは周知であり；プローブの長さおよび性質（DNA、RNA、塩基組成物）、標的の性質（溶液中に存在するかまたは固定された、DNA、RNA、塩基組成物など）、並びに塩および他の成分の濃度（たとえば、ホルムアミド、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコールの有無）などの因子が考慮され、ハイブリダイゼーション溶液は、上に挙げた条件とは異なるが同等である低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションの条件を生じるように変更してもよい。加えて、当技術分野では、高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーションを促進する条件（たとえば、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄工程の温度の上昇、ハイブリダイゼーション溶液中でのホルムアミドの使用など）は公知である（上記「ストリンジェンシー」に関する定義を参照されたい）。

40

【0072】

「増幅」は、鋳型特異性を含む核酸複製の特別な場合である。これは、非特異的鋳型複製（すなわち、鋳型依存的であるが特異的鋳型には依存しない複製）とは対照的である。鋳型特異性は、本明細書において複製の忠実性（すなわち、適切なポリヌクレオチド配列の合成）および（リボ-またはデオキシリボ-）ヌクレオチド特異性から区別される。鋳型

50

特異性は、「標的」特異性に関して説明されることが多い。標的配列は、標的配列が他の核酸から選別されることが求められるという意味で「標的」である。増幅技術は、主にこの選別のために設計される。

【0073】

鋳型特異性は、酵素の選択によりほとんどの増幅技術で達成される。増幅酵素は、これらが使用される条件下で、核酸の不均一混合物中の核酸の特定配列のみを処理する酵素である。たとえば、Q レプリカーゼの場合、MDV-1 RNAは、本レプリカーゼの特異的鋳型である (Kacian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:3038[1972])。他の核酸は、この増幅酵素により複製されない。同様に、T7 RNAポリメラーゼの場合、増幅酵素は、それ自身のプロモーターについてストリンジェントな特異性を有する (Chamberlin et al., Nature, 228:227[1970])。T4 DNAリガーゼの場合、酵素は、ライゲーション接合部のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基質と鋳型との間のミスマッチが存在する2つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと連結することはない (Wu and Wallace, Genomics, 4:560[1989])。最後に、TaqおよびPfuポリメラーゼは、高温で機能するそれらの能力のために、結合した配列について高い特異性を発揮し、その結果プライマーにより規定されることが見いだされている；高温は、標的配列とのハイブリダイゼーションには有利に働くが、非標的配列とのハイブリダイゼーションには有利に働かない熱力学的条件を生じる (H.A. Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press [1989])。

10

【0074】

本明細書に使用される「増幅可能な核酸」という用語は、任意の増幅法により増幅することができる核酸に関して使用される。「増幅可能な核酸」は、通常「試料鋳型」を含むことが企図される。

20

【0075】

本明細書に使用される「試料鋳型」という用語は、「標的」の存在について分析される試料を起源とする核酸を指す。対照的に、「バックグラウンド鋳型」は、試料中に存在することも存在しないこともある試料鋳型以外の核酸に関して使用される。バックグラウンド鋳型は、ほとんどの場合不注意によるものである。これは、キャリアオーバーの結果であるか、または試料から精製除去されることが求められる核酸混入物の存在に起因し得る。たとえば、検出されるもの以外の生物由来の核酸は、被験試料中にバックグラウンドとして存在し得る。

30

【0076】

本明細書に使用される「プライマー」という用語は、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下 (すなわち、ヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼなどの誘導剤の存在下、並びに適切な温度およびpHで) に置いた場合に、合成開始点として作用することが可能である、精製した制限消化物のように天然に生じるか、または合成的に生成されたオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーは、増幅効率を最大にするために、好ましくは一本鎖であるが、代わりに二本鎖であってもよい。二本鎖の場合、プライマーは、伸長産物を調製するために使用される前に、最初にその鎖を分離するように処置される。好ましくは、プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、誘導剤の存在下で、伸長産物の合成を刺激するのに十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマー供与源、およびその方法の使用を含む、多くの因子に依存する。

40

【0077】

本明細書に使用される「プローブ」という用語は、精製された制限消化物と同様に天然に存在するか、または合成的にか、組換え的にか、もしくはPCR増幅によって産生されたオリゴヌクレオチド (すなわち、ヌクレオチド配列) であって、別の関心対象のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能であるものを指す。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、および単離に有用である。本発明において使用された任意のプローブが、「レポーター分子

50

」により標識され、その結果、酵素（たとえば、ELISA、並びに酵素に基づく組織化学アッセイ）、蛍光、放射性、および発光系を含むが、これらに限定されるわけではない任意の検出系で検出可能であることが企図される。本発明は、任意の特定の検出系または標識に限定されることは企図されない。

【0078】

本明細書に使用される「一部」という用語は、ヌクレオチド配列に関する場合（「所与のヌクレオチド配列の一部」など）、その配列の断片を指す。断片は、4個のヌクレオチドから、全ヌクレオチド配列から1個のヌクレオチドを差し引いたもの（10個のヌクレオチド、20個、30個、40個、50個、100個、200個、その他）などのサイズの範囲であってもよい。

10

【0079】

本明細書に使用される「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」という用語は、そのそれぞれが、特異的ヌクレオチド配列でまたはその近傍で、二本鎖DNAを切断する細菌酵素を指す。

【0080】

本明細書に使用される「機能的な組み合わせ」、「機能的な順番」、および「機能的に連結」という用語は、所与の遺伝子の転写および/または所望のタンパク質分子の合成を指示することが可能である核酸分子が産生されるような核酸配列の連結を意味する。また、本用語は、機能的タンパク質が産生されるような様式でのアミノ酸配列の連結も指す。

【0081】

核酸について使用される「単離された」という用語は、「単離されたオリゴヌクレオチド」または「単離されたポリヌクレオチド」のように、同定され、かつその天然の供与源においてそれが通常会合されている少なくとも1種の成分または混入物から分離された核酸配列を指す。単離された核酸は、それが天然に見いだされるものとは異なる形態または状況に存在する。対照的に、非単離の核酸は、これらが天然に存在する状態で見いだされるDNAおよびRNAなどの核酸である。たとえば、所与のDNA配列（たとえば、遺伝子）は、隣接遺伝子の近傍で、宿主細胞染色体上に見いだされ；RNA配列、たとえば特異的タンパク質をコードする特異的mRNA配列は、多数のタンパク質をコードする多くの他のmRNAとの混合物として、細胞内に見いだされる。しかし、所与のタンパク質をコードする単離された核酸は、一例として、核酸が天然の細胞とは異なる染色体位置にあるか、さもなければ、天然に見いだされるものとは異なる核酸配列が側方にある、所与のタンパク質を通常発現している細胞内にあるような核酸を含む。単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖形態で存在することができる。単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドがタンパク質を発現するために利用される場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、最小限センス鎖またはコード鎖を含む（すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは一本鎖であってもよい）が、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含んでいてもよい（すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは二本鎖であってもよい）。

20

30

【0082】

本明細書に使用される「精製された」または「精製すること」という用語は、成分（たとえば、混入物）を試料から除去することを指す。たとえば、抗体は、混入している非免疫グロブリンタンパク質を除去することにより精製され；これらは、標的分子に結合しない免疫グロブリンの除去によっても精製される。非免疫グロブリンタンパク質の除去および/または標的分子に結合しない免疫グロブリンの除去は、試料中の標的反応性の免疫グロブリンの割合の増大を生じる。もう一つの例において、組換えポリペプチドは細菌宿主細胞において発現され、かつポリペプチドは宿主細胞タンパク質の除去により精製され；これにより、試料中の組換えポリペプチドの割合が増大される。

40

【0083】

「アミノ酸配列」、および「ポリペプチド」または「タンパク質」などの用語は、アミノ酸配列を、言及されたタンパク質分子に関連した完全な生得のアミノ酸配列に限定する

50

ことを意味するものではない。

【0084】

本明細書に使用される「生得のタンパク質」という用語は、タンパク質が、ベクター配列によりコードされたアミノ酸残基を含まないことを示し；すなわち、生得のタンパク質は、天然に存在するタンパク質中に見いだされるアミノ酸のみを含む。生得のタンパク質は、組換え手段により産生されるか、または天然の供与源から単離されてもよい。

【0085】

本明細書に使用される「一部」という用語は、タンパク質に関する場合（「所与のタンパク質の一部」などの）、タンパク質の断片を指す。断片は、4個のアミノ酸残基から、全アミノ酸配列から1個のアミノ酸を差し引いたものまでの範囲であってもよい。

10

【0086】

「サザンブロット」という用語は、サイズに従ってDNAを分画するための、アガロースまたはアクリルアミドゲル上でのDNAの分析、その後のニトロセルロースまたはナイロン膜などの固相支持体へのゲルからのDNAの転移を指す。次いで、固定されたDNAを標識したプローブでプローブし、使用したプローブに相補的なDNA種を検出する。このDNAは、電気泳動前に制限酵素により切断することができる。電気泳動後、DNAは、固相支持体への転移前またはその間に、部分的に脱プリンおよび変性される。サザンブロットは、分子生物学者の標準のツールである（J. Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, NY, pp 9.31-9.58[1989]）。

【0087】

本明細書に使用される「ノーザンブロット」という用語は、サイズに従ってRNAを分画するための、アガロースゲル上でのRNAの電気泳動によるRNAの分析、その後のニトロセルロースまたはナイロン膜などの固相支持体へのゲルからのRNAの転移を指す。次いで、固定されたRNAを標識したプローブでプローブし、使用したプローブに相補的なRNA種を検出する。ノーザンブロットは、分子生物学者の標準のツールである（J. Sambrook, et al., 前記, pp 7.39-7.52[1989]）。

20

【0088】

「ウエスタンブロット」という用語は、ニトロセルロースまたは膜などの支持体上に固定されたタンパク質（またはポリペプチド）の分析を指す。タンパク質を、アクリルアミドゲル上を泳動してタンパク質を分離し、その後、タンパク質をゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜などの固相支持体へと転移させる。その後、固定されたタンパク質を関心対象の抗原に対する反応性を有する抗体に曝露する。抗体の結合は、放射標識された抗体の使用を含む様々な方法で検出してもよい。

30

【0089】

本明細書に使用される「導入遺伝子」という用語は、たとえば、外来遺伝子の新たに受精した卵または初期胚への導入により、生物内に配置された外来遺伝子を指す。「外来遺伝子」という用語は、実験的操作により動物のゲノムに導入され、および導入された遺伝子が天然の遺伝子の場合と同じ位置に存在しない限りは、その動物内において見いだされた遺伝子配列を含み得るような任意の核酸（たとえば、遺伝子配列）を指す。

【0090】

本明細書に使用される「ベクター」という用語は、DNAセグメントをある細胞から別の細胞へと転移させる核酸分子を指す。時に「媒体」という用語は、「ベクター」と交換可能に使用されることがある。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、または植物もしくは動物ウイルスに由来することが多い。

40

【0091】

本明細書に使用される「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列および特定の宿主生物における機能的に連結されたコード配列の発現に必要な適切な核酸配列を含む組換えDNA分子を指す。原核生物における発現に必要な核酸配列は、通常、プロモーター、オペレーター（任意）、およびリボソーム結合部位を、しばしば他の配列と共に含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、並びに終結シグナルおよびポリアダニル化シグ

50

ナルを含むことが公知である。

【0092】

「過剰発現」および「過剰発現している」という用語、並びに文法的な同等物は、対照または非トランスジェニック動物の所与の組織において観察されるよりも、およそ3倍高い（または大きい）発現レベルを示す、mRNAのレベルについて使用される。mRNAレベルは、ノーザンブロット分析を含むが、これに限定されるわけではない、当業者に公知の多くの技術のいずれかを使用して測定される。分析される各組織から負荷されるRNA量の差異を制御するために、適当な対照をノーザンブロットに含められる（たとえば、各試料に存在し、全ての組織において本質的に同量存在する豊富なRNA転写産物である28S rRNAの量を、ノーザンブロットにおいて観察されるmRNA特異的シグナルの正規化または標準化の手段として使用することができる）。サイズが、正確にスプライシングされた導入遺伝子RNAに相当するバンド内に存在するmRNAの量が定量され；導入遺伝子プローブにハイブリダイズしているその他の少量のRNA種は、導入遺伝子のmRNAの発現の量とはみなされない。

10

【0093】

本明細書に使用される「トランスフェクション」という用語は、外来DNAの真核細胞への導入を指す。トランスフェクションは、リン酸カルシウム-DNA共沈、DEAE-デキストラ媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、電気穿孔、微量注入、リポソーム融合、リポフェクション、プロトプラスト融合、レトロウイルス感染、および遺伝子銃を含む、当技術分野において公知の様々な手段により実現することができる。

20

【0094】

「リン酸カルシウム共沈」という用語は、核酸を細胞へ導入する技術を指す。細胞による核酸の取込みは、核酸がリン酸カルシウム-核酸共沈物として存在する場合に増強される。Graham and van der Ebの当初の技術（Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456[1973]）は、特定の細胞型について条件が最適となるように、いくつかのグループにより改変されている。当業者であれば、これらの多くの改変を熟知しているであろう。

【0095】

「安定したトランスフェクション」または「安定してトランスフェクションされる」という用語は、外来DNAのトランスフェクションされた細胞のゲノムへの導入および組み込みを指す。「安定したトランスフェクタント」という用語は、外来DNAがゲノムDNAへ安定して組み込まれた細胞を指す。

30

【0096】

「一過性トランスフェクション」または「一過性にトランスフェクションされた」という用語は、外来DNAがトランスフェクションされた細胞のゲノムに組み込まれずに、細胞に外来DNAを導入することを指す。外来DNAは、数日間トランスフェクションされた細胞の核に留まる。この間に、外来DNAは、染色体内の内因性遺伝子の発現を支配する調節制御に供される。「一過性トランスフェクタント」という用語は、外来DNAを取り込んでいるが、このDNAを組み込むことができなかつた細胞を意味する。

【0097】

本明細書に使用される「選択マーカー」という用語は、その他の場合は必須栄養素であるものを欠いた培地において生育する能力を付与する酵素活性をコードする遺伝子（たとえば、酵母細胞におけるHIS3遺伝子）の使用を指し；加えて、選択マーカーは、その選択マーカーを発現している細胞に、抗生物質または薬物に対する抵抗性を付与し得る。選択マーカーは、「優性」であることができ；優性選択マーカーは、いずれの真核細胞株においても検出することができる酵素活性をコードしている。優性選択マーカーの例は、哺乳動物細胞において薬物G418に対する抵抗性を付与する細菌のアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ遺伝子（neo遺伝子とも称される）、抗生物質ヒグロマイシンに対する抵抗性を付与する細菌のヒグロマイシンGホスホトランスフェラーゼ（hyg）遺伝子、およびニコフェノール酸の存在下で生育する能力を付与する細菌のキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（gpt遺伝子とも称される）を含む。その他の選択

40

50

マーカーは、それらの使用に関連した酵素活性を欠いている細胞株と組み合わせなければならない点で優性ではない。非ドミナント選択マーカーの例は、tk⁻細胞株と組み合わせ使用されるチミジンリン酸化酵素 (tk) 遺伝子、CAD欠損細胞と組み合わせ使用されるCAD遺伝子、およびhprt⁻細胞株と組み合わせ使用される哺乳動物ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hprt) 遺伝子を含む。哺乳動物細胞株における選択マーカーの使用に関する総説は、Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) pp. 16.9-16.15に提供されている。

【0098】

本明細書に使用される「細胞培養」という用語は、細胞のインビトロ培養を指す。本用語に含まれるのは、連続継代細胞株（たとえば、不死化表現型を有する）、初代細胞培養物、形質転換細胞株、有限細胞株（たとえば、非形質転換細胞）、およびインビトロにおいて維持された任意の他の細胞集団である。

10

【0099】

使用される「真核生物」という用語は、「原核生物」から区別することができる生物を指す。本用語は、その中に染色体があるような、核膜で境界が示された真の核の存在、膜に結合した細胞小器官の存在、および通常真核生物において観察される他の特徴などの、真核生物の通常の特徴を示す細胞を有する全ての生物を包含することが企図される。したがって、本用語は、真菌、原生動物、および動物（たとえば、ヒト）などの生物を含むが、これらに限定されるわけではない。

20

【0100】

本明細書に使用される「インビトロ」という用語は、人工的環境、および人工的環境内で生じる過程または反応を指す。インビトロ環境は、試験管および細胞培養物からなるが、これらに限定されるわけではない。「インビボ」という用語は、天然の環境（たとえば、動物または細胞）、および天然の環境内で生じる過程または反応を指す。

【0101】

「試験化合物」および「候補化合物」という用語は、疾患、疾病、病気もしくは体の機能障害（たとえば、癌）の治療または予防に使用するための候補である化学的実体、製剤、薬物などを指す。試験化合物は、公知のおよび可能性のある治療的化合物の両方を含む。試験化合物は、本発明のスクリーニング法を使用するスクリーニングにより、治療的であることを決定することができる。本発明のいくつかの態様において、試験化合物は、アンチセンス化合物を含む。

30

【0102】

本明細書に使用される「試料」という用語は、その最も広範な意味で使用される。一つの意味において、これは、任意の供与源から得られた標本または培養物、並びに生物学のおよび環境的試料を含むことを意味する。生物学的試料は、動物（ヒトを含む）から得ることができ、液体、固形物、組織、および気体を包含する。生物学的試料は、血漿、血清などの血液産物を含む。環境的試料は、地表物質、土壌、水、結晶、および工業用試料などの環境材料を含む。しかし、このような例は、本発明に適用可能な試料の種類を限定するものとして解釈されない。

40

【0103】

発明の詳細な説明

本発明は、疾患診断法のための組成物および方法に関する。具体的には、本発明は、癌（たとえば、前立腺癌、肺癌、または乳癌）のファージ・マイクロアレイ・プロファイリングの方法および組成物を提供する。本発明は、疾患（たとえば、癌）の診断、特徴付け、および治療のために有用な新規のマーカーをさらに提供する。下記の記述では、癌診断および治療の状況における本発明を例証する。しかし、本発明は、癌の診断および治療における使用に限定されるわけではない。本発明の方法および組成物は、炎症性疾患、自己免疫疾患、癌、心臓血管疾患、および糖尿病を含むが、これらに限定されるわけではない種々の疾患の診断および治療における使用が見いだされる。

50

【0104】

癌は、最も早期において同定されたときに、治癒の確率が非常に高く、したがって、これらの早期を検出することができる診断的スクリーニング試験は、重要である。免疫系において体液性エフェクターによって認識される腫瘍関連抗原は、ヒト癌に対する診断的および治療的アプローチのための魅力的な標的である。癌のための早期発見アッセイの開発に向けられる試みは、伝統的に単一の生物マーカー分子に依存してきた。現在の技術は、期待外れであり、かつ臨床診療のための適切な診断試験をもたらさなかった。

【0105】

組換え発現クローニングによる抗原の血清学的同定 (SEREX) は、自己患者の血清と共にヒト固形腫瘍からの発現cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、数タイプの抗原を同定するために近年まで使用されてきた。しかし、従来法によるこのタイプのcDNA発現ライブラリーのスクリーニングでは、バクテリオファージ・ブランクをプロットした多数の膜フィルタを調製し、次いで特異的プローブで検索することが必要である。SEREX実験の場合、スクリーニングは、通常は非常に限られた量しか利用できない癌患者からの大量の血清を使用して行われる。第二の制限は、このような免疫スクリーニング法では、異なる患者に由来する血清によって認識される抗原を選択することができないことである。加えて、フィルタ・スクリーニング法のため、SEREXでは、高スループットスクリーニングが不可能であり、したがって、癌患者のサブセットからの血清によって認識することができる抗原の選択のために反復実験を行うことが困難となる。さらに、SEREXは、親和性選択工程 (バイオパニング) を伴わない工程スクリーニング技術に依存している。

【0106】

本発明の方法および組成物は、これらの制限の多くを克服する。いくつかの態様において、本発明は、これらの制限を克服し、たとえばT7ファージディスプレイcDNAライブラリーを使用して非常に少ない容積でcDNAライブラリーの親和性選択を行うことによってスクリーニング法を単純化するために有効なスクリーニング試験を提供する。ファージ-エピトープマイクロアレイのプラットフォームでは、わずかにマイクロリットルの血清を使用して1つのマイクロアレイで2300を超えるファージ・クローンを検出することができる。異なる患者の試料を使用する高度に平行したアッセイでは、エピトミックプロファイルに基づいて癌を分子分類することができるタンパク質マイクロアレイ技術を使用して容易に比較される (遺伝子発現に基づいた分子プロファイルに類似)。いくつかの態様において、本発明の方法は、診断ストラテジーとして免疫学的応答のパターンの認識を利用する。本発明は、使用するペプチド・ディスプレイ系の性質によって限定されるわけではない。

【0107】

ファージ-ディスプレイ技術は、典型的には、外来ヌクレオチド配列をT7ファージの種々のカプシドタンパク質をコードする遺伝子に挿入して、それぞれが対応する挿入物によってコードされる異なるペプチド配列を提示するファージの不均一混合物を生じることに基づいている。提示された融合タンパク質とそれをコードするDNAとの間の物理的結合により、このファージ標的が選択可能になる。いくつかの態様において、本発明の方法は、患者の腫瘍に発現されるタンパク質に反応して患者によって産生される抗体を検出する。これらのマーカーは、診断生物マーカーおよび治療標的としての使用が見いだされる。いくつかの態様において、本発明の方法は、診断として任意の単一のマーカーではなく複数のマーカーのパターン認識を利用する。本アプローチの特色は、任意の特定の種類の癌の不均一な性質を確認すること、および結果を解釈するために特化された生物情報学技術を使用することを含む。

【0108】

本発明の開発過程の間に行われた実験では、タンパク質マイクロアレイでの高度に平行したファージディスプレイ・アッセイを使用して多数のエピトープとの血清反応を検出した。一旦、選択されたエピトープ・マーカーを最終版のアレイにスポットすれば、癌患者と対照とに由来する血清が試験される。いくつかの態様において、血清の種々の被験体との反応の結果は、予測子を構築するため、さらに未知試料を試験するための機械学習装置

を訓練するために使用される。

【0109】

本発明の方法および組成物は、既存の方法を超えるいくつかの利点を提供する。たとえば、いくつかの態様において、本発明は、蛍光プローブおよびレーザスキャナを利用して、高感度を生じ、非常にわずかなシグナル相違を検出する。加えて、本発明の方法は、cDNAまたはオリゴアレイと比較して、cDNAではなくタンパク質発現レベルで検出することができる。好ましい態様において、本発明の方法は、視覚評価ではなく解析アプローチを利用し、これにより優れた一貫性および再現性がもたらされる。さらに、本技術は高感度であるため、少量（たとえば、わずか1~2 μ l）の血清試料が使用できる。本発明の方法は、迅速であり、タンパク質-タンパク質相互作用の解析が可能である。

10

【0110】

I. 癌のためのマーカー

いくつかの態様において、本発明は、その発現が、癌性前立腺組織において特異的に変化するマーカーを提供する。このようなマーカーは、癌（たとえば、前立腺癌、肺癌、または乳癌）の診断および特徴付けにおける使用が見いだされる。

【0111】

A. マーカーの同定

いくつかの態様において、本発明のファージ発現プロファイリング法（たとえば、詳細な説明について実験の節を参照されたい）は、癌マーカーまたは腫瘍抗原を同定するために使用される。例示的な前立腺腫瘍抗原は、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、および仮想的タンパク質XP_373908を含むが、これらに限定されるわけではない。例示的な乳癌腫瘍抗原は、ユビキリン1、核小体タンパク質3（NOL3）、-2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70）を含むが、これらに限定されるわけではない。

20

【0112】

B. 癌マーカーの検出

いくつかの態様において、本発明は、癌マーカー（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3（NOL3）、-2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70））の発現の検出のための方法を提供する。好ましい態様において、発現は（たとえば、RNAまたはタンパク質レベルで）、直接測定される。いくつかの態様において、発現は、組織試料（たとえば、生検組織）において検出される。その他の態様において、発現は、体液（たとえば、血漿、血清、全血、鼻水、および尿を含むが、これらに限定されるわけではない）において検出される。本発明は、マーカーの検出のためのパネルおよびキットをさらに提供する。好ましい態様において、癌マーカーの存在は、被験体に関する予後を提供するために使用される。また、提供された情報は、治療過程を指示するためにも使用される。たとえば、被験体が高度に転移性の腫瘍を示すマーカーを有することが見いだされた場合、さらなる療法（たとえば、ホルモン療法または放射線療法）を、これらがより有効である可能性が高い早期の時点に（たとえば、転移の前に）開始することができる。加えて、被験体がホルモン療法に反応しない腫瘍を有することが見いだされた場合、このような療法の費用および不都合を回避することができる。

30

40

【0113】

いくつかの態様において、本発明は、複数のマーカーの解析のためのパネルを提供する。パネルにより、発癌および/または転移に関連している複数のマーカーを同時に解析することができる。たとえば、パネルには、癌組織、転移癌、転移する可能性が高い限局性癌、癌性になる可能性が高いプレ癌組織、および癌性になる可能性が低いプレ癌組織に関連することが同定されたマーカーを含んでいてもよい。被験体に応じて、最適な診断および予後を提供するために、パネルを単独で、または共に解析してもよい。パネルに包含するためのマーカーは、下記の例示的実施例に記載したものを含むが、これらに限定されるわけではない任意の適切な方法を使用して、これらの予測値をスクリーニングすることによって選択される。

50

【0114】

その他の態様において、本発明は、種々の病期または予後（たとえば、将来の転移の可能性）の癌のタンパク質アレイプロファイルを含むファージ・アレイ・プロファイル・マップを提供する。このようなマップは、患者試料と比較するために使用することができる。デジタル化されたデータのコンピュータ比較によるものを含むが、これに限定されるわけではない、任意の適切な方法を利用してよい。比較データは、患者に診断および/または予後を提供するために使用される。

【0115】

i) RNAの検出

いくつかの好ましい態様において、前立腺癌マーカー（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン 1、核小体タンパク質3（NOL3）、 α -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70）を含むが、これらに限定されるわけではない）の検出は、組織試料（たとえば、前立腺組織、乳房組織、または肺組織）における対応するmRNAの発現を測定することによって検出される。mRNA発現は、任意の適切な方法によって測定してもよい。

【0116】

ii) タンパク質の検出

その他の態様において、癌マーカーの発現は、対応するタンパク質またはポリペプチドに対応する遺伝子の発現を測定することによって検出される。タンパク質発現は、任意の適切な方法によって検出してもよい。その他の態様において、タンパク質は、タンパク質に対して生じる抗体に対するこれらの結合によって検出される。抗体の産生は、下に記述される。

【0117】

抗体結合は、当技術分野において公知の技術によって検出される（たとえば、放射免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル内拡散沈降素反応法、免疫拡散法アッセイ、インサイチュー免疫アッセイ（たとえば、金コロイド、酵素、または放射性同位元素標識などを使用する）、ウエスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（たとえば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイ、その他）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動法アッセイ、その他。

【0118】

一つの態様において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。もう一つの態様において、一次抗体は、一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる態様において、二次抗体が標識されている。免疫アッセイにおいて結合を検出するために、多くの方法が当技術分野において公知であり、本発明の範囲内である。

