

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 524398

(P2003 - 524398A)

(43)公表日 平成15年8月19日(2003.8.19)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/495	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/495		16/24	4 B 0 6 3
16/24		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全131数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 606256(P2000 - 606256)

(86)(22)出願日 平成12年3月24日(2000.3.24)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月19日(2001.9.19)

(86)国際出願番号 PCT/US00/07945

(87)国際公開番号 W000/056352

(87)国際公開日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(31)優先権主張番号 09/276,600

(32)優先日 平成11年3月25日(1999.3.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , C A , J P

(71)出願人 アボット・ラボラトリーズ  
ABBOTT LABORATORIE  
S

アメリカ合衆国、イリノイ・60064 - 6050、  
アボット・パーク、アボット・パーク・ロ  
ード・100、チャド・0377/エイ・ピー・6・  
デー2

(72)発明者 ビリング - メデル , パトリシア・エイ  
アメリカ合衆国、イリノイ・60030、グレイ  
ズレイク、ラベンダー・サークル・34088

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 ( 外 5 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 前立腺疾患の検出に有用な試薬及び方法

(57)【要約】

P C I G F と称し、前立腺組織から転写される、一連の  
近接する及び部分的に重複する c D N A 配列及びそれ  
によりコードされるポリペプチドについて記載する。これ  
らの配列は前立腺疾患及び状態、例えば前立腺癌の検出  
、診断、病期判定 ( ステージング ) 、経過追跡 ( モニタ  
リング ) 、予後判定、i n v i v o 造影、予防もしくは  
は処置、又は疾病素質の判定に有用である。また P C I  
G F コード化ポリペプチド又はタンパク質に特異的に結  
合する抗体及びアゴニスト又は組織特異的 P C I G F ポ  
リペプチドの作用を防御するインヒビターをも提供し、  
これらの分子は前立腺疾患、腫瘍又は転移の治療的処置  
に有用である。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 被験サンプル中の標的P C I G Fポリヌクレオチドの存在を検出する方法であって：

(a) 被験サンプルを少なくとも1つのP C I G F特異的ポリヌクレオチド又はその相補体と接触させるステップであって、該P C I G F特異的ポリヌクレオチドが配列番号1のヌクレオチド629～1201（両端含む）にわたる領域に由来するポリヌクレオチド及びそのフラグメント又は相補体と少なくとも50%の同一性を有するステップ；及び

(b) 被験サンプルから該P C I G F特異的ポリヌクレオチドに結合する標的P C I G Fポリヌクレオチドの存在を検出するステップ；を含む方法。

【請求項2】 ステップ(a)を実施する前に前記標的P C I G Fポリヌクレオチドが固相に付着している、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ステップ(a)を実施する前に前記P C I G F特異的ポリヌクレオチドが固相に付着している、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 被験サンプル中のP C I G F mRNAの存在を検出する方法であって：

(a) 少なくとも1つのプライマーを用いて該サンプルで逆転写を実施しcDNAを産生するステップ；

(b) P C I G Fオリゴヌクレオチドをセンス及びアンチセンスプライマーとして使用してステップ(a)で得られたcDNAを増幅し、P C I G Fアンプリコンを得るステップ；

(c) P C I G Fアンプリコンの存在を検出するステップであって、ここでステップ(a)及び(b)で用いられるP C I G Fオリゴヌクレオチドが配列番号1のヌクレオチド629～1201（両端含む）にわたる領域に由来するポリヌクレオチド及びそのフラグメント又は相補体と少なくとも50%の同一性を有するステップ；を含む方法。

【請求項5】 ステップ(a)、(b)又は(c)を実施する前に前記被験

サンプルを固相と反応させる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記検出ステップが測定可能なシグナルを発生できる検出可能な標識を利用することを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 被験サンプル中の標的PCIGFポリヌクレオチドを検出する方法であって：

(a) 被験サンプルを、センスプライマーとして少なくとも1つのPCIGFオリゴヌクレオチドと、及びアンチセンスプライマーとして少なくとも1つのPCIGFオリゴヌクレオチドと接触させ、増幅して第1段階の反応産物を得るステップ；

