

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-525103

(P2005-525103A)

(43) 公表日 平成17年8月25日(2005.8.25)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00	Z N A C	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47		4 B O 6 3
C O 7 K 14/82	C O 7 K 14/82		4 B O 6 4
C O 7 K 16/32	C O 7 K 16/32		4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09	C 1 2 P 21/08		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2003-564553 (P2003-564553)	(71) 出願人	504279968
(86) (22) 出願日	平成15年1月27日 (2003. 1. 27)		ユニバーシティ オブ ピッツバーグ
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月27日 (2004. 8. 27)		アメリカ合衆国 1 5 2 6 0 ペンシルバ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/002340		ニア州, ピッツバーグ, サッカレイ ア
(87) 国際公開番号	W02003/065003		ド オハラ ストリーツ, ガードナー ス
(87) 国際公開日	平成15年8月7日 (2003. 8. 7)		ティール コンファレンス センター 2
(31) 優先権主張番号	60/351, 819		0 0
(32) 優先日	平成14年1月25日 (2002. 1. 25)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	60/412, 612	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成14年9月19日 (2002. 9. 19)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 結腸癌および結腸癌の肝臓転移に関わる核マトリックスタンパク質の変化とその使用

## (57) 【要約】

結腸の増殖性疾患の診断に有用なタンパク質が核マトリックスタンパク質調製物中に存在し、それらは分子量、等電点、およびアミノ酸配列によって特徴付けることができる。該タンパク質は、例えば2次元ゲル電気泳動、または抗体などの特異的結合パートナーによって同定することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかまたは量が低下している精製タンパク質であって、該タンパク質が次のもの：

- a) 分子量が約56kDでpIが約6.22のCC2；
- b) 分子量が約43kDでpIが約6.3のCC3；
- c) 分子量が約43kDでpIが約6.2のCC4；
- d) 分子量が約42kDでpIが約6.2のCC5；
- e) 分子量が約20kDでpIが約6.9のCC6a；
- f) 分子量が約20kDでpIが約6.8のCC6b；
- g) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
- h) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；および
- i) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；

10

からなる群から選択されたものである、精製タンパク質。

## 【請求項 2】

該タンパク質がCC2である請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 3】

該タンパク質がCC3である請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 4】

該タンパク質がCC4である請求項 1 に記載の精製タンパク質。

20

## 【請求項 5】

該タンパク質がCC5である請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 6】

該タンパク質がCC6aである請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 7】

該タンパク質がCC6bである請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 8】

該タンパク質がL1である請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 9】

該タンパク質がL2である請求項 1 に記載の精製タンパク質。

30

## 【請求項 10】

該タンパク質がL5である請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 11】

該タンパク質が結腸癌の肝臓転移では正常肝臓組織よりもより多く検出される、請求項 1 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 12】

該タンパク質がL1、L2、またはL3である、請求項 11 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 13】

CC2が配列番号14、15、16、17、または23に示すアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の精製タンパク質。

40

## 【請求項 14】

CC3が配列番号24～26に示すアミノ酸配列を含む、請求項 3 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 15】

CC4が配列番号27～29に示すアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 16】

CC6aが配列番号18～20に示すアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 17】

CC6bが配列番号21に示すアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 18】

L2が配列番号30～32に示すアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の精製タンパク質。

50

## 【請求項 19】

L5が配列番号33～36に示すアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 20】

該タンパク質が核マトリックス調製物中に存在する、請求項1に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 21】

請求項1に記載の精製タンパク質に対して特異的な結合パートナー。

## 【請求項 22】

該結合パートナーがモノクローナル抗体である、請求項21に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 23】

該結合パートナーがポリクローナル抗体である、請求項21に記載の精製タンパク質。

10

## 【請求項 24】

正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかまたは量が低下している精製タンパク質であって、該タンパク質が次のもの：

- a) 分子量が約40kDでpIが約5.5のN1；
- b) 分子量が約30kDでpIが約5.94のN2；
- c) 分子量が約30kDでpIが約5.88のN3；
- d) 分子量が約30kDでpIが約5.80のN4；
- e) 分子量が約30kDでpIが約5.73のN5；および
- f) 分子量が約18kDでpIが約6.6のN6；

20

からなる群から選択されたものである、精製タンパク質。

## 【請求項 25】

該タンパク質がN1である、請求項24に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 26】

該タンパク質がN2である、請求項24に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 27】

該タンパク質がN3である、請求項24に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 28】

該タンパク質がN4である、請求項24に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 29】

該タンパク質がN5である、請求項24に記載の精製タンパク質。

30

## 【請求項 30】

該タンパク質がN5である、請求項24に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 31】

該タンパク質が核マトリックス調製物中に存在する、請求項24に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 32】

請求項24に記載の精製タンパク質に対して特異的な結合パートナー。

## 【請求項 33】

該結合パートナーがモノクローナル抗体である、請求項32に記載の精製タンパク質。

40

## 【請求項 34】

該結合パートナーがポリクローナル抗体である、請求項32に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 35】

原発性結腸癌細胞およびそれから肝臓へ転移したものに存在し、癌の診断用マーカーとして有用な精製タンパク質であって、該タンパク質が次のもの：

- a) 分子量が約18kDでpIが約6.09のL3；
- b) 分子量が約18kDでpIが約6.00のL4；

からなる群から選択されたものである、精製タンパク質。

## 【請求項 36】

該タンパク質がL3である、請求項35に記載の精製タンパク質。

50

## 【請求項 37】

該タンパク質がL4である、請求項 35 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 38】

該タンパク質が核マトリックス調製物中に存在する、請求項 35 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 39】

請求項 35 に記載の精製タンパク質に対して特異的な結合パートナー。

## 【請求項 40】

該結合パートナーがモノクローナル抗体である、請求項 39 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 41】

該結合パートナーがポリクローナル抗体である、請求項 39 に記載の精製タンパク質。

## 【請求項 42】

癌性の結腸上皮細胞と正常な結腸上皮細胞とを識別するポリクローナル抗体の作製方法であって、動物を請求項 1 に記載のタンパク質で免疫し、該抗体を回収することを含んでなる、方法。

## 【請求項 43】

癌性の結腸上皮細胞と正常な結腸上皮細胞とを識別するポリクローナル抗体の作製方法であって、動物を請求項 24 に記載のタンパク質で免疫し、該抗体を回収することを含んでなる、方法。

## 【請求項 44】

結腸癌の肝臓へ転移したものと正常な肝臓上皮細胞とを識別するポリクローナル抗体の作製方法であって、動物を請求項 35 に記載のタンパク質で免疫し、該抗体を回収することを含んでなる、方法。

## 【請求項 45】

癌性の結腸上皮細胞と正常な結腸上皮細胞とを識別するモノクローナル抗体を作製する方法であって、動物を請求項 1 に記載のタンパク質で免疫し、その免疫した動物からB細胞を取り出し、i)該タンパク質に対して特異的な抗体を産生する該B細胞を不死化および単離し、またはii)B細胞から抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸を得て、宿主細胞が該核酸によってコードされる抗体を産生するように、該核酸を含んでいる1個以上の発現ベクターで該宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、または形質導入し、該タンパク質に対して特異的な抗体を産生する宿主細胞を選択することを含んでなる、方法。

## 【請求項 46】

癌性の結腸上皮細胞と正常な結腸上皮細胞とを識別するモノクローナル抗体を作製する方法であって、動物を請求項 24 に記載のタンパク質で免疫し、その免疫した動物からB細胞を取り出し、i)該タンパク質に対して特異的な抗体を産生する該B細胞を不死化および単離し、またはii)B細胞から抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸を得て、宿主細胞が該核酸によってコードされる抗体を産生するように、該核酸を含んでいる1個以上の発現ベクターで該宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、または形質導入し、該タンパク質に対して特異的な抗体を産生する宿主細胞を選択することを含んでなる、方法。

## 【請求項 47】

結腸癌の肝臓へ転移したものと正常な肝臓上皮細胞とを識別するモノクローナル抗体を作製する方法であって、動物を請求項 35 に記載のタンパク質で免疫し、その免疫した動物からB細胞を取り出し、i)該タンパク質に対して特異的な抗体を産生する該B細胞を不死化および単離し、またはii)B細胞から抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸を得て、宿主細胞が該核酸によってコードされる抗体を産生するように、該核酸を含んでいる1個以上の発現ベクターで該宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、または形質導入し、該タンパク質に対して特異的な抗体を産生する宿主細胞を選択することを含んでなる、方法。

## 【請求項 48】

患者の結腸の増殖性疾患を診断する方法であって、患者から得た組織、糞便、または体

10

20

30

40

50

液中に、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないか量が低下している、または正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないか量が低下している、少なくとも1種のタンパク質の存在を分析することを含んでなる方法で、該タンパク質が次のもの：

- a) 分子量が約56kDでpIが約6.22のCC2；
- b) 分子量が約43kDでpIが約6.3のCC3；
- c) 分子量が約43kDでpIが約6.2のCC4；
- d) 分子量が約42kDでpIが約6.2のCC5；
- e) 分子量が約20kDでpIが約6.9のCC6a；
- f) 分子量が約20kDでpIが約6.8のCC6b；
- g) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
- h) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；
- i) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；
- j) 分子量が約40kDでpIが約5.5のN1；
- k) 分子量が約30kDでpIが約5.94のN2；
- l) 分子量が約30kDでpIが約5.88のN3；
- m) 分子量が約30kDでpIが約5.80のN4；
- n) 分子量が約30kDでpIが約5.73のN5；および
- o) 分子量が約18kDでpIが約6.6のN6；

からなる群から選択されたものである、方法。

10

20

【請求項49】

少なくとも1個の該タンパク質の存在が2次元ゲル電気泳動で検出される、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

少なくとも1個の該タンパク質の存在が該タンパク質に特異的な結合パートナーを用いて検出される、請求項48に記載の方法。

【請求項51】

該結合パートナーがモノクローナルまたはポリクローナル抗体である、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

少なくとも1個の該タンパク質の存在が該タンパク質をコードするmRNAを核酸とハイブリダイズさせて検出することによって調べる、請求項48に記載の方法。

30

【請求項53】

該精製タンパク質が核マトリックス調製物中に存在している、請求項48に記載の方法。

【請求項54】

患者の結腸癌を診断する方法であって、患者から得た組織、糞便、または体液中のカルレティキュリンの存在を分析することを含んでなる、方法。

【請求項55】

該検出が2次元ゲル電気泳動で行われる、請求項54に記載の方法。

40

【請求項56】

カルレティキュリンが特異的な結合パートナーによって検出される、請求項54に記載の方法。

【請求項57】

該特異的な結合パートナーがモノクローナルまたはポリクローナル抗体である、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

カルレティキュリンがカルレティキュリンの核酸とハイブリダイズさせることによって検出される、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

50

組織が分析される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 0】

該組織が核マトリックス調製物である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

該増殖性疾患が結腸直腸癌である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 2】

該増殖性疾患が結腸腺腫である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 3】

該タンパク質がCC3、CC4、またはCC5である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

結腸腺腫が悪性のものとなる可能性を評価する方法であって、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、または正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、少なくとも1種のタンパク質の存在について該腺腫を分析することを含んでなる方法で、該タンパク質が次のもの：

- a) 分子量が約56kDでpIが約6.22のCC2；
- b) 分子量が約43kDでpIが約6.3のCC3；
- c) 分子量が約43kDでpIが約6.2のCC4；
- d) 分子量が約42kDでpIが約6.2のCC5；
- e) 分子量が約20kDでpIが約6.9のCC6a；
- f) 分子量が約20kDでpIが約6.8のCC6b；
- g) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
- h) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；
- i) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；
- j) 分子量が約40kDでpIが約5.5のN1；
- k) 分子量が約30kDでpIが約5.94のN2；
- l) 分子量が約30kDでpIが約5.88のN3；
- m) 分子量が約30kDでpIが約5.80のN4；
- n) 分子量が約30kDでpIが約5.73のN5；および
- o) 分子量が約18kDでpIが約6.6のN6；

からなる群から選択されたものであり、該タンパク質が検出されることが、悪性なものとなる可能性の増大を示すものである、方法。

【請求項 6 5】

少なくとも1個の該タンパク質の存在が2次元ゲル電気泳動で検出される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

少なくとも1個の該タンパク質の存在が該タンパク質に特異的な結合パートナーを用いて検出される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

該結合パートナーがモノクローナルまたはポリクローナル抗体である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

少なくとも1個の該タンパク質の存在が該タンパク質をコードするmRNAを核酸とハイブリダイズさせて検出することによって決定される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

該タンパク質がCC3、CC4、およびCC5である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 0】

患者の結腸癌の肝臓への転移を診断する方法であって、肝臓のサンプル中の、少なくとも1種のタンパク質の存在を分析することを含んでなる方法で、該タンパク質が次のもの：

10

20

30

40

50

- a) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
  - b) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；
  - c) 分子量が約17kDでpIが約6.09のL3；
  - d) 分子量が約17kDでpIが約6.00のL4；および
  - e) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；
- からなる群から選択されたものである、方法。

【請求項71】

少なくとも1種の該タンパク質の存在が高分解能2次元ゲル電気泳動によって検出される、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

少なくとも1個の該タンパク質の存在が該タンパク質に特異的な結合パートナーを用いて検出される、請求項70に記載の方法。

【請求項73】

該結合パートナーがモノクローナルまたはポリクローナル抗体である、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

該タンパク質がカルレティキュリンの核酸とハイブリダイズさせることによって検出される、請求項72に記載の方法。

【請求項75】

請求項1に記載のタンパク質の存在を調べるための診断用アッセイキットであって、該タンパク質と特異的に結合することのできる少なくとも1種の結合パートナーを含んでなる、診断用アッセイキット。