【0119】

いくつかの態様において、自動化された検出アッセイが利用される。免疫アッセイの自動化法は、米国特許第5,885,530号、第4,981,785号、第6,159,750号、および第5,358,691号に開示されたものを含み、これらのそれぞれが、参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、結果の解析および表示も自動化される。たとえば、いくつかの態様において、癌マーカーに対応する一連のタンパク質の有無を基に予後判定するソフトウェアが利用される。

【0120】

その他の態様において、免疫アッセイは、米国特許第5,599,677号および第5,672,480号に記述され、これらのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる。

【0121】

iii) データ解析

いくつかの態様において、コンピュータベースの解析プログラムを使用して、検出アッセイにより作成された生データ（たとえば、所与のマーカーの存在、非存在、または量）

10

20

30

40

50

が、臨床医のために推定値データに変換される。臨床医は、任意の適した手段を使用してこの推定値にアクセスすることができる。したがって、いくつかの好ましい態様において、本発明は、遺伝子または分子生物学に経験を積んでいない臨床医が、生データを理解する必要がないというさらなる利益を提供する。本データは、その最も有益な形態で臨床医に直接提示される。次いで、臨床医は、被験体の治療法を最適化するために、この情報を直ちに利用することができる。

【0122】

本発明は、アッセイを行う実験室、情報提供者、医療従事者、および被験体に、並びにそれらから、情報を受取り、処理し、および伝達することが可能である任意の方法を企図する。たとえば、本発明のいくつかの態様において、試料（たとえば、生検標本または血清もしくは尿試料）は、被験体から入手され、世界の任意の地域（たとえば、被験体の居住国または情報が最終的に利用される国とは異なる国）に位置するプロファイリングサービス（たとえば、医療施設の臨床検査室、ゲノムプロファイリング業者など）へ提出され、生データが作成される。試料が組織または他の生物学的試料を含む場合、被験体が医療センターを訪れ、試料が採取されてプロファイリングセンターに送付されるか、または被験体が試料（たとえば、尿試料）を自身で採取して、直接プロファイリングセンターに送付することができる。試料が以前に決定された生物学的情報を含む場合、情報を被験体がプロファイリングサービスに直接送付することができる（たとえば、情報を含む情報カードをコンピュータにより走査して、データをプロファイリングセンターのコンピュータへ、電子通信システムを使用して伝送してもよい）。一旦プロファイリングサービスが受け取れば、試料が処理されて、被験体にとって望ましい診断または予後の情報に特異的なプロファイルが作成される（すなわち、発現データ）。

10

20

【0123】

次いで、プロファイルデータは、治療担当医による解釈に適したフォーマットに加工される。たとえば、生の発現データが提供されるのではなく、加工されたフォーマットにより、被験体の診断またはリスク評価（たとえば、転移またはPSA不全の可能性）を、具体的な治療選択肢の推奨と共に示すことができる。データは、適切な方法により臨床医に示すこともできる。たとえば、いくつかの態様において、プロファイリングサービスは、臨床医が印刷することができる報告書を作成するか（たとえば、治療の場で）、または臨床医に対してコンピュータモニター上に表示することができる。

30

【0124】

いくつかの態様において、情報は、最初に治療の場で、または地域の施設で解析される。次いで、生データがさらなる解析のために中央処理施設へ送付され、および/または生データが臨床医または患者にとって有用な情報に変換される。中央処理施設は、プライバシー（全てのデータは、一様なセキュリティープロトコール下で中央施設に保存される）、スピード、およびデータ解析の一様性という利点も提供する。次いで、中央処理施設は、被験体の治療後のデータの運命も管理することができる。たとえば、電子通信システムを使用することにより、中央施設は、データを臨床医、被験体、または研究者に提供することができる。

40

【0125】

いくつかの態様において、被験体は、電子通信システムを使用してデータに直接アクセスすることができる。被験体は、結果に基づいて、さらなる介入またはカウンセリングを選択してもよい。いくつかの態様において、データは、研究用途のために使用される。たとえば、データは、特定の状態または疾患の病期の有用な指標として、マーカーの含ままたは除外をさらに最適化するために使用することができる。

【0126】

C. 腫瘍抗原の検出

上述の通り、癌細胞に発現される特異的タンパク質に対する免疫応答の存在は、癌の存在を指し示す。したがって、いくつかの態様において、本発明は、本発明の方法を使用して同定される腫瘍抗原（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパ

50

ク質XP_373908、ユビキリン 1、核小体タンパク質3 (NOL3)、 -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8 (HSPA70))の存在を検出する方法(たとえば、診断法)を提供する。いくつかの態様において(たとえば、腫瘍抗原が、非癌性細胞ではなく、癌性細胞に発現される場合)、腫瘍抗原タンパク質は、直接検出される。その他の態様において(たとえば、癌性細胞における自己抗体の存在は癌の存在を指し示すが、癌性でない細胞は示さない場合)、腫瘍抗原に対する自己抗体が検出される。好ましい態様において、腫瘍抗原は、癌性であることが疑われる腫瘍または細胞において直接検出される。

【0127】

本発明の診断法は、癌の診断および特徴付けにおける有用性が見いだされる。たとえば、特異的タンパク質に対する自己抗体の存在が、癌を指し示し得る。加えて、特定の自己抗体は、同じ癌の特異的な病期またはサブタイプを指し示し得る。

10

【0128】

得られた情報は、予後および適切な治療過程を決定するために使用される。たとえば、特異的自己抗体または癌の病期を有する個体は、所与の治療に対して抗体のない個体とは異なった反応をし得ることが企図される。したがって、本発明の診断法から得られる情報は、診断および治療の個人化を提供する。

【0129】

i) 抗原の検出

いくつかの態様において、抗体は、個体に由来する生体試料における腫瘍抗原を検出するために使用される。生物学的試料は、細胞を含む血液、血清、血漿、間質液、尿、脳脊髄液などのような体液であるが、これらに限定されるわけではない。好ましい態様において、生体試料は、癌性であることが疑われる細胞(たとえば、生検から得られた細胞)を含む。

20

【0130】

次いで、適切なストラテジー(たとえば、ELISAまたは放射免疫アッセイ)および形式(たとえば、マイクロウェル、尿試験紙(たとえば、国際特許公報W093/03367に記載されているとおり)など)を使用して、腫瘍抗原の存在について生体試料を直接試験することができる。または、試料中のタンパク質をサイズ分離することができる(たとえば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在下または非存在下におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)および免疫プロット法(たとえば、ウエスタンプロット法)によって検出される腫瘍抗原の存在による)。免疫プロット法技術は、一般に、タンパク質のエピトープに対応するペプチドに対して産生された抗体を用いるとより効果的であり、それゆえ、本発明に特に適している。

30

【0131】

抗体結合は、当技術分野において公知の技術によって検出される(たとえば、放射免疫アッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル内拡散沈降反応、免疫拡散法アッセイ、インサイチュー免疫アッセイ(たとえば、金コロイド、酵素、または放射性同位元素標識などを使用する)、ウエスタンプロット、沈降反応、凝集アッセイ(たとえば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイ、その他)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動法アッセイ、その他)。

40

【0132】

一つの態様において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。もう一つの態様において、一次抗体は、一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる態様において、二次抗体が標識されている。免疫アッセイにおいて結合を検出するために、多くの方法が当技術分野において公知であり、本発明の範囲内である。当技術分野において周知のように、免疫原性のペプチドは、任意の免疫化プロトコルに使用される担体分子を伴わずに提供されるはずである。たとえば、ペプチドがKLHに結合された場合、これは、スクリーニングアッセイにおいて、BSAに結合されていてもよく、または直接使用してもよい。))

50

【0133】

いくつかの態様において、自動化された検出アッセイが利用される。免疫アッセイの自動化法は、当技術分野において周知である（米国特許第5,885,530号、第4,981,785号、第6,159,750号、および第5,358,691号を参照されたい、これらのそれぞれが、参照により本明細書に組み入れられる）。いくつかの態様において、結果の解析および表示も自動化される。たとえば、いくつかの態様において、一連の抗原の有無を基に予後を作成するソフトウェアが利用される。

【0134】

ii) 自己抗体の検出

いくつかの態様において、腫瘍抗原に対する自己抗体の存在が検出される。腫瘍を診断し、分類するためのこのアプローチは、正常細胞に存在するが、免疫原でなく、かつ腫瘍細胞において免疫原である腫瘍抗原に特に適する。たとえば、いくつかの態様において、抗体（たとえば、モノクローナルまたはポリクローナル）は、本発明の開発の間に同定された自己抗体に対して産生される。次いで、このような抗体を使用して、上記したものを含むが、これらに限定されない任意の適切な技術を使用して、自己抗体の存在を検出する。

10

【0135】

その他の態様において、腫瘍タンパク質は、固体表面に付着される。自己抗体の存在は、固体表面（たとえば、マイクロアレイ）を被験体由来の血清と接触させて、腫瘍マーカーに対する結合を検出することによって同定される。このようなアッセイを行うための1

20

【0136】

iii) その他の検出法

本発明は、上に記述した検出方法に限定されるわけではない。癌細胞の特異的検出が可能な任意の適切な検出方法を利用してもよい。たとえば、いくつかの態様において、腫瘍抗原遺伝子に対応するRNAの発現が、アンチセンス・オリゴヌクレオチド（たとえば、下に記述したもの）に対するハイブリダイゼーションによって検出される。その他の態様において、RNA発現は、たとえば、ノーザンプロット、RNaseアッセイ、逆転写酵素PCR増幅等のようなハイブリダイゼーションアッセイによって検出される。

30

【0137】

本発明のさらなる態様において、被験体のゲノム内の特定の配列の存在が検出される。このような配列は、腫瘍抗原の異常な発現（たとえば、過剰発現または生理学的に不適当な時期における発現）と関連する腫瘍抗原配列を含む。これらの配列は、転写された配列（たとえば、腫瘍抗原のプロセッシングおよび/または翻訳に効果を及ぼす）およびプロモーター、エンハンサー、リプレッサーなどの調節配列における多型を含む、多型を含む。また、これらの配列は、転写因子などの発現に影響を及ぼす因子に関連した遺伝子または制御配列に多型を含んでいてもよい。これらの配列を検出し、および/または同定するための任意の適切な方法が本発明の範囲内であり、核酸シーケンシング、ハイブリダイゼーションアッセイ（たとえば、サザンプロット法）、一塩基多型アッセイ（たとえば、その全体が、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,994,069号を参照されたい）等を含むが、これらに限定されるわけではない。

40

【0138】

腫瘍抗原発現の直接および/または間接的な測定が、本発明の範囲内のマーカーとして使用され得る。本発明は、腫瘍抗原発現と癌との間の関連を提供するので、腫瘍発現の任意の指標を使用してもよい。たとえば、腫瘍抗原シグナリングもしくは調節に關与する因子の発現、活性化、または抑圧は、これらが腫瘍抗原発現および/または癌に確実に相關される限り、発現の代用測定として使用してもよい。

【0139】

D. 分子フィンガープリント

いくつかの態様において、本発明は、癌マーカーまたは腫瘍抗原の「分子フィンガーブ

50

リント」または「発現プロファイル・マップ」を提供する。このような分子フィンガープリントおよび発現プロファイルは、特定の癌または癌サブタイプにおける自己抗体または癌マーカーの存在のプロファイルを提供する。プロファイルは、癌診断および予後を提供する際に使用が見いだされる。このような予後は、治療方針を決定するために使用することができる。たとえば、いくつかの態様において、特定の癌サブタイプのプロファイルは、特定の療法の選択に応答する癌を指し示す。その他の態様において、プロファイルは、特定の癌サブタイプの侵襲性を指し示し、推進する治療の強度を決定するために使用される。

【0140】

E. 予後適用

いくつかの態様において、本発明の方法および組成物を使用して同定される癌マーカーは、癌予後（たとえば、癌転移、再発、または癌による死亡の確率）を提供する際に使用が見いだされる。本発明の開発過程の間に行った実験において（たとえば、実施例3および4を参照されたい）、発現プロファイルと癌予後との間の相関が観察された。たとえば、3要素モチーフ含有(tripartite motif-containing)7 アイソフォーム4、シトクロムc酸化酵素サブユニットI、核小体タンパク質3（CARDドメインをもつアポトーシス・リプレッサー）、仮想的タンパク質AM638、推定上のp150、MUP1、CG9996-PAに類似、仮想的タンパク質Magn028940、COG0568：DNA依存性RNAポリメラーゼ、サブユニット、IgG 軽鎖可変領域の発現と肺癌予後との間の相関が観察された（実施例3を参照されたい）。

【0141】

F. キット

さらにその他の態様において、本発明は、癌（たとえば、前立腺癌、乳癌、または肺癌）の発見および特徴付けのためのキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、検出試薬および緩衝液に加えて、癌マーカーまたは腫瘍抗原に特異的な抗体を含む。その他の態様において、キットは、mRNAまたはcDNAの検出のために特異的な試薬（たとえば、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー）を含む。好ましい態様において、キットは、全ての対照、アッセイ実施に関する指示、並びに結果の分析および表示に必要なソフトウェアを含む、検出アッセイを行うのに必要な構成要素の全てを含む。

【0142】

G. インビボでの造影

いくつかの態様において、動物（たとえば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物）における癌マーカーまたは腫瘍抗原の発現を可視化するために、インビボ造影法が使用される。たとえば、いくつかの態様において、癌マーカー-mRNAまたはタンパク質は、癌マーカーに特異的な標識された抗体を使用して標識化される。特異的に結合しかつ標識された抗体は、放射性核種造影、陽電子射出断層撮影、コンピュータ断層撮影、X線または磁気共鳴造影法、蛍光検出、および化学発光検出を含むが、これらに限定されるわけではない、インビボ造影法を使用して個体において検出することができる。本発明の癌マーカーに対する抗体産生法は、以下に記述される。

【0143】

本発明のインビボ造影法は、本発明の癌マーカーまたは腫瘍抗原を発現する癌（たとえば、前立腺癌）の診断に有用である。インビボ造影法は、癌のマーカー指標の存在を可視化するために使用される。このような技術により、不愉快な生検を使用することなく診断することができる。また、本発明のインビボ造影法は、癌患者に予後を提供するためにも有用である。たとえば、転移する可能性のある癌のマーカー指標の存在を検出することができる。本発明のインビボ造影法は、さらに体の他の部分において転移性癌を検出するために使用することができる。

【0144】

いくつかの態様において、本発明の癌マーカーまたは腫瘍抗原に特異的な試薬（たとえば、抗体）は、蛍光標識される。標識された抗体は、被験体に（たとえば、経口または非経口的に）導入される。蛍光標識された抗体は、任意の適した方法を使用して検出される

10

20

30

40

50

(たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,198,107号に開示された器具を使用して)。

【0145】

その他の態様において、抗体は、放射性標識される。インビボ診断のための抗体の使用は、当技術分野において周知である。Sumerdon et al., (Nucl. Med. Biol 17: 247-254 [1990]) は、標識としてインジウム-111を使用する腫瘍の放射免疫シンチグラフィ造影のために最適化された抗体-キレーターを記述している。Griffin et al., (J Clin Onc, 9: 631-640 [1991]) は、再発性結腸直腸癌を有することが疑われる患者において腫瘍を検出する際のこの薬剤の使用を記述している。磁気共鳴造影のための標識として常磁性イオンを伴う同様の薬剤の使用が、当技術分野において公知である (Lauffer, Magnetic Resonance in Medicine, 22: 339-342 [1991])。使用される標識は、選択された造影様式に依存する。インジウム-111、テクネチウム-99m、またはヨウ素-131などの放射性標識は、平面走査または単一光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) のために使用することができる。フッ素-19などの陽電子放射標識も、陽電子放出断層撮影 (PET) に使用することができる。MRIのためには、ガドリニウム (III) またはマンガン (II) などの常磁性イオンを使用することができる。

10

【0146】

スカンジウム-47 (3.5日)、ガリウム-67 (2.8日)、ガリウム-68 (68分)、テクネチウム-99m (6時間)、およびインジウム-111 (3.2日) などの、半減期が1時間~3.5日の範囲の放射性金属を抗体に対する結合に利用可能であり、これらのうちガリウム-67、テクネチウム-99m、およびインジウム-111は、線カメラ造影に好ましく、ガリウム-68は、陽電子放出断層撮影に好ましい。

20

【0147】

このような放射性金属による抗体標識の有用な方法は、たとえば、In-111およびTc-99mのためのKhaw et al., (Science 209: 295 [1980])、並びにScheinberg et al., (Science 215: 1511 [1982]) により記述されたように、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) などの二官能性キレート剤による。その他のキレート剤を使用することもできるが、1-(p-カルボキシメトキシベンジル)EDTAおよびDTPAのカルボキシ炭酸無水物は、抗体の免疫活性に実質的に影響を及ぼすことなく結合することができるので、これらの使用が有利である。

30

【0148】

DTPAのタンパク質への結合の別の方法は、Hnatowich et al., (Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33: 327 [1982]) に記述されたようなアルブミンのIn-111による標識のための環式無水DTPAの使用によるが、これは抗体標識に適合することができる。DTPAを用いるキレート化を使用しない、Tc-99mによる抗体の標識に適した方法は、Crockford et al., (米国特許第4,323,546号、参照により本明細書に組み入れられる) のプレティニング (pretinning) 法である。

【0149】

免疫グロブリンのTc-99mによる標識の好ましい方法は、血漿タンパク質に関して、Wong et al., (Int. J. Appl. Radiat. Isot., 29: 251 [1978]) により記述されており、最近、Wong et al., (J. Nucl. Med., 23: 229 [1981]) により抗体の標識のために成功裏に適用されている。

40

【0150】

特異的抗体に結合した放射性金属の場合、おそらくその免疫特異性を破壊することなく抗体分子へ可能な限り高い割合で放射性標識物を導入することが、同様に望ましい。さらなる改善は、抗体上の抗原結合部位が保護されていることを確実にするために、本発明の特異的癌マーカーの存在下で放射標識に作用することにより実現することができる。抗原は、標識後に分離される。

【0151】

なおさらなる態様において、インビボ生物光学的造影 (Xenogen, Alameda, CA) が、イ

50

ンビボ造影に利用される。このリアルタイムインビボ造影は、ルシフェラーゼを使用する。ルシフェラーゼ遺伝子は、細胞、微生物、および動物へ組み込まれる（たとえば、本発明の癌マーカーとの融合タンパク質として）。活性である場合、これは、光放射反応に至る。CCDカメラおよびソフトウェアを使用して画像を取り込み、これを分析する。

【0152】

11. 抗体

本発明は、単離された抗体を提供する。好ましい態様において、本発明は、本明細書に記述された癌マーカー（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3（NOL3）、 α -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70））の少なくとも5個のアミノ酸残基で構成された単離されたポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。これらの抗体は、本明細書において記述された診断法における使用が見いだされる。

10

【0153】

本発明のタンパク質に対する抗体は、タンパク質として認識することができる限り、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であることができる。抗体は、通常の抗体または抗血清調製法に従い抗原として本発明のタンパク質を使用することにより産生することができる。

【0154】

本発明は、モノクローナルおよびポリクローナルの両抗体の使用を企図する。本明細書に開示されるものを含むが、これらに限定されるわけではない任意の適した方法を使用して、本発明の方法および組成物に使用される抗体を作製することができる。たとえば、モノクローナル抗体の調製のために、タンパク質それ自体、または適した担体もしくは希釈剤と共に、抗体産生が可能な条件下で動物（たとえば、哺乳動物）に投与される。抗体産生能を増強するために、完全または不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。通常、タンパク質は、2週間から6週間毎に、合計約2回から約10回投与される。このような方法に使用するために適した動物は、霊長類、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含むが、これらに限定されるわけではない。

20

【0155】

モノクローナル抗体産生細胞を調製するために、抗体力価が確認された個体動物（たとえば、マウス）を選択し、最終免疫化後2日～5日に、その脾臓またはリンパ節を摘出し、その中に含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させ、所望のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製する。たとえば、下に記述したような標識されたタンパク質と抗血清の反応、次いで抗体に結合した標識物質の活性の測定により、抗血清中の抗体力価の測定を行うことができる。細胞融合は、たとえば、Koehler and Milstein (Nature 256: 495 [1975]) により記述された方法などの公知の方法に従って行うことができる。融合促進因子として、たとえば、ポリエチレングリコール（PEG）またはセンダイウイルス（HVJ）、好ましくはPEGが使用される。

30

【0156】

骨髄腫細胞の例には、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが含まれる。使用される抗体産生細胞（脾細胞）数と骨髄腫細胞数の比は、好ましくは約1:1～約20:1である。PEG（好ましくはPEG1000-PEG6000）は、好ましくは約10%～約80%の濃度で添加される。細胞融合は、両細胞の混合物を、約20～約40、好ましくは約30～約37で、約1分間～10分間インキュベーションすることにより効率的に行うことができる。

40

【0157】

抗体を（たとえば、本発明の腫瘍抗原または自己抗体に対して）産生するハイブリドーマをスクリーニングするために、様々な方法を使用することができる。たとえば、ハイブリドーマの上清を、抗体が直接または担体と共に吸着された固相（たとえば、マイクロプレート）に添加し、次いで抗免疫グロブリン抗体（細胞融合にマウス細胞が使用される場合は、抗マウス免疫グロブリン抗体が使用される）または放射性物質もしくは酵素で標識されたプロテインAを添加して、固相に結合したタンパク質に対するモノクローナル抗体

50

を検出することができる。または、ハイブリドーマの上清を、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAが吸着された固相に添加し、次いで放射性物質または酵素で標識されたタンパク質を添加して、固相に結合したタンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する。

【0158】

モノクローナル抗体の選択は、任意の公知の方法またはその変法に従って行うことができる。通常、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）が添加された動物細胞のための培地が使用される。任意の選択および増殖培地は、ハイブリドーマが増殖することができる限り、使用することができる。たとえば、1%~20%、好ましくは10%~20%ウシ胎仔血清を含有するRPMI 1640培地、1%~10%ウシ胎仔血清を含有するGIT培地、ハイブリドーマ培養のための血清非含有培地（SFM-101, Nissui Seiyaku）などを使用することができる。通常、培養は、20~40℃、好ましくは37℃で、約5日間~3週間、好ましくは1週間~2週間、約5%のCO₂気体下で行われる。ハイブリドーマ培養物の上清の抗体力価は、抗血清中の抗タンパク質の抗体力価に関して上記したのと同じ方法に従って測定することができる。

10

【0159】

モノクローナル抗体（たとえば、本発明の癌マーカーに対するもの）の分離および精製は、免疫グロブリンの分離および精製などの通常のポリクローナル抗体のものと同じ方法、たとえば塩析、アルコール沈殿、等電点沈殿、電気泳動、イオン交換体（たとえば、DEAE）との吸着および脱離、超遠心、ゲルろ過、または抗原結合性固相などの活性吸着体により抗体のみが収集される特異的精製法、プロテインAまたはプロテインG、並びに抗体を得るための結合の解離に従って行うことができる。

20

【0160】

ポリクローナル抗体を、患者から抗体を得ることを含む任意の公知の方法またはこれらの方法の変法により調製することができる。たとえば、免疫原（タンパク質に対する抗原）および担体タンパク質の複合体を調製し、上記モノクローナル抗体調製に関して記述したものと同様の様式に従って、動物を複合体により免疫する。抗抗体を含有する物質を免疫した動物から回収し、抗体を分離および精製する。

【0161】

動物の免疫に使用される免疫原および担体タンパク質の複合体と同様に、担体に対して架橋され、かつ免疫に使用されるハプテンに対する抗体が、効率的に産生される限り、あらゆる担体タンパク質、並びに担体およびハプテンの混合割合を使用することができる。たとえば、ウシ血清アルブミン、ウシシクログロブリン、キーホールリムベットヘモシアニンなどを、ハプテンに、ハプテン1につき約0.1~約20、好ましくは約1~約5の質量比で結合することができる。

30

【0162】

加えて、様々な縮合剤をハプテンおよび担体の結合に使用することができる。たとえば、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性化されたエステル、チオール基またはジチオピリジル基を含む活性化されたエステル試薬などは、本発明での使用が見いだされる。縮合物それ自体または適した担体もしくは希釈剤と共に、抗体産生が可能な動物の部位に投与する。抗体産生能を増強するために、完全または不完全フロイントアジュバントを投与することができる。通常、タンパク質は、2週~6週毎に1回、合計約3回~約10回投与される。

40

【0163】

ポリクローナル抗体は、上記方法で免疫化された動物の血液、腹水などから回収される。抗血清中の抗体力価は、ハイブリドーマ培養物の上清に関して上記したものと同様の様式に従って測定することができる。抗体の分離および精製は、上記モノクローナル抗体に関して記述したものと同様の免疫グロブリンの分離および精製法に従って行うことができる。

【0164】

50

免疫原として本明細書に使用されるタンパク質は、特定の型の免疫原に限定されない。たとえば、本発明の癌マーカー（さらに、部分的に変更されたヌクレオチド配列を有する遺伝子を含む）を免疫原として使用することができる。さらに、タンパク質の断片を使用することができる。断片は、遺伝子断片の発現、タンパク質の酵素処理、化学合成などを含むが、これらに限定されるわけではない任意の方法により得ることができる。

【0165】

III. 薬物スクリーニング

いくつかの態様において、本発明は、薬物スクリーニングアッセイ（たとえば、抗癌薬のスクリーニング）を提供する。本発明のスクリーニング法は、本発明の方法を使用して同定された癌マーカーおよび腫瘍抗原を利用する。たとえば、いくつかの態様において、本発明は、癌マーカーまたは腫瘍抗原遺伝子の発現を変更（たとえば、増加または減少）する化合物のスクリーニング法を提供する。いくつかの態様において、候補化合物は、癌マーカーに対するアンチセンス剤（たとえば、オリゴヌクレオチド）である。アンチセンス療法に関する考察は、下記を参照されたい。その他の態様において、候補化合物は、本発明の癌マーカーまたは腫瘍抗原に特異的に結合する抗体である。

10

【0166】

一つのスクリーニング法において、候補化合物は、化合物を、癌マーカーを発現している細胞と接触させ、次いで候補化合物の発現に対する効果をアッセイすることによって、これらが癌マーカー発現を変更する能力について評価される。いくつかの態様において、候補化合物の癌マーカー遺伝子の発現に対する効果は、細胞により発現された癌マーカーまたは腫瘍抗原mRNAのレベルを検出することによってアッセイされる。mRNA発現は、任意の適した方法によって検出することができる。その他の態様において、候補化合物の癌マーカーまたは腫瘍抗原遺伝子の発現に対する効果は、癌マーカーによりコードされたポリペプチドレベルを測定することによってアッセイされる。発現されたポリペプチドのレベルは、本明細書に説明されたものを含むが、これらに限定されるわけではない任意の適した方法を使用して測定することができる。