(b) 該第1段階の反応産物を、少なくとも1つの別のPCIGFオリゴヌクレオチドと接触させて第2段階のステップ反応産物を得るステップであって、ただし、別のPCIGFオリゴヌクレオチドはステップ(a)で用いられるPCIGFオリゴヌクレオチドの3'に位置し、該第1段階の反応産物に相補的であるステップ；及び

(c) 標的PCIGFポリヌクレオチドの存在の指標として第2段階反応産物を検出するステップであって、ここでステップ(a)及び(b)で用いられるPCIGFオリゴヌクレオチドが、配列番号1のヌクレオチド629~1201(両端を含む)にわたる範囲の領域に由来する配列及びそのフラグメント又は相補体と少なくとも50%の同一性を有するステップ；

を含む方法。

【請求項8】 ステップ(a)、(b)又は(c)の1つを実施する前に前記被験サンプルを固相と反応させる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記検出ステップが測定可能なシグナルを発生できる検出可能な標識を利用することを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 前記検出可能な標識を固相と反応させる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 被験サンプル中のPCIGFポリヌクレオチドを検出するのに有用な試験キットであって、該試験キットが配列番号1のヌクレオチド629~1201(両端を含む)にわたる領域に由来する配列及びそのフラグメント

又は相補体と少なくとも50%の同一性を有する少なくとも1つのPCIGFポリヌクレオチドを収容する容器からなる試験キット。

【請求項12】 PCIGF核酸分子に由来する精製されたポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは配列番号1のヌクレオチド629～1201（両端を含む）にわたる領域に由来する配列及びそのフラグメント又は相補体と少なくとも50%の同一性を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項13】 前記ポリヌクレオチドが選択的にPCIGF核酸配列にハイブリダイズする、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項14】 前記ポリヌクレオチドが全長で約20～約50のヌクレオチドである、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項15】 前記ポリヌクレオチドが全長で約10～約25のヌクレオチドである、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項16】 前記ポリヌクレオチドが組換え技術により産生される、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項17】 前記ポリヌクレオチドが合成技術により産生される、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】 前記ポリヌクレオチドが少なくとも1つのPCIGFエピトープをコードする配列を含んでなる、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項19】 前記ポリヌクレオチドが固相に付着している、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項20】 前記固相がそこに結合したポリヌクレオチド分子のアレイを含んでなる、請求項19に記載のポリヌクレオチド。

【請求項21】 PCIGFポリヌクレオチドに由来する核酸配列を含んでなる組換え発現系であって、ここで該配列が所望の宿主に適合する制御配列に機能的に連結され、該核酸配列が配列番号1のヌクレオチド629～1201（両端を含む）にわたる領域に由来する配列及びそのフラグメント又は相補体と少なくとも50%の同一性を有する、組換え発現系。

【請求項22】 請求項21の組換え発現系でトランスフェクトされた細胞。

【請求項23】 配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長より短いPCIGFポリペプチドであって、ここで該ポリペプチドが配列番号7～9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチド。

【請求項24】 前記ポリペプチドが組換え技術により産生される請求項23に記載のPCIGFポリペプチド。

【請求項25】 前記ポリペプチドが合成技術により産生される請求項23に記載のPCIGFポリペプチド。

【請求項26】 特異的結合分子であって、配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長より短いポリペプチドに由来する少なくとも1つのPCIGFエピトープに結合し、配列番号7～9からなる群から選択されるアミノ酸配列及びそのフラグメントと少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる特異的結合分子。

【請求項27】 前記特異的結合分子が抗体分子である請求項26に記載の特異的結合分子。

【請求項28】 被験サンプル中のPCIGF抗原又は抗PCIGF抗体の存在を判定する試験キットであって、該試験キットが配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長より短く、配列番号7～9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるPCIGFポリペプチドを収容した容器を含む試験キット。