【請求項76】

該結合パートナーは固相支持体上に固定化されたものである、請求項75に記載の診断用アッセイキット。

【請求項77】

該結合パートナーが検出しうるように標識されたものである、請求項75に記載の診断用アッセイキット。

【請求項78】

該結合パートナーが抗体である、請求項75に記載の診断用アッセイキット。

【請求項79】

患者の結腸の増殖性疾患の生物学的マーカーとしてのタンパク質の使用であって、患者から得た組織、糞便、または体液中で該タンパク質を検出し、該タンパク質が癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下していることで特徴付けられるか、または該タンパク質が正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下していることで特徴付けられ、該タンパク質が次のもの：

- a) 分子量が約56kDでpIが約6.22のCC2；
- b) 分子量が約43kDでpIが約6.3のCC3；
- c) 分子量が約43kDでpIが約6.2のCC4；
- d) 分子量が約42kDでpIが約6.2のCC5；
- e) 分子量が約20kDでpIが約6.9のCC6a；
- f) 分子量が約20kDでpIが約6.8のCC6b；
- g) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
- h) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；
- i) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；
- j) 分子量が約40kDでpIが約5.5のN1；
- k) 分子量が約30kDでpIが約5.94のN2；
- l) 分子量が約30kDでpIが約5.88のN3；
- m) 分子量が約30kDでpIが約5.80のN4；

10

20

30

40

50

- n) 分子量が約30kDでpIが約5.73のN5；および  
 o) 分子量が約18kDでpIが約6.6のN6；  
 からなる群から選択されたものである、使用。

【請求項79】

結腸の該増殖性疾患が結腸の腺癌である、請求項78に記載の使用。

【請求項80】

結腸の該増殖性疾患が結腸腺腫である、請求項78に記載の使用。

【請求項81】

患者の結腸癌の肝臓への転移を診断する生物学的マーカーとしてのタンパク質の使用であって、該タンパク質を患者から得た肝臓のサンプル中で検出し、該タンパク質が次のもの： 10

- a) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；  
 b) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；  
 c) 分子量が約17kDでpIが約6.09のL3；  
 d) 分子量が約17kDでpIが約6.00のL4；および  
 e) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；  
 からなる群から選択されたものである、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】 20

政府支援の研究に関する供述

本発明は米国国立衛生研究所(United States National Institutes of Health)からの政府援助を受けてなされたものである。米国政府は本発明に対して一定の権利を有するものである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

本発明は結腸癌および結腸癌の肝臓への転移を含む結腸の細胞増殖障害に伴うタンパク質に関する。本発明はまた、正常な結腸組織に関わるタンパク質に関する。

【0003】 30

手術手技、補助療法、およびスクリーニング法の改良によって、結腸癌の死亡率は過去20年間、全体として減少した(1)。それでもやはり、結腸直腸癌は依然として米国では全ての癌のうちの11%を占める重要な疾患であり、2001年では、130,200例の新患者および48,100例の死亡があるものと推測されている(2)。初期の限局性のステージで診断を受けた場合は結腸癌の5年生存率は90%である。このステージで偶然に結腸癌であると診断される症例は37%にすぎず、残りの方々では、腫瘍が転移してしまってから医師の診断を仰ぐことがよくある。

【0004】

このような公衆衛生上の問題を解決するには、結腸直腸癌に対するより効果的なスクリーニング法と予防策が必要である。結腸大腸癌の早期発見法には、糞便中の血液の試験または内視鏡の使用が含まれる。糞便中の血液試験での検出には、腫瘍が非常に大きくなっていることが必要であり(小さなポリープでは感度は90%で、微小なポリープでは75%である)、感度は約26%で、このことは悪性の病変のある患者の74%が検出されないことを意味する。便潜血の試験では初期の結腸癌のステージでは糞便中には血液はほとんど放出されないため、初期の結腸癌の多数のものを検出することができない。また、便潜血試験は一般的なスクリーニングとしてはさほど特異性が高くなく、多数の方々はこの試験後の腸の精密検査で不必要な不快感と危険性をもたらすこととなる。 40

【0005】

前癌状態および癌の病変を内視鏡で観察することは、早期発見に効果的ではあるが、合併症の大きな危険性を伴う侵襲的な方法である(4,5)。例えば、この方法の実施例のうち 50

で盲腸まで到達するのは80%~95%であり(22)、結腸鏡観察が不完全な場合には、結腸鏡での観察を反復するかまたは補助的にバリウム浣腸のいずれかを行う必要がある。

#### 【0006】

結腸鏡観察の複雑性とコストはかなり大きく、癌のスクリーニングの道具としてこの方法をどの程度の頻度で用いるべきかは不明である。さらに、内視鏡の操作を行う作業者によってこの方法への適性がかなり異なる。従って、結腸鏡観察は現在のところ一般人での結腸癌のスクリーニングには有用でない。

#### 【0007】

癌の早期発見または早期の予後判定のための情報を高い信頼性で提供することのできる、結腸癌のより良い診断用マーカーを見出すための努力が、長年にわたってなされてきた。癌胎児性抗原(CEA)は腫瘍関連糖タンパク質であるが、結腸直腸癌、胃癌、および膵臓癌の95%、乳癌、肺癌、および頭頸部癌の多数でその発現レベルが上昇していることが見出された(6)。診断用の血中CEA試験は結腸直腸癌の管理で治療の結果をフォローするために用いられている。術後のフォローアップではCEAは再発、主として肝臓転移のマーカーとして有用であると考えられるが(感度77%;特異性98%)、モニタリング療法では結腸直腸癌の検出に十分なだけのCEAのレベルを放出する結腸直腸癌は半数にすぎないことが示されている(7,8)。

#### 【0008】

癌の再発の検出におけるCEAの有用性は議論のあるところであり、広く適用されるには至っていない(9,10)。非悪性疾患の患者でのCEAの高値が報告されており、また結腸癌の患者、特に結腸癌の初期の患者の多数で血清中のCEAのレベルは正常である(7,11)。現在得られているデータからは、血清CEA測定は、無症状の人々での結腸直腸癌の早期スクリーニング試験として必要とされる感度、特異性のいずれも有していない(12)。

#### 【0009】

大きな形態学的変形を含む核の形、大きさ、およびDNA組織化の変化は癌細胞のユニークな特徴であり、癌の診断に用いられてきた。核の構造は核の足場をなすものである各マトリックスで決定されている。この核マトリックスは末梢ラミン、タンパク質複合体、内部リボ核酸タンパク質ネットワーク、および、残りの核小体から構成されている(23)。核のフレームワークは約10%の核タンパク質からなり、および実質的には脂質、DNA、およびヒストンを欠いている(24)。これまでに同定された核マトリックスタンパク質の大部分は全ての細胞タイプに共通したものであったが、同定されたNMPのいくつかは組織および細胞系統特異的なものであり、NMPは分化とともに変化していくことが示されている(25,26)。

#### 【0010】

異常な核マトリックスタンパク質の細胞タイプ特異的な「フィンガープリント」および癌の発達において核マトリックスタンパク質が出現してくるので、これらの核マトリックスタンパク質を癌の診断のための、および/または予後判定のためのマーカーとして開発しうるか否かを調べる努力において種々の腫瘍での核マトリックスタンパク質組成の分析を行うこととなった。高分解能の2次元電気泳動によって特異的な核マトリックスタンパク質の変化が、前立腺、膀胱、腎臓、および結腸の原発性癌に存在することが示された(27-30)。種々のタイプの癌を有する患者の血清中に核マトリックスタンパク質が検出された(31)。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

#### 発明の要旨

本発明の1態様では、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかまたは量が低下している、精製タンパク質が提供される。特定のタンパク質としては、CC2、CC3、CC4、CC5、CC6a、CC6b、L1、L2、およびL5が含まれる。これらのタンパク質の見かけの分子量、等電点、および部分アミノ酸配列は、本明細書の実施例の記

10

20

30

40

50

載中で提供される。好ましい1実施形態においては、該タンパク質は核マトリックス調製物(「NMP」)中に検出される。

【0012】

本発明の別の1態様では、正常な結腸上皮細胞中には存在するが、癌性の結腸細胞中で全く存在しないかまたは量が低下しているタンパク質が提供される。特定されたタンパク質には、N1~N6が含まれ、それらの見かけの分子量、および等電点の値は提供されている(後記の実施例を参照のこと)。好ましい1実施形態においては、該Nタンパク質は核マトリックスタンパク質中に検出される。

【0013】

本発明のまた別の1態様では、結腸癌の診断マーカーとして有用な、癌性の結腸細胞およびそれから由来した肝臓への転移癌中の精製タンパク質が提供される。特定のタンパク質としてはL1、L2、L3、L4、およびL5が含まれ、これらを見かけの分子量および等電点は下記に示す。好ましい1実施形態においては、タンパク質L1~L5はNMP中で検出される。

【0014】

本発明のさらに別の1態様では、本発明のタンパク質に対して特異的な結合パートナーが提供される。結合パートナーは例えば診断用または治療用に用いることができる。結合パートナーを作製する方法が提供される。結合パートナーは好ましくはモノクローナルまたはポリクローナル抗体である。本発明のさらに別の1態様では、患者から得た組織、糞便、または体液中に、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、または正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、少なくとも1種のタンパク質の存在を分析することによって、その患者の体内の、結腸の細胞増殖性疾患、好ましくは結腸癌を診断するための方法が提供される。そのような診断用タンパク質としては、CC2、CC3、CC4、CC5、CC6a、CC6b、L1、L2、およびL5、ならびにN1~N6が含まれる。これらのタンパク質は、2次元ゲル電気泳動、特異的結合パートナーによる検出などの生化学的方法を含む種々の方法によって、またはコードするmRNAのレベルを測定することによって、検出することができる。1実施形態においては、該増殖性疾患は結腸直腸の腺癌であり、また別の実施形態では、該増殖性疾患は結腸腺腫である。

【0015】

本発明のさらにまた別の1態様では、患者体内の結腸癌を診断する方法が提供され、その方法は、その患者から得た組織、糞便、または体液にカルレティキュリン(calreticulin)がないか分析することを含んでなる。カルレティキュリンは2次元電気泳動、特異的結合パートナーによる検出、またはカルレティキュリンをコードするmRNAのレベルの測定などの生化学的方法を含む種々の方法のいずれかで検出することができる。好ましい1実施形態においては、カルレティキュリンはNMP調製物中に検出される。

【0016】

本発明のまた別の1態様では、結腸腺腫が悪性のものとなる可能性があるかを評価する方法が提供される。その方法は、その腺腫について、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、または正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、少なくとも1種のタンパク質の存在を分析することを含む。そのようなタンパク質とは、CC2、CC3、CC4、CC5、CC6a、CC6b、L1、L2、およびL5、ならびにN1~N6である。好ましい1実施形態においては、該タンパク質はCC3、CC4、およびCC5である。該タンパク質は2次元電気泳動、特異的結合パートナーとの結合の検出、または該タンパク質をコードするmRNAのレベルの測定などの生化学的方法を含む種々の方法のいずれかで検出することができる。

【0017】

本発明のさらに別の1態様では、患者体内での結腸癌の肝臓への転移を診断する方法が提供される。その方法は、肝臓のサンプルについて少なくとも1種のタンパク質の存在を分析することを含んでなるものであり、そのタンパク質とはL1~L5のうちのいずれかであ

10

20

30

40

50

る。該タンパク質は2次元電気泳動、特異的結合パートナーとの結合の検出、または該タンパク質をコードするmRNAのレベルの測定などの生化学的方法を含む種々の方法のいずれかで検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

発明の詳細な説明

上述のとおり、本発明の重要な1態様は発明者らが、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかまたは量が低下している精製タンパク質を提供することである。それらのタンパク質ならびにそれらの見かけの分子量(SDS-PAGEによる測定)および等電点は下記のとおりである：

10

- a) CC2は分子量が約56kDでpIは約6.22；
- b) CC3は分子量が約43kDでpIは約6.3；
- c) CC4は分子量が約43kDでpIは約6.2；
- d) CC5は分子量が約42kDでpIは約6.2；
- e) CC6aは分子量が約20kDでpIは約6.9；
- f) CC6bは分子量が約20kDでpIは約6.8；
- g) L1は分子量が約50kDでpIは約6.01；
- h) L2は分子量が約20kDでpIは約5.73；

および

- i) L5は分子量が約19kDでpIは約5.88。

20

【0019】

また、これらのタンパク質は表5、6、および9に示すアミノ酸配列によって、ならびにNMP調製物中に存在することによって定義づけることもできる。例えば、CC2の場合には、分子量が約56kDで等電点が約6.22の1種以上のタンパク質を含むものであって、そのタンパク質のアミノ酸配列が配列番号14～17および23のうちのいずれか1種以上のものを含む、と定義される。このようにCC2は、その分子量とpI、NMP調製物中の存在、および配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、もしくは配列番号23、またはこれらの配列の任意の組み合わせによって定義することができる。

【0020】

また、正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかまたは量が低下している精製タンパク質も提供される。それらのタンパク質ならびにそれらの見かけの分子量(SDS-PAGEによる測定)および等電点は下記のとおりである：

30

- a) N1は分子量が約40kDでpIは約5.5；
- b) N2は分子量が約30kDでpIは約5.94；
- c) N3は分子量が約30kDでpIは約5.88；
- d) N4は分子量が約30kDでpIは約5.80；
- e) N5は分子量が約30kDでpIは約5.73；および
- f) N6は分子量が約18kDでpIは約6.6。

【0021】

タンパク質N1～N5はそれらの分子量とpI、およびNMP調製物中に存在することによって定義づけることができる。

40

【0022】

さらに、結腸癌の肝臓転移についての診断用マーカーとして有用な種々の精製タンパク質が提供される。それらのタンパク質ならびにそれらの見かけの分子量(SDS-PAGEによる測定)および等電点は下記のとおりである：