20

【0167】

具体的には、本発明は、本発明の癌マーカーまたは腫瘍抗原に結合し、たとえば癌マーカーもしくは腫瘍抗原発現もしくは活性に対する阻害（または刺激）効果を有し、またはたとえば、癌マーカーもしくは腫瘍抗原基質の発現もしくは活性に対して刺激または阻害効果を有するモジュレーター、すなわち候補または試験化合物または薬剤（たとえば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプチド、小分子、または他の薬物）を同定するためのスクリーニング法を提供する。こうして同定された化合物は、標的遺伝子産物の生物学的機能を生成するため、もしくは正常な標的遺伝子相互作用を破壊する化合物を同定するために、治療プロトコルにおいて直接的または間接的のいずれかで、標的遺伝子産物（たとえば、癌マーカーまたは腫瘍抗原遺伝子）の活性を調整するために使用することができる。癌マーカーもしくは腫瘍抗原の活性または発現を阻害する化合物は、増殖傷害、たとえば癌、特に転移性（たとえば、アンドロゲン非依存性）前立腺癌の治療に有用である。

30

【0168】

一つの態様において、本発明は、癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質もしくはポリペプチドまたはこれらの生物学的活性部分の基質である候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。もう一つの態様において、本発明は、癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質もしくはポリペプチドまたはこれらの生物学的活性部分に、結合するかまたは活性を調整する候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

40

【0169】

本発明の試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー（ペプチドの機能性を有するが、新規の非ペプチドバックボーンをもつ分子のライブラリーであり、これは酵素分解に抵抗性があるが、それにもかかわらず生体活性を維持している。たとえば

50

、Zuckennann et al., J. Med. Chem., 37 : 2678-85 [1994]を参照されたい) ; 空間的にアドレス可能な平行固相または液相ライブラリー ; デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法 ; 「1ピース1化合物」ライブラリー法 ; および、アフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野において公知のコンビナトリアルライブラリーの任意の多くの方法を使用して得ることができる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリー法は、ペプチドライブラリーと共に使用するために好ましいが、他の4種のアプローチは、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー、または小分子のライブラリーに適用可能である (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12 : 145)。

【0170】

分子ライブラリーの合成法の例は、当技術分野において、たとえば : DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 : 6909 [1993] ; Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 11422 [1994] ; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37 : 2678 [1994] ; Cho et al., Science 261 : 1303 [1993] ; Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059 [1994] ; Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 : 2061 [1994] ; および Gallop et al., J. Med. Chem. 37 : 1233 [1994]に見いだすことができる。

【0171】

化合物のライブラリーは、溶液中 (たとえば、Houghten, Biotechniques, 13 : 412-421 [1992])、またはビーズ (Lam, Nature 354 : 82-84 [1991])、チップ (Fodor, Nature 364 : 555-556 [1993])、細菌もしくは孢子 (米国特許第5,223,409号 ; 参照により本明細書に組み入れられる)、プラスミド (Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 1865-1869 [1992])、またはファージ (Scott and Smith, Science 249 : 386-390 [1990] ; Devlin Science, 249 : 404-406 [1990] ; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87 : 6378-6382 [1990] ; Felici, J. Mol. Biol., 222 : 301 [1991])に存在してもよい。

【0172】

一つの態様において、アッセイは、癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質またはこれらの生物学的活性部分を発現する細胞を試験化合物と接触させ、試験化合物が癌マーカーの活性を調整する能力を決定する、細胞に基づいたアッセイである。試験化合物が癌マーカー活性を調整する能力の決定は、たとえば酵素活性の変化をモニタリングすることにより達成することができる。細胞は、たとえば哺乳動物起源であってよい。

【0173】

試験化合物が、化合物、たとえば癌マーカー基質に対する癌マーカーまたは腫瘍抗原結合を調整する能力も評価することができる。これは、例えば化合物 (たとえば基質) と放射性同位元素または酵素標識との結合により実現され、その結果、化合物 (たとえば基質) の癌マーカーへの結合は、複合体中の標識された化合物、たとえば基質の検出により決定することができる。

【0174】

または、癌マーカーまたは腫瘍抗原は、試験化合物が、複合体中の癌マーカーまたは腫瘍抗原基質に対する癌マーカー結合を調整する能力をモニタリングするために、放射性同位元素または酵素標識と結合される。たとえば、化合物 (たとえば、基質) は、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hによって直接または間接のいずれかで標識することができ、放射性同位元素は、放射線放出の直接計測またはシンチレーション計数によって検出することができる。または、化合物は、たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼによって酵素的に標識することができ、酵素標識は、適切な基質の産物への転換を決定することによって検出される。

【0175】

化合物 (たとえば、癌マーカー基質) が、任意の反応体の標識化を伴うか、または伴わない、癌マーカーと相互作用する能力を評価することができる。たとえば、マイクロフィジオメーターを使用して、化合物または癌マーカーのいずれかの標識を伴わずに、化合物の癌マーカーとの相互作用を検出することができる (McConnell et al. Science 257 : 19

10

20

30

40

50

06-1912 [1992])。本明細書に使用される「マイクロフィジオメーター」(たとえば、Cytosensor)は、細胞がその周囲を酸性化する速度を、光アドレス可能な電位差測定分析センサー(light-addressable potentiometric sensor)(LAPS)を使用して測定する分析装置である。この酸性化速度の変化は、化合物と癌マーカーとの間の相互作用の指標として使用することができる。

【0176】

さらにもう一つの態様において、癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質またはこれらの生物学的活性部分を試験化合物と接触させ、試験化合物が癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質またはこれらの生物学的活性部分に結合する能力が評価される、無細胞アッセイが提供される。本発明のアッセイに使用される癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質の好ましい生物学的活性部は、基質またはその他のタンパク質、たとえば高い表面可能性スコアをもつ断片との相互作用に關与する断片を含む。

10

【0177】

無細胞アッセイは、2つの成分が相互作用して結合し、その結果除去および/または検出することができる複合体を形成することを可能にするために十分な条件下並びに時間で、標的遺伝子タンパク質および試験化合物の反応混合物を調製することを含む。

【0178】

また、2つの分子間の相互作用は、たとえば蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を用いて検出することができる(たとえば、Lakowicz et al., 米国特許第5,631,169号; Stavriopoulos et al., 米国特許第4,968,103号を参照されたい; これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる)。フルオロフォア標識は、第1のドナー分子が放出した蛍光エネルギーが、第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識により吸収され、これが次に吸収されたエネルギーにより蛍光となることができるよう選択される。

20

【0179】

または、「ドナー」タンパク質分子は、トリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを単に利用することができる。「アクセプター」分子標識を「ドナー」のものから区別することができるように、異なる波長の光を放出する標識が選択される。標識間のエネルギー転移効率は、分子を隔てる距離に關連しているので、分子間の空間的關係を評価することができる。分子間に結合が生じる状況では、15アッセイ内の「アクセプター」分子標識の蛍光発光は、最大であるはずである。FRET結合事象は、通常当技術分野において周知の標準的な蛍光検出の手段(たとえば、蛍光計の使用)によって測定することができる。

30

【0180】

もう一つの態様において、癌マーカーまたは腫瘍抗原タンパク質が標的分子に結合する能力の決定は、リアルタイム生体分子相互作用分析系(BIA)を使用して行うことができる(たとえば、Sjolander and Urbaniczky, Anal. Chem. 63: 2338-2345 [1991]およびSzabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705 [1995]を参照されたい)。「表面プラスモン共鳴」または「BIA」は、生体特異的相互作用を、いずれの反応体の標識を伴わずにリアルタイムで検出する(たとえば、BIAcore)。結合表面時の質量の変化(結合事象の指標)は、表面近くの光の屈折率の変化を生じ(表面プラスモン共鳴(SPR)の光学現象)、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用することができる検出可能なシグナルを生じる。

40

【0181】

一つの態様において、標的遺伝子産物または試験物質は、固相上にアンカーされる。固相上にアンカーされた標的遺伝子産物/試験化合物複合体は、反応の最後に検出することができる。好ましくは、標的遺伝子産物は、固体表面上にアンカーされ得、試験化合物(アンカーされていない)は、本明細書において考察した検出可能な標識で直接的または間接的に標識することができる。

【0182】

癌マーカー、抗癌マーカー抗体またはその標的分子を、一方または両方のタンパク質の、非複合型形態からの複合型形態の分離を促進するため、並びにアッセイの自動化に適応

50

するために、固定することが望ましいかもしれない。候補化合物の存在下または非存在下における試験化合物の癌マーカータンパク質への結合、または癌マーカータンパク質と標的分子の相互作用は、反応体を含むのに適した任意の容器内で行うことができる。このような容器の例は、マイクロタイタープレート、試験管、およびマイクロ遠心管を含む。一つの態様において、タンパク質の一方または両方をマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が提供される。たとえば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-癌マーカー融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導体化されたマイクロタイタープレート上に吸着させ、次いでこれらを試験化合物と、または試験化合物および非吸着標的タンパク質もしくは癌マーカータンパク質のいずれかと混合し、混合物を、複合体形成を行う条件下で (たとえば、塩およびpHに関して生理的条件で) インキュベーションすることができる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄し、未結合の成分を除去して、ビーズの場合は、固定されたマトリックスを、たとえば上記のように直接または間接的のいずれかで決定する。

10

20

30

40

50

【0183】

または、複合体は、マトリックスから解離され、癌マーカーの結合または活性のレベルが、標準技術を用いて決定される。癌マーカータンパク質または標的分子のいずれかをマトリックス上に固定するその他の技術は、ビオチンおよびストレプトアビジン複合体の使用を含む。ビオチン化された癌マーカータンパク質または標的分子は、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド) から、当技術分野において公知の技術を使用して調製し (たとえば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, EL)、ストレプトアビジンでコーティングされた96ウェルプレート (Pierce Chemical) に固定することができる。

【0184】

アッセイを行うために、固定されていない成分を、アンカーされた成分を含むコーティングされた表面に添加する。反応完了後、あらゆる形成された複合体が固体表面上に固定されたままであるような条件下で、未処理の成分を除去する (たとえば、洗浄による)。固体表面上にアンカーされた複合体の検出は、多くの方法で行うことができる。事前に、固定されていない成分が、予め標識されている場合、表面上に固定された標識の検出は、複合体が形成されたことの指標になる。事前に、固定されていない成分が予め標識されていない場合、間接標識を使用して表面上にアンカーされた複合体を検出することができ；たとえば、固定された成分に特異的な標識された抗体を使用する (抗体は、次に、直接標識されるか、またはたとえば標識された抗IgG抗体で間接的に標識する)。

【0185】

本アッセイは、癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質または標的分子とは反応性であるが、癌マーカータンパク質のその標的分子への結合は妨害しない抗体を利用して行われる。このような抗体は、プレートのウェルに誘導体化して、未結合の標的または癌マーカータンパク質を抗体結合によりウェル内に捕獲することができる。このような複合体の検出法は、GST固定された複合体に関して上記したものに加え、癌マーカータンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する複合体の免疫検出、並びに癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質または標的分子に関連した酵素活性の検出による酵素結合アッセイを含む。

【0186】

または、無細胞アッセイを液相で行うことができる。このようなアッセイにおいて、反応生成物は、分画遠心分離 (たとえば、Rivas and Minton, Trends Biochem Sci, 18: 284-7 [1993]) ; クロマトグラフィー (ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー) ; 電気泳動 (たとえば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York.を参照されたい) ; 並びに、免疫沈降 (たとえば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New Yorkを参照されたい) を含むが、これらに限定されるわけではない多くの標準技

術のいずれかにより、未反応の成分から分離される。このような樹脂およびクロマトグラフィ技術は、当業者に公知である（たとえば、Heegaard, J. Mol. Recognit 11:141-8 [1998]; Hageand Tweed, J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl 699:499-525 [1997]を参照されたい）。さらに、蛍光エネルギー転移も、本明細書に説明されたように、さらに溶液から複合体を精製することなく結合を検出するために好都合に利用される。

【0187】

アッセイは、癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質またはこれらの生物学的活性部分を、癌マーカーもしくは腫瘍抗原と結合しアッセイ混合物を形成する公知の化合物と接触させる工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物が癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を含み、試験化合物が癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、公知の化合物と比較して、試験化合物が癌マーカーもしくは腫瘍抗原またはこれらの生物学的活性部分に優先的に結合する能力、または標的分子の活性を調整する能力を決定する工程を含む。

10

【0188】

癌マーカーが、インビボにおいて、1つまたは複数のタンパク質などの細胞または細胞外巨大分子と相互作用することができる範囲では、このような相互作用の阻害剤が有用である。阻害剤を同定するために均一アッセイを使用することができる。

【0189】

たとえば、標的遺伝子産物と、相互作用性の細胞または細胞外結合パートナー産物との予め形成された複合体を、標的遺伝子産物またはこれらの結合パートナーのいずれかが標識されているが、標識によって生じるシグナルが複合体形成によって消光されるように、調製する（たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、免疫アッセイに本アプローチを利用する、米国特許第4,109,496号を参照されたい）。予め形成された複合体に由来する種の一方と競合し、置換する試験物質の添加により、バックグラウンドを上回るシグナル形成を生じる。本方法では、標的遺伝子産物-結合パートナーの相互作用を破壊する試験物質が同定される。または、癌マーカータンパク質は、ツー-ハイブリッドアッセイまたはスリー-ハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」として使用され（たとえば、米国特許第5,283,317号: Zervos et al., Cell 72:223-232 [1993]; Madura et al., J. Biol. Chem. 268.12046-12054 [1993]; Bartel et al., Biotechniques 14:920-924 [1993]; Iwabuchi et al., Oncogene 8:1693-1696 [1993]; および、Brent、W094/10300を参照されたい; これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる）、癌マーカーもしくは腫瘍抗原と結合するか、または相互作用し（「癌マーカー結合タンパク質」または「癌マーカー-bp」）、かつ癌マーカーもしくは腫瘍抗原活性に関与する、他のタンパク質を同定することができる。このような癌マーカー-bpは、癌マーカータンパク質によるシグナルのアクチベーターもしくは阻害因子、または、たとえば、癌マーカーで媒介されるシグナル伝達経路の下流エレメントのような標的であり得る。

20

30

【0190】

また、癌マーカーもしくは腫瘍抗原発現のモジュレーターを同定することができる。たとえば、細胞または無細胞の混合物を候補化合物と接触させ、癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質の発現を、候補化合物非存在下での癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較して評価する。候補化合物の存在下での癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質の発現が、その非存在下よりも大きい場合、候補化合物は、癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質発現の刺激因子として同定される。または、候補化合物の存在下で癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質の発現が、その非存在下よりも少ない（すなわち、統計的に有意に少ない）場合、候補化合物は、癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質発現の阻害因子として同定される。癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質発現のレベルは、癌マーカーもしくは腫瘍抗原mRNAまたはタンパク質を決定するために本明細書に記述した方法によって決定することができる。

40

50

【0191】

調整剤は、細胞に基づいたアッセイまたは無細胞アッセイを使用して同定することができ、薬剤が癌マーカーもしくは腫瘍抗原タンパク質の活性を調整する能力は、インビボにおいて、たとえば疾患の動物モデルなどの動物（たとえば、前立腺癌、乳癌、もしくは肺癌または転移性前立腺癌、乳癌、もしくは肺癌を有する動物；または、動物（たとえば、ヒト）由来の前立腺癌、肺癌、もしくは乳癌の異種移植片、または前立腺癌、乳癌、もしくは肺癌の転移（たとえば、リンパ節、骨、または肝臓への）により生じる癌由来の細胞、または前立腺癌、乳癌、もしくは肺癌細胞株由来の細胞を有する動物について確認することができる。

【0192】

本発明は、さらに、上述のスクリーニングアッセイによって同定された新規薬剤に関する（たとえば、下記の癌療法の記述を参照されたい）。従って、さらに適切な動物モデル（本明細書に記述したものなどの）において、本明細書に記述したように同定された物質（たとえば、癌マーカー調整物質、アンチセンス癌マーカー核酸分子、siRNA分子、癌マーカー特異抗体、または癌マーカー結合パートナー）を使用し、このような薬剤による治療の効能、毒性、副作用、または作用機序を決定することも本発明の範囲内である。さらに、上述のスクリーニングアッセイによって同定された新規薬剤は、たとえば本明細書に記述した治療に使用することができる。

【0193】

IV. 癌療法

いくつかの態様において、本発明は、癌（たとえば、前立腺癌）の療法を提供する。いくつかの態様において、療法は、本発明のファージ・アレイ・プロファイリング法を使用して同定された癌マーカーまたは腫瘍抗原（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3（NOL3）、-2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70）を含むが、これらに限定されるわけではない）を標的とする。

【0194】

A. 免疫療法

本発明の開発の間に同定された腫瘍抗原は、癌免疫療法における使用が見いだされる。このような方法は、現在利用可能な、非特異的な化学療法的癌療法を超える改善された方法である。たとえば、いくつかの態様において、腫瘍抗原が治療的抗体を産生するために使用される。その他の態様において、本発明の腫瘍抗原は、癌ワクチンの産生における使用が見いだされる。

【0195】

i) 抗体免疫療法

いくつかの態様において、本発明は、治療的な抗体の投与を含む癌のための療法を提供する（たとえば、米国特許第6,180,357号；および第6,051,230号を参照されたい；その両方が、参照により本明細書に組み入れられる）。

【0196】

いくつかの態様において、治療的抗体には、細胞障害性の薬剤に結合された、本発明の腫瘍抗原（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3（NOL3）、-2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70））に対して産生された抗体を含む。このような抗体は、腫瘍細胞に発現されるが、正常細胞に発現されない腫瘍抗原を標的にするために特に適する。このような態様において、正常細胞を標的にせず、したがって従来の化学療法の有害な副作用の多くを減少させる腫瘍特異的治療剤が作製される。一定の適用に関して、治療剤は、抗体もしくは増殖因子への付着に有用な薬剤として役立つ薬理学的薬剤、特に細胞障害剤、さもなければ内皮細胞を殺傷するかまたは増殖もしくは細胞分裂を抑制する能力を有する抗細胞剤であることが構想される。本発明は、抗体に結合することができ、活性型で送達される任意の薬理学的薬剤の使用を企図する。抗細胞剤の例は、化学療法剤、放射性同

10

20

30

40

50

位元素、および細胞毒を含む。本発明の治療的抗体は、放射性同位元素（たとえば、ヨウ素-131、ヨウ素-123、テクネチウム-99m、インジウム-111、レニウム-188、レニウム-186、ガリウム-67、銅-67、イットリウム-90、ヨウ素-125またはアスタチン-211）、ステロイドなどのホルモン、シトシンなどの代謝拮抗剤（たとえば、アラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、またはアミノプテリン；アントラサイクリン；マイトマイシンC）、ピンカアルカロイド（たとえば、デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン）、並びにクロラムブシルまたはメルファランなどの抗腫瘍アルキル化剤を含むが、これらに限定されるわけではない様々な細胞毒性部分を含むことができる。その他の態様には、凝集剤、サイトカイン、増殖因子、細菌内毒素または細菌内毒素のリピドA部分などの薬剤を含んでもよい。たとえば、いくつかの態様において、治療的薬剤は、わずかな数倍を挙げると、植物由来、真菌由来、または細菌由来の毒素、たとえばA鎖毒、リボソーム不活性化タンパク質、 α -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、リボヌクレアーゼ、ジフテリア毒、または緑膿菌外毒素を含む。いくつかの好ましい態様において、脱グリコシル化されたリシンA鎖が利用される。

10

【0197】

任意の事象において、これらなどの薬剤が、望ましい場合、公知の結合技術を使用して、必要に応じて、標的化された腫瘍細胞部位にて、血液成分に対してこれらを標的化、内在化、放出または提示させる方法で、抗体に首尾よく結合され得ることが提唱されている（たとえば、Ghose et al., *Methods Enzymol.*, 93:280[1983]を参照されたい）。

【0198】

たとえば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の腫瘍抗原を標的にする免疫毒を提供する。免疫毒は、典型的には腫瘍関連抗体または断片を特異的に標的化薬の、毒素部分などの細胞毒性薬との抱合体である。標的化薬は、毒素に向けられており、これにより、標的にされた抗原を保持する細胞を選択的に殺傷する。いくつかの態様において、治療的抗体は、高いインビボ安定性を提供する架橋を利用する（Thorpe et al., *Cancer Res.*, 48:6396 [1988]）。

20

【0199】

その他の態様、特に固形腫瘍の治療に関連した態様において、抗体は、血管内皮細胞の増殖または細胞分裂を抑制することにより、腫瘍血管に対する細胞毒、さもなければ抗細胞効果を有するように設計される。この攻撃は、腫瘍に局在化した血管の崩壊、腫瘍細胞からの酸素および栄養素の枯渇、特に血管から遠位の腫瘍細胞からの枯渇を引き起こし、最終的には細胞死または腫瘍壊死を引き起こすことが意図される。

30

【0200】

好ましい態様において、抗体に基づいた治療法は、薬学的組成物として、上記したように調剤される。好ましい態様において、本発明の抗体組成物の投与は、癌の測定可能な減少（たとえば、腫瘍の減少または消滅）をもたらす。

【0201】

ii) 癌ワクチン

いくつかの態様において、本発明は、特定の癌に向けられた癌ワクチンを提供する。癌ワクチンは、全身性の腫瘍特異的免疫応答を誘導する。このような応答は、体のどこの腫瘍細胞（たとえば、転移性の腫瘍細胞）でも根絶することができる。腫瘍ワクチンを作製するための方法は、当技術分野において周知である（たとえば、米国特許第5,994,523号；第5,972,334号；第5,904,920号；第5,674,486号；および第6,207,147号を参照されたい；これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる）。

40

【0202】

いくつかの態様において、腫瘍ワクチンは、最初に癌が検出されるときに投与される（たとえば、化学療法などのその他の治療法と共に）。その他の態様において、癌ワクチンは、再発または転移を予防するために治療（たとえば、外科的切除または化学療法）後に投与される。さらにその他の態様において、癌ワクチンは、予防的に投与される（たとえば、特定の癌のリスクがあるものに対して）。

50

【0203】

いくつかの態様において、本発明の癌ワクチンは、薬学的組成物中に1つまたは複数の腫瘍抗原を含む（たとえば、上記したもの）。いくつかの態様において、腫瘍抗原は、投与前に不活性化される。その他の態様において、ワクチンは、1つまたは複数のさらなる治療剤（たとえば、サイトカインまたはサイトカイン発現する細胞）をさらに含む。

【0204】

いくつかの態様において（たとえば、米国特許5,674,486号に記述された方法、参照により本明細書に組み入れられる）、たとえばルーチンの皮膚生検により得られた、線維芽細胞などの患者から選択された細胞が、1つまたは複数のサイトカインを発現するように遺伝子改変される。または、マクロファージ、単球、およびリンパ球などの通常免疫系において抗原提示細胞として役立ち得る患者の細胞を、同様に、1つまたは複数のサイトカインを発現するように遺伝子改変してもよい。次いで、サイトカイン発現細胞を患者の腫瘍抗原（たとえば、本発明の腫瘍抗原）と共に、たとえば照射を受けた腫瘍細胞の形態で、または精製された天然もしくは組換え腫瘍抗原の形態で混合して、全身性の抗腫瘍免疫を誘導するために、たとえば皮下に免疫化するのに使用する。

10

【0205】

本発明のワクチンは、上記したものを含むが、これらに限定されるわけではない任意の適切な方法を使用して投与してもよい。他の好ましい態様において、本発明の癌ワクチンの投与により、検出可能な癌細胞の除去（たとえば、腫瘍の減少または除去）または予防がもたらされる。

20

【0206】

B. アンチセンス療法

いくつかの態様において、本発明は、癌マーカーの発現を標的にする。たとえば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の癌マーカー（たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3（NOL3）、-2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8（HSPA70））をコードする核酸分子の機能を調整するために、オリゴマーアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド（たとえば、上述した薬剤スクリーニング法において同定されたもの）を含有する組成物を利用して、最終的に発現される癌マーカーの量を調整する。これは、本発明の癌マーカーをコードする1つまたは複数の核酸と特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物を提供することにより達成される。オリゴマー化合物のその標的核酸との特異的ハイブリダイゼーションは、核酸の正常な機能を妨害する。この標的核酸に特異的にハイブリダイズする化合物によるその機能の調整は、一般に「アンチセンス」と称される。妨害されるDNAの機能は、複製および転写を含む。妨害されるRNAの機能は、たとえば、RNAのタンパク質翻訳部位への転写位置、RNAからのタンパク質翻訳、1つまたは複数のmRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAにより保証されたもしくは促進され得る触媒活性などの全ての不可欠な機能を含む。このような標的核酸機能の妨害の全般的効果が、本発明の癌マーカー発現の調整である。本発明との関連において、「調整」は、遺伝子発現の増加（刺激）または減少（阻害）のいずれかを意味する。たとえば、腫瘍増殖を潜在的に予防するために発現を阻害してもよい。

30

40

【0207】

アンチセンスに対して特異的な核酸を標的にすることが好ましい。特定の核酸に対するアンチセンス化合物の「標的化」は、本発明の状況において、多工程の過程である。この過程は、通常、その機能が調整される核酸配列の同定で始まる。これは、たとえば、その発現が特定の障害もしくは病態と関連づけられた細胞遺伝子（または遺伝子から転写されたmRNA）、または感染性物質由来の核酸分子であり得る。本発明において、標的は、本発明の癌マーカーをコードする核酸分子である。また、標的化過程は、所望の効果、たとえばタンパク質の発現の検出または調整が生じるように起こるアンチセンス相互作用に関する、この遺伝子内の部位の決定も含む。本発明の状況において、好ましい遺伝子内の部位は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始コドンまたは終結コドン

50

を包含する領域である。翻訳開始コドンは、典型的には5'-AUG（転写されたmRNA分子において；対応するDNA分子においては、5'-ATG）であるので、翻訳開始コドンは、「AUGコドン」、「開始コドン」、または「AUG開始コドン」とも称される。少数の遺伝子は、RNA配列が、5'-GUG、5'-UUG、または5'-GUGである翻訳開始コドンを有し、並びに5'-AUA、5'-ACG、および5'-CUGは、インビボにおいて機能することが示されている。したがって、「翻訳開始コドン」および「開始コドン」という用語は、たとえそれぞれの例において開始アミノ酸が、典型的にはメチオニン（真核生物）またはホルミルメチオニン（原核生物）であっても、多くのコドン配列を包含する。真核および原核細胞遺伝子は、2種またはそれ以上の代わりの開始コドンを有することがあり、その一つは、特定の細胞型もしくは組織において、または特定の条件設定下において、優先的に翻訳開始に利用される。本発明に関連して、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、このようなコドンの配列とは関わりなく、インビボにおいて使用されて、本発明の腫瘍抗原をコードする遺伝子から転写されたmRNA分子の翻訳を開始するコドンを指す。

10

20

30

40

50

【0208】

遺伝子の翻訳終結コドン（または「停止コドン」）は、3種の配列（すなわち、5'-UAA、5'-UAG、および5'-UGA；対応するDNA配列は、それぞれ5'-TAA、5'-TAG、および5'-TGAである）の一つを有し得る。「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」という用語は、翻訳開始コドンからいずれかの方向（すなわち、5'側または3'側）に約25～約50個の連続ヌクレオチドを含むmRNAまたは遺伝子の一部を指す。同様に、「停止コドン領域」および「翻訳終結コドン領域」という用語は、翻訳終結コドンからいずれかの方向（すなわち、5'側または3'側）に約25～約50個の連続ヌクレオチドを含むmRNAまたは遺伝子の一部を指す。