【請求項29】 前記PCIGFポリペプチドが固相に付着している、請求項28に記載のキット。

【請求項30】 被験サンプル中のPCIGF抗原の存在を判定するための試験キットであって、該キットが請求項26に記載の特異的結合分子を含む容器を含む試験キット。

【請求項31】 前記特異的結合分子が固相に付着している、請求項30に記載のキット。

【請求項32】 少なくとも1つのPCIGFエピトープを含んでなるポリペプチドを産生する方法であって、該方法が、ポリペプチド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でトランスフェクトされた宿主細胞をインキュベートすることからなり、ここで該ポリペプチドが配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長よりも短い配列を有し、配列番号7～9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドである方法。

【請求項33】 前記PCIGF抗原の含有が疑われる被験サンプル中のPCIGF抗原を検出するための方法であって：

(a) 被験サンプルを請求項26に記載の特異的結合分子と接触させるステップであって、結合分子/抗原複合体を形成するのに十分な時間及び条件で該接触を実施するステップ；及び

(b) 該PCIGF抗原の存在の指標として該複合体の存在を検出するステップ；

を含む方法。

【請求項34】 前記特異的結合分子が抗体分子又はそのフラグメントである請求項33に記載の方法。

【請求項35】 前記特異的結合分子が固相に付着している、請求項33に記載の方法。

【請求項36】 PCIGF抗原に特異的な抗体の含有が疑われる被験サンプル中のこのような抗体の存在を検出するための方法であって：

(a) 被験サンプルをPCIGFポリペプチドと接触させるステップであって、該PCIGFポリペプチドが、少なくとも1つのPCIGFエピトープを含み、配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長よりも短く配列番号7～9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに由来し、さらにここで抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間及び条件で該接触を実施するステップ；及び

(b) PCIGF抗原に特異的な抗体の存在の指標として該複合体の存在を検出するステップ；

を含む方法。

【請求項37】 前記PCIGFポリペプチドが固相に付着している、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 請求項23に記載の少なくとも1つのPCIGFポリペプチドをコードする核酸配列でトランスフェクトされた細胞。

【請求項39】 PCIGF抗原に特異的に結合する抗体を産生する方法であって、に免疫応答を引き起こすのに十分量の単離された免疫原性ポリペプチドを個体に投与することを含み、ここで該免疫原性ポリペプチドが、少なくとも1つのPCIGFエピトープを含んでなり、配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長よりも短く配列番号7～9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチドに由来する方法。

【請求項40】 PCIGF抗原に特異的に結合する抗体を産生する方法であって、配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長よりも短い配列を有し配列番号7～9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに由来する少なくとも1つのPCIGFエピトープをコードする配列を含んでなるプラスミドを個体に投与することを含む方法。

【請求項41】 ランセット、吸い取り紙、布、綿棒及びカップからなる群から選択される、前記サンプルを収集するのに有用なツールを有する容器をさらに含んでなる、請求項11に記載の試験キット。

【請求項42】 ランセット、吸い取り紙、布、綿棒及びカップからなる群から選択される、前記サンプルを収集するのに有用なツールを有する容器さらに含んでなる、請求項28に記載の試験キット。

【請求項43】 ランセット、吸い取り紙、布、綿棒及びカップからなる群から選択される、該サンプルを収集するのに有用なツールを有する容器を含んでなる、請求項30に記載の試験キット。

【請求項44】 特異的結合分子が抗体又はそのフラグメントである請求項30に記載の試験キット。

【請求項45】 請求項12に記載のポリヌクレオチドであって、ポリヌク

レオチドが配列番号6で示されるPCIGFのアミノ酸配列全長よりも短いアミノ酸配列を含んでなり、配列番号7~9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるPCIGFタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項46】 前記ポリヌクレオチドが配列番号7、配列番号8又は配列番号9と少なくとも50%の同一性を有するポリペプチドをコードするDNAを含んでなる、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項47】 被験サンプル中の標的PCIGFポリヌクレオチドの存在が前立腺癌の指標である、請求項1に記載の方法。

【請求項48】 前記アンプリコンの存在が前立腺癌の指標である、請求項4に記載の方法。

【請求項49】 前記第2段階反応産物の存在が前立腺癌の指標である、請求項7に記載の方法。

【請求項50】 前記複合体の検出が前立腺癌の指標である、請求項33に記載の方法。

【請求項51】 前記複合体の検出が前立腺癌の指標である、請求項36に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の背景)**