- a) L1は分子量が約50kDでpIは約6.01；
- b) L2は分子量が約20kDでpIは約5.73；
- c) L3は分子量が約17kDでpIは約6.09；
- d) L4は分子量が約17kDでpIは約6.00；および
- e) L5は分子量が約19kDでpIは約5.88。

50

## 【0023】

L1～L5は結腸癌の肝臓転移の診断用マーカーとして有用であるが、それは、これらのタンパク質が正常な肝臓組織のサンプル中よりも結腸癌を含んでいる肝臓のサンプル中でより高く検出されるからである。これらのタンパク質は分子量およびpI、NMP調製物中に存在すること、ならびに表9に示すアミノ酸配列によって定義することができる。

## 【0024】

本明細書で用いる「正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかまたは（もしくは）量が低下している」という用語は、該タンパク質が正常な結腸上皮細胞中では検出されないか、またはそのような細胞中で検出はされるが結腸直腸癌細胞中で認められるよりも低いレベルであることを意味する。正常結腸上皮細胞に対して結腸直腸癌でより高く検出される、とは、該タンパク質は癌のサンプルのうちの80%以上で検出されうるのに対して、それに対応する癌でないサンプルでは50%以下しか検出されないことである。同様にして、結腸癌の肝臓転移のマーカーに関しても、「全く存在しないかまたは（もしくは）量が低下している」という用語は、該タンパク質が結腸癌を含んでいる肝臓のサンプル中では、正常な肝臓組織のサンプル中よりも高く検出されることを意味する。「より高く検出される」とは、タンパク質L1～L5が結腸癌の肝臓転移のサンプルの80%で検出されるのに対し、正常肝臓組織のドナーサンプルでは50%以下しか検出されないことである。

10

## 【0025】

正常な肝臓組織に対して結腸癌の肝臓転移したものでL1～L5が高く検出されることは、これらのタンパク質が結腸癌細胞中では、肝細胞を含む正常な肝臓細胞よりもその発現レベルが上昇していることによるものと思われる。「正常な肝臓組織」としては、「正常なドナー肝臓組織」が含まれ、それは転移性肝癌を有していないドナーから得た肝臓組織を意味し、「隣接正常肝臓組織」とは結腸癌が転移した肝臓から得た正常な肝臓組織を意味する。「隣接」という用語は、そのような正常組織と転移癌との間の近接性の程度を示すのではなく、この「正常な」肝臓組織を得た元の肝臓のタイプ(すなわち転移した肝臓)を同定するために用いられる。

20

## 【0026】

結腸癌の転移を含む肝臓サンプルおよび正常肝臓組織を含むサンプル中でL1～L5が検出された2次元ゲルのパーセンテージを表7(実施例5)に示す。L3およびL4タンパク質は正常な隣接肝臓組織中および正常ドナー肝臓組織中で検出されたが、検出されたタンパク質の量は転移癌組織中の量よりも低かった。

30

## 【0027】

本発明のタンパク質が特定の組織で別の組織よりもより高く検出されるか否かを測定するためには、核マトリックス調製物の銀染色した高分解能2次元ゲル電気泳動での分析によるタンパク質の同定が好ましい方法である。その他のアプローチも可能であり、その様なアプローチとしては、該タンパク質に特異的な結合パートナーを用いた、または該タンパク質をコードするRNAを検出することによって、組織もしくは組織抽出物中のそのタンパク質を検出することが含まれる。

## 【0028】

この説明において、「核マトリックス」という用語は分裂間期核中に存在する3次元の繊維状タンパク質の網状構造を意味する。このタンパク質網状構造のNMPは核の全体としての大きさや形を維持するための枠組みを提供し、分裂間期の間のDNA螺旋の構造的付着部位として働く。

40

## 【0029】

「NMP調製物」とは、核マトリックスタンパク質(「NMP」)を豊富に含んでいる生物学的供給源(例えば、細胞、組織、または体液)から調製したものである。「豊富に含んでいる」とは、少なくともいくつかのNMPが、天然の状態(例えば、細胞、組織、または体液中に)存在するNMP中にあるよりも、より高頻度で存在することを意味する。NMP調製物は、界面活性剤および尿素での抽出などの当業界ではよく知られた方法で調製することができる(Getzenbergら、参考文献29を参照のこと)。NMPを豊富に含んでいるNMP調製物は核マト

50

リックスの一部ではないタンパク質を含んでいてもよい。

【0030】

本発明は、本発明のタンパク質に特異的な結合パートナーを提供する。その結合パートナーはサンプル中の該タンパク質の存在を検出するために有用である。該タンパク質とその結合パートナーは分子の結合ペアであり、それらは、例えばイオン結合、共有結合、疎水結合、ファン・デル・ワールス力および水素結合を含む種々の分子間力のいずれかを介して互いに相互作用し、それによって該ペアは互いに特異的に結合する性質を有する。特異的結合とは、その結合ペアが、別の分子とは結合しないような条件下で互いに結合することを意味している。特異的結合ペアのタイプの例としては、抗原-抗体、ビオチン-アビジン、ホルモン-受容体、受容体-リガンド、酵素-基質、IgG-プロテインA、および類似のものが挙げられる。本発明のタンパク質にとって好ましい結合パートナーは抗体であるが、その他の望ましい結合パートナーとしては、核酸(例えば、天然または合成のDNA、RNA、gDNA、cDNA、mRNA、tRNAなど)、レクチン、オリゴサッカライド、糖タンパク質、候補薬剤(例えば、ランダムペプチドライブラリー、天然物ライブラリー、レクチンライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、オリゴサッカライドライブラリー、またはファージディスプレイライブラリー)、代謝産物、ビタミン、脂質、ステロイド、金属、および類似のものが含まれる。

10

【0031】

本明細書の文脈において、「抗体」とは1種以上のポリペプチドから成り立っている、実質的には免疫グロブリン遺伝子またはその遺伝子の断片でコードされているタンパク質である。免疫グロブリンの遺伝子として認められているものには、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、および $\mu$ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は  $\kappa$  または  $\lambda$  のいずれかに分類される。重鎖は  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、または  $\gamma$  に分類され、それらは免疫グロブリンのクラスであるIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEをそれぞれ定義することとなる。

20

【0032】

典型的な免疫グロブリン(抗体)は、2本の全く同じ「軽」鎖のペア(各々が約25kD)と、2本の全く同じ「重」鎖のペア(各々が約50~70kD)から構成される四量体である。各鎖のN末端は約100~110以上のアミノ酸の可変領域を定義づけるもので、主として抗原の認識を行っている。「軽鎖可変部」(variable light chain:VL)および「重鎖可変部」(variable heavy chain:VH)という用語は軽鎖および重鎖の可変部分をそれぞれ意味している。免疫グロブリン分子の抗原認識部位またはリガンド/基質結合部位は、重鎖と軽鎖のV領域内の3個の高度に多様なストレッチから形成される「超可変領域」として知られているものであり、それは「フレームワーク領域」として知られている、より保存されている隣接のストレッチ間に挟まれている。1つの抗体分子中で1本の軽鎖の3個の超可変領域および1本の重鎖の3個の超可変領域は3次元空間内で互いに相対するように配置されて抗原結合を行う表面を形成する。この表面は標的抗原またはリガンド/基質の認識と結合を仲介する。重鎖と軽鎖の各々の3個の超可変領域は「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれ、それについては例えば、Kabatら(15)に述べられている。抗体のCDRと相互作用する抗原の部分はエピトープと呼ばれる。

30

40

【0033】

抗体は、無傷の免疫グロブリンとして、またはよく特徴の調べられた多数のフラグメント、例えば種々のペプチダーゼで消化して作製したものおよび組換えDNA技法で作製するものなどとして、存在する。抗体フラグメントとしては、Fab'モノマー、Fab'2ダイマー、Fvフラグメント、単鎖Fv(「scFv」)フラグメント、および類似のものが含まれる。例えば、Hustonら(16)を参照のこと。抗体フラグメントとしてはまた、軽鎖および/または重鎖定常領域の欠失セグメントまたは末端切断型セグメントも含まれる。

【0034】

本発明の抗体はモノクローナルまたはポリクローナルなものとすることができる。一般的には、ポリクローナル抗体は本発明のタンパク質またはその断片を1回以上注射するこ

50

とによって免疫した動物の血清中に存在する。一般的には、モノクローナル抗体は、適切に免疫された動物からB細胞源を得て、そのB細胞を不死化し、個々の不死化した細胞からB細胞集団をクローン化し、目的の抗体を産生するクローンを選択することによって調製される。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当業界でよく知られている。例えば、HarlowとLane(17)を参照のこと。

【0035】

したがって、原発性結腸癌を正常な結腸から、および/または結腸癌の肝臓転移を正常な肝臓組織から識別するポリクローナル抗体を作製するための方法が提供される。その方法は、本発明のタンパク質の1種以上を用いて動物を免疫し、その抗体を回収することを含む。さらに、原発性結腸癌を正常な結腸から、および/または結腸癌の肝臓転移を正常な肝臓組織から識別するモノクローナル抗体を作製するための方法が提供される。その方法は、本発明のタンパク質の1種以上のものを用いて動物を免疫し、その免疫した動物からB細胞を取り出し、不死化し、そのタンパク質に対して特異的な抗体を産生するB細胞を単離することを含む。不死化の代わりに、抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸を、免疫した動物の免疫細胞から得ることができる。次いでその核酸を適切な発現ベクター中にクローン化し、宿主細胞を形質転換、トランスフェクト、または形質導入して、それによって宿主細胞が、免疫した動物のB細胞中に存在する重鎖および軽鎖由来の抗体を産生するようにすることができる。目的の抗体を産生する宿主細胞を選択することができる。

10

【0036】

本発明のタンパク質に対して特異的な抗体を引き出すために適した免疫原は、該タンパク質の精製した、または部分的に精製した調製物を含むことができる。本発明の精製タンパク質は少なくとも20%の純度、好ましくは少なくとも40%の純度、より好ましくは少なくとも60%の純度、さらにより好ましくは少なくとも80%の純度、さらにより好ましくは少なくとも90%の純度、および最も好ましくは少なくとも約95%から99%の間の純度のものである。

20

【0037】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、本説明ではアミノ酸残基のポリマーを示すものとして相互交換可能なものとして用いられている。「タンパク質」のカテゴリーには、他の分子と会合しているタンパク質、例えば、糖タンパク質、プロテオグリカン、リポタンパク質、核酸、およびそれらの組み合わせが含まれる。特に断らない限りは、「a」、「an」、または「the」という用語は1以上であることを意味する。本発明のタンパク質には保存的に置換されたそのタンパク質の変異体も含まれる。一次アミノ酸配列の小さな改変は、本明細書に記載の天然ポリペプチドと比較して実質的に等価な活性を有するタンパク質をもたらす。配列内での保存的な置換とは、あるアミノ酸残基を構造的に類似の残基と置換することを意味するものだが、そのような置換が好ましい。保存的な置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン、もしくはメチオニンなどの疎水性残基の1つを別の疎水性残基と置換すること、または極性の残基1つを別の極性残基と置換すること、例えばリジンの代わりにアルギニン、アスパラギン酸の代わりにグルタミン酸、アスパラギンの代わりにグルタミンなどに置換することなどが含まれる。そのような改変は、部位特異的突然変異誘発によるもののような計画的なものとすることができ、または自然発生的なものとすることができ、非必須アミノ酸の欠失も含むことができる。改変には、1もしくは複数のアミノ酸の欠失が含まれ、それはより広い用途を有する活性のあるより小さい分子を開発するために用いることができる。これらの改変で作製されたポリペプチドの全ては、該天然タンパク質の生物学的活性が同等に維持されている限りは本発明に含まれる。本発明のタンパク質はまた、例えばそのタンパク質の結合パートナーを作製するために有用なタンパク質断片をも含む。

30

40

【0038】

あるNMP調製物を免疫原の部分的に精製されたタンパク質源として用いることができる。本発明のタンパク質は、多数のよく知られた精製方法のいずれかによって精製することができ、そのような精製方法としては、沈殿、クロマトグラフィー、電気泳動、モノク

50

ローナルまたはポリクローナル抗体が関与する免疫学的分離、および類似のものが含まれる。例えば、精製タンパク質調製物はNMPの2次元ゲル電気泳動を行った後に該タンパク質のスポットを切り取り、そのゲルからの該タンパク質の溶出に電気泳動を用いることによって得ることができる(実施例を参照のこと)。あるいはまた、該タンパク質またはそれらの断片は、タンパク質の配列に基づいて、例えば、Merrifield(13)またはStewartとYoung(14)が報告した、よく知られた固相ペプチド合成法によって合成することができる。

#### 【0039】

本発明のタンパク質またはその断片の精製調製物は、Goeddelら(18)が報告しているものなどの当業界ではよく知られた市販のベクターと宿主細胞を用いて組換えで発現させることによって調製することができる。宿主細胞としては、例えば、哺乳類細胞、細菌、酵母、および類似のものが含まれる。宿主細胞は当業界で既知の従来の技法によって組換えDNAで形質転換することができる。例えば、宿主が大腸菌(E.coli)などの原核生物である場合には、コンピテントな細胞を調製することができ、それはDNAを取り込むことのできるものであり、そのような細胞は対数増殖期の後に従来法によってCaCl<sub>2</sub>で処理した細胞から採取することができる。形質転換はまた、宿主細胞のプロトプラストを形成させることによって、または電気穿孔法によって行うこともできる。真核生物の宿主は、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、電気穿孔法、リボソーム封入、ウイルスベクター、および類似のものなどのよく知られた方法を用いて外来DNAで形質転換することができる。組換えDNAも当業界でよく知られているトランスフェクションおよび形質導入法によって導入することができる。