【0209】

また、翻訳開始コドンと翻訳終結コドンとの間の領域を指すオープンリーディングフレーム（ORF）または「コード領域」は、効果的に標的にし得る領域である。その他の標的領域は、翻訳開始コドンから5'方向の一部のmRNAを指す5'側非翻訳領域（5'UTR）を含み、したがって5'キャップ部位とmRNAまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドの翻訳開始コドンとの間のヌクレオチドを含み、並びに翻訳終結コドンから3'方向の一部のmRNAを指す3'側非翻訳領域（3'UTR）を含み、したがって翻訳終結コドンとmRNAまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドの3'末端との間のヌクレオチドを含む。mRNAの5'キャップは、5'-5'三リン酸結合を介してmRNAの最も5'側の残基に結合したN7-メチル化されたグアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造それ自体、並びにキャップに隣接する最初の50個のヌクレオチドを含むと考えられる。キャップ領域もまた、好ましい標的領域であり得る。

【0210】

一部の真核生物mRNA転写産物は、直接翻訳されるが、多くは、それが翻訳される前に転写産物から切出される「イントロン」として公知の1つまたは複数の領域を含む。残りの（したがって、翻訳された）領域は、「エキソン」として公知であり、共にスプライシングされ、連続mRNA配列を形成する。また、mRNAスプライシング部位（すなわち、イントロン-エキソン接合部）は、好ましい標的領域でもあり得るし、異常なスプライシングが疾患に関係している状況、または特定のmRNAスプライシング産物の過剰産生が疾患に関係している状況において特に有用である。再配列または欠失に由来する異常な融合接合部も好ましい標的である。イントロンも、たとえばDNAまたはプレ-mRNAに標的にされるアンチセンス化合物のための有効な、したがって、好ましい標的領域であることが見いだされている。

【0211】

いくつかの態様において、アンチセンス阻害の標的部位は、市販のソフトウェアプログラムを使用して同定される（たとえば、Biognostik, Gottingen, Germany； SysArris Software, Bangalore, India； Antisense Research Group, University of Liverpool, Liverpool, England； GeneTrove, Carlsbad, CA）。その他の態様において、アンチセンス

阻害のための標的部位は、米国特許W00198537A2（参照により本明細書に組み入れられる）に開示されたアクセス可能な部位の方法を使用して同定される。

【0212】

一旦、1つまたは複数の標的部位が同定されたならば、標的と十分に相補的である（すなわち、十分良好にハイブリダイズし、十分な特異性をもつ）オリゴヌクレオチドが選択され、所望の効果を生じる。たとえば、本発明の好ましい態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、開始コドン、または開始コドンの近傍を標的にする。

【0213】

本発明との関連において、「ハイブリダイゼーション」は、アンチセンス組成物および方法に関して、相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基間のWatson-Crick、Hoogsteenまたは逆Hoogsteen水素結合であり得る、水素結合を意味する。たとえば、アデニンおよびチミンは、水素結合形成によって対形成する相補的核酸塩基である。アンチセンス化合物の配列は、特異的にハイブリダイズするためにはその標的核酸の配列と100%相補性である必要はないことが理解される。アンチセンス化合物は、化合物の標的DNAまたはRNA分子との結合が、標的DNAまたはRNAの通常の機能を妨害して、有用性を喪失し、かつ特異的結合が望まれる条件下（すなわち、インビボアッセイまたは治療的処置の場合には、生理的条件下、およびインビトロアッセイの場合は、アッセイが行われる条件下）において、アンチセンス化合物の非標的配列への非特異的結合を回避するために十分な程度の相補性が存在している場合に、特異的にハイブリダイズ可能である。

10

【0214】

アンチセンス化合物は、一般に研究用試薬および診断用薬として使用される。たとえば、特異的に遺伝子発現を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子の機能を明らかにするために使用することができる。たとえば、生物学的経路の様々なメンバー間の機能を区別するためにも、アンチセンス化合物を使用することができる。

20

【0215】

アンチセンスの特異性および感度は、治療用途にも適用することができる。たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物およびヒトの病態の治療において、治療的部分として使用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトに対して安全にかつ効果的に投与されており、多くの治験が現在進行中である。従って、オリゴヌクレオチドは、細胞、組織、および動物、特にヒトの治療のための治療計画に有用であるように構成することができる、有用な治療様式であることが確立されている。

30

【0216】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンス化合物の好ましい形態であるが、本発明は、以下に記述したような、オリゴヌクレオチド模倣物を含むが、これらに限定されるわけではないその他のオリゴマーアンチセンス化合物を包含する。本発明のアンチセンス化合物は、好ましくは約8～約30個の核酸塩基（すなわち、約8～約30個の連結された塩基）を含むが、本発明においてはより長い配列およびより短い配列の両方の使用が見いだされ得る。特に好ましいアンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、さらにより好ましくは約12～約25個の核酸塩基を含むものである。

40

【0217】

本発明に有用な好ましいアンチセンス化合物の具体例は、修飾されたバックボーンまたは非天然のヌクレオシド間結合を含む、オリゴヌクレオチドを含む。本明細書に定義したように、修飾されたバックボーンを有するオリゴヌクレオチドは、バックボーンにリン原子を保持するもの、およびバックボーンにリン原子を有さないものを含む。本明細書の目的のために、それらのヌクレオシド間のバックボーンにリン原子を有さない修飾されたオリゴヌクレオチドも、オリゴヌクレオチドであるとみなすことができる。

【0218】

好ましい修飾されたオリゴヌクレオチドバックボーンは、たとえば、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノア

50

ルキルホスホトリエステルの、3'-アルキレンホスホナートおよびキラルホスホナートを含むメチルおよび他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、3'-アミノホスホラミダートおよびアミノアルキルホスホラミダートを含むホスホラミダート、チオノホスホラミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、並びに通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'結合された類似体、並びにヌクレオシド単位の隣接した対が、3'-5'から5'-3'または2'-5'から5'-2'結合された、逆転した極性を有するものを含む。様々な塩、混合された塩、および遊離酸の形態も含まれる。

【0219】

その中にリン原子を含まない好ましい修飾されたオリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくはヘテロ環式ヌクレオシド間結合によって形成されたバックボーンを有する。これらは、モルホリノ結合（部分的にヌクレオシドの糖部から形成される）；シロキサンバックボーン；スルフィド、スルホキシドおよびスルホンバックボーン；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；アルケン含有バックボーン；スルファミン酸バックボーン；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノバックボーン；スルホン酸およびスルホンアミドバックボーン；アミドバックボーン；並びに、混合されたN、O、S、およびCH₂成分部分を有するその他のものを有するバックボーンを含む。

【0220】

その他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣物において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合（すなわち、バックボーン）は、新たな基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。このようなオリゴマー化合物の一つである優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されたオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖バックボーンは、アミド含有バックボーン、特にアミノエチルグリシンバックボーンで置換されている。核酸塩基は、維持されており、バックボーンのアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合されている。PNA化合物の調製を教示する代表的米国特許は、それぞれ、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,539,082号；第5,714,331号；および、第5,719,262号であるが、これらに限定されるわけではない。PNA化合物に関するさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 254:1497 (1991)の論文に見いだすことができる。

【0221】

本発明の最も好ましい態様は、ホスホロチオアートバックボーンをもつオリゴヌクレオチド、およびヘテロ原子バックボーンをもつオリゴヌクレオチドであり、特に前述の米国特許第5,489,677号の--CH₂、--NH--O--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[メチレン（メチルイミノ）またはMMIバックボーンとして公知]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--、および--O--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[式中、未変性ホスホジエステルバックボーンは、--O--P--O--CH₂--として示される]、並びに上で参照した米国特許第5,602,240号のアミドバックボーンである。上で参照した米国特許第5,034,506号のモルホリノバックボーン構造を有するオリゴヌクレオチドも好ましい。

【0222】

また、修飾されたオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の置換された糖部分を含む。好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に、OH；F；O-、S-、またはN-アルキル；O-、S-、またはN-アルケニル；O-、S-もしくはN-アルキニル；または、O-アルキル-O-アルキルの1つを含み、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、C₁~C₁₀アルキルまたはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルで置換されていても、されていなくてもよい。特に好ましいのは、O[(CH₂)_n]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂であり、式中nおよびmは、1~約10である。その他の好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に下記の1つを含む：C₁~C₁₀の低級アルキル、置換された低級アルキ

10

20

30

40

50

ル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善する基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学特性を改善する基、並びに同様の特性を有する他の置換基。好ましい修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O--CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2'-メトキシエチル)または2'-MOEとしても公知)(Martin et al., Helv. Chim. Acta 78: 486 [1995])、すなわちアルコキシアルコキシ基を含む。さらに好ましい修飾は、2'-DMAOEとしても公知である2'-ジメチルアミノオキシエトキシ(すなわち、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基)、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当技術分野において、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても公知)、すなわち、2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂である。

10

【0223】

その他の好ましい修飾は、2'-メトキシ(2'-O--CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、および2'-フルオロ(2'-F)を含む。また、類似の修飾は、オリゴヌクレオチドのその他の位置、特に3'末端ヌクレオチドまたは2'-5'結合されたオリゴヌクレオチドの糖の3'位、並びに5'末端ヌクレオチドの5'位で行われてもよい。また、オリゴヌクレオチドは、ペンタフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣物を有していてもよい。

20

【0224】

オリゴヌクレオチドは、核酸塩基(当技術分野において単に「塩基」と称されることも多い)の修飾または置換を含んでいてもよい。本明細書に使用される「未修飾」または「天然の」核酸塩基は、プリン塩基であるアデニン(A)およびグアニン(G)、並びにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)を含む。修飾された核酸塩基は、その他の合成および天然の核酸塩基、たとえば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換されたアデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換されたウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンおよび3-デアザグアニン、並びに3-デアザアデニンを含む。さらなる核酸塩基は、米国特許第3,687,808号に開示された核酸塩基を含む。これらの核酸塩基のいくつかは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大するために特に有用である。これらは、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含む、5-置換されたピリミジン、6-アザピリミジン、並びにN-2、N-6、およびO-6置換されたプリンを含む。5-メチルシトシン置換は、特に2'-O-メトキシエチル糖修飾との組み合わせの場合、0.6~1.2 で核酸二重鎖の安定性を増大することが示されており、現在好ましい塩基置換である。

30

40

【0225】

本発明のもう一つのオリゴヌクレオチドの修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取込みを増強する1つまたは複数の部分または結合体の、オリゴヌクレオチドに対する化学結合を含む。このような部分は、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、(たとえば、ヘキシル-S-トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪族鎖、(たとえば、ドデカンジオール残基またはウンデシル残基)、リン脂質、(たとえば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホナート)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖もしくはアダマンタン酢酸、パルミチル部分、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシ

50

ルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分などの脂質部分を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0226】

当業者には、上述の修飾を含むオリゴヌクレオチドを作成する方法が周知である。本発明は、上述したアンチセンスオリゴヌクレオチドに限定されない。任意の適した修飾または置換を利用することができる。

【0227】

所与の化合物内の全ての位置が均質に修飾される必要はなく、実際に、複数の前述の修飾を単一の化合物内またはさらにオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオチドに組み込むことができる。また、本発明は、キメラ化合物であるアンチセンス化合物をさらに含む。「キメラの」アンチセンス化合物または「キメラ」は、本発明との関連において、それぞれが、少なくとも1種のモノマー単位、すなわちオリゴヌクレオチド化合物の場合、ヌクレオチドで構成されている2種またはそれ以上の化学的に異なる領域を含むアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的にはヌクレアーゼ分解に対する増大した抵抗、増大した細胞取込み、および/または標的核酸に対する増大した結合親和性をオリゴヌクレオチドに付与するために、オリゴヌクレオチドが修飾された領域を少なくとも1つ含む。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断することが可能な酵素の基質として役立ち得る。例として、RNaseHは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。その結果、RNaseHの活性化は、RNA標的の切断を生じ、これにより遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大きく増大する。結果的に、キメラオリゴヌクレオチドが使用されるときに、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオアートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、より短いオリゴヌクレオチドと比較可能な結果が得られることが多い。RNA標的の切断は、ルーチンにゲル電気泳動によって、必要であるならば、当技術分野において公知の関連した核酸ハイブリダイゼーション技術によって検出することができる。

10

20

【0228】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、上述したような2種またはそれ以上のオリゴヌクレオチド、修飾されたオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合構造として形成されてもよい。

30

【0229】

本発明はさらに、下記のような本発明のアンチセンス化合物を含有する薬学的組成物および調剤も含む。

【0230】

C. RNAi療法

その他の態様において、RNAiは、本発明の腫瘍抗原の発現または癌マーカーを調節するために使用される。RNAiは、ヒトを含む大部分の真核生物における外来遺伝子の発現を制御するための、進化的に保存された細胞の防御である。RNAiは、二本鎖RNA(dsRNA)によって惹起され、dsRNAに応答して、相同の一本鎖標的RNAの配列特異的mRNA分解を生じさせる。mRNA分解のメディエーターは、低分子干渉RNA二重鎖(siRNA)であり、これは、通常細胞における酵素の切断によって長いdsRNAから産生される。siRNAは、一般に長さおよそ21ヌクレオチドであり(たとえば、長さ21~23ヌクレオチド)、2ヌクレオチドの3'-オーバーハングによって特徴付けられる塩基対構造を有する。細胞内への低分子RNAの導入またはRNAiに続き、本配列は、RISC(RNA誘導サイレンシング複合体)と呼ばれる酵素複合体に送達されると考えられる。RISCは、標的を認識し、これをエンドヌクレアーゼで切断する。より大きなRNA配列が細胞に送達された場合は、RNase III酵素(ダイサー(Dicer))が、より長いdsRNAを21~23ntのds siRNA断片に変換する点に留意されたい。

40

【0231】

化学的に合成されたsiRNAは、培養体細胞における哺乳動物遺伝子機能のゲノム全体での解析のための強力な試薬となった。また、遺伝子機能のバリデーションのためのこれら

50

の価値を越えて、siRNAは、遺伝子特異的治療剤として多大な潜在性を保持する (Tuschl and Borkhardt, *Molecular Intervent.* 2002 ; 2 (3) : 158-67、参照により本明細書に組み入れられる)。

【0232】

動物細胞へのsiRNAのトランスフェクションにより、特異的遺伝子において強力な持続的転写後サイレンシングが生じる (Caplen et al, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001 ; 98 : 9742-7 ; Elbashir et al., *Nature.* 2001 ; 411 : 494-8 ; Elbashir et al., *Genes Dev.* 2001 ; 15 : 188-200 ; および Elbashir et al., *EMBO J.* 2001 ; 20 : 6877-88、これらの全てが参照により本明細書に組み入れられる)。siRNAでRNAiを行うための方法および組成物は、たとえば米国特許第6,506,559号において記述されており、参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0233】

siRNAは、標的にしたRNAの量を低下させる際に非常に有効であり、エクステンションタンパク質によって往々にして検出不可能なレベルにする。サイレンシング効果は、数月持続することができ、標的RNAとsiRNAの中央領域との間の1ヌクレオチド・ミスマッチが、往々にしてサイレンシングを防止するために十分であることから、非常に特異的である。Brummelkamp et al, *Science* 2002 ; 296 : 550-3 ; およびHolen et al, *Nucleic Acids Res.* 2002 ; 30 : 1757-66、これらの両方共が、参照により本明細書に組み入れられる。

【0234】

C. 遺伝子療法

本発明は、本発明の癌マーカー (たとえば、BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3 (NOL3)、 α -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8 (HSPA70)) の発現を調整する際の遺伝子操作の使用を企図する。遺伝子操作の例は、遺伝子ノックアウト (たとえば、例として組換えを使用して染色体から癌マーカー遺伝子を除去すること)、誘導可能プロモーターを伴うかまたは伴わないアンチセンス構築物の発現などを含むが、これらに限定されるわけではない。核酸構築物の細胞へのインビトロまたはインビボにおける送達は、任意の適した方法を使用して行うことができる。適した方法とは、核酸構築物を細胞へ導入し、その結果望ましい事象 (たとえば、アンチセンス構築物の発現) を生じさせる方法である。

20

【0235】

遺伝情報を有する分子の細胞への導入は、裸のDNA構築物の有向注入、該構築物を負荷した金粒子を用いたボンバードメント、およびたとえば、リポソーム、生体高分子などを使用する巨大分子を媒介した遺伝子導入を含むが、これらに限定されるわけではない任意の様々な方法によって達成される。好ましい方法は、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノ随伴ウイルスを含むが、これらに限定されるわけではないウイルスに由来する遺伝子送達媒体を使用する。レトロウイルスと比較して高い効率のため、アデノウイルス由来のベクターは、インビボにおいて核酸分子を宿主細胞に導入するための好ましい遺伝子送達媒体である。アデノウイルスベクターは、動物モデルにおける様々な固形腫瘍に、および免疫欠損マウス内のヒト固形腫瘍異種移植片に、非常に効率的なインビボ遺伝子導入をもたらすことが示されている。アデノウイルスベクターおよび遺伝子導入法の例は、PCT公報WO00/12738およびWO00/09675、並びに米国特許出願第6,033,908号、第6,019,978号、第6,001,557号、第5,994,132号、第5,994,128号、第5,994,106号、第5,981,225号、第5,885,808号、第5,872,154号、第5,830,730号、および第5,824,544号に記述されており、これらのそれぞれが、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0236】

ベクターは、様々な方法で被験体に投与することができる。たとえば、本発明のいくつかの態様において、ベクターは、腫瘍または腫瘍に関連した組織へ、直接注入を使用して投与される。その他の態様において、投与は、血液またはリンパ循環を介する (たとえば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、PCT公報WO99/02685を参照されたい

50

)。例示的なアデノウイルスベクターの用量レベルは、好ましくは、灌流液に添加される $10^8 \sim 10^{11}$ 個のベクター粒子である。

【0237】

V. 薬学的組成物

いくつかの態様において、本発明は、腫瘍抗原もしくは癌マーカー・ポリヌクレオチド配列、腫瘍抗原ポリペプチド、抗体を含む腫瘍抗原生理活性の阻害剤もしくはアンタゴニストの全てまたは一部を、単独で、または安定化化合物などの少なくとも1つのその他の薬剤と組み合わせて含んでいてもよく、並びに食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水を含むが、これらに限定されるわけではない任意の無菌の生体適合性薬学的担体中で投与してもよい薬学的組成物を提供する。薬学的組成物は、癌の治療のための治療剤およびワクチンとしての使用が見いだされる。

10

【0238】

本発明の方法は、上により詳細に記載したような癌を治療する際に使用が見いだされる。抗体は、生理食塩水などの薬学的に許容される担体中で患者の静脈内に投与することができる。抗体の細胞内送達のための標準的方法（たとえば、リボソームを経た送達）を使用することができる。このような方法は、当業者に周知である。本発明の製剤は、静脈内、皮下、筋肉内、および腹腔内などの非経口投与のために有用である。

【0239】

医術分野において周知のように、任意の一人の患者のための投薬量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性、投与の回数および経路、一般的健康、並びに共に投与される他の薬物との相互作用を含む多数の因子に依存する。

20

【0240】

したがって、本発明のいくつかの態様において、組成物（たとえば、抗体およびワクチン）は、単独で、またはその他のヌクレオチド配列、薬物、もしくはホルモンと組み合わせて患者に、またはこれが賦形剤もしくはその他の薬学的に許容される担体と混合されている薬学的組成物中で投与することができる。本発明の一つの態様において、薬学的に許容される担体は、薬学的に不活性である。本発明のもう一つの態様において、組成物は、癌に罹患した個体に対して単独で投与してもよい。

【0241】

治療される癌の型に応じて、これらの薬学的組成物は、全身性に、または局所的に処方し、および投与してもよい。処方および投与のための技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co, Easton Pa.)の最新の版において見いだされ得る。適切な経路は、たとえば経口または経粘膜投与；並びに筋肉内、皮下、髄内、くも膜下腔内、脳室内、静脈内、腹腔内、または鼻腔内投与を含む非経口的送達を含んでいてもよい。

30

【0242】

注入のためには、本発明の薬学的組成物は、水溶液中、好ましくはハックス液、リンゲル液、または生理緩衝食塩水などの生理的に適合性の緩衝液中に調剤可能である。組織または細胞の投与のためには、透過させる特定の障壁に適した浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は、一般に当技術分野において公知である。

40

【0243】

その他の態様において、本発明の薬学的組成物は、当技術分野において周知の薬学的に許容される担体を経口投与のために適した投薬量で使用して調剤することができる。治療される患者による経口または経鼻摂取のためには、このような担体により、薬学的組成物を錠剤、丸剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として調剤することができる。

【0244】

本発明に使用するために適した薬学的組成物は、活性成分が意図された目的を達成するような有効量で含まれる組成物を含む。たとえば、抗体またはワクチンの有効量は、癌細胞の存在を減少させる（たとえば、腫瘍を縮小させ、もしくは排除し、または循環癌細胞

50

数を減少させる)量であってもよい。有効量の決定は、特に本明細書に提供した開示を鑑みて、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0245】

活性成分に加えて、これらの薬学的組成物は、薬学的に使用することができる製剤中に、活性化合物の処理を促進にする賦形剤および添加剤を含む適切な薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。経口投与のために調剤される製剤は、錠剤、糖衣剤、カプセル、または溶液の形態であってもよい。

【0246】

本発明の薬学的組成物は、それ自体公知の様式で(たとえば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣剤作製、微粒化、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥過程によって)製造してもよい。

10

【0247】

非経口投与のための薬学的製剤は、水溶性型の活性化合物の水溶液を含む。加えて、活性化合物の懸濁液を、適切な油性注入懸濁液として調製してもよい。適切な親油性溶媒または媒体は、ゴマ油または合成脂肪酸エステル(たとえば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリドまたはリポソーム)などの脂肪油を含む。水性注入懸濁液は、懸濁液の粘性を増大する物質(たとえば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストラン)を含んでいてもよい。任意に、懸濁液は、高度に濃縮された溶液の調製を可能にするために、化合物の溶解度を増大する適切な安定剤または薬剤も含み得る。

20

【0248】

経口使用のための薬学的製剤は、固体賦形剤と活性化合物を組み合わせる工程、任意に、生じた混合物を挽く工程、および必要に応じて、タブレットまたは糖衣剤芯を得るために適切な添加剤を添加後に顆粒中の混合物を処理する工程によって得ることができる。適切な賦形剤は、乳糖、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖; トウモロコシ、コムギ、米、パレイショなどからのデンプン; メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはナトリウムカルボキシメチルセルロースなどのセルロース; 並びにアラビアゴムおよびトラガカンタを含むゴム質; 並びにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質のような炭水化物またはタンパク質充填剤である。必要に応じて、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムなどのこれらの塩のような崩壊剤または可溶化剤を添加してもよい。

30

【0249】

糖衣剤芯は、濃縮砂糖溶液などの適切なコーティングと共に提供され、これは、また、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボルゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物も含み得る。製品同定のために、または活性化合物の量(すなわち、投薬量)を特徴付けるために、染料または色素を錠剤または糖衣剤コーティングに添加してもよい。

【0250】

経口的に使用することができる薬学的製剤には、ゼラチンで作られた押し込み型カプセル、並びにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどのコーティングで作られた密封軟カプセルが含まれる。押し込み型カプセルは、乳糖もしくはデンプンなどの充填剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および任意に安定剤と混合された活性成分を含み得る。軟カプセルでは、活性化合物が、安定剤の有無にかかわらず、脂肪油、流動パラフィン、もしくは液体のポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解、または懸濁され得る。

40

【0251】

薬学的に許容される担体中に調剤される本発明の化合物を含む組成物は、調製され、適切な容器に配置され、指示された状態の治療のためにラベルされ得る。本発明の腫瘍抗原に対する抗体については、ラベルに示される状態は、癌に関連した状態の治療を含んでもよい。

50

【0252】

薬学的組成物は、塩として提供されてもよく、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、その他を含むが、これらに限定されるわけではない多くの酸で形成することができる。塩は、水または対応する遊離塩基形態であるその他のプロトン性溶媒中により可溶性の傾向がある。その他の場合には、好ましい製剤は、使用前に緩衝液と組み合わせるpH範囲4.5~5.5の1mM~50mMヒスチジン、0.1%~2%のショ糖、2%~7%のマンニトールの溶液中の凍結乾燥粉末であってもよい。

【0253】

本発明の方法に使用される任意の化合物について、治療的に有効な用量は、最初に細胞培養アッセイによって推定することができる。次いで、好ましくは、投薬量は、抗体レベルを調整するために望ましい循環濃度範囲を達成するために、動物モデル（特に、マウス・モデル）において処方することができる。

10

【0254】

治療的に有効な用量は、疾病状態の症候を改善する抗体の量を指す。このような化合物の毒性および治療有効性は、たとえばLD₅₀（集団の50%に致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的薬学的手順によって決定することができる。毒性と治療効果との間の用量比が治療指数であり、これは、比LD₅₀/ED₅₀として表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよびさらなる動物実験から得られるデータは、ヒトの使用のための投薬量の範囲を処方する際に使用することができる。このよう

20

【0255】

正確な投薬量は、治療される患者を考慮して個々の医師によって選択される。投薬量および投与は、十分なレベルの活性部分を提供するか、または所望の効果を維持するように調整される。考慮され得るさらなる因子には、疾病状態の重症度；患者の年齢、重量、および性；食餌、時間および投与頻度、併用薬物、応答感度、および療法に対する寛容性/応答が含まれる。長時間作用性の薬学的組成物は、特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて、3~4日毎、毎週、または2週ごとに一度投与されてもよい。

30

【0256】

通常の投薬量は、投与の経路に応じて、最大約1gの全投与量で、0.1~100,000マイクログラムで変更してもよい。特定の投薬量および送達方法に関する手引きは、文献に提供されている（米国特許第4,657,760号；第5,206,344号；または第5,225,212号を参照されたい、これらの全てが、参照により本明細書に組み入れられる）。

【0257】

いくつかの態様において、本発明の薬学的組成物は、癌の治療に有用な1つまたは複数の薬剤をさらにも含む。たとえば、いくつかの態様において、1つもしくは複数の抗体またはワクチンは、化学療法剤と組み合わせられる。化学療法剤は、当業者に周知である。このような化学療法剤の例は、アルキル化剤、抗生物質、抗代謝剤、植物に由来する薬剤、およびホルモンを含む。適切なアルキル化剤には、シクロホスファミド、アジリジン、アルキルアルコン（alkone）スルホナート、ニトロソ尿素などのナイトロジェンマスタード；ダカルバジンなどの非古典的アルキル化剤、並びにカルボプラチンおよびシスプラチンなどの白金化合物がある。ダクチノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシンC、プリカマイシン、ならびにドキシソルピシン（アドリアマイシンとしても公知）およびミトキサントロンなどのアントラサイクリンは、適切な抗生物質製剤である。適切な抗代謝薬には、メトトレキセートなどの抗葉酸剤、プリン類似体、5-フルオロウラシル（5-FU）およびシタラピンなどのピリミジン類似体、アスパラギナーゼなどの酵素、並びにヒドロキシ尿素などの合成剤がある。適切な植物に由来する薬剤には、ビンクリスチンおよびビンブラスチンなどのピンカアルカロイド、タキサン、エトポシドなどのエピポドフィロトキシ