本発明は概して前立腺疾患の検出に関する。さらに、本発明はまた、前立腺疾患を検出する試薬及び方法に関する。より特定的には本発明は、ポリヌクレオチド配列及びそれによりコードされるポリペプチドのような試薬、及び、これらの配列を使用する方法に関する。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列は、前立腺癌のような前立腺疾患又は状態の検出、診断、病期判定（ステージング）、経過追跡（モニタリング）、予後判定、*in vivo*造影、予防もしくは処置又は疾病素質の判定に有用である。

**【0002】**

米国男性の癌で最も多い形態が前立腺癌であり、1998年には新規症例は184500例、及び関連死亡数は39200例と報告されている（*American Cancer Society*）。前立腺癌はまた他の型の癌に比較して最大の発生増加率を示し、1992から1996年で142%増加している。

**【0003】**

前立腺癌のような前立腺疾患又は状態の検出、診断、病期判定、経過追跡、予後判定、*in vivo*造影、予防もしくは処置又は疾病素質の判定に使用される方法は患者の運命に極めて重要である。例えば、局在性前立腺癌と診断された患者の5年生存率が90%を上回るのに比べて、遠隔転移と診断された患者の生存率は25~31%である（*American Cancer Society statistics*）。従って、前立腺癌を早期に検出するための診断方法はこの疾患を特異的に検出し、症状が発現する前に前立腺癌の存在を検出すべきである。

**【0004】**

このような診断方法はまた、侵入性が最も少ない方法によって得られる血液、血漿、血清又は尿のような被検サンプルにおける免疫学的方法による種々の疾病マーカーの出現に基づく免疫学的アッセイを含む。これらの診断方法は、患者の負担を少なくして前立腺疾患患者を医師が管理する支援情報を提供するであろう

。前立腺特異的抗原 ( P S A ) のようなマーカーが存在しており、前立腺癌の患者をスクリーニングするために臨床使用されている。血清中の P S A タンパク質レベルの上昇は、無症状の男性の前立腺癌の早期検出に使用される。G . E . H a n k s ら : C a n c e r : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e o f O n c o l o g y , V o l . 1 , F o u r t h E d i t i o n , p p . 1 0 7 3 - 1 1 1 3 , P h i l a d e l p h i a , P A : J . B . L i p p i n c o t t C o . 1 9 9 3 。 P S A は通常前立腺から高レベルで精液に分泌されるが、前立腺が正常である男性の血液中には極めて低レベルで存在する。しかしながら、良性前立腺肥大症 ( B P H ) 及び前立腺アデノカルチノーマなどの前立腺疾患を有する患者では、P S A レベルは血液中で著明に高く、従って前立腺疾患の指標として有用である。しかしながら P S A は B P H 及び前立腺癌の間で区別できず、前立腺癌のマーカーとしての特異性は低い。M . K . S c h w a r t z ら : C a n c e r : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e o f O n c o l o g y , V o l . 1 , F o u r t h E d i t i o n , p p . 5 3 1 - 5 4 2 , P h i l a d e l p h i a , P A : J . B . L i p p i n c o t t C o . 1 9 9 3 参照。このように前立腺癌により特異的な新規マーカーが本疾患の早期検出に有利であろう。

#### 【0005】

前立腺癌患者の管理における重大な工程は、癌の外科的手術前段階に最適治療を計画するための予後判定及び診断基準を提供することである。外科的手術の前に正確な前立腺癌の病期判定をするための方法を改善することが必要である。ある研究では現在の外科手術前の前立腺癌の病期判定方法は当時約50%は不正確であった。F . L a b r i e ら、U r o l o g y 4 4 ( S y m p o s i u m I s s u e ) : 2 9 - 3 7 ( 1 9 9 4 ) 。前立腺癌管理はまた不適切な体内区画に見出される新規マーカーを利用することにより改善されるであろう。かかるマーカーは初期前立腺腫瘍を起源としているが血液、骨髄又はリンパ節中には存在しない細胞により発現されるmRNA又はタンパク質マーカーであり、これらの遠位器官への転移に関する高感度指標であろう。例えば転移性前立腺癌患者では、P S A タンパク質は骨髄において免疫組織化学的技術により検出され、血液、