10

20

#### 【0040】

真核細胞はまた、本発明のタンパク質をコードするDNA配列、および単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子などの選択しうる表現型をコードする第2の外来DNA分子を用いて同時形質転換することもできる。別の方法としては、真核細胞性のウイルスベクター、例えばSV40(Simian Virus 40)またはウシパピローマウイルスなどを用いて、真核細胞を一過性に感染させるかまたは形質転換して、該タンパク質を発現させることである。

#### 【0041】

本発明のタンパク質またはその断片は外来ポリペプチド、例えばGSTまたは連鎖球菌のプロテインAなどの細菌性のリガンド結合配列などに融合させた融合体として発現させることもできる。例えば、GSTとの融合によって融合産物の精製、または免疫原性の増大のための効率的な方法が提供される(例えば、UhlenとMoks, (19)を参照のこと)。免疫原性はまた、該タンパク質またはその断片を適切な免疫原性キャリアータンパク質と化学的に結合することによって増強させることもできる。本発明に有用なキャリアータンパク質は少なくとも約20,000ダルトンの分子量を有する。本発明に有用なキャリアータンパク質としては、例えば、GST、キーホールリンペットから得たものなどのヘモシアニン、血清アルブミンもしくは陽イオン化血清アルブミン、チログロブリン、卵白アルブミン、破傷風トキソイドもしくはジフテリアトキソイドなどの種々のトキソイドタンパク質、免疫グロブリン、または熱ショックタンパク質が含まれる。あるポリペプチドをキャリアータンパク質と化学的に結合させる方法は当業界ではよく知られており、そのような方法としては、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどの水溶性カルボジイミドによるコンジュゲーション、例えばNHSエステル基もしくはスルホ-NHSエステル類似体を有するホモ二官能性架橋剤によるコンジュゲーション、例えばNHSエステルおよびスルホスクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートなどのマレイミド基を有するヘテロ二官能性架橋剤によるコンジュゲーション、グルタルアルデヒドを用いたコンジュゲーション、および類似のものが含まれる。例えば、Hermanson(20)ならびに米国特許第4,608,251号および第4,161,519号を参照せよ。

30

40

#### 【0042】

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体などの結合パートナーは、RIA、EIA、および類似のものなどのイムノアッセイで本発明のタンパク質を検出するために用いることができる。そのようなアッセイは競合的なものまたは非競合的なものとすることができ、直接

50

的または間接的方式に基づいたものとする事ができる。このような結合パートナーは液中で、および/または固相担体と結合させて用いることができる。担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、磁鉄鉱、および類似のものが含まれる。担体の性質は、可溶性または不溶性のいずれであってもよい。免疫アッセイで典型的に見られるとおり、該結合パートナーまたは本発明のタンパク質は当業界でよく知られた種々の方法で標識して、検出しうるようにすることができる。結合パートナーはまた、電気泳動で分離したゲル(例えば2次元ゲル)中にある、またはウエスタンブロットなどのような固相膜に付着した状態の、本発明のタンパク質の検出にも用いることができる。

【0043】

10

本発明のタンパク質もしくはその断片を含む免疫原は、該タンパク質もしくは断片をアジュバントと混合するか、またはそのアジュバントとコンジュゲートさせるかもしくはその他の方法で連結させることによって、そのアジュバントとともに投与することもできる。種々のアジュバントが知られており、そのようなものとしては、フロイントのアジュバント(完全および不完全)、水酸化アルミニウム(alum)、ムラミルジペプチド、BCG、LPS、Ribi Adjuvant System(登録商標)、TiterMax(登録商標)、および類似のものが含まれる。当業者であればある与えられた状況での使用に適するアジュバントのタイプは承知しているであろう。

【0044】

20

本発明はまた、患者の体内での結腸の増殖性疾患を診断する方法をも提供し、その方法は、患者から得た組織、糞便、または体液中に、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、または正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、少なくとも1種のタンパク質の存在を分析することを含んでなるものであり、該タンパク質は次のものからなる群から選択されたものである：

- a) 分子量が約56kDでpIが約6.22のCC2；
- b) 分子量が約43kDでpIが約6.3のCC3；
- c) 分子量が約43kDでpIが約6.2のCC4；
- d) 分子量が約42kDでpIが約6.2のCC5；
- e) 分子量が約20kDでpIが約6.9のCC6a；
- f) 分子量が約20kDでpIが約6.8のCC6b；
- g) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
- h) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；
- i) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；
- j) 分子量が約40kDでpIが約5.5のN1；
- k) 分子量が約30kDでpIが約5.94のN2；
- l) 分子量が約30kDでpIが約5.88のN3；
- m) 分子量が約30kDでpIが約5.80のN4；
- n) 分子量が約30kDでpIが約5.73のN5；および
- o) 分子量が約18kDでpIが約6.6のN6。

30

40

【0045】

既に述べたとおり、該タンパク質は2次元電気泳動、モノクローナルまたはポリクローナル抗体などの特異的結合パートナーによる検出、および類似のものなどの生化学的手段を含む種々の方法のいずれかで検出することができる。該タンパク質はまた、該タンパク質をコードするmRNAを、適切なオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせることによって、該mRNAのレベルを測定することによって検出することもできる。ここで「患者」とは哺乳類、好ましくはヒトである。

【0046】

本明細書で「結腸の増殖性疾患」という用語は、悪性の、ならびに悪性でない(または良性的)結腸疾患を意味する、ここで結腸には、限定はされないが結腸上皮が含まれる。

50

そのような疾患としては、異型または異形成を伴うようなポリープ、無茎の絨毛腺腫、有茎の管状腺腫、および類似のものが含まれる。これらの増殖性疾患を構成している細胞は周囲の正常組織とは形態学および遺伝子型からみて異なっていることが多いように思われる。該増殖性疾患は、例えば、本発明のCCまたはLタンパク質、後者の場合は特にL1、L2、およびL5の発現を伴っている可能性がある。細胞周期の不適切な時点での、または適正でない細胞タイプ中での、同定されたタンパク質の発現によって細胞増殖性疾患がもたらされる可能性がある。該タンパク質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド(またはリボザイム)の形態のものは結腸の過形成および悪性腫瘍の治療に有用である。好ましい実施形態においては、該増殖性疾患は結腸癌である。表2(実施例2)は、正常な隣接結腸組織と正常ドナー結腸組織の核マトリックス調製物中でL1、L2、およびL5が検出された2次元ゲルのパーセンテージを示している。

10

## 【0047】

また本明細書は結腸腺腫が悪性腫瘍となる可能性を評価する方法をも提供し、その方法は、癌性の結腸細胞中には存在するが正常な結腸上皮細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、または正常な結腸上皮細胞中には存在するが癌性の結腸細胞中では全く存在しないかもしくは量が低下している、少なくとも1種のタンパク質の存在について該腺腫を分析することを含んでなるものであり、該タンパク質は次のものからなる群から選択されたものである：

- a) 分子量が約56kDでpIが約6.22のCC2；
- b) 分子量が約43kDでpIが約6.3のCC3；
- c) 分子量が約43kDでpIが約6.2のCC4；
- d) 分子量が約42kDでpIが約6.2のCC5；
- e) 分子量が約20kDでpIが約6.9のCC6a；
- f) 分子量が約20kDでpIが約6.8のCC6b；
- g) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
- h) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；
- i) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5；
- j) 分子量が約40kDでpIが約5.5のN1；
- k) 分子量が約30kDでpIが約5.94のN2；
- l) 分子量が約30kDでpIが約5.88のN3；
- m) 分子量が約30kDでpIが約5.80のN4；
- n) 分子量が約30kDでpIが約5.73のN5；および
- o) 分子量が約18kDでpIが約6.6のN6、

20

ここで該タンパク質が検出されることは、悪性化する可能性の増大を示している。好ましい実施形態においては、該タンパク質はCC3、CC4、およびCC5である。

30

## 【0048】

本発明はまた、患者の体内での結腸癌の肝臓転移の診断をも包含しており、それはその患者の組織または体液中に次のものからなる群から選択されたタンパク質の少なくとも1種が存在するか分析することによるものである：

- a) 分子量が約50kDでpIが約6.01のL1；
- b) 分子量が約20kDでpIが約5.73のL2；
- c) 分子量が約17kDでpIが約6.09のL3；
- d) 分子量が約17kDでpIが約6.00のL4；および
- e) 分子量が約19kDでpIが約5.88のL5。

40

## 【0049】

本発明によるタンパク質の検出は、結腸細胞増殖性疾患のうちで悪性腫瘍となる可能性のあるまたは転移する可能性のある疾患のそれぞれを識別することを可能にする。本明細書で述べているタンパク質組成物もまた、結腸直腸癌などの結腸細胞増殖性疾患の早期診断、および再発の早期発見、ならびにそれから由来した転移性疾患の早期発見のためのマーカーとして有用であり、そのマーカーから得られた知識はこの疾患の効果的な治療法に

50

とって中心的なものとなるものである。これらのタンパク質を個々に用いることに加えて、本発明のタンパク質のいずれか2種以上の検出を組み合わせ、結腸癌およびその肝臓への転移を含む結腸の増殖性疾患を診断することができる。本発明のタンパク質の検出はまた、その他の結腸癌のマーカー、例えばCEAまたはすでに報告されている結腸癌NMP(32)などの検出と組み合わせ、結腸癌およびその肝臓への転移を診断することができる。

#### 【0050】

本明細書に記載の特定のタンパク質またはその断片は、例えば、それをコードするmRNAのレベルを検出することによって、間接的に検出することができる。従って、本発明は前述した実施形態の同定タンパク質またはその断片をコードする精製ポリヌクレオチド配列を提供する。また、本発明は上述のタンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする(または相補的な配列とハイブリダイズする)核酸プローブを提供する。本明細書で用いている「核酸」という用語はデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのポリマーで一本鎖もしくは二本鎖のいずれかの形態であり、また天然のヌクレオチドと類似の様式で機能する、天然のヌクレオチドの既知の類似体をも包含する。プローブは好ましくは一本鎖であり、好ましくは少なくとも約14ヌクレオチドの長さからなり、より好ましくは少なくとも約18ヌクレオチドの長さからなり、最も好ましくは少なくとも約25ヌクレオチドの長さからなる。核酸プローブは放射性同位元素、生物発光性化合物、化学発光性化合物、蛍光性化合物、金属キレート、酵素、および類似のもので、検出しうるように標識することができる。

10

#### 【0051】

また、結腸細胞増殖性疾患を検出するためのキットも提供される。そのキットには本発明のタンパク質のいずれか1種以上に対して特異的な結合パートナーまたは核酸プローブを含むものとすることができる。該結合パートナーまたはプローブは検出が容易となるように標識することができる。そのキットには各試薬を別々のバイアル瓶に入れたものとすることができ、陽性および陰性の対照、反応を行うためのものなどのバッファー、ならびに使用説明書を含めることができる。また、そのキットは、本発明のタンパク質の1つをコードする標的ポリヌクレオチド配列を、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅によって増幅できるようにオリゴヌクレオチドプライマーを含めることもできる。

20

#### 【0052】

本発明はまた、原発性の結腸癌およびそれから由来する肝臓への転移癌に存在するタンパク質の発現または活性のレベルを低下させることによる、結腸癌およびその肝臓転移を治療する方法をも提供する。そのようなタンパク質としては、本明細書で開示しているCCまたはLタンパク質のうちのいずれかが含まれる。該タンパク質の発現のレベルは、例えば、その個体をアンチセンス核酸またはリボザイムを用いて治療することによって低減させることができる。

30

#### 【0053】

アンチセンス核酸はある特定の遺伝子配列に対して相補的となるように設計された、短いDNAまたはRNAオリゴヌクレオチドである。アンチセンスを用いることによる目的は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが特定の遺伝子配列に結合することによってその特定の遺伝子の発現に変化を与えることである。DNAヘリックスの特定の領域と結合するアンチセンス分子は、そのヘリックスを構成している2本の鎖と結合する部位で第3の鎖を形成するので3本鎖を作ることができる。RNAを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは触媒作用を持たないもの、または触媒作用を持つもの(すなわち、リボザイム)のいずれかとすることができる。触媒作用のないアンチセンス分子の標的RNAへの結合は、RNAがさらにプロセシングされることをブロックするか、またはいくつかの可能な機序のいずれかを介する輸送をブロックすることができ、そのような機序としては、例えば1)リボソームの該RNAへの結合をmRNA上のリボソーム結合部位をマスクして妨げることによる一時的な阻害; 2)大多数の細胞中に存在する酵素であるRNアーゼHがRNA/DNAハイブリッド中のRNAを分解することによる該プロセスの永続的な阻害; および該オリゴヌクレオチドの標的RNAへの架橋による永続的な阻害が含まれる。

40

50

## 【0054】

該アンチセンス化合物は好ましくは約8個から約30個の核酸塩基(すなわち、約8個から約30個の連結されたヌクレオシド)を含み、より好ましくは約12個から約25個の核酸塩基を含む。該アンチセンスオリゴヌクレオチドはその形状を直鎖状または環状とすることができる。本発明で有用なアンチセンス化合物としては、骨格の修飾されたもの、または非天然のヌクレオシド間の結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸3'-アルキレンおよびキラルホスホン酸を含むホスホン酸メチルおよびその他のホスホン酸アルキル、ホスフィネート、3'-アミノホスホロアミデートおよびアミノアルキルホスホロアミデートを含むホスホロアデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに正常な3'-5'結合をもつボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似体、およびヌクレオシド単位の隣接対が3'-5'から5'-3'に、もしくは2'-5'から5'-2'に結合された逆極性をもつものが含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを調製する方法に関する広範な引用は、例えばBennett、米国特許第6,210,892号に見出すことができる。