40

50

ン、ならびにカンプトテカンがある。適切なホルモンには、ステロイドがある。現在では、好ましい薬物は、アドリマイシンである。しかし、その他の適切な化学療法剤には、上で同定された薬剤群内のさらなる薬剤を含み、治療される癌の型、ヒトまたは獣医学的患患者の状態等によって、当業者が容易に決定し得る。

【0258】

選択された化学療法剤に適した投薬量は、当業者に公知である。当業者であれば、必要に応じて、投与の経路、受ける投薬の数、投薬のタイミング、および投薬量を容易に調整することができる。このような用量は、選択される特定の薬物または薬剤によって容易に調整され得、上記したものを含むが、これらに限定されるわけではない任意の適切な経路によって投与され得る。投薬は、必要に応じて繰り返してもよい。

10

【0259】

VI. 癌マーカー遺伝子を発現するトランスジェニック動物またはノックアウト

本発明は、本発明の外來性癌マーカーまたは腫瘍抗原 (BRD2、eIF4G1、RPL22、RPL13A、HES1、仮想的タンパク質XP_373908、ユビキリン1、核小体タンパク質3 (NOL3)、 α -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8 (HSPA70)) 遺伝子またはこれらの突然変異体および変腫 (たとえば、切断または一塩基多型) を含むトランスジェニック動物の作製を企図する。その他の態様において、トランスジェニック動物は、癌マーカーまたは腫瘍抗原遺伝子のノックアウトを含む。好ましい態様において、トランスジェニック動物は、野生型動物と比較して、変更された表現型を示す (たとえば、増大または減少したマーカーの存在)。このような表現型の有無を分析する方法は、本明細書に開示したものを含むが、これらに限定されるわけではない。いくつかの好ましい態様において、トランスジェニック動物は、さらに成長が増大もしくは減少された腫瘍または癌の徴候を示す。

20

【0260】

本発明のトランスジェニック動物は、薬物 (たとえば、癌療法) スクリーニングにおける使用が見いだされる。いくつかの態様において、試験化合物 (たとえば、癌の治療に有用であると疑われる薬物) および対照化合物 (たとえば、偽薬) が、トランスジェニック動物および対照動物に投与されて効果が評価される。

【0261】

トランスジェニック動物は、様々な方法により作製することができる。いくつかの態様において、様々な発生段階の胚細胞を使用してトランスジェニック動物を作製するために、導入遺伝子が導入される。胚細胞の発生段階に応じて、異なる方法が使用される。接合子は、微量注入の最適の標的である。マウスにおいて、雄の前核サイズは、直径およそ20 μ mに達し、DNA溶液1~2ピコリットル (pl) の再現性のある注入が可能である。遺伝子導入の標的としての接合子の使用は、ほとんどの場合において、最初の卵割前に注入されたDNAが宿主ゲノムに導入されるという大きな利点を有する (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 [1985])。結果として、トランスジェニック非ヒト動物の全ての細胞は、組み込まれた導入遺伝子を保持する。これは、一般に、生殖細胞の50%が導入遺伝子を持つので、初代の子孫への導入遺伝子の効率的伝達も招くと考えられる。米国特許第4,873,191号は、接合子の微量注入の方法を記述しており; この特許の開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0262】

その他の態様において、非ヒト動物への導入遺伝子の導入のために、レトロウイルス感染が使用される。いくつかの態様において、レトロウイルスベクターの卵母細胞の卵黄周囲への注入によって卵母細胞をトランスフェクトするために、レトロウイルスベクターが利用される (米国特許第6,080,912号、これは参照により本明細書に組み入れられる)。その他の態様において、非ヒト胚は、インピトロにおいて胚盤胞期まで培養することができる。この間に、割球は、レトロウイルス感染の標的となることができる (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260 [1976])。透明帯を除去するための酵素処理により、割球の効率的感染が得られる (Hogan et al., in Manipulating the Mouse Embryo, Co

50

ld Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1986])。導入遺伝子の導入に使用されるウイルスベクター系は、典型的には導入遺伝子を保持する複製欠損レトロウイルスである (Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 6927 [1985])。トランスフェクションは、ウイルス産生細胞の単層上での割球の培養によって容易かつ効率的に得られる (Stewart et al., EMBO J., 6 : 383 [1987])。または、感染は、後期に行うことができる。ウイルスまたはウイルス産生細胞は、胞胚腔へ注入することができる (Jahner et al., Nature 298 : 623 [1982])。ほとんどの初代は、組み込みがトランスジェニック動物を形成する細胞のサブセット内にのみ生じるため、導入遺伝子についてモザイクである。さらに、初代は、ゲノムの異なる位置に導入遺伝子の様々なレトロウイルス挿入を含んでいてもよく、これは一般に子孫において分離される。加えて、低効率ではあるが、妊娠中期の胚の子宮内レトロウイルス感染によって、導入遺伝子を生殖系列に導入することも可能である (Jahner et al., 前記[1982])。当技術分野において公知のトランスジェニック動物を作製するためにレトロウイルスまたはレトロウイルスベクターを使用するさらなる手段は、レトロウイルス粒子またはレトロウイルスを産生するマイトマイシンC処置した細胞の、受精卵または初期胚の卵黄周辺腔への微量注入を含む (PCT国際出願WO90/08832[1990]、並びにHaskell and Bowen, Mol. Reprod. Dev., 40 : 386 [1995])。

10

【0263】

その他の態様において、導入遺伝子が胚性幹細胞へ導入されて、トランスフェクションされた幹細胞を利用して胚が形成される。ES細胞は、適切な条件下における移植前の胚のインビトロ培養によって得られる (Evans et al., Nature 292 : 154 [1981]; Bradley et al., Nature 309 : 255 [1984]; Gossler et al., Proc. Acad. Sci. USA 83 : 9065 [1986]; およびRobertson et al., Nature 322 : 445 [1986])。導入遺伝子は、リン酸カルシウム共沈殿、プロトプラストまたはスフェロプラスト融合、リポフェクションおよびDEAE-デキストラン媒介したトランスフェクションを含む、当技術分野において公知の様々な方法によるDNAトランスフェクションによって、ES細胞へ効率的に導入される。導入遺伝子は、さらに、レトロウイルスを媒介した形質導入によって、または微量注入によってもES細胞へ導入される。このようなトランスフェクションされたES細胞は、その後、胚盤胞期胚の胞胚腔にこれらを導入した後に胚をコロニー形成し、生じるキメラ動物の生殖系列に寄与し得る (総説については、Jaenisch, Science 240 : 1468 [1988]を参照されたい)。トランスフェクトしたES細胞の胞胚腔への導入前に、トランスフェクトしたES細胞を様々な選択プロトコルに供して、導入遺伝子を組み込んだES細胞を濃縮してもよく、導入遺伝子には、このような選択手段を提供することを想定する。または、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、導入遺伝子が組み込まれたES細胞をスクリーニングしてもよい。この技術では、トランスフェクションされたES細胞を、胞胚腔へ導入する前に適切な選択条件下で増殖する必要がない。

20

30

【0264】

さらに他の態様において、遺伝子機能をノックアウトするため、または欠失突然変異体 (たとえば切断型突然変異体) を作製するために、相同組換えが使用される。相同組換えの方法は、米国特許第5,614,396号に記述されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0265】

実験

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい態様および局面を示し、さらに例証するために提供され、その範囲を限定するものと解釈すべきでない。

【0266】

以下の実験の開示においては、以下の略語を使用する：N (規定濃度) ; M (モル濃度) ; mM (ミリモル濃度) ; μ M (マイクロモル濃度) ; mol (モル) ; mmol (ミリモル) ; μ mol (マイクロモル) ; nmol (ナノモル) ; pmol (ピコモル) ; g (グラム) ; mg (ミリグラム) ; μ g (マイクログラム) ; ng (ナノグラム) ; l または L (リットル) ; ml (ミリ

50

リットル) ; μ l (マイクロリットル) ; cm (センチメートル) ; mm (ミリメートル) ; μ m (マイクロメートル) ; nm (ナノメートル) ; および (摂氏温度)。

【実施例】

【0267】

実施例1

前立腺癌のファージレイプロファイリング

本実施例は、前立腺癌に適用された本発明のファージレイプロファイリング法を記述する。

【0268】

A. 方法

患者集団および試料

診断時に、およびラジカル前立腺切除の前に、生検試験済みの臨床的限局性前立腺癌の参加者からの血清は、1995年1月～2003年1月の間にミシガン大学前立腺癌専門研究プログラム (Specialized Research Program in Prostate Cancer : SPORE) 組織/血清バンクによって収集した。全ての前立腺癌患者の平均年齢は、59.6 (41～74の範囲) であった。前立腺切除後の前立腺癌患者については、平均年齢およびPSA値は、それぞれ58.1および0.169ng/mlであった。前立腺癌の任意の既知の病歴のない肺腺癌患者 (平均年齢53.9) からの血清を使用した。対照として、癌の既知の病歴のない85人の年齢がマッチした男性 (平均年齢62.5、50～80の範囲) からの血清試料を研究のために使用した。全ての血清は、使用まで-20℃にてアリコートにて貯蔵した。

【0269】

T7ファージディスプレイ前立腺癌cDNAライブラリーの構築

総RNAを標準的Trizolプロトコルに従って、6人の前立腺癌組織試料から別々に単離した (Dhanasekaran et al., Nature 412, 822-826. (2001))。それぞれのRNA調製の完全性は、 A_{260}/A_{280} 比が1.8を超えること、およびゲル電気泳動で確認することによって評価した。6人の組織からの同量の総RNAを合わせてプールを作製した。ポリ(A) RNAは、Straight A's mRNA Isolation Systemプロトコル (Novagen) に従って総RNAプールから精製した。合計8.7 μ gのmRNAを溶出して、その完全性をゲル電気泳動で判断した。

【0270】

OrientExpression cDNA Synthesis and Cloning System (Novagen) を使用してT7ファージ前立腺癌cDNAライブラリーを構築した。N末端およびC末端のアミノ酸配列の表現を確認して、オリゴ(dT)-プライムされた鎖に由来する固有の3'バイアスを除去するために、それぞれからの同量のmRNAを使用して、方向性のオリゴ(dT)プライマーおよびランダムプライマーを平行して使用して2つのcDNAライブラリーを構築した。

【0271】

ベクター・ライゲーションおよびT7パッケージング後に、2つのcDNAファージディスプレイ・ライブラリーを構築して、オリゴ(dT)プライマー・ライブラリーについては 4.2×10^6 pfuおよびランダムプライマーライブラリーについては 2.2×10^6 pfuでのブランク検定によって、それぞれライブラリー力価を決定した。2つのライブラリーからのファージ粒子を合わせてファージ・ライブラリー・プールを作製した。増幅後、グリセロールを添加して、ライブラリーを-80℃にて貯蔵した。

【0272】

ライブラリーの増幅

カルベニシリンを含む5ミリリットルのLBを、新たに画線したプレートからのBLT5615の単一コロニーと共に、37℃にて一晚接種した。一晚の培養物を、カルベニシリンを含む100mlのLBに添加して、 OD_{600} が0.5まで培養した。1mMのIPTGを添加して、細胞をさらに30分間培養した。適切な体積の培養を0.001～0.01の感染効率(MOI) (すなわち、それぞれのpfuについて100～1000細胞) にてファージ・ライブラリーを感染させた。溶解が観察されるまで、感染させた細菌を37℃にて1～2時間振盪しながらインキュベートした。次いで、ファージ可溶化液を8000 \times gにて10分間回転させて透明にした。上清を収集し、-80℃にて

10

20

30

40

50

貯蔵した。

【0273】

前立腺癌に特異的なファージ-エピトープクローンのためのバイオパニング

前立腺癌と特異的に会合するIgGに結合するファージエピトープを濃縮するために、ポジティブおよびネガティブ選択ストラテジーを行った。最初に、10個の正常な血清からの精製されたIgGプールに対するファージ・ライブラリーをプレ吸着によって、プレクリーニング工程を使用して、非特異的エピトープ-クローンを除去した。次に、プレクリアされたファージ・ライブラリーを19の限局性前立腺癌患者の血清から精製されたIgGのプールに対して選択した。次いで、プロテインA/Gアガロースビーズ (Pierce) を使用して、前立腺癌患者の血清からIgGを精製した。簡潔には、10 μ lのプロテインA/Gアガロースビーズを1.5mlのエピペンドルフチューブに入れ、1 \times PBSで2回洗浄した。洗浄したビーズを4 \times にて1時間、1%のBSAでブロッキングした。次いで、ビーズを、1%のBSAに1:50希釈にて対照または前立腺癌患者からの15 μ lの個々の血清と共に4 \times にてインキュベートした。一晚のインキュベーション後、ビーズを1000gにて2分間遠心分離することによって1 \times PBSで洗浄した。3回の洗浄後、10 μ lの1 \times PBSをそれぞれのチューブに添加して、10人の対照血清および19人の前立腺癌血清のチューブからのプロテインA/G-IgG複合体の10個のチューブを合わせて、それぞれ対照および前立腺癌のIgGプールを作製した。プロテインA/Gビーズと会合したこれらの対照および前立腺癌IgGプールをその後のバイオパニングのための株として4 \times に貯蔵した。

10

【0274】

20マイクロリットルの対照IgGプールを、10%のBSAで1:40に希釈した30 μ lの増幅したファージ・ライブラリー・プールと共に4 \times にてインキュベートした。2時間後、混合を1000gにて2分間遠心分離した。非特異的に結合したファージ粒子を伴うビーズを廃棄して、上清を収集した。次に、上清を30 μ lの前立腺癌IgGプールと共に4 \times にて一晚インキュベートした。混合物を1000gにて2分間遠心分離し、上清を廃棄した。結合したファージを溶出するために、100 μ lの1%のSDSを添加して、T7ファージ粒子を崩壊させることなく抗体-抗原反応を分解するために、10分間室温でインキュベートした。結合したファージを8分間5500gにて遠心分離することによってビーズから除去した。溶出したファージを増幅のための10mlのBLT5615細胞の培養物に移した。前立腺癌特異的エピトープファージを濃縮するために、5サイクルの親和性選択およびバイオパニングを実施した。

20

30

【0275】

ファージ-エピトープマイクロアレイの構築

第5サイクルのバイオパニングからのファージ・ライブラリー ($\sim 10^{10}$ pfu) を1:10⁸に希釈して、カルベニシリンを含むLB寒天プレート上で培養させた。2300の総数のランダムファージコロニーを採集して、96ウェルプレートにて増幅した。ファージ可溶化液をFASTスライド (Schleicher & Schuell) 上にスポットして、GMS 417プリンター (Affymetrix) を使用して高密度ファージ・エピトープ・マイクロアレイを作製した。いずれのcDNAの挿入も伴わないT7ファージおよび1:1000で希釈した抗ヒトIgGを、それぞれネガティブおよびポジティブ対照として3つ組でスポットした。アレイを室温で一晚乾燥させた。処理の前に、アレイを0.1%のtween-20を含む4%の脱脂乳/PBS中で簡単にすすぎ、結合していないファージを除去して、次いで、直ちにブロッキング溶液として4%の脱脂乳/PBSに室温で1時間移す。乾燥させることなく、それぞれ1:500および1:5000の希釈のヒト血清およびT7-タグ抗体 (Novagen) を含む2mlのPBSをねじぶたハイブリダイゼーション・チューブ内のスライド表面に適用した。免疫応答の特異性を試験するために、反応性の血清には、50倍多い量 (v/v) の細菌可溶化液 (OD₆₀₀ 0.5) で予め吸着することにより、最初に非特異的活性をクエンチし、次いで、後述するようにインキュベーションのために使用した。アレイを前立腺癌または対照個体からの血清と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、PBS/0.1%のTween-20の溶液中で5回、それぞれ5分間洗浄した。全ての洗浄液は、室温で行った。

40

【0276】

50

洗浄後、アレイを暗闇で1:5,000の希釈にてCy3標識されたヤギ抗マウス抗体およびCy5標識されたヤギ抗ヒト抗体 (Jackson ImmunoResearch) を含む2mlのPBSと共に両方について1時間インキュベートした。PBS/0.1%のTween-20の溶液を使用して、5回の洗浄をそれぞれ5分間行った。アレイを500gにて5分間遠心分離することによって乾燥させて、走査した。

【0277】

ファージ-エピトープマイクロアレイの走査および一次解析

全てのスライドは、532nmおよび635nmレーザー (Axon Laboratories) を使用して走査した。走査後、アレイ・イメージをGenePixソフトウェア (Axon Laboratories) を使用して定量化した。実験計画に従って、スポットするファージエピトープの量のわずかな変動を制御するために、Cy5/Cy3の中央値を利用した。それぞれのスポットについてのCy5/Cy3の比をネガティブT7空スポットのCy5/Cy3の中央値によって減算し、それぞれのチップ上のT7空ファージについてのシグナルが、アレイ全体についてのシグナル強度と高度に相関して観察された。それぞれのクローンの平均値がアレイ全体でゼロであり、かつ標準偏差が1であるように、Z-変化をクローンに適用した。

10

【0278】

正規化したデータをClusterおよびTreeView (Eisen et al., Proc Natl Acad Sci U S A 95, 14863-14868 (1998)) を使用して二元配置クラスタリング解析に供した。データをフィルターするために、1.2よりも大きな絶対値をもつ少なくとも1つの観察の基準を適用して、186個のクローンを選択した。教師なし階層的クラスタリング解析を相関 (非中心) 相似マトリックスおよび平均連結クラスタリング法で行った。

20

【0279】

体液性の免疫応答プロファイルの教師あり解析

ファージエピトープクローンに対して何百もの血清を効率的にスクリーニングするために、上記した高密度エピトープマイクロアレイの一次解析から選択した180個のファージ・クローンに含まれる集束タンパク質マイクロアレイを利用した。この集束マイクロアレイには、ネガティブ対照として4つのT7空のファージを含んだ。この小さなマイクロアレイ・プラットフォームを使用することによって、前立腺切除前に得られた前立腺癌患者からの59個の血清および年齢がマッチした男性からの70個の対照血清を含んだ129個の血清を上で述べたようにスクリーニングした。

30

【0280】

129試料からの全データセットを使用して、アルゴリズム/K-最近接 (GA/KNN) (この研究ではk=3) 法 (Li et al., 4, 727-739 (2001)) におけるリーブ・ワン・アウト・クロス・バリデーション (leave one out cross validation: LOOCV) ストラテジーによる分類予測モデルを構築した。生のファージ-エピトープ・マイクロアレイ・データを高密度エピトープマイクロアレイについて記述したように正規化した。次いで、正規化したアレイデータを、これらのGA解の存在頻度に基づいてこれらをランク付けすることによって、特徴エピトープの選択およびエピトープの相対的な予測的重要性の評価のために、GAに適用した。異なる数の最上エピトープを使用して、異なるKNN予測モデルを構築した。

40

【0281】

予測精度および誤りは、異なるKNNモデルの性能を評価するためのLOOCVを使用して算出した。最後に、トップランクの22クローンを、特異性および感度に対するこれらの最高の性能に基づいて選択した。予測感度および特異性は、癌および対照群において誤って分類された試料の数に基づいて計算した。

【0282】

非依存的なデータに対する分類予測

以前に記述したように (Golub et al., Science 286, 531-537 (1999))、「試験試料」を予測するために加重投票スキームを採用した。簡潔には、特徴セットにおけるそれぞれのエピトープには、分類0または1のための加重票を投ずる: $V_x = T_x (e_x - b_x)$ 、式中、 e_x は、エピトープxの発現値、 T_x はトレーニングセットのエピトープxの2つの分類平均を比

50

較するためのt-統計値であり、および b_x は、 $(\mu_{class0} + \mu_{class1}) / 2$ である。分類0または1のための最終票は、 $sign(xV_x)$ であり、予測強度(PS)またはウイニングクラスの予測における信頼は、 $(V_{win} - V_{lose}) / (V_{win} + V_{lose})$ であり、式中、 V_i は、分類*i*のための票である。

【0283】

統計解析

主成分分析(PCA)(Crescenzi and Giuliani, FEBS Lett 507, 114-118 (2001))を22のファージ・クローンのエピトミックプロファイルに適用した。最初の5成分は、データセットの変異の90%を含んでおり、その後二成分診断結果として癌対正常をロジスティック回帰フィッティングする際の共変動として使用した。適合された確率が得られ、ROC曲線を作製してエピトミックプロファイルの予測精度を評価するために使用した。全ての統計分析は、SPSS 11.1 (SPSS Inc)で行った。ファージエピトープ体液性応答についての平均値は、平均値の95%の信頼区間を示すエラーバーと共に平均プロットとして示した。0.05未満のP値を統計学的に有意であるとみなした。

【0284】

体液性応答候補の配列解析

上位22ファージエピトープクローンを、T7カプシドフォワードおよびリバースプライマー(Novagen)を使用してPCRによって増幅した。簡潔には、2 μ lの $\sim 10^{10}$ pfuの力価である新鮮なファージ可溶化液を100 μ lの10mM EDTA、pH 8.0と共に60 $^\circ$ Cにて10分間インキュベートした。14,000 \times gにて3分間遠心分離した後に、2 μ lの変性させたファージを、標準状態下で100 μ l体積のPCR反応のために使用した。PCR産物は、臭化エチジウムを含む1%のアガロースゲルで確認した。製造業者のプロトコルに従って、MultiScreen-FBフィルタープレート(Millipore)で精製した後、PCR産物を、T7カプシド・フォワードプライマーを使用してシーケンシングしてcDNA挿入物を決定した。DNA配列および潜在性タンパク質配列は、NCBI BLASTを使用して整列させた。

【0285】

体液性応答候補を確認するためのELISAの開発

ファージエピトープに関して、異なる患者の血清とこれらの免疫応答を確認するためにELISAを開発した。96ウェルMAX-SORBマイクロタイタープレート(NUNC)を1 \times PBSを使用して1:1000に希釈した100 μ lのT7-タグ抗体(Novagen)で、オービタルシェーカーで4 $^\circ$ Cにて一晩コーティングした。全ての添加は、他に述べない限り、100 μ lの体積であった。血清および二次検出試薬の希釈は、1:5 HPE緩衝液(R&D systems)に行った。EL404マイクロプレート自動洗浄機(Bio-Tek)を使用してPBS/Tween-20で5回洗浄後、プレートを、最初に200 μ lの2%のBSA/PBSで2時間、続いて200 μ lのsuperblock(Pierce)で2時間、両方とも室温でブロッキングした。ネガティブ対照としてのファージおよびT7空ファージは、別々に1:25に、 $\sim 10^9$ pfuの最終力価に希釈した。上記のように洗浄後、プレートを希釈した100 μ lのファージと共にRTにて2時間インキュベートした。段階希釈した(1:500、1:1000、および1:2000)血清試料をそれぞれのウェルに添加して、RTにて1時間インキュベートした。洗浄後、次いでプレートを1:10000希釈したHRP結合抗ヒトIgGと共にRTにて1時間インキュベートした。次いで、プレートを最終洗浄後に100 μ lのTMB基質系(Sigma)を使用して30分間発色させた。反応を50 μ lの1.5Mの H_2SO_4 を使用して止めて、ELx800汎用マイクロプレートリーダー(Bio-Tek)を使用して450nmにて読み込んだ。

【0286】

体液性応答候補の遺伝子発現の展望研究

4つの遺伝子、すなわち、BRD2、eIF4G1、RPL13A、およびRPL22の遺伝子発現レベルを、ONCOMINEを使用して研究した。簡潔には、それぞれの遺伝子をデータベース上で検索して、前立腺癌を選択することによって結果をフィルタリングした。 $p < 0.05$ をもつ良性前立腺、前立腺癌、および/または転移性前立腺癌の研究分類からのデータを使用して、SPSS 11.1でボックスプロットをプロットした。それぞれの群についてのP値は、スチューデントt検定を使用して算出した。

【0287】

免疫プロット解析

組織を50mmol/LのTris-HCl、pH 7.4、1%のNonidet P-40 (Sigma)、および完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含むNP-40溶解緩衝液中にホモジナイズした。15 µgのタンパク質抽出物をSDS試料緩衝液と混合して、還元条件下で4~15%の直線勾配SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。分離されたタンパク質をポリビニルジフルオリド膜 (Amersham) 上に移した。次いで、膜をブロッキング緩衝液 (0.1%のTweenを含むTris-緩衝食塩水 (TBS-T) および5%の脱脂乾燥乳) 中で1時間インキュベートした。膜を精製した1:4000希釈のeIF4G1ウサギ・ポリクローナル (Bethyl)、1:400希釈のRPL22マウス・モノクローナル (BD biosciences)、1:400希釈のBRD2ウサギ・ポリクローナル (Abgent)、および1:4000希釈にて使用したRPL13aウサギ・ポリクローナル (Dr. Paul Foxの親切な贈与) と共にインキュベートして、4 にて一晩インキュベートした。TBS-T緩衝液で3回洗浄後、膜を西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギIgGまたはウサギ抗マウスIgG HRP結合体 (Amersham) と1:5000にて共に、室温で1時間インキュベートした。

10

【0288】

TBS-TおよびTBSでのプロットを洗浄した後に、ECL検出系 (Amersham) およびオートラジオグラフィーでシグナルを視覚化した。同等の負荷をモニターするために、膜を1:25,000希釈の抗ヒトGAPDH抗体 (Abcam) と共に2時間インキュベートして、シグナルを視覚化した。

20

【0289】

組織マイクロアレイ (TMA) および免疫組織化学

広範囲の前立腺組織の全体にわたるインサイチューでのeIF4G1タンパク質の発現を決定するために、良性前立腺組織、限局性前立腺癌、および転移性前立腺癌で構成される前立腺癌進行TMAを使用した。電子レンジ内においてクエン酸緩衝液pH 6.0中でスライドを15分間加熱することによって抗原回収を行った。ウサギ抗eIF4G1 (Bethyl) 抗体を加え (1:100希釈)、室温で1時間インキュベートした。二次抗マウス抗体アビジン抱合体を洗浄前に加えた。酵素反応は、ストレプトアビジン・ビオチン検出キット (Dako) を使用して完了した。

【0290】

免疫蛍光および共焦点顕微鏡観察

前立腺癌組織切片スライドをキシレン中に浸漬してパラフィンを除去した。圧力釜においてクエン酸緩衝液pH6.0中でスライドを15分間加熱することによって抗原を回収した。次いで、スライドをPBS-T中で5%の正常なロバ血清で1時間ブロッキングした。ウサギ抗eIF4G1 (Bethyl) 抗体およびマウス抗Eカドヘリン (BD biosciences) 抗体の混合物をスライドにそれぞれ1:40および1:250希釈にて添加して、室温で1時間インキュベートした。次いで、スライドを二次抗体 (1:1000希釈の抗マウスAlexa 488および抗ウサギAlexa 555) と共にインキュベートし、1時間インキュベートした。PBS-TおよびPBSでスライドを洗浄した後に、スライドを、DAPIを含むvectashield封入剤を使用してマウントした。共焦点イメージは、紫外線、アルゴン、およびヘリウムネオン1光供与源を使用して、Zeiss LSM510 META (Carl Zeiss) イメージングシステムで撮影した。3色イメージをTIFF画像としてエクスポートし、色のバランスをとった。