リンパ節及び骨髄の細胞ではPSA mRNAはRT-PCRにより検出されている。K. Pantelら, *Onkologie* 18:394-401(1995)。

#### 【0006】

初期前立腺癌の生物学的挙動を予測し得る新規なマーカーは有意な価値を有するであろう。患者の生命を脅かしている又は脅かすであろう初期前立腺癌は、生命に脅威のない又は脅威にならない癌よりも臨床的に重要である。G. E. Hanks, 前出。従って、臨床上重要な前立腺癌と重要でない前立腺癌を区別できる新規マーカーが存在する必要がある。かかるマーカーがあれば医師は、前立腺組織に局在する、治療しなければ転移し、患者を死に至らしめるであろう前立腺癌を正確に同定し、有効に治療し得るであろう。さらに、侵襲性癌に特徴的なかかるマーカーが存在しないことが示されたときは、患者が高価で無益な治療を受けなくても済む。

#### 【0007】

PSAよりもより鋭敏に前立腺癌の再発を検出し、アンドロゲンによる影響を受けない前立腺関連マーカーを見出すこともまた有利であろう。今日までに、PSAは疾患の再発を検出するのに最も鋭敏なマーカーであることが解っている。しかしながら、癌治療に使用されるホルモン治療のために、PSAの上昇を生じずに腫瘍が進行する場合もある。アンドロゲンの低下に付随してPSAが低下し、必ずしも腫瘍転移の低下を反映しなくなる。この複雑さはアンドロゲン刺激によるPSA発現の結果によるものである。アンドロゲン除去後に観察されるPSAの低下は一部、腫瘍細胞死によるものではなく、PSA発現の減少によるものである。G. E. Hanks, 前出。

#### 【0008】

従って、前立腺疾患又は状態の検出、診断、病期判定、経過追跡、予後判定、*in vivo*造影、予防もしくは処置、又は、疾病素質の判定を行うための特異的方法及び試薬を提供すること、又はこれらの状態に対する素因の可能性を示すことは有益であろう。このような方法は、癌などの前立腺疾患及び状態の際に過剰発現される遺伝子産物を被検サンプル中で検定するアッセイを含む。このよ

うな方法はまた前立腺疾患又は状態に関連する遺伝子変化の産物に関して被験サンプルを検定するアッセイを含む。このような方法はさらに、癌のような前立腺関連疾患又は状態によって体内の種々の組織及び区画における分布が変化した遺伝子産物を被検サンプル中で検定するアッセイを含む。有用な試薬は、生検組織、血液又はその他の被検サンプルから抽出されたmRNAの逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、PCR又はハイブリダイゼーションアッセイのような診断方法で使用され得る (1つ又は複数の) ポリヌクレオチド、又はその (1つ又は複数の) フラグメント; 又は、このようなmRNAの翻訳産物であるポリペプチドもしくはタンパク質; 又は、これらのポリペプチドもしくはタンパク質に対する抗体である。前立腺疾患又は状態のための薬物治療又は遺伝子治療はこれらの同定された遺伝子配列又はその発現タンパク質を基盤にすることができ、いずれかの特定の治療の効果を経過追跡することができる。さらに初期段階の前立腺疾患例えば癌を検出でき、代替的に利用できる非外科的手術診断方法を得ることは有益であろう。

#### 【0009】

本発明は新規に同定されたポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドにコードされるポリペプチド、このようなポリヌクレオチド及びポリペプチドの使用、並びにこのようなポリヌクレオチド及びポリペプチドの産生に関する。さらにとりわけ本発明のポリペプチドは、以後しばしば「PCIGF」と称される前立腺癌誘導成長因子である。