10

## 【0055】

細胞増殖性疾患が本発明のタンパク質(例えば、N1またはN6)の発現が低いという特徴を持っている場合には、欠落したその発現の低いタンパク質(例えば増殖または腫瘍抑制タンパク質)をコードするポリヌクレオチド配列を、その発現レベルを上昇させるために投与することができる。このことは、宿主被験者の細胞内に、本発明のタンパク質のいずれか1種以上をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入することによって行うことができる。好ましくは、該発現ベクターは宿主被験者の細胞中へ*ex vivo*で導入され、形質転換された細胞が得られ、その形質転換された細胞が被験者の体内へ再導入される。このことは、例えば、レトロウイルスベクターなどのRNAウイルスベクターを用いて行うことができる。該タンパク質を発現するように形質転換された細胞は、例えば、腫瘍ワクチンとしても有用である。細胞内にセンスまたはアンチセンス核酸を(*in vivo*または*in vitro*で)送達するためのベクターの調製方法、およびこれらの送達ベヒクルを投与用に製剤化する方法は当業界ではよく知られている。例えば、Coffeyらの米国特許第5,824,490号を参照のこと。

20

30

## 【0056】

本発明のタンパク質の発現レベルはまた、プロモーターやエンハンサーなどの発現を制御する調節領域に影響を及ぼす化合物、または該タンパク質の活性を調節する化合物で個体を処置することによって低減させることもできる。そのような化合物は、a)本発明のタンパク質を発現している増殖性の細胞(例えば、結腸直腸癌細胞)を、その細胞と試験組成物が相互作用することのできる条件下で試験組成物とインキュベートし、b)その試験組成物が該タンパク質の機能をブロックまたは増強するかを測定することによって同定することができる。Caco-2細胞はこの点で有用な結腸直腸癌細胞系統の1例である。

## 【0057】

本発明は下記の非限定的な実施例を参照してよりいっそう詳細に説明される。

40

## 【実施例1】

## 【0058】

## NMPの単離と精製方法

## A. 組織のプロセッシング

結腸腺癌の肝臓転移サンプル(N=12)およびそれと適合する隣接正常肝臓組織(N=12)を、施設内倫理委員会(IRB)の承認を得てピッツバーグ大学メディカルセンターの早期発見研究ネットワーク(Early Detection Research Network:EDRN)を通じて収集した。患者の年齢の範囲は44~75歳であり、平均年齢は62.4歳であった。サンプリングした集団の60%は女性であった。癌は標準TNMシステムに従ってステージ分けし、そのカテゴリーは表1に示すとおりであった。

50

## 【0059】

結腸腺癌のサンプル(N=10)およびそれと適合する隣接正常肝臓組織(N=10)も、施設内倫理委員会(IRB)の承認を得てピッツバーグ大学メディカルセンターの早期発見研究ネットワーク(EDRN)を通じて収集した。患者の年齢の範囲は36~82歳であり、平均年齢は71歳であった。サンプリングした集団の60%は女性であった。癌はステージ分けし、そのカテゴリーは表1に示すとおりであった。

## 【表1】

表1: NMPの調製に用いた結腸癌のステージとUIグレード

臨床的パラメーター	結果(サンプル数)
腫瘍の位置	右半結腸 (n=5) 左半結腸 (n=5)
腫瘍のステージ(UICC)	I: T <sub>1-2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> (n=0) II: T <sub>3-4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> (n=5) III: T <sub>1-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub> (n=4) IV: T <sub>1-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>1</sub> (n=1)
腫瘍のグレード	G1 (n=0) G2 (n=9) G3 (n=1)

10

20

## 【0060】

正常肝臓組織は外傷を受けた被害者から得たもので、その内訳は、銃撃の被害者1例、および交通事故の被害者2例であった(N=3)。患者の年齢の範囲は36~48歳で、平均年齢40.3歳であった。これらの正常人のうちの2例は男性で、1例は女性であった。これらの患者で肝硬変の患者はいなかった。患者の30%は軽度の脂肪症を有していた。診断は、各検体に付けられた病理所見報告から得て、組織学的に確認した。組織はプロセッシングするまでは-80℃で保存した。散在性の結腸腺癌サンプルおよびそれと適合する隣接正常組織、ならびに正常ドナーの結腸組織は既に報告されているとおり集めた(30)。

30

## 【0061】

正常結腸組織は外傷の被害者から得た。すなわち、それらの被害者の内訳は、銃撃創を有するものが2例、交通事故による外傷が1例、および臓器のドナーが1例であった(N=4)。患者の年齢の範囲は20~59歳であり、平均年齢は47.2歳であった。これらの正常結腸ドナーは全員男性であった。診断は、各検体に付けられた病理所見報告から得て、組織学的に確認した。

## 【0062】

結腸癌の細胞系統であるSW480およびCaco-2は、American Type Culture Collection(Maassas, Virginia)から得た。これらの細胞系統は双方とも原発性ヒト結腸癌細胞から樹立されたものである。SW480細胞系統は10%ウシ胎児血清を添加したLeibovitz培地中で37℃でCO<sub>2</sub>なしで増殖させた。Caco-2細胞系統は、10%ウシ胎児血清、1% L-グルタミン(200mM)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、1%ピルビン酸ナトリウム(100mM)、1% MEN 非必須アミノ酸、1.5% HEPESバッファー(1M)を添加したダルベッコ最小必須培地(DMEM)中で37℃で5% CO<sub>2</sub>雰囲気中で増殖させた。

40

## 【0063】

結腸癌細胞系統CX-1はピッツバーグ大学のLee YJ, Ph.D.から贈与を受けたものである。この細胞系統は原発性ヒト結腸癌細胞から樹立されたものである。この細胞系統は、10

50

%ウシ胎児血清、1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI-1640培地中で37 で5% CO<sub>2</sub>雰囲気増殖させた。

【0064】

正常ヒト肝細胞(50 x 10<sup>6</sup>)は63歳の女性の臓器ドナーから得たもので、Dr. Stephan Strom(ピッツバーグ大学, PA)から贈与を受けたものである。ヒト原発性肝癌細胞系統のhuh7、HepG 2はDr. George Michalopoulos(ピッツバーグ大学, PA)から贈与を受けたものである。細胞系統は双方とも、10%ウシ胎児血清、1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDMEM中で37 で5% CO<sub>2</sub>雰囲気増殖させた。

【0065】

B. 核マトリックス調製物

核マトリックスタンパク質はGetzenbergら(29)の方法に従って種々の細胞および組織から抽出した。簡潔に記せば、組織を小片に細かく切断し、2mMのバナジリリボヌクレオシド(RNアーゼの阻害剤)を含有する溶液中の0.5% Triton X-100を用いて、氷上でテフロン乳棒でホモジナイズして、脂質および可溶性タンパク質を放出させた。そのホモジネートを350μmのナイロンメッシュを通過させてろ過した。DNアーゼおよびRNアーゼでの処理を行って可溶性クロマチン除去し、中間径フィラメントおよびNMPを含む残存画分を得た。次いでこの画分を8M尿素で解離し、炭水化物と細胞外マトリックスからなる不溶性成分を遠心によって除去した。透析して尿素を除いた後、中間径フィラメントを再び組み立て、その後それらのフィラメントを遠心によって分離した。

【0066】

次いでNMPをエタノールで沈殿させ、9M尿素、65nM 3-((3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホネート、2.2% アンフォライト、および140mM DTTからなる2Dサンプルバッファー中に再懸濁し、クーマシープラスタンパク質アッセイ(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)でウシ血清アルブミンを標準品として用いて定量した。エタノール沈殿後に得たNMPを含有するペレットは出発材料中の細胞性タンパク質の合計量の1%未満であった。

【0067】

C. 高分解能2次元電気泳動

この方法はInvestigator 2-D ゲルシステム(Genomic Solution, Ann Arbor, MI)を用いて既に報告されているとおり行った(29, 33-34)。ゲルあたり100μgのタンパク質を毛細管サイズのIEFカラム上にロードした。プレフォーカシングの1.5時間後に1次元等電点フォーカシングを1mm x 18インチのチューブゲルを用いて18000ボルト-時間行った。そのチューブゲルを押し出し、1mmのSDS Duracryl(Genomic Solution, Ann Arbor, MI)高引っ張り強度のPAGEスラブゲル上においた。そのゲルを12 の定温で4.5~5時間電気泳動した。ゲルを50%のメタノールと10%の酢酸で固定した。十分に洗い脱水した後、50mM リン酸塩(pH7.2)で緩衝化した後、ゲルを5% グルタルアルデヒドと5mM DTTで処理した。ゲルをWrayらの方法(Accurate Chemical Co., Westbury, NY)(21)を用いて銀染色した。結腸NMPの分子量はGenomic Solutionsが提供している標準品を用いて求めた。等電点(PI)はカルバミル化した標準品(Gallard-Schlessinger(Carle Place, NY)およびSigma Chemical Co.(St. Louis, MO)が販売しているBDH)を用いて測定した。

【0068】

各サンプルについて複数のゲルを用いて測定し、複数のサンプルを別々の時点で測定した。ゲルはBioImage 2D Electrophoresis Analysis System(BioImage, Ann Arbor, MI)を用いて分析し、このシステムはゲル間のタンパク質スポットをぴったり一致させてゲルとタンパク質スポットをデータベース中で分類するものである。あるサンプルタイプのゲル全てで複数のタンパク質スポットが明確かつ再現性をもって同一であるときにのみ、報告されているNMPを示しているものであるとした。

【実施例2】

【0069】

結腸癌または正常な結腸上皮に特徴的なNMPの同定

10

20

30

40

50

## A. 結腸直腸癌および正常結腸上皮から得たNMPの分析

高分解能2次元ゲル電気泳動によって分離したNMPを評価して、主として結腸直腸腺癌中で発現された臨床的に価値のある7種類のNMPを同定し、表2に示すとおり名付けた。CC2からCC6a, bは全ての結腸腫瘍中で強く発現されていたが、隣接正常組織では検出されなかった。これに対して、CC1は癌の抽出物と隣接正常組織またはドナー組織では発現されたが、そのシグナルは結腸癌では正常組織源のいずれよりも強かった。

【0070】

主として正常な結腸上皮で発現された臨床的に価値のある6種類のNMPを表2に示すとおり名付けた。N2~N6は結腸癌の少数で発現していたが(約20%)、隣接する正常組織およびドナー組織の抽出物では全てで発現していた。これに対してN1は癌の抽出物の多数(約70%)、および正常組織抽出物の全てで発現していたが、正常組織抽出物ではそのシグナルがより強かった。同定した結腸癌NMP`の特徴を表2に要約する。

【表 2】

表 2：結腸直腸腺癌および正常結腸上皮の NMP<sup>+</sup> の特徴

マーカー No.	分子量 (kD)	PI	組織での発現
CC1	59	4.40	癌と正常上皮、しかし癌により強く発現 (10/10 癌; 10/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
CC2	56	6.22	癌のみ (8/10 癌; 0/10 隣接正常; および 0/4 正常ドナー)
CC3	43	6.27	癌のみ (10/10 癌; 0/10 隣接正常; および 0/4 正常ドナー)
CC4	43	6.22	癌のみ (10/10 癌; 0/10 隣接正常; および 0/4 正常ドナー)
CC5	42	6.25	癌のみ (10/10 癌; 0/10 隣接正常; および 0/4 正常ドナー)
CC6a	20	6.86	癌およびドナーの上皮、しかし隣接正 常上皮では発現していない (8/10 癌; 0/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
CC6b	20	6.81	癌およびドナー上皮、しかし隣接正 常上皮では発現していない (8/10 癌; 0/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
N1	40	5.50	正常上皮 (隣接およびドナー) ならび に癌 (サンプルの約 70%)、しかし正常 組織でより強く発現 (7/10 癌; 10/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
N2	30	5.94	主として正常上皮** (2/10 癌; 10/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
N3	30	5.88	主として正常上皮 (2/10 癌; 10/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
N4	30	5.80	主として正常上皮 (2/10 癌; 10/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
N5	30	5.73	主として正常上皮 (2/10 癌; 10/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)
N6	18	6.58	主として正常上皮 (1/10 癌; 10/10 隣接正常; および 4/4 正常ドナー)

10

20

30

40

\*NCとは参考文献で、大きさまたはpIが近似しているものが報告されていないものを意味する。

【0072】

\*\*癌のサンプルでは発現頻度が約10~20%であること意味する。

【0073】

#### B. 結腸直腸腫瘍細胞系統から得たCC NMPの分析

NMP調製物を2つのヒト結腸癌細胞系統、Caco-2およびSW480、から、本質的にはヒト組織からのNMP調製物について報告されているとおりの方法で単離した。これらのNMPを上述のヒト組織NMPについて説明した2次元ゲル電気泳動法によって分析した。2つの細胞系統はどちらも、隣接またはドナーゲルでは発現されていたタンパク質(N1~N6)のいずれをも発現していなかった。細胞系統SW480は結腸癌関連タンパク質であるCC1およびCC6a/bを発現していた(図5); Caco-2細胞系統はCC1、CC3、CC4、CC6a, bを発現していた。Caco-2、SW480のNMP調製物中でCC2は検出されなかったが、癌細胞系統CX-1では検出された。CX-1 NMP中ではCC3、CC4は検出されたがCC5は検出されなかった。

10

【0074】

これらの調査は、ヒト結腸癌から単離された核マトリックスタンパク質は正常な隣接組織および正常なドナー組織と異なり、特定のタンパク質の喪失および獲得の双方を示すことを実証している。癌細胞中でのユニークなNMPの存在または不在は疾患の診断に有用であり、発癌におけるNMPの機能についての新たな情報を提供するものである。

【0075】

20

#### C. 結腸の腺腫性ポリープでのCC NMPの分析

結腸ポリープ(n=20)は、施設内倫理委員会(IRB)の承認を得てピッツバーグ大学メディカルセンターの早期発見研究ネットワーク(EDRN)を通じて収集した。若年性ポリープの1検体、管状腺腫(TA)の6検体、管状絨毛腺腫(tubulovillus adenoma; TVA)の7検体、高度な異形成を伴う管状絨毛腺腫(HGDを伴うTVA)の6検体を調べた。患者の年齢の範囲は18~77歳であり、平均年齢は58歳であった。サンプリングした集団の55%は女性であった。診断は、各検体に付けられた病理所見報告から得て、組織学的に確認した。結腸ポリープを組織学的に分けたものは表3に示している。組織はプロセッシングするまで-80℃で保存した。