30

40

【0291】

B. 結果

前立腺癌のエピトミック・バイオマーカーを同定するために本発明に使用される方法の概要を図1に記述してある。前立腺癌のためのT7ファージディスプレイ・ライブラリーを開発するために、RNAを臨床的限局性癌疾患である6人の患者に由来する前立腺癌組織から単離した。(3人の患者は、グリーソン等級6であり、3人の患者はグリーソン等級7の前立腺癌である)。広範囲にわたるエピトープを作製するために (両方ともC末端およびN末端エピトープを示す)、オリゴ (dT) およびランダムプライマーを使用して平行したライブラリーを構築した。

50

【0292】

一旦、T7ファージ系にパッケージングされると、ライブラリーからのエピトープは、ファージの表面上のカプシド10Bタンパク質との融合タンパク質として発現された。これは、血清において見いだされる潜在的自己抗体を捕獲するための「ベイト」として役立つ。前立腺癌患者において体液性応答を特異的に生じるエピトープを濃縮するために、ファージ-エピトープ・ライブラリーを5ラウンドのバイオパニングに供した(図1)。非特異的免疫応答を除去するために、ファージエピトープ粒子を10人の対照個体から単離された免疫グロブリン(IgG)のプールに対して予め吸着させた。次いで、「フロースルー」または非結合上清を、臨床的限局性前立腺癌である19人の患者(患者に関する臨床的および病理的情報については、図4、5、および6を参照されたい)のプールからのIgGと共にインキュベートすることによって、前立腺癌特異的エピトープを濃縮した。プロテインA/Gビーズを使用して、前立腺癌患者に由来する抗体に特異的に結合したファージ-エピトープ粒子を単離した。結合したファージを溶出して、細菌内で増幅し、こうして1ラウンドのバイオパニングを完了した(図1)。5ラウンドのバイオパニングの後、プールには、前立腺癌患者における体液性免疫応答を特異的に誘発するエピトープが濃縮されることが予想される。およそ2300(2.3K)個のファージ-エピトープクローンをランダムにバイオパニングした材料から選択してタンパク質マイクロアレイを作製した。一旦、マイクロアレイ形式で、これらの濃縮されたファージエピトープクローンを使用して体液性免疫応答マーカーについて血清試料を調べる。

10

【0293】

この2.3Kのファージ-エピトープマイクロアレイを使用して、前立腺癌患者および対照からの血清を評価した。緑色蛍光色素(Cy3)を使用してタンパク質スポットのための対照としてのカプシド10B融合タンパク質のレベルを測定し、赤色蛍光(Cy5)を使用して結合したIgG(図1)のレベルを測定する二色系を使用した。したがって、Cy5/Cy3が増大されることにより、様々なレベルの免疫応答を表した。初期の発見アプローチとして、前立腺癌患者由来の20個の血清および11個の対照からなる31個の血清試料を評価した。前立腺癌患者由来の大部分の血清は、マイクロアレイ上のファージ-エピトープクローンと反応する抗体レパートリーを示したが、一方で大部分の対照は示さなかった。正規化後、少なくとも1つの血清試料において1.2より大きい絶対値をもつCy5/Cy3比を有するエレメントについてデータをフィルターした。これにより、186個のファージ-エピトープクローンを生じ、これをその後の解析のために使用した。教師なし学習法を使用して、これらの免疫応答性クローンからのCy5/Cy3値を階層的にクラスター形成させた。前立腺癌患者からの血清と対照からのものを2つの主なクラスターに分けた。主に前立腺癌患者からの血清を含むクラスターの試料は、特異的ファージエピトープクローンに対して強い体液性応答を示した(黄色の強度によって表してある)。この31個の血清のセットでは、前立腺癌コホート並びに対照群の両方から誤って分類された試料が1つあった。これにより、それぞれ95%および91%の感度および特異性を生じた。

20

30

【0294】

試験した血清の集団を拡大するために、教師なし解析(上記)並びにさらなる対照エレメント(すなわち、T7空ファージ)に使用される180個のクローンからなる集束ファージ-エピトープマイクロアレイを開発した。これらの集束タンパク質マイクロアレイを使用して、前立腺癌であることが生検で確認された59人の患者および70人の対照を含む129人の血清試料を評価した。合計176個のエピトープ・クローン(4つのネガティブクローンを除く)を使用する教師なし解析により、129人の血清試料について80%の特異性および83%の感度が明らかになった(図7を参照されたい)。分類精度を増大させるために、母数によらないパターン認識アプローチ、k-最近接法(KNN)と組み合わせた遺伝的アルゴリズム(GA)を使用することによって、分類予測モデルを開発して、種々の血清試料を識別した。試料分類のためのそれぞれのエピトープの予測重要性を評価して、次いでエピトープにランクを付けて、一番上のエピトープにランク1を割り当てた。11個の異なるKNN分類予測モデルを異なる数の最上位のエピトープ(10、20~26、30、50、および100個の形質)を

40

50

使用して構築し、リーブ-ワン-アウト-クロス-バリデーション (leave-one-out-cross-validation) によってこれらの予測性能を評価した。予測精度は、より多くのエピトープがモデルに含まれるにつれて改善されたが、一方で、あまりに多くのエピトープでは、モデルに過剰な誤りが導入され、したがって予測精度が減少する。22個のファージエピトープクローンでは、血清試料を分類する際に最高の性能を生じ、97%の特異性 (70人の対照のうちの2人が、誤って分類された) および88%の感度 (59人の前立腺癌患者のうちの7人が、誤って分類された) であった。したがって、実質的により大きな血清のコホートでは、22個のファージエピトープに対する体液性応答に基づいて、前立腺癌状態を予測することが可能であった。

【0295】

次に、体液性応答マーカーの多重パネルの受信者動作特性 (ROC) により、予測精度を査定するために評価した。ROC曲線を作成するために、22個の予測的ファージ・エピトープバイオマーカーを共変動とみなして、体液性免疫応答からのデータセットの規模を主成分解析 (PCA) によって減少させた。変動の90%の原因である最初の5成分を、前立腺癌対対照を予測するためのロジスティック回帰に適用した。ロジスティックモデルからの適合した確率 (全体のモデルに対して $p < 0.001$) を感度および特異性を算出するための閾値位置として使用した (図2A)。曲線下面積は、0.95に等しかった。

【0296】

教師付き解析によって同定された上位22個の識別クローンをシークエンシングした。22個のクローンのうちの6つは、インフレイムであり、公知の発現配列であることを見いだした。これらの6つには、プロモドメイン含有タンパク質2 (BRD2)、真核生物翻訳開始因子4-1 (eIF4G1)、リボソームタンパク質L22 (RPL22)、リボソームタンパク質L13A (RPL13A)、HES1 (hairy and enhancer of split 1、ショウジョウバエの相同体)、および仮想的タンパク質XP_373908が含まれた。これらのタンパク質のいずれも、過剰発現タンパク質として、または体液性応答ターゲットとしてのいずれとしても、以前に前立腺癌と関連していなかった。仮想的タンパク質XP_373908を除いて、インフレイムのファージ-エピトープクローンのうちの4つが、迅速に増殖している細胞における転写または翻訳の調節に参与する細胞内タンパク質であった。BRD2 (RING3としても公知である) は、ヒト白血病において上方調節されることが公知である核転写因子リン酸化酵素である (Denis and Green, *Genes Dev* 10, 261-271 (1996); Denis et al., *Cell Growth Differ* 11, 417-424 (2000))。BRD2は、ヒストンH4上のアセチル化されたリジン12と特異的に相互作用することが示されている (Kanno et al., *Mol Cell* 13, 33-43 (2004))。eIF4グループの開始因子は、メッセンジャーRNA (mRNA) の5'キャップ領域の認識、並びにmRNA構造の巻き戻しに重要である (Gingras et al., *Genes Dev* 15, 807-826 (2001))。これらの中で、eIF4G1は、開始前複合体の構築において中心的役割を果たす (Morino et al., *Mol Cell Biol* 20, 468-477 (2000))。eIF4G1は、頭頸部扁平上皮癌 (Cromer et al., *Oncogene* (2003)) および扁平上皮肺癌腫患者 (Bauer, C. et al. *Int J Cancer* 98, 181-185 (2002); Bauer et al., *Cancer* 92, 822-829 (2001)) において過剰発現されて、体液性免疫応答を生じることが示されている (Brass et al., *Hum Mol Genet* 6, 33-39 (1997))。eIF4G1の過剰発現は、NIH3T3細胞を形質転換することが示されている (Fukuchi-Shimogori et al., *Cancer Res* 57, 5041-5044 (1997))。RPL22およびRPL13Aは、60Sサブユニットの構成要素である細胞質リボソームタンパク質である (Mazumder et al., *Cell* 115, 187-198 (2003))。RPL22は、肺癌において過剰発現されることが示されている (Miura et al., *Cancer Res* 62, 3244-3250 (2002); Racz et al., *Eur J Cancer* 35, 641-646 (1999))。RPL13aは、インターフェロン活性化翻訳阻害因子 (GAIT) の候補として同定され、したがって転写物特異的な翻訳調節を媒介する (Mazumder et al., 前記)。HES1は、achaete-scuteファミリーの塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス転写因子である。ヒトachaete-scute相同体1 (hASH1) は、延髄の甲状腺癌および小細胞肺癌などの神経内分泌癌において高度に発現される。HES1遺伝子は、ショウジョウバエhairy and Enhancer-to-splitに構造的相同性をもつヘリックス・ループ・ヘリッ

10

20

30

40

50

クス転写リプレッサーをコードする。HES1タンパク質は、大部分の非神経内分泌ヒト肺癌株化細胞において大量のレベルで検出される。

【0297】

残りの17個の前立腺癌特異的ファージエピトープクローンは、発現遺伝子の非翻訳領域に、または公知の遺伝子のコード配列のフレームの外のいずれかにあった(図11および12を参照されたい)。これらのクローンは、構造的に発現タンパク質に類似する「ミモトープ(mimotopes)」またはエピトープであるが、タンパク質配列レベルにて無関係であるか、または弱い関係である可能性が高い。残りの17個の識別クローンのうちの3つは、自己複製を含む種々の細胞プロセスに関係するPolycomb Group (PcG)タンパク質であるBMI1遺伝子の5'非翻訳領域(UTR)(5'-UTR_BMI1)に由来するオーバーラップ配列によってコードされるエピトープである(Park et al., Nature 423, 302-305 (2003); Molofsky et al., Nature 425 962-967 (2003))。PcGタンパク質は、多成分複合体として機能する。5'-UTR_BMI1である3つのファージ・クローンによって共有されるペプチド配列のタンパク質BLAST解析により、アンドロゲン受容体(図12)のグリシン・リッチな範囲に有意な相同性(E値= 5×10^{-4})を同定した。アンドロゲンは、前立腺癌進行において重要な役割を果たすことが公知である(Singh and Figg, Cancer Biol Ther 3 (2004); Taplin et al., J Cell Biochem 91, 483-190 (2004))。これは、複数の独立したクローンによって表された本発明の方法によって拾われた唯一のファージエピトープクローンであり、前立腺癌患者(図2B、C)におけるこの体液性応答の整合性および堅牢性を示唆する。1985年に、LiaoおよびWitteは、37%の男性および3%の女性だけがアンドロゲン受容体に対して有意な自己抗体を有したことを報告した(Liao and Witte, Proc Natl Acad Sci U S A 82, 8345-8348 (1985))。66歳を超える男性は、より若い男性または女性よりもアンドロゲン受容体に対して高い力価の自己抗体を有することが多かった。

10

20

30

40

50

【0298】

ファージ-エピトープ・タンパク質マイクロアレイを使用して本発明者らが行った観察を確認するために、5'-UTR_BMI1、eIF4G1、およびRPL22を含むファージエピトープクローンのうちの3つを使用してELISAを作製した。ファージ粒子を精製して、その後前立腺癌患者および対照に由来する代表的血清とインキュベーションするために、96ウェルプレート上にコーティングした。図2Bに示したように、前立腺癌患者は、対照と比較して、これらのエピトープに対して体液性応答を生じる。5'-UTR_BMI1クローンに対する体液性免疫応答の力価を、図2Cに代表例として示してある。

【0299】

22クローン・エピトミックプロファイルを確認するために、48人の臨床的限局性前立腺癌患者(前立腺切除前)、14人の前立腺癌患者(前立腺切除後)、11人のホルモン不応性前立腺癌患者、15人の年齢がマッチした対照、および10人の肺癌患者に由来する血清の独立したコホートを使用した。予測モデルは、129人の試料の「トレーニング」コホートに由来する22個のファージ・エピトープ・プロファイルを使用して、加重投票アルゴリズムによって構築した(図8)。独立した試験コホートとして、このモデル(図9)を使用して、63人の試料(48人の限局性前立腺癌および15人の対照)に対して分類予測を行った。全体で、15人の対照のうちの2人および42人の癌からの8人だけが、誤って分類され、87%の特異性および81%の感度を生じた。さらなる6人の癌試料は、0.1の低い予測強度(信頼度)のために、分類されないものとみなした(図8、9、および10を参照されたい)。前立腺切除後に、体液性応答は、一般に、特に再発を示さなかった患者において減少し、免疫応答が「免疫原」の除去によって減弱されることを示唆する。また、前立腺切除後PSA再発を示す4/4患者は、22エピトープ体液性応答を維持した。ホルモン不応性疾患である11人の患者のうちの3人だけが、22個の選択されたエピトープに対して体液性応答を示した。これは、体液性免疫応答が、進行型前立腺癌または抗アンドロゲンおよび/または化学療法で治療された患者において減弱されていることを示唆する。この22エピトープ・プロファイルが、前立腺癌に対して特異的かどうかを決定するために、10人の肺癌患者に由来する血清を調べた。肺癌患者に由来する2/10の血清のみが、前立腺癌エピトープに応答性

を示した。これは、このプラットフォームを使用して、前立腺癌患者に関して達成される80%以上の感度とは対照的であり、エピトミックプロファイルが、前立腺癌特異的であることを示唆する（比率検定、 $P < 0.001$ ）。

【0300】

4つのインフレイムのファージエピトープクローン（図3A）が前立腺癌において調節不全にされているかどうかを決定するために、公的に利用できる前立腺癌遺伝子発現データの展望研究を行った（LaTulippe et al., *Cancer Res* 62, 4499-4506（2002）；Luo et al., *Mol Carcinog* 33, 25-35（2002）；Luo et al., *Cancer Res* 61, 4683-4688.（2001）；Singh et al., *Cancer Cell* 1, 203-209.（2002）；Welsh et al., *Cancer Res* 61, 5974-5978.（2001）；Dhanasekaran et al., 前記）。このインシリコ解析では、4つのインフレイムのファージエピトープクローン（図3B）の過剰発現に関する複数プロファイリング研究における十分な証拠があることを示唆した。良性前立腺および前立腺癌組織抽出物の免疫プロット分析では、タンパク質レベルでこれらの体液性応答候補の過剰発現を証明し、インシリコ解析を確認した（図3C）。

【0301】

インサイチューでの体液性応答候補の発現を評価するために、免疫組織化学および免疫蛍光解析を行った。免疫プロット分析（図3C）のために使用した4つの抗体のうちの1つが、組織を染色する目的に適合した。これらの適用に関して良好であった抗体は、eIF4G1タンパク質に向けられた。eIF4G1の弱い細胞質の染色が、良性前立腺上皮において観察され、強力な染色が、臨床的限局性前立腺癌において観察された。これらの免疫組織化学的解析は、さらにeIF4G1に対する免疫蛍光染色によっても確認された。良性上皮におけるネガティブ染色と比較して、eIF4G1の強力な細胞質染色が前立腺癌上皮において観察された。

【0302】

要約すると、本実施例は、内因性の体液性免疫応答に基づいて癌を検出するために、タンパク質マイクロアレイとファージディスプレイを組み合わせる強力なアプローチを記述する。このアプローチは、マーカーの多重セットに依存するので、PSAなどの単一のバイオマーカーをモニターすることによる欠点を被る可能性が低い。

【0303】

実施例2

体液性免疫応答のエピトミックプロファイリングによる乳癌検出

本実施例は、乳癌における体液性免疫サインの研究を記述する。ファージディスプレイ乳癌cDNAライブラリーは、商業的にNovagenから購入した。10人の乳癌血清および10人の正常な対照に由来するIgGのプールを使用して、ライブラリーを乳癌特異的ファージエピトープについて濃縮した。合計2,304のファージ・クローンを採集して、スライド上にプリントし、高密度ファージ・エピトープ・マイクロアレイを作製した。このプラットフォームを適用することによって、42人の乳癌および35人の正常な対照を含む77人の血清試料をスクリーニングした。イメージおよびデータを解析して、前立腺癌と同様に正規化した（実施例1を参照されたい）。予測子を構築するために、合計28人の癌および24人の対照をランダムに選択して、トレーニングセットとして割り当て、残りの14人の癌および11人の対照をテストセットとして役立てた。最高の性能のクローンを1000×順列でのt検定によってトレーニングセットから選択した。合計21のクローンを81%の特異性（5/24）および79%の感度（6/28）で選択した。独立したテストセットでこれらの21個のファージエピトープを適用するとき、同じレベルの精度に達し、91%の特異性（10/11）および50%の感度（7/14）であった。

【0304】

実施例3

肺腺癌における診断および予後に関連する体液性免疫応答プロファイル

A. ファージ-エピトープ・タンパク質マイクロアレイの構築

肺癌のエピトミック生物マーカーを同定するために、前立腺癌のプロファイリングについて上記したアプローチ（実施例1を参照されたい）を使用した（図13）。肺癌のための

ファージディスプレイ・ライブラリーを開発するために、総RNAを7人の肺癌組織（3人の肺腺癌および4人の扁平上皮）から単離した。次いで、6人の腺癌、4人の扁平上皮、および3人の非癌対照からの個々の血清試料を使用して、親和性精製（バイオパニング）によって、ファージ・ライブラリーを濃縮した。こうして、合計13個の濃縮されたファージ・ライブラリーを作製した。4ラウンドのバイオパニング後、肺癌患者または対照において体液性免疫応答を特異的に誘発するエピトープを濃縮した。全体として、エピトープマイクロアレイを作製するために、13個のバイオパニングしたライブラリーから2304個のファージ-エピトープクローンをランダムに選択した。マイクロアレイ形式において一旦、これらの濃縮されたファージエピトープクローンを使用して、体液性免疫応答マーカーについて血清試料を調べた。

10

【0305】

この高密度ファージ-エピトープマイクロアレイプラットフォームを使用して、150人の肺腺癌および101人の非癌対照に由来する血清を評価した。上記の通りに（実施例1を参照されたい）、緑色蛍光色素（Cy3）を使用してタンパク質スポットのための対照としてのカプシド10B融合タンパク質のレベルを測定し、赤色蛍光（Cy5）を使用して結合したIgGのレベルを測定する二色系を使用した。こうして、Cy5/Cy3が増大されることにより、様々なレベルの免疫応答が表された。正規化後、データをその後の診断および生存分析のために使用した。結果を表1および2に示してある。

【0306】

（表1）トレーニング/テストセット試料のための臨床情報

20

	トレーニングセット	テストセット
腺癌 (n)	75	75
年齢の平均 (年)	63.6	66.3
年齢の範囲	44-90	34-88
男性	37	37
女性	38	38
病期 I-II	57	59
病期 III-IV	18	16
死亡	35	33
生存	40	42
生存期間 (ms)	31.5	32.4
非癌対照 (n)	50	51
年齢の平均 (年)	60.8	60.8
年齢の範囲	36 - 77	40 - 77
男性	30	31
女性	20	20

30

【0307】

（表2）トレーニングおよびテストセットの予測精度

	トレーニングセット	テストセット
感度	82.7% (62/75)	82.7% (62/75)
特異性	94.0% (47/50)	84.3% (43/51)
精度	87.2% (109/125)	83.3% (105/126)

40

【0308】

診断解析のために、251人の試料を、年齢、性、病期、および生存がマッチしたトレーニングセット（75人の腫瘍および50人の対照）およびテストセット（75人の腫瘍および51人の対照）に最初にランダムに割り当てた（図13および表1）。トレーニングセットでは、リーブ-ワン-アウト-クロス-バリデーション（LOOCV）と組み合わせたt検定を行って分類予測モデルを構築し、これらの最高性能の82.7%（62/75）感度および94.0%（47/50）特異性に基づいてトップランクの59個のエピトープクローンを選択した（表2）。予測感度および特異性を、癌および対照群において誤って分類された試料の数に基づいて計算した

50

。次いで、59個のファージ-エピトープからなるこの予測モデルを独立したテストセットに適用した。テスト試料は、それぞれ82.7%の(62/75)感度および84.3%の(43/51)特異性で、癌および正常な群に正しく分類された(表2)。

【0309】

免疫応答プロファイルの予測性能を調査するために、テストセットにおける予測精度を評価するために、トレーニングセットに由来する59個のファージ-エピトープを使用して、受信者動作特性(ROC)解析を行った。癌と対照との間の59個のファージ-エピトープのパネルの判別能力は、統計学的に有意であり($p < 0.0001$)、曲線下面積(AUC)は0.88(95% CI=0.82~0.94)(図14)と同等であった。

10

【0310】

最適な診断に関連したファージエピトープを選択するために、全ての251人の試料(150人の腫瘍および101人の対照)に対してリーブ-ワン-アウト-クロス-バリデーション・アプローチを行った。トップランクの113クローンが、最高の予測値を与えることが見いだされ、83%(125/150)の感度および87.1%(88/101)の特異性を有した。

【0311】

B. 体液性免疫応答プロファイルにより、生存を予測する

次に、ファージエピトープと患者の生存との間の関連を調査した。最初に、150人の癌試料を、病期および死亡/生存がマッチしたトレーニング($n=100$)セットおよびテストセット($n=50$)に対してランダムに割り当てた。Cox比例ハザード回帰モデルでLOOCVを使用し、トレーニングセットにおける生存に関連したエピトープを選択した。指数の中央値のカットオフ位置に基づいて、7つのトップランクの生存に関連したクローンからエピトープ・リスク指数を作製した(これは、トレーニングセットにおいて最高の全体的生存予測を与える($P=0.004$ 、図15))。次いで、リスク指数およびカットオフ位置をテストセットに適用した。この上位7クローンのリスク指数は、独立したテストセット内において低および高リスクの個体を正しく同定した($P=0.02$ 、図15b)。

20

【0312】

生存に関連したクローンと最も強いセットを選択するために、LOOCVアプローチを使用して、全部で150人の腫瘍試料から生存に関連するエピトープを同定した。上位8クローンのリスク指数は、150人の患者を高および低リスク群に有意に分離することができる(中央値のカットオフ位置、 $P=0.0008$ 、図15c)。このリスク指数により、病期I、Ia、またはIbの癌である患者を予測することもできる(図15d、e、およびf)。一変量Coxモデルでのさらなる解析では、患者の病期、TまたはN状態が生存にも関連があったが、年齢および性には関連がなかったことを示した(表3)。このエピトープ・リスク指数が、その他の臨床的変数から独立した因子であるかどうかを解析するために、多変量Coxモデルを年齢、性、病期、およびリスク指数に対して行った。結果は、このエピトープ・リスク指数が、独立した生存予測子であることを示した($P=0.003$ 、表4)。

30

【0313】

(表3) 一変量Cox比例ハザードモデル

変数	P値
年齢	0.96
性別	0.48
病期 II	0.02
III-IV	<0.0001
T状態	0.02
N状態	<0.0001
エピトープ・リスク指数	0.0008

40

【0314】

(表4) 多変量Cox比例ハザードモデル

変数	HR	95% CI	P値
年齢	1.02	0.999 - 1.05	0.06
性別	1.13	0.693 - 1.85	0.6
病期 II	2.61	1.233 - 5.54	0.01
病期 III-IV	5.89	3.352 - 10.35	<0.00001
エピトープ・リスク指数	2.23	1.328 - 3.76	0.003

【0315】

C. ファージエピトープの同定

ファージディスプレイ・ペプチド・マイクロアレイ・ストラテジーにより、シークエンシングおよびBLAST検索による体液性応答標的を簡単に同定することができる。以前に全
10
ての試料に基づいたLOOCV解析によって同定された上位400クローンをシークエンシングした(表5)。いくつかの配列は、ユビキリン1、核小体タンパク質3(NOL3)、 α -2-糖タンパク質1、および熱ショック70kDaタンパク質8(HSPA70)などの公知のタンパク質配列とインフレイムであることが見いだされた。大部分の体液性免疫応答ペプチド標的は、ミモトープであった。

【0316】

インフレイムの公知のタンパク質の中で、熱ショック70kDaタンパク質は、肺癌における体液性免疫応答標的であることが以前に別のグループによって報告された。2つの異なるサイズ(113~197および113~219のCDS領域)のHSP70が、同じ体液性免疫応答パターンで見いだされた。核小体タンパク質3および α -2-糖タンパク質1の3つのクローンがそれぞれ発見されたが、NOL3に対する血清抗体は、非癌対照と比較して、腫瘍において減少され、この体液性免疫応答は、肺腺癌における生存に対して好ましくない関連があった($P < 0.006$)。
20

【0317】

UBQLN1の2つの異なるサイズ(112aaおよび125aa)をもつ合計9クローンが、この研究において見いだされた。mRNAは、肺腺癌において増大された(図16a)。2つの形態のタンパク質が、2Dウエスタンブロットによって見いだされ、天然の形態が、正常肺組織と比較して腫瘍において増大し、リン酸化された形態が腫瘍において減少した(図16bおよびc)。UBQLN1の第2のリン酸化された形態は、正常組織のみにおいて見いだされた。
30

【0318】

(表5) 診断および予後に関連したファージ・クローンに関する配列アイデンティティ

クローン ID	と関連する 診断 予後	翻訳タンパク質 配列	SEQ ID NO	クローン 数	タンパク質
12G5	X	PGLIPGFTPGLGALGST GGSSGTNGSNATPSEN TSPTAGTTEPGHQQFI QQMLQALAGVNPQLQ NPEVRFQQLEQLSA MGFLNREANLQALIAT	1	7	ユビキリン1

12G9	X	QIQQGLQTLATEAPGL IPGFTPGLGALGSTGGS SGTNGSNATPSENTSP TAGTTEPGHQQFIQQM LQALAGVNPQLQNPE VRFQQLEQLSAMGF LNREANLQALIATGGD INAAIERLLGSQPS	2	2	ユビキリン1	
7A2	X	NSLESYAFNMKATVE DEKLQGKINDEDKQKI LDKCNEIINWLDKNQT AEKEEFEHQKKELEKV CNPIITKLYQSAGGMP GGMPGGFPGGGAPPS GGASSGPTIEEVD	3	2	熱ショック70kDa タンパク質8 (HSPA8)	10
18D1 1	X	GAYPSTYDLIEVHGG LQPCLELEYGAEPVGI KGSLSLASEEATMK VESWGSRKHEALYCIQ NTEI	4	2	仮想的 タンパク質 OB1516	
4C10	X	QAFPQQTGRRATSEPT AM	5	2	予測: 凝固 第II因子受容体 前駆体に 類似	
2D5	X	VTRPPSGRRPPTS	6	2	予測: B細胞受容体関連 タンパク質29に 類似	20
17H1 2	X	AVAQMRMRMKMRM RMGQEGTQQEPQQQN ILEDDTRDQGAHTGGP PGKPDAD	7	2	TPA: HDC18596	
19G8	X	QERQTRAQKKGTS HSTTKVIP	8	2	推定上タンパク質	
4C4	X	GTEIDGRSISLYYTGEK GQNQDYRGGKNSTWS GESKTLVLSNLSYSAT EETLQEVFEKATFIKVP QNQNGKSKGYAFIEFA SFEDAKEALNSCNKRE IEGRAIRLELQGPRGSP NARSQPSKTLFVKGLS EDTTEETLKESFDGSV RARIVTDRETGSSKGF GFVDFNSEEDAKAAK EAMEDGEIDGNKVTL DWAKPKGEGGFGRG GGQACGRTRVTS	9	1	ヌクレオリン (NCL タンパク質)	30