#### 【0010】

本発明は構造的及び機能的にTGF- $\beta$ に關与するポリヌクレオチド及びポリペプチドに関する。ペプチド成長因子の形質転換成長因子ファミリーには5つのメンバーが含まれ、TGF- $\beta$ 1ないしTGF- $\beta$ 5と称し、これらは全ておよそ25kDのホモダイマーを形成する。TGF- $\beta$ ファミリーはムエラーン阻害物質 (Cate, R.L.ら、Cell 45:685-698 (1986))、デカペンタプレジック (Padgett, R.W.ら、Nature 325:81-84 (1987))、骨形態形成因子 (Wozney, J.M.ら、Science 242:1528-1534 (1988))、vg1 (We

eks, D. L. 及び Melton, D. A., Cell 51: 861 - 867 (1987)), アクチビン (Vale, W. ら, Nature 321: 776 - 779 (1986)), 及びインヒビン (Mason, A. J. ら, Nature 318: 659 - 663 (1985)) を含むペプチドシグナル発生分子の、より大きな拡張されたスーパーファミリーに属する。これらの因子は構造全体において TGF- に類似するが、TGF- タンパク質と、及び互いにおよそ 25% しかアミノ酸の同一性を共有しない。これらの分子は全て成長、発達及び分化の変調に重要な役割を果たすと考えられている。本発明のタンパク質、PCIGF は TGF- の活性ドメインである C 末端に保存された 7 個のシステイン残基を保持する。

#### 【0011】

マウスモデル系及び限定的なヒト免疫細胞学データを用いて、Thompson ら (J. Cell Biochem. 16H: 54 - 61 (1992)) は前立腺癌の発病原因における TGF- 1 の役割を示唆している。診断用試験としてのこれの使用及び関連ペプチドに関するこのような利用を示唆してはいない。さらにその他の研究 (ヒト良性前立腺肥大における基本的な繊維芽細胞成長因子及び形質転換成長因子 2 の遺伝子発現の増加、Mori H.; Maki. M.; Oishi, K.; Jaye, M.; Igarashi K.; Yoshida O.; Hatanaka M., Prostate (UNITED STATES) 16(1): 71 - 80 (1990)) は TGF- 1 転写は良性前立腺肥大において上昇することを示唆している。本発明の配列は TGF- 1 と遠縁であるが、明確に実在し、前立腺癌において優先的に誘導されることが示される。

#### 【0012】

新規の 4 つの TGF- スーパーファミリーメンバーのタンパク質が最近公開された:

- (1) PCT 特許出願 # WO 96 / 18730、発明者 Hudson ら (公開日: 1996 年 6 月 20 日)。
- (2) 日本特許出願番号平 6 - 24885、発明者 Kato ら (公開日: 199

5年10月3日) ; ジーンバンク登録g I 1 8 1 3 3 2 6。

(3) H r o m a s によるジーンバンク登録g I 1 8 7 2 5 5 3。

(4) P a r a l k a r らによるジーンバンク登録g I 2 2 9 0 9 7 2。

#### 【0013】

4つのタンパク質配列は全て、全308残基のうち全一致ではない9個の位置で本質的に同一である。差異が多型性又はシーケンシングエラーを表すかどうかについては明らかではない。ジーンバンク登録g I 2 2 9 0 9 7 2のペプチド配列が公開されているが、対応するポリヌクレオチド配列は公開されていない。

#### 【0014】

この遺伝子の発現については、胎盤に豊富に存在し、従って生殖において役割を果たす、又は前立腺分化因子として、又は前立腺特異的であり、従って良性前立腺肥大もしくは前立腺癌を検出するための診断用として有用であるなど様々に報告されている。これらの研究が全て本質的に同一の配列に基づいているという真実に関わらず、発現パターン又は有用性に関して全一致ではないことは明らかである。驚くべきことに、我々は前記日本特許出願番号平6-24885、発明者K a t o ら(公開日1995年10月3日)の1201bpの配列の3'部分に対応するmRNAによりコードされるペプチド配列は前立腺腫瘍において選択的に発現されるが、正常前立腺においても、良性前立腺肥大においても発現されないことを見出した。W h i l e H u d s o n らは前立腺癌診断の理論的な利用性において、この診断が癌特異的であり、その他の前立腺異常から区別され得ることは示唆していない。実際に、遺伝子が臓器特異的であり、癌特異的ではないと示唆しており、故にこの前立腺特異性に関する分類は特異的診断有用性を論破している。従って、当業者はこれから、前立腺癌診断の有用な方法であることを容易に推論できない。対照的に、本発明は非癌性前立腺における低レベル発現に基づく癌診断の有用性を教示する。