【表3】

30

表3: 結腸ポリープを有する患者の特徴

若年性ポリープ	N=1	年齢=18歳	男性1例
管状腺腫	N=6	平均年齢=58歳	男性4例;女性2例
管状絨毛腺腫	N=7	平均年齢=56歳	男性1例;女性7例
高度な異形成を伴う			
管状絨毛腺腫	N=6	平均年齢=62歳	男性3例;女性3例

【0076】

40

結腸の種々の腺腫におけるCC2、CC3、CC4、およびCC5 NMPの存在の検出結果を表4に示す。

## 【表4】

表4：腺腫性結腸ポリープ中のCC NMPの存在

結腸の異常	CC2	CC3	CC4	CC5
病巣の高度な異形成を伴う				
管状絨毛腺腫(n=6)	0%	83%	100%	33%
管状絨毛腺腫(n=7)	0%	86%	86%	0%
管状腺腫(n=6)	0%	83%	100%	17%
若年性ポリープ(n=1)	0%	0%	0%	0%

10

## 【0077】

CC2は前悪性(pre-malignant)ポリープのいずれでも全く認められなかった。CC5はHGDを伴う前悪性TVAでは2検体(33%)、TAでは1検体(17%)にのみ存在していた。CC3とCC4は、TAでは83~100%、TVAでは86%、HGDを伴うTVAでは83~100%に存在していた。若年性ポリープ(結腸癌の前駆状態ではない)では核マトリックスタンパク質は認められなかった。

## 【0078】

CC5はHGDを伴う前悪性TVAで2検体のみに、およびTAの1検体に存在していたが、結腸癌組織ではその全てに存在し、進行した腺腫と侵襲的な結腸癌の境界で発現されている。CC5は進行したポリープと結腸癌上皮に発現されるので、結腸ポリープの悪性化の可能性を示すための有望なマーカーである。CC3とCC4は大部分の腺腫に、その進行の程度にかかわらず存在していた。この2種のタンパク質は双方とも腺腫性ポリープの発達の初期から発現されており、また結腸癌でもその全てで発現されている(表2)。ここで試験した4種類のCCマーカーの全てを組み合わせたものも、結腸ポリープの悪性化の早期発見に診断的価値を提供する。

20

## 【実施例3】

## 【0079】

結腸癌NMPの部分アミノ酸配列

## A. ポリペプチドの単離と配列分析の方法

2次元ゲルで単離した特定のCCマーカーについて部分アミノ酸配列を、Gaevaertら(35)が開発した技法を改変して用いて決定した。簡潔に記せば、NMP調製物を泳動させた2次元ゲルを0.2M イミダゾール中で15分間ネガティブ染色し、脱イオン水で数回洗い、加温した0.3M 塩化亜鉛溶液で染色し、その染色反応を脱イオン水中で洗うことによって停止させた。タンパク質のスポットをゲルから切り取り、-80℃で凍結した。そのゲルスポットを融解し、プールし、45%メタノール/9%酢酸中に0.25% クーマシーブルーを含む液で20分間染色した。単離したゲルスポットを脱色溶液(5%メタノール/7.5%酢酸)中で1時間振盪して脱色し、脱イオン水で1時間洗い、SDSポリアクリルアミドサンプルバッファー(1% SDS/10% グリセロール/50mM DTT/12mM Tris-HCl pH7.1)中で1時間平衡化した後、SDSアクリルアミド/アガロースゲルにロードした。

30

## 【0080】

脱色後、各ゲルのスポットから得たタンパク質を、ミニアガロース/アクリルアミドゲル上で濃縮した。このゲルは、幅1cm、厚さ1.5mmのスペーサーを介して分離された2枚のあらかじめ加温した(60℃)ガラスプレート(10cm x 9cm)間で作製された。Whatman 3MMろ紙の紙片を底部において低い位置のアガロースゲルの支持体として用いて、ゲルが電気泳動中に滑らないようにした。2個の平行においたスペーサー間に幅2cm x 厚さ1.5cmのスペーサーを1個挿入してゲルスポットを受容するサンプルウエルを形成させた。そのサンプルウエルは、ガラスプレートの中心部に挿入し、接着テープでバックプレートの上端を接着した各々幅1cm x 厚さ1.5cmの2個の平行においたスペーサー間にセットした幅2cm x 厚さ1.5cmのスペーサーによって形成された。

40

## 【0081】

50

ミニゲルの泳動ゲル部分は2cmの深さのアガロース(0.36M Tris-HCl pH8.7/0.1% SDS中の1.45% アガロース)からなり、アガロースを注ぎ入れ、硬化させた。ポリアクリルアミド分離用ゲル(5.45% アクリルアミド/ 0.13% ビスアクリルアミド/0.12M Tris-HCl pH6.8 /0.1% SDS)をそのアガロースの上に載置した。分離用ゲルが重合した後、中心のウエルを形成しているスペーサーを除去すると、高さ2cm、幅2cm、および厚さ1.5mmの大きさのローディングウエルが残された。次いでそのミニ濃縮ゲルを小さな電気泳動タンク(BioRad, Hercules, CA)上に固定し、ローディングスロットをSDSサンプルバッファーで平衡化したゲルスポットで満たした。残存する容積はブランクのゲル片で満たした。

【0082】

ミニゲルを100Vで泳動させると、該タンパク質が組み合わせたゲル片からアクリルアミド中に溶出される。この時点で、中心スペーサーを、染料の先端が2つの平行におかれた幅1cmのスペーサーを通り過ぎるまで、再度サンプルウエルに挿入した。その場所で中心スペーサーを除去し、電気泳動を染料の先端がアガロースに入り紙に到達するまで継続した。

【0083】

アガロースの泳動ゲルを取り外し、新鮮な50%メタノール/10% 酢酸中で室温30分間振盪して固定した。そのゲルを0.05% クーマシーブルー(50%メタノール/10% 酢酸)で5分間染色し、次いで5% メタノール/7% 酢酸中で一定に振盪しつつ2時間かけて脱色した。次いでタンパク質のバンドをアガロースゲルの容積が最小となるように切り取り、滅菌済の試験管に移し、トリプシンで十分に消化させた。トリプシン消化した断片を分取用逆相C18 HP LCにかけ、種々のペプチドを含んだ画分を単離した。種々の画分中の断片の配列は自動配列分析機を用いて決定した。

【0084】

B. ペプチド配列分析の結果

Caco-2細胞のNMP調製物から単離した特定の単離CCポリペプチドのトリプシン消化断片のN末端アミノ酸配列は表5に示し、ヒト結腸直腸癌検体のNMP調製物から単離した特定のCポリペプチドの配列は表6に示す。

【表5】

表5 : Caco-2 NMP 調製物から単離した CC3 および CC6 タンパク質の部分アミノ酸配列

マーカー No.	アミノ酸配列(5'-3')
CC6a	PXVKFNSYVDGVEV (ピーク 31) (配列番号 1) EGDLIEDY (ピーク 17) (配列番号 2)
CC3	YPVEAFN (ピーク 9) (配列番号 3) TVAPLFIVIPN (ピーク 35) (配列番号 4) XVTGLTQIETLFAAPGVD (ピーク 47) (配列番号 5)  SMTEAEQQQLIDDHFLFDKPVSP (ピーク 52) (配列番号 6) SLPQNIPLTQTPV (ピーク No:31) (配列番号 7) VLPGEIVEYSR (ピーク No:15) (配列番号 8)

10

20

30

40

【表 6】

表 6：ヒト結腸直腸組織 NMP 調製物から単離した CC タンパク質の部分アミノ酸配列

マーカー No.	アミノ酸配列 (5'-3')
CC1	YTIFDNFLITNDEAYAEFFG (ピーク 30) (配列番号 9) QIDNPDYKGTXIHPE (ピーク 34) (配列番号 10) PAVYFKEQFLDGDGW (ピーク 24) (配列番号 11) TLIVRPDNTYEVK (ピーク 18) (配列番号 12) YAVLITVLQDS (ピーク 13) (配列番号 13) AKTDFATFLYT (ピーク 28) (配列番号 22)
CC2	NLPQE (ピーク 07) (配列番号 14) TEPELQDKIHQ (ピーク 18) (配列番号 15) TDAPSFSDIPNL (ピーク No:20) (配列番号 16) LKYENEVALR (ピーク No:20) (配列番号 23) XQKEDVPSE (ピーク No:02) (配列番号 17)
CC3	VYOEPLVFR (ピーク 31) (配列番号 24) RAPFQELYND (ピーク 31) (配列番号 25) XFYQLDAYPSGAXY (ピーク 35) (配列番号 26)
CC4	VIEAFNR (ピーク 17) (配列番号 27) ILLFDYFNR (ピーク 28) (配列番号 28) VLVALEPLS (ピーク 29) (配列番号 29)
CC6a	NAFNDGLK (ピーク 12) (配列番号 18) YFDSFGDLSSASAIMGN (ピーク 19) (配列番号 19) TYFSHIDVSPGSAQVK (ピーク 18) (配列番号 20)
CC6b	SLDEQEQTk (ピーク 06) (配列番号 21)

10

20

30

40

50

## 【0085】

該アミノ酸配列を公開されているアミノ酸データベースに対して検索して既知のタンパク質でないか調べた。CC1から作製した断片のアミノ酸配列(配列番号9、10、および11)はカルレティキュリンというタンパク質と一致しており、一方、配列番号12および13を有するCC1配列はカルレティキュリンの前駆体と一致していた。カルレティキュリンは重要な多機能性のカルシウム結合タンパク質で、平滑筋の筋小胞体および筋肉以外の小胞体(ER)の膜中に見出される主要なカルシウム結合タンパク質である。カルレティキュリンは主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラスIタンパク質の新たに合成された分子の折り畳みとペプチドのローディングにおいて免疫学的機能を有している。完全なMHCクラスI分子は、短いペプチド断片と結合した鎖の3個のドメインとより小さな2-ミクログロブリンからできている。2-ミクログロブリンが鎖にまず最初に結合すると、この部分的に折りた

たまれたヘテロダイマーはカルレティキュリンを含んでいるタンパク質の複合体と結合する。カルレティキュリンとMHC分子との結合は発生期のN-結合型オリゴサッカライドのグルコーストリミングによって調節される--MHCクラスI分子の1ドメイン中のオリゴサッカライド部分および3ドメイン内の残基はカルレティキュリンとの結合(intersection)にきわめて重要である。ペプチドのローディングとN-結合型グリカンの糖の除去後、カルレティキュリンはそのヘテロダイマーから解離する。

【実施例4】

【0086】

結腸癌NMP調製物中のカルレティキュリンの同定

結腸癌中のカルレティキュリンの存在をNMP調製物ならびに核および細胞質抽出物を用いて評価した。

10

【0087】

A. 方法

核および細胞質抽出物：NE-PER核および細胞質抽出試薬(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を、核および細胞質抽出物の調製に用いた。そのタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準品として用いてクーマシー・プラス・プロテインアッセイ(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)で定量した。

【0088】

1次元イムノプロット：1次元イムノプロット分析は標準的な確立されたプロトコールに従って行った。抽出したNMPの各サンプルの10 $\mu$ gをPBS(リン酸塩緩衝食塩水)中に懸濁し、核抽出試薬(NER)中、または細胞質抽出試薬(CERI)中に懸濁した核および細胞質抽出物を12% SDS-PAGEで分離した。10 $\mu$ LのRainbowマーカー(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)もロードした。次いでタンパク質をポリビニリデンジフルオリド膜(Millipore, Bedford, MA)に転写し、その膜を0.2% Tween 20を加えたPBSに4% 脱脂粉乳を入れた液中で4時間一晩ブロックした。次いでその膜をPBSと0.2% Tween 20で洗った後、1:2000希釈の抗カルレティキュリンIgG(Research Diagnostics, NC, Flanders, NJ)および0.2% Tween 20を加えたPBSに2% 脱脂粉乳を入れた液で1時間インキュベートした。その膜をさらにPBSと0.2% Tween 20で洗い、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)をコンジュゲートさせた1:5000希釈のヤギ抗ウサギIgG(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)二次抗体中で1時間インキュベートした。各タンパク質抽出の相対純度の測定には、その膜を、モノクローナル $\alpha$ -チューブリンマウス抗体(1:500)(細胞質チューブリンに特異的なもの)と0.2% Tween 20を加えたPBS中に2% 脱脂粉乳を入れた液で、プローブした。これらの膜をさらにPBSと0.2% Tween 20で洗い、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートさせた1:5000希釈のヤギ抗マウスIgG(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)中で1時間インキュベートした。その膜を再度PBSと0.2% Tween 20で洗い、タンパク質をECL イムノプロットキット(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)を用いて化学発光反応で検出した。

20

30

【0089】

2次元イムノプロット：2次元電気泳動を行った後、ペプチド配列分析の結果カルレティキュリンと同定されたスポットが位置するゲル部分を取り出し、ポリビニリデンジフルオリド膜(Millipore, Bedford, MA)に転写した。ゲルのこの部分はゲル全体の代わりに用いたが、それは大きなゲルを用いるとプロットングとプロセシングが困難となるためである。その後、上述と同じ方法で1次元イムノプロットを行った後、0.2% Tween 20を加えたPBSに2% 脱脂粉乳を入れた液中に1:2000の希釈の抗カルレティキュリンIgG(Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ)と1時間インキュベートした。その膜をさらにPBSと0.2% Tween 20で洗い、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)をコンジュゲートさせた1:5000希釈のヤギ抗ウサギIgG(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)二次抗体中で1時間インキュベートした。その膜を再度PBSと0.2% Tween 20で洗い、タンパク質をECL イムノプロットキット(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)を用いて化学発光反応で検出した。