11G4	X	LGTAIGPVGPVTPIGPI GPIVPFTPIGPIGPIGPT GPAAPPGSTGSGGPTG PTVSSAAPSETTSPTSE SGPNQQFIQQMVQAL AGANAPQLPNPEVRFQ QQLEQLNAMGFLNRE ANLQALIAATGGDINAA IERLLGSQPS	10	1	ユビキリン2	
5B4	X	AERVSETWYMKGTVQ HCDFN	11	1	アポリポタンパク質B	
22A1 0	X	AKHSSAYTFFHPSNP VSHYHPRFI	12	1	仮想的 タンパク質 UM00661.1	10
7D8	X	ARWGLRMG	13	1	アセチル-CoA	
7G8	X	CCLPRFTESTSV	14	1	アセチルトランスフェラーゼ ENSANGP000000 05259に 類似	
8D5	X	GELKGKEK	15	1	アデニン ホスホリボシルトラン スフェラーゼ1, APRT	
13D2	X	GKVGGGFLI	16	1	COG0730: 予測された パーミアーゼ	
22F5	X	GPQTDPRPPQDRRPRHA PCPQEGCVPLESNAGR PHNLLSDYSCDKSPGR SMTRG	17	1	仮想的 タンパク質 MCA0617	20
17D3	X	GSRGQEFKTS LANMV KLHLY	18	1	PRO0478	
1H8	X	HLHNPGDPCR VMSQR PL	19	1	予測: VPS10ドメイン受容体 タンパク質SORCS 3に 類似	
18A7	X	HPWAPKGWARWGAA PWAAGWPGTPALSAG TPKLAAALE	20	1	予測: Zincフィンガー タンパク質43に類似	
22C1	X	IISRRGTNTAPLTSSSA TTRTPARLWCCRS	21	1	仮想的 タンパク質 FG05539.1	
1E8	X	IKTKENMLREARQKG LVTNGSPSD	22	1	仮想的 タンパク質	30
6B5	X	IRIAPLEVKFLDRRKT QSESICQECFH	23	1	溶質担体 ファミリー9、メンバー4	
4D1	X	KKKDNL	24	1	COG0628: 予測されたパーミアーゼ	
4E8	X	KKTSGPDGFTGERYQ XI	25	1	ORF2は 逆転写酵素 ドメインを 含む	
2B6	X	KYWRSIEDRKI	26	1	シトクロムD ユビキノール酸化酵素 サブユニットII	
2G4	X	LELQRQSSL	27	1	spalt4	40

13F6	X	LEPSFSANYHKDKKTP HVLTHRWELNNENTW TQEEEQHTLGPVL	28	1	予測: グリコゲニン2に 類似	
13F9	X	LIFRNGQGMRGNK K	29	1	仮想的 タンパク質 AN5619.2	
1B8	X	LLLKLEPISQQ	30	1	グリコシル トランスフェラーゼ、グループ2 ファミリータンパク質	
1F4	X	LRQEDCLNPGGRGCSE PRSCHCTPAWATE	31	1	KIAA1556タンパク質	
7E6	X	LRSHAWWWT	32	1	trbI	
10G2	X	LSISCL	33	1	仮想的 タンパク質 FG08221.1	10
2C6	X	MVLVNLKP	34	1	ヘパラン硫酸- グルクロン酸-5- エピメラーゼ (hse-5)	
7F9	X	NKTPSVPHNHFLIK	35	1	予測: ジンクフィンガー タンパク質300に類似	
8B6	X	NSCILKEDKDILKKPL NSRFSSNSKVKNMRL EHSTFSAPLNRVM	36	1	アスパラギンに 富んだタンパク質、推定上	
7E10	X	NSDFYDFHFK	37	1	仮想的 タンパク質 CBG01255	
2D10	X	NSEGRLLS	38	1	仮想的 タンパク質 ZC443.6	
2F9	X	NSFDLVGTGGLEESRL SIPWPLGSLLYAKSPR K	39	1	TPA; 嗅覚 受容体 OR11-50	20
3C5	X	NSKESI	40	1	ATP依存性 ヘリカーゼ	
3D1	X	NSKNTVLQLDSVRSM SESRAITT	41	1	免疫グロブリン 重鎖 可変領域	
2B9	X	NSLPGLPSLYFVSMK HKNNSTTIS	42	1	GH05757p	
7B7	X	NSPNTLFRSASTKPK	43	1	一般分泌 タンパク質E	
2C5	X	NSQECLSQILLIPSSCL KKNICV	44	1	ENSANGP000000 11065	
7E11	X	NSRLRGIL	45	1	COG0330: 膜プロテアーゼ サブユニット、 ストマチン/プロヒピチン 相同体	30
4B6	X	NSVFLPFINMFIRKWWY HSEHISYILFFCVWIF TLR	46	1	センサー-ヒスチジン・ リン酸化酵素 VanSc	
11D1	X	NVTRVFK	47	1	仮想的 タンパク質	
7A10	X	PASTLKGQDARNRLT QK	48	1	AF15q14タンパク質 アイソフォーム2に類似	
1B12	X	PIHMCYTGAKEGCF VGKSS- EEVPRTWLLSLKGDG	49	1	CIRタンパク質、 推定上	40

		VNSPCWGSY				
13D1	X	PQIASHSLFLLPRVLST SIIS	50	1	仮想的 タンパク質 GZ28G717	
5A4	X	PQMTKTKRTHKNI	51	1	FP588	
17A5	X	QAYVNV	52	1	COG1538; 外膜 タンパク質	
8B3	X	QEASVSGLKMKSMST KQVWNQIAFDEKGSG FWRLYFRCCYNASSN QD	53	1	S2 遺伝子産物	
6A6	X	QTCKQLQFLPFAS	54	1	予測: 仮想的 タンパク質 XP537924	10
7B10	X	RMTYLWGLNHKPTDN VNCHSQFLP	55	1	推定上のパーミアーズ (MFS スーパーファミリー)	
5D5	X	RSQFQQGNVPVQSRLR	56	1	クリプトスポリジウム 特異的パラログを有する 仮想的タンパク質	
2B3	X	RVTPTAEQSPIGCRK	57	1	TonB依存的 受容体	
1A8	X	VCSSSIHRSPQVERVSP PHHFPEEQT	58	1	PMF31	
3D5	X	VESASLHLDCE	59	1	仮想的 タンパク質 BH11560	
3B7	X	VGGGRASGRIANGCW A	60	1	AMPA グルタミン酸 受容体サブユニット (glr-2)	20
1A10	X	VPIQMPPEATCVT	61	1	仮想的 タンパク質 Bcep02003282	
6D2	X	VSNSMKI	62	1	ORFveg109	
1F6	X	VVSGSGHLERSQDCGE KGNIFQ	63	1	グリセロール-3- リン酸塩脱水素酵素の 可能性が高い	
20A1 2	X	AHSPTKGCQICQDQEK	64	1	推定上の レトロエレメントpol ポリタンパク質	
20D1 2	X	AHSRRKTAGN	65	1	組換え活性化 遺伝子2	30
6G7	X	EHIPAPASPRFSIQGS	66	1	予測: 仮想的 タンパク質 4832420M10に類似、 部分的	
10D1 0	X	GNRDPVAC	67	1	TPA: 52K	
17H8	X	GPWHQMPSPKGLG RISQ	68	1	鞭毛特異的 ATP合成酵素 FliH	
15B6	X	IAHSGSSVF	69	1	ニーマン-ピック病、 C1型	

15A1 2	X		IQCVMYKPNSHFV	70	1	RIKEN cDNA 4930429020に 類似	
19B12	X		IYISLNVVTLKACTLKF GCINATFNLN	71	1	ENSANGP000000 25688	
23E12	X		LFYGGMGGWKNGSR ASEAD	72	1	NiB タンパク質	
15E9	X		LLQRNTVPQKQRNKA GWRMTLTS	73	1	予測: アンキリンリピート含有 SOCSボックスタンパク質5に 類似	
16H8	X		LPSVARRSPGLGPQLR QQGGCGPVCHHHQDI PPPQGLPFLAPSPFL	74	1	パラチモシン様	10
8B12	X		NSALGNHGEKPIVEC LLRC	75	1	二成分系センサー・ タンパク質	
6H3	X		NSASSKCPST	76	1	仮想的 タンパク質 PMM1351	
21G1 0	X		NSFKAIRK	77	1	CDC27 D-618 タンパク質	
17H1 0	X		NSFLEGEEQIL	78	1	仮想的 タンパク質 LIC11950	
14E12	X		NSSVTLMRQRVTMMG RHTT	79	1	DNA トポイソメラーゼII	
21C12	X		PDWDAVVQSWLTAAS NS	80	1	ADAM 32 前駆体 (ディスインテグリンおよび メタロプロテアーゼ・ ドメイン32) 変異体	20
16C7	X		PRRTGEGAPPARLARR AGEVEHERTC	81	1	予測: testinに類似	
17G1 0	X		SKLSKGYEKLVF	82	1	推定上の 転写制御因子	
16E8	X		TMPKGNVKLGN	83	1	分裂促進因子活性化 タンパク質キナーゼ・ キナーゼ・キナーゼ3 アイソフォーム2	
8F11	X		VITLIYR	84	1	仮想的 タンパク質 OB0069	30
16H1 1	X	X	GPEGSEAVQSGTPEEP EPELEAEASKEAEPEPE PEPELEPEAEAEPEPEL EPEPDPEPEPDFEERDE SEGIPGQSSDRRCPA HAG	85	3	核小体タンパク質3 (CARDドメインをもつ アポトーシス・リプレッサー)	
16E9	X	X	PQCREKTKFN	86	1	3要素モチーフ含有 (tripartite motif-containing)7 アイソフォーム4	
16B11		X	SGMPRRYSYDPDAYT T	87	1	シトクロムc 酸化酵素サブユニットI	
16E11		X	DVRVSIHKHILG	88	1	核小体タンパク質3 (CARDドメインをもつ アポトーシス・リプレッサー)	40

8E11	X	GKRRDSFFSF	89	1	仮想的 タンパク質 AM638	
14E11	X	LETIILSKLAQEQTCKH RMFSLISGS	90	1	推定上のp150	
16G1 1	X	NSPSVGLFTH	91	1	MUP1	
10G9	X	NSRLYQKYKN	92	1	CG9996- PAに類似	
5E3	X	PARLARRAGEVEHERT C	93	1	仮想的 タンパク質 Magn028940	
16F11	X	SLTSTASDGDYSARTV M	94	1	COG0568:DNA 依存性RNA ポリメラーゼ、 σ サブユニット	10
10G1 1	X	TQSPTTLNVAGTPQQ	95	1	IgG κ 軽鎖可変 領域	
21C5		PSQLKCSPSANVKMG GGKGLKIRENCMHLR T	96	14	グリシン 脱炭酸酵素	
13E11		GERGKRTFQKESDTAL ILRECPICL	97	11	BRCA1 タンパク質	
11A1 2		NSLEWTKVYLGKKIW TPEKGNSSYK	98	7	FAM53B タンパク質	
13B3		RPQTDPRPPQDRRPRHA PCPQEGCVPLESNAGR PHNLLSDYSCDKSPGR SMTRG	99	5	PSIP1 タンパク質	20
19H9		GQQRKPCLGKKKKT	100	3	CGI-143 タンパク質	
22A9		NSTATTSSSSLKDPGSR RPSWTSIAKERSQEQA KRNLEFQSPTLSPPMK ATLSKPS	101	3	癌遺伝子 EMS1	
16B9		PCSKH	102	3	Siah2 タンパク質	
15D6		QERPSETIDRERKRLV ETLQADSG...EPDFEER DESEDS	103	3	核小体タンパク質3	
13C8		RICPTHKPNIVPLH LLRPTIDQL	104	3	FAT腫瘍 抑制因子2 前駆体	30
12E5		WVSEPHCVVVM	105	3	キネシン様 タンパク質 KIF13B	
15E3		GAGTGARARARAGAA LTWS	106	2	ALEX2 タンパク質	
17A7		ILLMRRRMTRMSGGA EQTQTMQMGVGTK	107	2	CREB-結合 タンパク質	
17B10		LHHIGQQHPQRFWHQ RPIS	108	2	テロメラーゼ 触媒サブユニット	

18H6	LMRVLKTEVTGYQEV CTPKRNWNSRQE	109	2	EFハンド・ドメイン・ ファミリー、メンバーA1	
13E12	NSLIQHQLGQI	110	2	ZFP-95	
19G6	NSQGLDFSKATLRSRQ RL	111	2	TIP30	
18F11	NSSDSLRIWLLSDVY ESFLHLPFQISHCSWY KYLS	112	2	CCAAT/エンハンサー 結合タンパク質 α	
14H1 2	NSSPADLPCRIC	113	2	UbcH 7- 結合 タンパク質	
21E12	RTPSSPCWPPGPVLAE. ..EPEPDFEERDESEDS	114	2	核小体タンパク質3 (CARDドメインをもつ アポトーシス・リプレッサー)	10
13A6	RVPKQRYRSMEQNRA LRNNAVYLQLSDL	115	2	腫瘍関連 タンパク質 DRC2	
10G3	STKKMGTQALSKAAP HC	116	2	クリングル含有 タンパク質	
15B12	TRSGSSSWAVLTGARP KRLCAATFPNMEKS	117	2	HSPC017	
8G11	AEEYRLQRHYCSY	118	1	プレクストリンおよびSec7 ドメイン含有2	
23D1 2	AESTPVQDPSIFCEYST PTSMGGGK	119	1	鎖B、 ヒトTau プロテインキナーゼ1の 二成分複合体構造 溶質	20
11A2	AEVPILFIPP	120	1	担体ファミリー4 炭酸水素ナトリウム 共輸送体様メンバー10	
17A1	AGGSFSPWPVLLPPPPP GGKSGHNRRGQRPH	121	1	frizzled 8	
10D4	AHIRTKDSINCI	122	1	TRIM14 アイソフォーム α	
6F3	AICSIL	123	1		
10E5	AIGKIAKNNP	124	1	SFRSタンパク質 リン酸化酵素2	30
16E4	ANNLLNGGLYTGKPY CGN	125	1	RAD51D	
10C11	ANQLNELNPK	126	1		
9G11	AQGPRCAGCTGKGRT TAG	127	1		
6D4	AQVLCHIEDQVPDQIL PGVPLELLGEFCQESG RRK	128	1		
12B5	ARGPSWRSNELWLHH LSSSRHLMSS	129	1		40

1A11	ASCYLTSNCTTRVQ	130	1	
1F11	ASRKIWYELNSGYAE WRTEEAIRRSGRHQV Q	131	1	
1E7	ATLSV	132	1	
4E5	AVYFFKAK	133	1	
13H8	AWYKICKICL	134	1	
14B9	AYNKFLHL	135	1	10
21A1 2	CWPGWSQTPDLR	136	1	
7H8	DEWKNTFQGELKGLK C	137	1	
14A5	DKKFLIETSI	138	1	
7G7	DVFNTVGPLGWSVFH PQTINADQNGVF	139	1	
1G7	ECQGQC	140	1	
6G6	EEHSDKYVLSLLMNS LSLRS	141	1	20
6G2	EFFLMTIGKN	142	1	
17G8	EKEKNLNCFFGRITTK KR	143	1	
7A5	EKLATSMYLQNPWR LSSESEVSME	144	1	
9F11	ELESCCVTQAGVPCYD LCSLQPPSPGFK	145	1	
12H4	ELLFL	146	1	
21B8	EMLNGGRVLWM	147	1	
12B3	EQLQT	148	1	30
4F10	ERKVF	149	1	
8B1	ETSIKYT	150	1	
17G1 2	GAGKFLREKEKEISLG LMLGK	151	1	
8E5	GCLG	152	1	
1F7	GCLGFWGRG	153	1	
15C3	GEACLSTATSW	154	1	40

6C12	GFLTMERKKITPPTTK TYISTLPTDSIKQLRNG DYKATS	155	1	
7C9	GGCDHCRDTTHGGCG HCGLRGNPSRPPDLQD CLC	156	1	
3A6	GIFFVSKI	157	1	
3A1	GIGNVKDGRHGESF	158	1	
14A1 1	GISPTKEDVIHSDVQD ELVHSACYVCI	159	1	
23F5	GKHEGEG	160	1	10
3C10	GKIDERGRQGGRERD RNRDRERQRERE	161	1	
17B6	GKPKRHWDERAAGGL	162	1	
1A1	GKPTPLIQ	163	1	
9F9	GKVKELNKEVREKKG KIKQYNTXQKGKKS RQCKNS	164	1	
7E7	GLPLWRRERVKVMR	165	1	
5G11	GLWWKRKYLHLNTR KHSQKLLCDDCIHLTE LNIPIDRAVWKHSCCG MCKWRFAL	166	1	20
24D5	GMST	167	1	
21D2	GNYAK	168	1	
21D1 2	GNYARQ	169	1	
11H1 1	GPAFVLMKPGASPYPI LALTTLITNQMLQNKSN NDPN	170	1	
1F9	GPFCHQRSGNPRHHQ HSQAHPWSSLQEACT SGTQRDSEICHEGDGN SRCAH	171	1	30
8G5	GPTSN	172	1	
21H1 1	GQHYPNTKARQKITR KL	173	1	
10F2	GQRLIING	174	1	
1G3	GRCVVATEINSRNRDS ACQEFEFRV	175	1	
13G1	GRGRTRWGMMLLK KIQ	176	1	40

3E1	GRPGIGATHSSRFIPLK	177	1	
19F5	GRVPFTFFNLSL	178	1	
2B10	GTSSSHDPLSRLPKLN LSRGGVWASWVK	179	1	
3H10	GVERVAYSIH PASPTS VSHSLVERMAMAPPV MESMRSP PQSTRPRVP LS	180	1	
17B12	GWGRRIA	181	1	
6D6	HCHCLPDLF	182	1	10
3G10	HILSSTCCFLT	183	1	
7D6	HLWAQHHSVSSLKGR TTLEYF	184	1	
17B4	HTFKNTWELKNENTW TQGGEYHTPGPAGGF GGKGRESIRTKI	185	1	
8F4	IASYM	186	1	
16G2	IDLKSNL	187	1	
12G1 2	IFRN	188	1	20
4F5	IGTRDQ GKRLRMK	189	1	
7G1	ILLQGYPGSSSTSLRPH SSN	190	1	
16E3	INQKYTWLDKSHYAL TTNASS	191	1	
4F11	IQNSKKS	192	1	
17C8	IQSATELVGRLGMHPR IQSATELVVS	193	1	
14B10	IRASNQYRSSVKYISV H	194	1	30
6A3	ITPRAVFWY	195	1	
20D1 0	IYFKKKKT	196	1	
7H2	KDHAQSNKYLTSL	197	1	
4E9	KGMNKTSKNCGTM	198	1	
15G5	KGTRSGSLGCK	199	1	
2G11	KIYNI	200	1	40

4D5	KKAERSTK	201	1	
1C8	KKEESSSRMWPL	202	1	
22C12	KKHFICTSFLDLGYTV PVY	203	1	
12D2	KSF CRIFLCW	204	1	
20B6	KSTAHS LCKGLM	205	1	
11H2	KTTIF	206	1	
21E6	LAYVSN SHQKFGWL SGLSR	207	1	10
7G11	LDGMLAAQTEEDPET	208	1	
15F4	LETEAGESLEPRRWRL Q	209	1	
22D3	LEVRISRPSWLTR	210	1	
13A1 2	LHKPQSQWTR	211	1	
4A9	LHQNP KGLGSEFWIT LPGR	212	1	
20C1	LKDVT VSVRLAPLYIS M	213	1	20
14F2	LKHENCLNPGGRGCSE SRWCRCTPTRTTE	214	1	
10A9	LKQILSSVLNSEIELLL	215	1	
9H8	LLHMAAARRSAEQRG KSPS	216	1	
7C2	LLPQPPE	217	1	
16G1	LLSHLQDWQHH	218	1	
12G1	LLSKSLRNEDTAVV	219	1	30
7B8	LQTGKEKASHPPPTLF SPIIYNNTDLRAVKVIL KYYIKWVRRE	220	1	
14G1 1	LQVTLPRRGRDTCGSH REATER	221	1	
16G1 2	LRIT	222	1	
23B7	LRLSTPWPTLKPHLKG KVMSL	223	1	
16C10	LSESIWF AFHFDDCK	224	1	
15F5	LSHGTG	225	1	40

1C11	LTRNDI	226	1		
11B9	MKEYA	227	1		
11D1 2	NELWLHHLSSSRHL MSS	228	1		
10C12	NGCVYLSKFKL	229	1	TBC1ドメイン・ ファミリー、メンバー2	
17A3	NKEREVFSTNGTGYPH GKKRRTTQ	230	1		
15D1 2	NNQK	231	1		10
1E4	NRGKHRG	232	1		
4A5	NSACL	233	1		
1C12	NSAQN	234	1		
8D1 .	NSASTEPSTNRLQLPW VGGLMQTGRLPGLT A	235	1		
18D4	NSASTRPISHIRRRILL SSA	236	1		
11B10	NSDLVRHQFKGKTTL KVH	237	1		20
5D4	NSDQIQNTGAESREKV RMSITADEFVG	238	1		
3E4	NSDVI	239	1		
3B8	NSECTCIIVKGNTFSPC KFIV	240	1		
4D2	NSEG	241	1		
13H1 2	NSEGAT	242	1		
2A7	NSEQQLKELKSEHTN NKKVKQPCC	243	1		
15D1	NSESNSFASKNKFN	244	1		30
21B1	NSFCVCFNSQS	245	1		
8C2	NSFGFST	246	1		
18C9	NSFLLEIQEPSLGVWIR TPFL	247	1		
10E11	NSFLSF	248	1		
11F3	NSFPSSICFNS	249	1		
1E10	NSFQGLQDYLIKSSMN LVL	250	1	TRHDE	40

15F11	NSFRKQRHWKG	251	1	
6C6	NSFRL	252	1	
20E10	NSFRPHRFKSNA	253	1	
7C12	NSFRYFA	254	1	
11E7	NSGVSW	255	1	
9E3	NSHCDI	256	1	
4C9	NSHNPKLEK	257	1	10
7A3	NSIHHVLLSLHPPLYK	258	1	
3A2	NSIHM	259	1	
22C3	NSIIPRAIWLSVERMW QLRW	260	1	
2A6	NSIKCKKM	261	1	
12H7	NSIKRFSASCVARICPG	262	1	
18D6	NSIL	263	1	20
17E4	NSILIKYGDTWN	264	1	
1G10	NSILQSAGESFLLHNL NLCS	265	1	
2G3	NSITHLEKHTILYTNSS TK	266	1	
3A4	NSKETSSNGTEWNP	267	1	
17B5	NSKGRRV	268	1	
9E4	NSKHR	269	1	30
21H6	NSKIMFSKMFLSQITE	270	1	
19H5	NSKQRFFLKKK	271	1	
17C5	NSLCGICI	272	1	
7C11	NSLKKL	273	1	
19H7	NSLLCLICLT	274	1	
10B2	NSLNKIQNTFESSTID	275	1	

21B4	NSLPLT	276	1	
10B10	NSLPWKQKV	277	1	鎖A、 Traf媒介 シグナリングのための リンホトキシン-B受容体 およびCd40における 構造的に異なった 認識モチーフ
12D7	NSLS	278	1	
11H1 2	NSLSFADWFWKRS	279	1	10
5H5	NSLSSFHCSSHCF	280	1	
8B2	NSMMDHVTN NATGM NIMEK	281	1	
4G1	NSMSMPRLCGRMKEC VPATNAPTSTS	282	1	
13C9	NSMVVTATSYSTPIPE DRLSTRGKEQMPHEM S	283	1	
7E5	NSNEE	284	1	
22E11	NSNPYPGGRSTSGDPK FKPRNCSVPQWLGYN PFWP	285	1	20
4F2	NSPAGISRELVDKLAA ALE	286	1	
1C6	NSPASAS	287	1	
10B1	NSPKMGSPSLKYYT	288	1	
9D1	NSPKMGSPSLKYYT- RS	289	1	
6A2	NSPPAN	290	1	
3D4	NSPSQPA CLGAQR	291	1	30
5F1	NSPVPSVTTDYQNISLL T	292	1	
10H1 0	NSQAVCIFF	293	1	
21H1 0	NSQNVFNSSSFHFMAL ERYRRK	294	1	
1H5	NSQRLIWLSN	295	1	
14H6	NSQVGLSSSY PQ	296	1	
3D3	NSRCHCPA	297	1	40

8A1	NSRFDF	298	1		
11D4	NSSDITLIEKKELIKANI	299	1	TAK1様タンパク質	
2D11	NSSFLMT	300	1		
4E11	NSSFLQGALVPLSGE	301	1		
17D6	NSSGLLKVSLLKYHPS FMNSRGFSLQVL	302	1		
16G8	NSSRQPHLLTSLNILY I	303	1		
3B10	NSSRTAFSFHSLLLL	304	1		10
10G5	NSSSSQHREHEKEEKY	305	1	HGDF関連pro2	
4D7	NSSSSNPILSHGTTKN KVCSAPEALYAGDGQ LNENLKGKPSGLRCVP LRDFT	306	1		
17A9	NSSSYRPQRVWCGSIC SRASTGIPIQGLPPKY LAFKELSYLNSAGTSC	307	1		
7F8	NSSV		1		
18C5	NSSVTLMRQRVMMM GRHTT	308	1	ジベプチドABC 輸送体、 ジベプチド-結合 タンパク質	20
11H8	NSSWHIRSQGEDNRET ALVYRKQIFSETLHYY KKKK	309	1		
20E7	NSTDK	310	1		
16B6	NSTGNMKGHILTFQLK RMGKPTPLLF	311	1		
1D4	NSTR	312	1		
19A2	NSTSKSVEHS	313	1		30
9A3	NSTVLKYVTLPHLRE	314	1		
5F2	NSVCV	315	1		
10C6	NSVIIESLVVNV	316	1		
1C7	NSVNFILPLDLEG	317	1		
12C8	NSVQGRAVLLCHGLT GRAWFYLYGLFCV	318	1		
6C2	NSVVH	319	1		