40

50

## 【0090】

## B. 結果

CC1の2次元イムノプロットは抗カルレティキュリン抗体をプローブとして調べると陽性を示した。結腸癌組織、正常隣接結腸組織および正常ドナー結腸組織の細胞質、核、および核マトリックスタンパク質画分の1次元イムノプロットをカルレティキュリンおよび - チューブリン(細胞質にある51kDタンパク質)に対して特異的な抗体をプローブとして調べた。チューブリンは核および核マトリックスタンパク質画分には検出されず、このことは、これらの画分には細胞質物質の夾雑はないことを示している。カルレティキュリンはヒト結腸癌組織、隣接正常組織および正常ドナー組織の3種類の異なるタンパク質画分の全てで検出された(60kDバンド付近)。これらの結果はカルレティキュリンが結腸癌細胞の核タンパク質画分、より具体的には核マトリックスタンパク質画分中に存在し、その画分に存在することは細胞質のカルレティキュリンの夾雑によるものではないことを示している。1次元イムノプロットでは、カルレティキュリンは正常隣接結腸組織および正常ドナー結腸組織のNMP調製物中では、より検出が少なかった。

10

## 【実施例5】

## 【0091】

肝臓転移した結腸癌細胞と原発性結腸癌細胞のNMPの特徴の同定

## A. 種々の供給源から得たNMP中でのL1~L5の発現

種々のNMP調製物について高分解能2次元(2D)ゲル電気泳動を行い、臨床的に価値のある5種類のタンパク質(L1~L5)を同定した(表7)。NMP L1~L5は、肝臓に転移した結腸癌の種々のもののNMP調製物についての2Dゲルの約83%から100%で検出された。L1~L5は正常な肝細胞のNMP調製物中には検出されなかった。L1、L2、およびL5の3種のタンパク質は正常ドナー肝臓組織のNMP調製物中には検出されず、L3およびL4の2種のタンパク質は、正常ドナー肝臓組織のNMP調製物から調製したゲルでは結腸癌の肝臓転移の組織のものと比較すると検出のパーセンテージは低かった。これらのタンパク質のうちの4種(L1、L2、L4、およびL5)は隣接正常肝臓組織サンプル中では40%未満に検出され(表7)、一方L3タンパク質は隣接肝臓組織サンプルの92%に検出された(表7)。

20

## 【0092】

L1、L2、L3、およびL4の4種のタンパク質はまた、原発性結腸癌細胞のNMP調製物を用いて調製されたゲルの60%以上で検出された(表7)。他方、L5タンパク質は原発性結腸癌細胞のNMP調製物を用いて調製されたゲルの20%で検出されたにすぎなかった(表7)。L3およびL4タンパク質は正常隣接結腸のNMP調製物を用いて調製したゲルでは100%で発現されており、ドナー結腸組織ではそれぞれ100%および75%に発現されていた。L2タンパク質は隣接正常結腸組織の10%で発現され、一方L1は隣接正常結腸では検出されなかったが、ドナー結腸サンプル4検体のうちの1つでは検出された(25%、表7)。同定したタンパク質の電気泳動で調べた特徴を表7に示している。

30

## 【0093】

このように、L1~L5は正常肝臓への転移と正常な肝細胞とではその発現に差がある。L1とL2はこれらのタンパク質の全種類のうちで最も差が大きく、その相違は結腸癌の肝臓転移対隣接肝臓組織、および原発性結腸癌対隣接結腸組織の双方で認められる。L3は肝臓転移対隣接肝臓組織、または原発性結腸癌対正常隣接結腸で差が認められる。

40

## 【表 7】

表 7: 肝臓転移ならびにその他の肝臓および結腸の組織中の NMP の特徴

マーカー /NMP	分子 量 (kD)	PI	組織での発現(2次元ゲル)						
			結腸癌の 肝臓転移 (n=12)	正常隣 接肝臓 (n=12)	正常ド ナー肝 臓(n=3)	正常肝 細胞	結腸癌 (n=10)	正常隣 接結腸 (n=10)	正常ド ナー結 腸 (n=4)
L <sub>1</sub>	50	6.01	92%	42%	0%	0%	70%	0%	25%
L <sub>2</sub>	20	5.73	100%	17%	0%	0%	100%	10%	0%
L <sub>3</sub>	17	6.09	100%	92%	33%	0%	90%	100%	100%
L <sub>4</sub>	17	6.00	100%	17%	33%	0%	60%	100%	75%
L <sub>5</sub>	18	5.88	83%	8%	0%	0%	20%	0%	0%

10

## 【0094】

## B. 肝臓および結腸癌組織ならびに細胞系から得たNMPの分析

組織サンプルは上皮細胞、基質細胞、免疫細胞、およびその他の細胞タイプの複雑な混合物である。検出された核マトリックスの変化が実際に悪性新生物細胞中で起こっていた変化を示しているのかを調べるため、またモデルとなりうるものを同定するために、2種類のヒト原発性肝癌細胞系のNMP組成を調べた。純粋な細胞系から得たNMPフィンガープリントは、肝臓転移および結腸癌検体の3次元複合体と異なるであろうと予想されるが、そのNMPフィンガープリントは試薬を作製するための道具、また単一の細胞タイプを調べるための道具として役立つ。ヒト肝臓癌細胞系Huh 7およびHepG 2、ならびにヒト結腸癌細胞系Coco-2およびSW480を増殖させ、それらのNMPを単離した。次いでこれらのNMPを分離し、上述のとおり分析した。HepG 2細胞系では、肝臓転移に関わるタンパク質は全く発現されず、Huh 7細胞系は肝臓転移に関わるタンパク質のうちの1種(L1)を発現した。Caco-2細胞系はそれらのタンパク質のうちの2種(L3、L2)を発現し、SW480細胞系は1種のタンパク質(L2)を発現したにすぎない。これらの細胞系中で同定されたタンパク質の電気泳動で調べた特徴は表8に示す。

20

30

## 【表 8】

表 8: 大腸癌細胞系中の NMP の特徴

マーカー /NMP	分子 量 (kD)	PI	細胞中での発現(2次元ゲル)			
			Hep G <sub>2</sub>	Huh 7	Caco-2	SW 480
L <sub>1</sub>	50	6.01	0%	0%	0%	0%
L <sub>2</sub>	20	5.73	0%	0%	100%	100%
L <sub>3</sub>	17	6.09	0%	0%	100%	0%
L <sub>4</sub>	17	6.00	0%	0%	0%	0%
L <sub>5</sub>	19	5.88	0%	0%	0%	0%

40

## 【0095】

これらの研究からは、核マトリックスタンパク質がヒトの肝臓転移から得られたNMP調

50

製物中に一樣に存在するが、正常なドナー組織または単離した肝細胞中には容易には見つからないことを示している。さらに、場合によっては、正常隣接肝臓組織に、肝臓転移に認められるものと類似の核マトリックスタンパク質の変化がみられる。これらの5種類のタンパク質は、原発性結腸癌中にも程度は様々ながら認められたが、その他のタイプの癌では認められなかった。

【0096】

NMP抗体の作製を介してのこれらのタンパク質の機能の同定と検出を、結腸癌の予後判定および転移の早期発見のための試験法を開発するために用いることができる。血液または組織サンプル中の特定の核マトリックスタンパク質を検出するための抗体を作製し、ここで同定した個々のタンパク質の検出と組み合わせを含むアッセイ法を開発しうる。これらの抗体を用いたアッセイ法を開発すれば、高い感度と特異性を有する腫瘍マーカーとして用いうる。

10

【0097】

さらに、肝臓転移でのユニークなNMPの存在、または癌細胞中でのアップレギュレーションは、転移の発症におけるNMPの機能に関する新たな情報を提供しうるものであり、抗癌治療法のための新たな標的を提供しうるものである。

【実施例6】

【0098】

2次元ゲルからの"L"タンパク質の単離および配列分析

Lタンパク質の単離と配列分析の方法は、実施例3においてCCタンパク質について述べたものと同様である。結腸直腸癌の肝臓転移のNMP調製物から単離した特定のLポリペプチドのトリプシン処理断片についてN末端アミノ酸配列分析したものを表9に示している。

20

【表9】

表9：ヒト結腸直腸癌の肝臓転移のNMP調製物から単離したL2およびL5タンパク質の部分アミノ酸配列

マーカー No.	アミノ酸配列(5'-3')
L2	QFYQLDAYPSGAWYYVP (ピーク *) (配列番号 30) FFVALFPEVF (ピーク 23) (配列番号 31) QFYQLDAYPSGAWYYVP (ピーク 31) (配列番号 32)
L5	TDAPSFSDIPNL (ピーク No:20) (配列番号 33) FFVALFPEVFGK (ピーク No:26) (配列番号 34) QFYQL (ピーク No: 28) (配列番号 35) AVPYPQRDMPI (ピーク 38) (配列番号 36)

30

40

【0099】

公表文献リスト

1. Wu et al., Dis. Colon Rectum, 43: 1473-1486, 2000.
2. Greenlee et al., CA Cancer J.Clin., 50: 7-33, 2000.
3. Ahlquist, Gastroenterol. Clin. North Am., 26: 41-55, 1997.
4. Silvis et al., JAMA, 235: 928-930, 1976.
5. Geenen et al., Am.J.Dig.Dis., 20: 231-235, 1975.
6. Goldenberg et al., J.Natl.Cancer Inst., 57: 11-22, 1976.
7. Carriquiry et al., Dis.Colon Rectum, 42: 921-929, 1999.

50

8. Wanebo et al., New. Engl. J. Med., 299: 448-451, 1978.
9. Martell et al., Int. J. Biol. Markers, 13: 145-149, 1998.
10. Moertel et al., JAMA, 270: 943-947, 1993.
11. Herrera et al., Ann. Surg., 183: 5-9, 1976.
12. Reynoso et al., JAMA, 220: 361-365, 1972.
13. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1962).
14. Stewart and Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 27-62 (Freeman Publ., 1969).
15. Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST 4th ed., U. S. Dept. Health and Human Services, Public Health Services (Bethesda, MD, 1987). 10
16. Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988.
17. Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).
18. Goeddel et al., Meth. Enzymol., 185: 3-7 (Academic Press, NY, 1990).
19. Uhlen & Moks, Meth. Enzymol., 185: 129-143 (Academic Press, NY, 1990)
20. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, Calif. (1996).
21. Wray et al., Anal.Biochem., 118: 197-203, 1981.
22. Godreau, Fam. Pract. Res. J., 12: 313-320, 1992.
23. Berezney et al., Biochem.Biophys.Res.Comm., 60: 1410-1417, 1974. 20
24. Fey et al., Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr., 1: 127-143, 1991.
25. Getzenberg, et al., Endocrine Reviews, 11: 399-417, 1990.
26. Getzenberg, Journal of Cellular Biochemistry, 55: 22-31, 1994.
27. Konety et al., Journal of Urology, 159: 1359-1363, 1998.
28. Getzenberg et al., Cancer Res, 56: 1690-1694, 1996.
29. Getzenberg et al., Cancer Res, 51: 6514-6520, 1991.
30. Brunagel et al., Cancer. Cancer Res, 62: 2437-2442, 2002.
31. Miller et al., Cancer Res., 52: 422-427, 1992.
32. Keesee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 91: 1913-1916, 1994.
33. Patton et al., Biotechniques, 8: 518-527, 1990. 30
34. Boyd et al., Journal of the National Cancer Institute, 83: 862-866, 1991.
35. Gevaert et al., in METHODS IN PROTEINS STRUCTURE ANALYSIS, Plenum Press, New York (1995).

本発明を、広く開示し、上述の代表的な実施形態を参照して説明してきた。当業者であれば、本発明の思想および範囲から逸脱することなく様々な変形を行いうることは理解されよう。

【手続補正書】

【提出日】平成16年9月24日(2004.9.24)

【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】

臨床症状の指標となるアナライトの存在について生物学的検体を分析する方法であって、該アナライトに結合する抗体と該検体とを接触させる工程、該検体中の該抗体の結合を検出する工程、及び該検出された結合を該臨床症状と関連させる工程を含み、ここで該抗体が、

Asn-Leu-Pro-Gln-Glu(配列番号14)、  
Thr-Glu-Pro-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Gln(配列番号15)、  
Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-Asp-Ile-Pro-Asn-Leu(配列番号16)、  
Xaa-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu(配列番号17)、または  
Leu-Lys-Tyr-Glu-Asn-Glu-Val-Ala-Leu-Arg(配列番号23)  
と結合するものであり、ならびに該検出される結合が細胞増殖性疾患と相関する、上記方法。

【請求項2】

前記検出される結合が結腸の細胞増殖性疾患と相関する請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記検体が組織、糞便または体液サンプルである請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記抗体がAsn-Leu-Pro-Gln-Glu(配列番号14)と結合する請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記抗体がThr-Glu-Pro-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Gln(配列番号15)と結合する請求項1記載の方法。

【請求項6】

前記抗体がThr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-Asp-Ile-Pro-Asn-Leu(配列番号16)と結合する請求項1記載の方法。

【請求項7】

前記抗体がXaa-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu(配列番号17)と結合する請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記抗体がLeu-Lys-Tyr-Glu-Asn-Glu-Val-Ala-Leu-Arg(配列番号23)と結合する請求項1記載の方法。

【請求項9】

臨床症状の指標となるアナライトの存在について生物学的検体を分析する方法であって、該アナライトに結合する抗体と該検体とを接触させる工程、該検体中の該抗体の結合を検出する工程、及び該検出された結合を該臨床症状と相関させる工程を含み、ここで該生物学的検体が体液であり、該抗体が

Thr-Glu-Pro-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Gln(配列番号15)