4E4	NSVYMI	320	1	
3F3	NSYCVNQAGLELLASS DPLALASGMLGL	321	1	
1H4	NSYLFSR	322	1	
1D12	PAWATKSKTPS	323	1	
13H6	PGLGEWCRCV	324	1	
6B10	PGRHLAEAQHGHRP CLHSEVFS	325	1	
3E6	PHATSHLRVKHEISQIQ HPPLLS	326	1	10
14F11	PISLRGATAGRAERIRE EEVRGAVHHRH	327	1	
7B1	PQRTTLNFLGQPARL PLGLSVGDRPTSQGR	328	1	
1B9	PRFPSSAQQRMK	329	1	
5E11	PSRPPRRGGGARAHVL GPERW	330	1	
1A9	QGHTGVSHK	331	1	
1B7	QKTKHRIFSLIGGN	332	1	20
2A2	QMLLLPAI	333	1	
3E12	QRSRVAEGWRGPLNP ELTPKCIDPSMHGWR	334	1	
20F1	QSLPPARNCNKPDSML	335	1	
1E9	QVPRVLPQHRLGLAG EEAGAPSIPATDHRRL RSGQL	336	1	GADD45 γ
2E2	QVSGPPSKI	337	1	
2H3	QWLTPVIPTLWEAKA GG	338	1	乳糖抑制因子 エレメント Ishmael Upper RP2
2B4	RALQQLRHPDLHLQR RSQAQQHQGGQDS	339	1	
14E10	RAVRREASHRPSPLA SRRPLDALS	340	1	
4D8	RDDSDYSVE	341	1	
18F10	RECTRCRKTESTAQR VKKPATLLASVKPPAN AVSTM	342	1	
1B5	RGPKRLL	343	1	

20G3	RISILKR	344	1	
18E11	RIVRVTPRRSWNHYET IESKE	345	1	
8G6	RLGPQARHG	346	1	
18F2	RLHR	347	1	
1E3	RMKQIVRKVEPIMT	348	1	
19D3	RMMSSSIQSLRKAGSE P	349	1	
2E7	RNWNKPSKRNC	350	1	10
8C11	RPQP	351	1	
14C10	RPQTDLPRTDVPGTLL VLRRAASPWSPTRGDP ITCCLITVVISPREGA	352	1	PSIP1 タンパク質
13B11	RPTDRQTSPGQTSPAR SLSSGGLRPPGVQRGA TP	353	1	
2F6	RQDCF	354	1	
19C12	RRLGLYMVL	355	1	20
6F7	RRRLW	356	1	
14B8	RRSRPSWPTG	357	1	
1D7	RRWTKAHCK	358	1	
10H1 1	RTLKAEVEKGS	359	1	
20E12	RVPFTFFNLSL	360	1	
22B12	SFSRG	361	1	
12A1 1	SLSSTHFDICAGSGGR RSTKCKGLSTSVQCVY EEAH	362	1	30
23H1 0	SNEGLKEVKISTCRLS KQSVSKLLNEKKS	363	1	
15F12	SNSHSPSTQGS�DCVF QETHLIWSDFVSPPKS HLEL	364	1	
6D9	SRRMA	365	1	
12E11	SRSASFVGTITVSDR LRTSDFRS	366	1	
2H5	SXARXPIQRESRMGD	367	1	40

13D4	TIPGLRTPVSTRPTGTV PIPPIL	368	1	
1G11	TPTRDTSVMQIEETGR GKESSTMVVATTIHHG EATGTISMSTGTRTTI MGTGDIWMPTVPEAI DPTTCPERGLMTSTSL RPHSSN	369	1	
15H6	TRLAWDLNWKLNVV	370	1	
2A10	TRPPSGRRPPTS	371	1	
7H12	TVLFGV	372	1	10
21H4	VAQRPAGPVGWAAG GEALIG	373	1	
1E11	VFEDLKKYLKF	374	1	推定上のプロリン・ オリゴペプチダーゼ
20F12	VFTVVISTSGARCQRQ Y	375	1	
8C10	VGSWERAGGPPRGEPP PVPAPCLSAPPRCS	376	1	
24H1 2	VGTIY	377	1	
4E6	VGVGIIIS	378	1	20
2D6	VHYHNINNLVK	379	1	
21D5	VIGSLMGMALNL	380	1	
16A1 2	VKKLVVGSWERAGGP PRGEPPPVPAPCLSAPP RCS	381	1	
17D1 2	VKNYF	382	1	
9G3	VLLYLKR	383	1	
8C3	VPGHARWLTPIPALR DAEAGGS	384	1	30
9D8	VVCSISLLSF	385	1	
2E8	VVFLR	386	1	
14A9	VVQTESLKSPSTYRCA QQDQVTSSSDCHHK	387	1	
3E11	VVVVVETGAI	388	1	
1G1	VYGRNYDGI	389	1	
13A3	WELNSEKTWTQGGEH HTPGPLWGRGARGGI ALG	390	1	40

16D1 0	WKKNSRCY	391	1
22H4	WKSGRS	392	1
24F10	WMQSKYSKKSCCYVY G	393	1
11F5	WPPELRLRLTDQWQHSI LMGM	394	1
20H3	WPPSSGPDCRFTHAIK L	395	1
16B7	WRSSFPSTIYGKD	396	1
19A1	WSGWPT	397	1
11F11	YWTNPPTLTIPRHLS TVLA	398	1

10

【0319】

実施例4

前立腺癌の予後に関連する体液性免疫応答プロファイル

本実施例は、前立腺癌の予後とファージエピトープクローンの関連の研究を記述する。実施例1に記述した前立腺癌cDNAファージディスプレイ・ライブラリーを、16人の前立腺癌血清（グリーンソン=6である7人の試料並びにグリーンソン=8および9である9人の試料）からのIgGのプールを使用してバイオパニングした。ファージ・エピトープ・マイクロアレイ・プラットフォームの構築後、32人の血清試料をスクリーニングした。走査した生データは、前立腺癌診断のために、実施例1に記載されているように正規化した。予後に関するファージ・クローンを同定するために、試料を同じグリーンソンスコアを有する試料と同等の比率で、トレーニングセット（31人の試料）またはテストセット（11人の試料）にランダムに割り当てた。リーブ-ワン-アウトクロスバリデーションと組み合わせたt検定をトレーニングセットに適用した。グリーンソンスコア 6である低リスク患者およびグリーンソンスコア 8である高リスク患者を2つの群とみなした。これらの最高性能の100%特異性（13/13）および62.5%感度（5/8）であるトレーニングセットに基づいて、合計21クローンを選択した。これらの21ファージエピトープを独立したテストセットに適用したときに、その性能は、100%特異性（4/4）および75%感度（5/6）であることが示された。

20

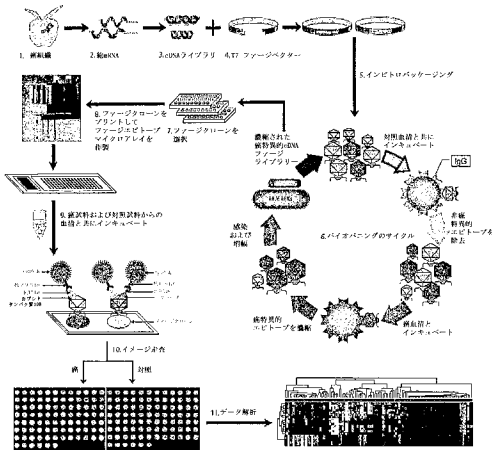
30

【0320】

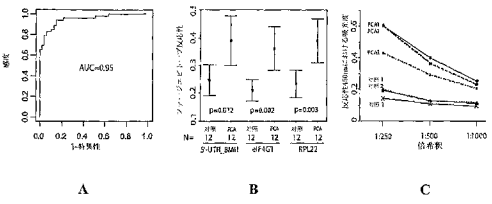
上記の明細書において述べた全ての刊行物および特許は、参照により本明細書に組み入れられる。本発明の記述された方法および系の種々の改変および変更は、当業者には本発明の範囲内であることが明らかであろう。本発明は、特定の好ましい態様に関して記述してあるが、主張した本発明は、このような特定の態様に過度に限定されるべきではないことが理解されるはずである。実際に、関連した分野の当業者には明らかである本発明を実施するために記述した様式の種々の改変が、請求の範囲の範囲内であることが意図される。

。

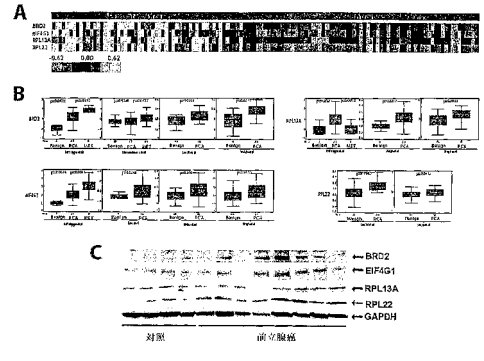
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

特徴	値
平均年齢 (年) ±SEM*	59.508 ± 1.05
平均腺重量 (g) ±SEM*	57.717 ± 8.78
平均腺サイズ (cm) ±SEM†	1.416 ± 0.096
PSA ‡	
平均 (ng/ml) ±SEM	8.276 ± 1.073
0-2.5 ng/ml (%)	8.5
2.6-10 ng/ml (%)	69.5
4-10 ng/ml (%)	57.6
> 10 ng/ml (%)	22
生化学的再発 (%)	13.6
グリーソン等級*	
≤6 (%)	36.2
≥7 (%)	63.8
原発腫瘍同定†	
T2a (%)	23.7
T2b (%)	64.4
T3a (%)	3.4
T3b (%)	6.8
T4 (%)	1.7
民族性‡	
白人 (ラテンアメリカ系の起源でない)(%)	83
ヒスパニック (%)	1.9
黒人 (ラテンアメリカ系の起源でない)(%)	3.8
不明 (%)	11.3

*データは、59人の患者について利用された。
 †データは、59人の患者について利用された。
 ‡データは、58人の患者について利用された。
 §データは、59人の患者について利用された。
 ¶データは、58人の患者について利用された。
 ††データは、59人の患者について利用された。
 ‡‡データは、53人の患者について利用された。

【図5】

特徴	値
平均年齢 (年) ±SEM*	59.72 ± 1.06
平均腺重量 (g) ±SEM*	57.750 ± 2.49
平均腺サイズ (cm) ±SEM†	1.628 ± 0.145
PSA ‡	
平均 (ng/ml) ±SEM	7.633 ± 1.053
0-2.5 ng/ml (%)	24.6
2.6-10 ng/ml (%)	62.5
4-10 ng/ml (%)	43.8
> 10 ng/ml (%)	23
生化学的再発 (%)	35.4
グリーソン等級*	
≤6 (%)	52.1
≥7 (%)	47.9
原発腫瘍同定†	
T2a (%)	22.9
T2b (%)	58.3
T3a (%)	8.3
T3b (%)	10.4
民族性‡	
白人 (ラテンアメリカ系の起源でない)(%)	80.9
ヒスパニック (%)	2.1
黒人 (ラテンアメリカ系の起源でない)(%)	2.1
不明 (%)	14.9

*データは、62人の患者について利用された。
 †データは、61人の患者について利用された。

【図6】

試料番号	年齢	RRP	グリーソン	転移性	PSA (ng/ml)	転移性	転移性	転移性	転移性	転移性
P1	55	Y	5+4=9	T2b	4	N	N	N	N	N
P2	76	N	N/A	転移性	95	Y	Y	Y	Y	Y
P3	76	Y	N/A	T2	18	Y	Y	Y	Y	N
P4	68	N	3+4=7	T3a	15	N	N	N	N	N
P5	69	N	4+5=7	T2c	238	Y	N	Y	Y	Y
P6	76	N	4+4=8	T2	8	Y	N	Y	Y	Y
P7	44	N	5+4=9	転移性	674	Y	Y	Y	Y	N
P8	72	N	1+2=3	転移性	17	Y	Y	Y	Y	Y
P9	72	N	4+4=8	転移性	412	Y	N	Y	Y	Y
P10	45	N	4+5=7	転移性	0.1	Y	N	Y	Y	Y
P11	52	N	4+3=7	転移性	183	Y	N	Y	Y	Y

【 図 7 】

形数の数	予測精度 (%)	誤り
10	93	9/12/29
20	93	9/12/29
21	93	9/12/29
22	93	9/12/29
23	91	12/12/29
24	90	13/12/29
25	90	13/12/29
26	91	12/12/29
30	91	12/12/29
50	88	15/12/29
100	86	18/12/29

【 図 8 - 1 】

試料名	判定	信頼度	病態	誤り
トロンボグゼット_175	正常	0.828	正常	
トロンボグゼット_116	正常	0.827	正常	
トロンボグゼット_178	正常	0.769	正常	
トロンボグゼット_168	正常	0.768	正常	
トロンボグゼット_111	正常	0.726	正常	
トロンボグゼット_182	正常	0.695	正常	
トロンボグゼット_190	正常	0.684	正常	
トロンボグゼット_187	正常	0.678	正常	
トロンボグゼット_115	正常	0.648	正常	
トロンボグゼット_208	正常	0.645	正常	
トロンボグゼット_210	正常	0.635	正常	
トロンボグゼット_114	正常	0.596	正常	
トロンボグゼット_203	正常	0.588	正常	
トロンボグゼット_179	正常	0.581	正常	
トロンボグゼット_189	正常	0.562	正常	
トロンボグゼット_117	正常	0.558	正常	
トロンボグゼット_184	正常	0.538	正常	
トロンボグゼット_214	正常	0.527	正常	
トロンボグゼット_164	正常	0.527	正常	
トロンボグゼット_174	正常	0.507	正常	
トロンボグゼット_108	正常	0.487	正常	
トロンボグゼット_109	正常	0.463	正常	
トロンボグゼット_112	正常	0.463	正常	
トロンボグゼット_113	正常	0.439	正常	
トロンボグゼット_107	正常	0.437	正常	
トロンボグゼット_166	正常	0.433	正常	
トロンボグゼット_198	正常	0.430	正常	
トロンボグゼット_167	正常	0.410	正常	
トロンボグゼット_207	正常	0.409	正常	
トロンボグゼット_185	正常	0.394	正常	
トロンボグゼット_181	正常	0.370	正常	
トロンボグゼット_103	正常	0.367	正常	
トロンボグゼット_170	正常	0.358	正常	
トロンボグゼット_225	正常	0.355	正常	
トロンボグゼット_169	正常	0.354	正常	
トロンボグゼット_105	正常	0.348	正常	
トロンボグゼット_102	正常	0.331	正常	
トロンボグゼット_125	正常	0.320	正常	
トロンボグゼット_157	正常	0.326	正常	
トロンボグゼット_177	正常	0.324	正常	
トロンボグゼット_173	正常	0.323	正常	
トロンボグゼット_212	正常	0.236	正常	
トロンボグゼット_136	正常	0.233	正常	
トロンボグゼット_217	正常	0.233	正常	
トロンボグゼット_201	正常	0.231	正常	
トロンボグゼット_110	正常	0.227	正常	

【 図 8 - 3 】

トロンボグゼット_195	正常	0.030	正常	
トロンボグゼット_238	正常	0.035	正常	
トロンボグゼット_192	正常	0.042	正常	
トロンボグゼット_149	正常	0.041	正常	
トロンボグゼット_142	正常	0.040	正常	
トロンボグゼット_204	正常	0.038	正常	
トロンボグゼット_145	正常	0.033	正常	
トロンボグゼット_188	正常	0.027	正常	
トロンボグゼット_197	正常	0.024	正常	
トロンボグゼット_123	正常	0.024	正常	
トロンボグゼット_153	正常	0.021	正常	
トロンボグゼット_121	正常	0.019	正常	
トロンボグゼット_155	正常	0.018	正常	
トロンボグゼット_205	正常	0.016	正常	
トロンボグゼット_218	正常	0.016	正常	
トロンボグゼット_216	正常	0.016	正常	
トロンボグゼット_148	正常	0.013	正常	
トロンボグゼット_134	正常	0.010	正常	
トロンボグゼット_200	正常	0.007	正常	
トロンボグゼット_115	正常	0.003	正常	
トロンボグゼット_224	正常	0.002	正常	
トロンボグゼット_122	正常	0.001	正常	
トロンボグゼット_127	正常	0.000	正常	
トロンボグゼット_139	正常	0.000	正常	
トロンボグゼット_147	正常	0.000	正常	
トロンボグゼット_154	正常	0.000	正常	
トロンボグゼット_215	正常	0.000	正常	

* Armstrong, S. A., Stanton, J. E., Silverman, L. B., Platzer, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., Shih, S. E., Langer, E. S., Golub, T. R. and Korsmeyer, S. J., MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet 2002. 36: 41-47.

【 図 8 - 2 】

トロンボグゼット_106	正常	0.226	正常	
トロンボグゼット_210	正常	0.226	正常	
トロンボグゼット_101	正常	0.222	正常	
トロンボグゼット_229	正常	0.216	正常	
トロンボグゼット_133	正常	0.211	正常	
トロンボグゼット_143	正常	0.202	正常	
トロンボグゼット_171	正常	0.197	正常	
トロンボグゼット_140	正常	0.195	正常	
トロンボグゼット_159	正常	0.193	正常	
トロンボグゼット_162	正常	0.191	正常	
トロンボグゼット_121	正常	0.190	正常	
トロンボグゼット_156	正常	0.176	正常	
トロンボグゼット_156	正常	0.176	正常	
トロンボグゼット_160	正常	0.168	正常	
トロンボグゼット_222	正常	0.166	正常	
トロンボグゼット_183	正常	0.165	正常	
トロンボグゼット_161	正常	0.163	正常	
トロンボグゼット_122	正常	0.156	正常	
トロンボグゼット_130	正常	0.153	正常	
トロンボグゼット_213	正常	0.151	正常	
トロンボグゼット_119	正常	0.148	正常	
トロンボグゼット_146	正常	0.146	正常	
トロンボグゼット_163	正常	0.146	正常	
トロンボグゼット_185	正常	0.142	正常	
トロンボグゼット_183	正常	0.140	正常	
トロンボグゼット_125	正常	0.138	正常	
トロンボグゼット_180	正常	0.136	正常	
トロンボグゼット_191	正常	0.132	正常	
トロンボグゼット_188	正常	0.130	正常	
トロンボグゼット_199	正常	0.121	正常	
トロンボグゼット_125	正常	0.116	正常	
トロンボグゼット_150	正常	0.109	正常	
トロンボグゼット_223	正常	0.108	正常	
トロンボグゼット_144	正常	0.105	正常	
トロンボグゼット_201	正常	0.102	正常	
トロンボグゼット_176	正常	0.097	正常	
トロンボグゼット_202	正常	0.097	正常	
トロンボグゼット_128	正常	0.093	正常	
トロンボグゼット_141	正常	0.089	正常	
トロンボグゼット_194	正常	0.088	正常	
トロンボグゼット_209	正常	0.087	正常	
トロンボグゼット_124	正常	0.085	正常	
トロンボグゼット_126	正常	0.075	正常	
トロンボグゼット_172	正常	0.075	正常	
トロンボグゼット_151	正常	0.074	正常	
トロンボグゼット_227	正常	0.074	正常	
トロンボグゼット_186	正常	0.069	正常	
トロンボグゼット_137	正常	0.069	正常	
トロンボグゼット_138	正常	0.069	正常	
トロンボグゼット_150	正常	0.067	正常	
トロンボグゼット_130	正常	0.066	正常	
トロンボグゼット_200	正常	0.063	正常	
トロンボグゼット_226	正常	0.058	正常	
トロンボグゼット_104	正常	0.056	正常	
トロンボグゼット_206	正常	0.056	正常	
トロンボグゼット_152	正常	0.052	正常	

【 図 9 - 1 】

試料名	判定	信頼度	病態	誤り
アストゼット_101	正常	0.147	正常	
アストゼット_102	正常	0.239	正常	
アストゼット_103	正常	0.210	正常	
アストゼット_104	正常	0.317	正常	
アストゼット_105	正常	0.388	正常	
アストゼット_108	正常	0.490	正常	
アストゼット_107	正常	0.471	正常	
アストゼット_108	正常	0.570	正常	
アストゼット_109	正常	0.577	正常	
アストゼット_110	正常	0.585	正常	
アストゼット_111	正常	0.801	正常	
アストゼット_112	正常	0.636	正常	
アストゼット_113	正常	0.680	正常	
アストゼット_114	正常	0.711	正常	
アストゼット_115	正常	0.748	正常	
アストゼット_118	正常	0.002	癌	
アストゼット_117	正常	0.002	癌	
アストゼット_118	正常	0.012	癌	
アストゼット_119	正常	0.047	癌	
アストゼット_120	正常	0.072	癌	
アストゼット_121	正常	0.084	癌	
アストゼット_122	正常	0.137	癌	
アストゼット_123	正常	0.186	癌	
アストゼット_124	正常	0.226	癌	
アストゼット_125	正常	0.256	癌	
アストゼット_128	正常	0.283	癌	
アストゼット_127	正常	0.279	癌	
アストゼット_128	正常	0.297	癌	
アストゼット_129	正常	0.343	癌	
アストゼット_130	正常	0.351	癌	
アストゼット_131	正常	0.382	癌	
アストゼット_132	正常	0.396	癌	
アストゼット_133	正常	0.396	癌	
アストゼット_134	正常	0.474	癌	
アストゼット_136	正常	0.504	癌	
アストゼット_136	正常	0.506	癌	
アストゼット_137	正常	0.543	癌	
アストゼット_138	正常	0.604	癌	

【配列表】

2011217749000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年6月14日(2011.6.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の自己抗体を検出するための方法であって、該試料中の、FAM53B、ユビキリン、5'UTR-BMI、ジンクフィンガー-292、DCAMKL1、RPL22、RPL13A、仮想的タンパク質XP 373908、NOL3、またはAZGP1由来の抗原に対する自己抗体の存在、欠如、またはレベルを検出することを含む方法。

【請求項2】

前記試料中の、BRD2、HES1、eIF4G1、またはHSPA70由来の抗原に対する自己抗体の存在、欠如、またはレベルを検出することをさらに含む方法。

【請求項3】

前記試料が癌を有することが疑われる被検体からのものである、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記癌が、前立腺癌、乳癌、または肺癌である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記試料が、前立腺癌の1または複数の症状を有する被検体からのものであり、該1または複数の症状が、CTスキャンにより検出された腫瘍または増大したPSAレベルである、請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記自己抗体の存在が癌の存在を示す、請求項1記載の方法。

【請求項7】

複数のエピトープ・マーカを含む複数の自己抗体の存在を検出するためのパネルであって、該マーカの少なくとも1つが、FAM53B、ユビキリン、5'UTR-BMI、ジンクフィンガー-292、DCAMKL1、RPL22、RPL13A、仮想的タンパク質XP 373908、NOL3、またはAZGP1由来の抗原である、パネル。

【請求項8】

BRD2、HES1、eIF4G1、またはHSPA70由来の抗原であるエピトープ・マーカをさらに含む、請求項7記載のパネル。

【請求項9】

前記パネルが、癌について被験体をスクリーニングするためのものである、請求項7または8記載のパネル。

【請求項10】

前記癌が、前立腺癌、乳癌、または肺癌である、請求項9記載のパネル。

【請求項11】

前記パネルがアレイである、請求項7～9のいずれか一項記載のパネル。

【請求項12】

前記複数のエピトープ・マーカが、癌試料からの血清中に存在する抗体レパートリーにより認識されるが、対照試料においては認識されない、請求項7～10のいずれか一項記載のパネル。

【請求項13】

FAM53B、ユビキリン、5'UTR-BMI、ジンクフィンガー-292、DCAMKL1、RPL22、RPL13A、仮想的タンパク質XP 373908、NOL3、またはAZGP1由来の抗原に対する自己抗体の存在、欠如

、またはレベルを特異的に検出することができる試薬。

【請求項 14】

抗原、抗体、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプチド、または小分子を含む、請求項 13 記載の試薬。

【請求項 15】

前記試薬が、癌について被験体をスクリーニングするためのものである、請求項 13 または 14 記載の試薬。

【請求項 16】

前記癌が、前立腺癌、乳癌、または肺癌である、請求項 15 記載の試薬。

【請求項 17】

請求項 13 ~ 16 のいずれか一項記載の複数の試薬を含むキット。

【請求項 18】

BRD2、HES1、eIF4G1、またはHSPA70由来の抗原に対する自己抗体の存在、欠如、またはレベルを特異的に検出することができる試薬をさらに含む請求項 17 記載のキット。

【請求項 19】

前記BRD2、HES1、eIF4G1、またはHSPA70由来の抗原に対する自己抗体の存在、欠如、またはレベルを特異的に検出することができる試薬が、抗原、抗体、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプチド、または小分子を含む、請求項 18 記載のキット。

【請求項 20】

前記キットが、癌について被験体をスクリーニングするためのものである、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項記載のキット。

【請求項 21】

前記癌が、前立腺癌、乳癌、または肺癌である、請求項 20 記載のキット。

【請求項 22】

前記被験体が、前立腺癌の 1 または複数の症状を有し、該 1 または複数の症状が、CTスキャンにより検出された腫瘍または増大したPSAレベルである、請求項 21 記載のキット

。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574		A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00		A	

(72)発明者 ワン シャオユ

アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー ガブリエル アベニュー 6 1 4 5

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA12 BA61 CA04 HA12

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ10 QQ42 QR32 QR72 QS32 QS33 QS34

QX01

专利名称(译)	噬菌体 - 微阵列分析方法对疾病的体液反应		
公开(公告)号	JP2011217749A	公开(公告)日	2011-11-04
申请号	JP2011109520	申请日	2011-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	密歇根大学		
申请(专利权)人(译)	密歇根大学董事会		
[标]发明人	チナイヤンアルール ワンシャオユ		
发明人	チナイヤン アルール ワン シャオユ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 C40B50/06 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/574 C12N15/09 C12N15/10 C40B40/02 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/4748 C12N15/1037 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/118 C12Q2600/136 G01N33 /6845 G01N33/57415 G01N33/57423 G01N33/57434		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA C12Q1/68.ZCC.A C40B50/06 G01N33/53.S G01N33/533 G01N33/574.A C12N15/00.A C12N15/10.P C12N15/10.Z C12Q1/68.AZC.C C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063 /QA19 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR72 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/578406 2004-06-09 US 11/145861 2005-06-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
用于癌症(例如,前列腺癌,肺癌或乳腺癌)的噬菌体微阵列谱分析的方法和组合物,以及可用于诊断,表征和治疗疾病的新颖标记物。解决方案:疾病特异性克隆从噬菌体文库中富集,该噬菌体文库由多个噬菌体克隆组成,这些噬菌体克隆包含从患病受试者的mRNA中获得的cDNA,并暴露于患有该疾病的患者的血清中。一种鉴定与血清反应的克隆的方法。[选择图]无

	トレーニングセット	テストセット
腺癌 (n)	75	75
年齢の平均 (年)	63.6	66.3
年齢の範囲	44-90	34-88
男性	37	37
女性	38	38
病期 I-II	57	59
病期 III-IV	18	16
死亡	35	33
生存	40	42
生存期間 (ms)	31.5	32.4
非癌対照 (n)	50	51
年齢の平均 (年)	60.8	60.8
年齢の範囲	36 - 77	40 - 77
男性	30	31
女性	20	20

【 0 3 0 7 】

(表2) トレーニングおよびテストセットの予測精I