と結合し、ならびに該検出される結合が結腸の細胞増殖性疾患と相関する、上記方法。

【請求項10】

前記体液が血清である請求項9記載の方法。

【請求項11】

本質的にAsn-Leu-Pro-Gln-Glu(配列番号14)からなる合成ペプチド。

【請求項12】

本質的にThr-Glu-Pro-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Gln(配列番号15)からなる合成ペプチド。

【請求項13】

本質的にThr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-Asp-Ile-Pro-Asn-Leu(配列番号16)からなる合成ペプチド。

【請求項14】

本質的にXaa-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu(配列番号17)からなる合成ペプチド。

【請求項15】

本質的にLeu-Lys-Tyr-Glu-Asn-Glu-Val-Ala-Leu-Arg(配列番号23)からなる合成ペプチド。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/02340
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07K 16/00, 17/00, 17/14; C12P 21/08 US CL : 424/277.1; 530/350, 387.7, 388.8, 391.1, 391.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/277.1; 530/350, 387.7, 388.8, 391.1, 391.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	Database SWISS PROTEIN 41, Accession Nos. P04090, Q99936, Q9UCX3, Q9UQJ2. 01 November 1986; see USPTO search report "pct-us03-02340-14.rsp", result 6.	1, 2, 11, 13, and 20 ----- 21-23, 42, and 75-78
X --- Y	Database SWISS PROTEIN 41, Accession No. Q9UN16. 16 October 2001; see USPTO search report "pct-us03-02340-14.rsp", result 12.	1, 2, 11, 13, and 20 ----- 21-23, 42, and 75-78
X --- Y	Database SWISS PROTEIN 41, Accession No. Q9UL58. 16 October 2001; see USPTO search report "pct-us03-02340-14.rsp", result 14. ✓	1, 2, 11, 13, and 20 ----- 21-23, 42, and 75-78
X,T --- Y,T	Database SWISS PROTEIN 41, Accession Nos. P80365, Q13194, Q8N439, Q96AN8. 15 September 2003; see USPTO search report "pct-us03-02340-14.rsp", result 13.	1, 2, 11, 13, and 20 ----- 21-23, 42, and 75-78
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 09 December 2003 (09.12.2003)		Date of mailing of the international search report 20 DEC 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Stephen L. Rawlings, Ph.D. Telephone No. (703) 308-0196 <i>Stephen L. Rawlings</i>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/02340

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

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

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claim Nos.: 58,63,69,74 and 79-81  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims 58, 63, 69, 74, and 79-81 have been found unsearchable under Article 17(2)(b) because of defects under Article 17(2)(a).
3.  Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1, in part, 2, 3, 11, 13 and 14, in part, 20-23, 42, and 75-78
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/02340

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

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

Note: The second claim originally numbered 79 and claims 80 and 81 have been renumbered as claims 80-82, respectively.

Group I, claim(s) 1, 2, 11, 13, 20, and 42, insofar as the claims are drawn to CC2 and a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with the protein.

Group II, claim(s) 1, 3, 11, 14, and 20, insofar as the claims are drawn to CC3.

Group III, claim(s) 1, 4, 11, 15, and 20, insofar as the claims are drawn to CC4.

Group IV, claim(s) 1, 5, 11, and 20, insofar as the claims are drawn to CC5.

Group V, claim(s) 1, 6, 11, 16, and 20, insofar as the claims are drawn to CC6a.

Group VI, claim(s) 1, 7, 11, 17, and 20, insofar as the claims are drawn to CC6b.

Group VII, claim(s) 1, 8, 11, 12, and 20, insofar as the claims are drawn to L1.

Group VIII, claim(s) 1, 9, 11, 12, 18, and 20, insofar as the claims are drawn to L2.

Group IX, claim(s) 1, 10, 11, 19, and 20, insofar as the claims are drawn to L5.

Group X, claim(s) 1, 11, 12, and 20, insofar as the claims are drawn to L3.

Group XI, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for CC2 and a kit comprising said binding partner.

Group XII, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for CC3 and a kit comprising said binding partner.

Group XIII, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for CC4 and a kit comprising said binding partner.

Group XIV, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for CC5 and a kit comprising said binding partner.

Group XV, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for CC6a and a kit comprising said binding partner.

Group XVI, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for CC6b and a kit comprising said binding partner.

Group XVII, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for L1 and a kit comprising said binding partner.

Group XVIII, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for L2 and a kit comprising said binding partner.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/02340

- Group XIX, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for L5 and a kit comprising said binding partner.
- Group XX, claim(s) 21-23 and 75-78, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for L3 and a kit comprising said binding partner.
- Group XXI, claim(s) 24, 25, and 31, insofar as the claims are drawn to N1.
- Group XXII, claim(s) 24, 26, and 31, insofar as the claims are drawn to N2.
- Group XXIII, claim(s) 24, 27, and 31, insofar as the claims are drawn to N3.
- Group XXIV, claim(s) 24, 28, and 31, insofar as the claims are drawn to N4.
- Group XXV, claim(s) 24, 29, and 31, insofar as the claims are drawn to N5.
- Group XXVI, claim(s) 24, 30, and 31, insofar as the claims are drawn to N6.
- Group XXVII, claim(s) 32-34, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for N1.
- Group XXVIII, claim(s) 32-34, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for N2.
- Group XXIX, claim(s) 32-34, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for N3.
- Group XXX, claim(s) 32-34, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for N4.
- Group XXXI, claim(s) 32-34, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for N5.
- Group XXXII, claim(s) 32-34, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for N6.
- Group XXXIII, claim(s) 35, 36, and 38, insofar as the claims are drawn to L3.
- Group XXXIV, claim(s) 35, 37, and 38, insofar as the claims are drawn to L4.
- Group XXXV, claim(s) 39-41, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for L3.
- Group XXXVI, claim(s) 39-41, insofar as the claims are drawn to a binding partner specific for L4.
- Group XXXVII, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with CC3.
- Group XXXVIII, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with CC4.
- Group XXXIX, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with CC5.
- Group XL, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with CC6a.
- Group XLI, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with CC6b.
- Group XLII, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with L1.
- Group XLIII, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with L2.
- Group XLIV, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with L5.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/02340

Group XLV, claim(s) 42, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with L3 of claim 12.

Group XLVI, claim(s) 43, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with N1.

Group XLVII, claim(s) 43, insofar as the claim are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with N2.

Group XLVIII, claim(s) 43, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with N3.

Group XLIX, claim(s) 43, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with N4.

Group L, claim(s) 43, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with N5.

Group LI, claim(s) 43, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with N6.

Group LII, claim(s) 44, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with L3 of claim 35.

Group LIII, claim(s) 44, insofar as the claims are drawn to a method for producing polyclonal antibodies comprising immunizing an animal with L4.

Groups LIV-LXIII, claim(s) 45, insofar as the claims are drawn to a method for producing a monoclonal antibody comprising immunizing an animal with a protein selected from the group consisting of (54) CC2, (55) CC3, (56) CC4, (57) CC5, (58) CC6a, (59) CC6b, (60) L1, (61) L2, (62) L5, and (63) L3 of claim 12.

Groups LXIV-LXIX, claim(s) 46, insofar as the claims are drawn to a method for producing a monoclonal antibody comprising immunizing an animal with a protein selected from the group consisting of (64) N1, (65) N2, (66) N3, (67) N4, (68) N5, and (69) N6.

Groups LXX and LXXI, claim(s) 47, insofar as the claims are drawn to a method for producing a monoclonal antibody comprising immunizing an animal with a protein selected from the group consisting of (70) L3 of claim 35 and (71) L4.

Groups LXXII-LXXXVI, claim(s) 48-53, insofar as the claims are drawn to a method for diagnosing a proliferative disorder of the colon in a patient comprising analyzing a sample for the presence of at least one protein, wherein said at least one protein is selected from the group consisting of (72) CC2, (73) CC3, (74) CC4, (75) CC5, (76) CC6a, (77) CC6b, (78) L1, (79) L2, (80) L5, (81) N1, (82) N2, (83) N3, (84) N4, (85) N5, and (86) N6.

Group LXXXVII, claim(s) 54-57 and 59-62, insofar as the claims are drawn to a method for diagnosing colon cancer in a patient comprising analyzing a sample for the presence of calreticulin.

Groups LXXXVIII-CII, claim(s) 64-68, insofar as the claims are drawn to a method for evaluating colonic adenomas for potential to become malignant comprising analyzing the adenoma for the presence of at least one protein, wherein said at least one protein is selected from the group consisting of (88) CC2, (89) CC3, (90) CC4, (91) CC5, (92) CC6a, (93) CC6b, (94) L1, (95) L2, (96) L5, (97) N1, (98) N2, (99) N3, (100) N4, (101) N5, and (102) N6.

Groups CIII-CVII, claim(s) 70-73 and 82, insofar as the claims are drawn to a method for diagnosing colon cancer metastasis of the liver comprising analyzing a sample of liver for the presence of at least one protein, wherein said at least one protein is selected from the group consisting of (103) L1, (104) L2, (105) L3, (106) L4, and (107) L5.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/02340

Claims 1 and 2 are drawn to more than one species of the generic invention wherein CC2 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: (a) 14, (b) 15, (c) 16, (d) 17, and (e) 23.

Claims 1 and 3 are drawn to more than one species of the generic invention wherein CC3 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: (a) 24, (b) 25, and (c) 26.

Claims 1 and 4 are drawn to more than one species of the generic invention wherein CC4 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: (a) 27, (b) 28, and (c) 29.

Claims 1 and 5 are drawn to more than one species of the generic invention wherein CC6a comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: (a) 18, (b) 19, and (c) 20.

Claims 1 and 9 are drawn to more than one species of the generic invention wherein L2 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: (a) 30, (b) 31, and (c) 32.

Claims 1 and 10 are drawn to more than one species of the generic invention wherein L5 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: (a) 33, (b) 34, (c) 35, and (d) 36.

Claim 48 is drawn to more than one species of the generic invention wherein the step of analyzing the presence of at least one protein involves measuring the level of (a) the protein or (b) the mRNA encoding the protein.

Claim 54 is drawn to more than one species of the generic invention wherein the proliferative disorder is selected from the group consisting of (a) colorectal carcinoma and (b) colonic adenoma.

Claim 64 is drawn to more than one species of the generic invention wherein the step of analyzing the presence of at least one protein involves measuring the level of (a) the protein or (b) the mRNA encoding the protein.

The inventions listed as Groups I-CVII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of each group of invention is making and using a different protein. In addition, PCT Rules 13.1 and 13.2 do not provide for a single general inventive concept comprising more than the first named product, the first named method for making said product, and the first named method for using said product.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of each species of generic invention is making and using a different protein, or diagnosing a colon cancer having different pathology and/or etiology; or alternatively, each species of generic invention has lacks the same or corresponding special technical feature because the methods are materially different and/or comprise different steps.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/02340

Databases SWISS PROTEIN, GENEMBL, EST, PUBLISHED APPLICATIONS, GENESEQ, SPTREMBL, PIR: SEQ ID NOs: 14 and 24; WEST, MEDLINE: colon cancer, tumor associated antigen, diagnosis, CC2, CC3.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 N 15/00	A

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(72) 発明者 バウアー, アンソニー, ジェイ.

アメリカ合衆国 1 5 2 3 7 - 4 2 7 9 ペンシルバニア州, ピッツバーグ, リランド ドライブ  
6 7 5

(72) 発明者 ブルーネーゲル, ギゼラ

アメリカ合衆国 1 5 2 3 2 ペンシルバニア州, ピッツバーグ, エルマー ストリート 5 5 0  
8, アpartment 6

(72) 発明者 ゲッツェンベルグ, ロバート, エイチ.

アメリカ合衆国 1 5 2 1 7 ペンシルバニア州, ピッツバーグ, オーガスタ ドライブ 1 6 2  
7

(72) 発明者 ショーエン, ロバート, イー.

アメリカ合衆国 1 5 2 1 7 ペンシルバニア州, ピッツバーグ, ワイトマン ストリート 1 4  
2 5

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA44 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12 DA02 EA04 FA02  
FA10 GA03 GA11 GA18 GA23 GA27 HA03 HA08 HA12 HA14  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QQ58 QQ79 QR32 QR55  
QR82 QS10 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02 QX07  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA14  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA51 FA71  
FA72 FA74 GA31 HA05 HA06 HA15 HA16

专利名称(译)	核基质蛋白参与结肠癌和结肠癌肝转移的变化及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005525103A</a>	公开(公告)日	2005-08-25
申请号	JP2003564553	申请日	2003-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学		
申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学		
[标]发明人	パウアーアンソニージェイ ブルーネーゲルギゼラ ゲッツエンベルグロバートエイチ シヨーエンロバートイー		
发明人	パウアー, アンソニー, ジェイ. ブルーネーゲル, ギゼラ ゲッツエンベルグ, ロバート, エイチ. シヨーエン, ロバート, イー.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/32 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/4748 C07K14/47 G01N33/57419		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.C C07K14/47 C07K14/82 C07K16/32 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53. D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA23 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA14 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA31 4H045/HA05 4H045/HA06 4H045/HA15 4H045/HA16		
优先权	60/351819 2002-01-25 US 60/412612 2002-09-19 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

用于诊断结肠增生性疾病的蛋白质存在于核基质蛋白质制剂中，其可以通过分子量，等电点和氨基酸序列表征。例如，可以通过二维凝胶电泳或通过特异性结合配偶体（例如抗体）鉴定蛋白质。

臨床的パラメーター	結果(サンプル数)
腫瘍の位置	右半結腸 (n=5) 左半結腸 (n=5)
腫瘍のステージ(WICC)	I: T <sub>1-2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> (n=0) II: T <sub>3-4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> (n=5) III: T <sub>1-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub> (n=4) IV: T <sub>1-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>1</sub> (n=1)
腫瘍のグレード	G1 (n=0) G2 (n=9) G3 (n=1)