#### 【0015】

##### 発明の要旨

本発明は本明細書で以後「P C I G F」と称するT G F - スーパーファミリータンパク質(日本特許出願番号平6-24885、発明者K a t o ら(公開日

1995年10月3日)、ポリヌクレオチド配列(配列番号1)及びそれにコードされるポリペプチド配列(配列番号6)に関する。

【0016】

本発明は被験サンプルにおける標的PCIGFポリヌクレオチドを検出する方法であって、被験サンプルを少なくとも1つのPCIGF特異的ポリヌクレオチドと接触させ、被験サンプル中の標的PCIGFポリヌクレオチドの存在を検出することからなる方法に関する。また、方法を実施する前にPCIGF特異的ポリヌクレオチドを固相に付着させてもよい。

【0017】

本発明はまた被験サンプル中のPCIGF mRNAを検出する方法であって、少なくとも1つのプライマーで逆転写(RT)を実施してcDNAを産生し、PCIGFオリゴヌクレオチドをセンス及びアンチセンスプライマーとして用いて、そのようにして得られたcDNAを増幅し、PCIGFアンプリコンを得、及び被験サンプル中のPCIGFアンプリコンの存在をPCIGFの存在の指標として検出することからなる方法をも提供する。ポリメラーゼ連鎖反応により増幅を実施できる。また方法を実施する前、増幅する前、又は検出する前に、被験サンプルを固相と反応させることができる。この反応を直接的又は間接的反應にできる。さらに、検出工程は測定可能なシグナルを生じることができる検出可能な標識を利用することからなる。検出可能な標識を固相に付着させることができる。

【0018】

本発明はさらに標的PCIGFポリヌクレオチドの含有が疑われる被験サンプル中の標的PCIGFポリヌクレオチドを検出する方法であって、(a)被験サンプルをセンスプライマーとして少なくとも1つのPCIGFオリゴヌクレオチド及びアンチセンスプライマーとして少なくとも1つのオリゴヌクレオチドと接触させ、同一物を増幅して第1段階反応産物を得ること；(b)第1段階反応産物を少なくとも1つの「その他の」PCIGFオリゴヌクレオチドと接触させて第2段階反応産物を得、但し「その他の」PCIGFオリゴヌクレオチドは工程(a)で用いたPCIGFオリゴヌクレオチドの3'に位置し第1段階反応産物

に相補的である；並びに（c）被験サンプル中の標的P C I G F ポリヌクレオチドの存在の指標として第2段階反応産物を検出することからなる方法を提供する。ポリメラーゼ連鎖反応により増幅を実施できる。方法を実施する前、増幅する前、又は検出する前に被験サンプルを固相と直接的に又は間接的に反応させることができる。検出工程はまた測定可能なシグナルを生じることができる検出可能な標識を利用することからなり；さらに検出可能なシグナルを固相に付着させることができる。少なくとも1つのP C I G F 特異的ポリヌクレオチドを収容する容器を含んでなる、被験サンプル中の標的P C I G F ポリヌクレオチドを検出するのに有用な検査キットもまた提供される。これらの検査キットはさらに被験サンプル（例えば、血液、尿、唾液及び糞便）の収集に使用されるツールの付いた容器を含む。このようなツールは、採血用ランセット及び血液を収集し、安定させる吸取り紙又は布；唾液を収集し、安定させるスワブ；尿又は糞便のサンプルを収集し、安定させるコップである。紙、布、スワブ、コップなどのような収集材料は、サンプルの変質又は不可逆的吸着を防止するために任意に処理し得る。収集材料はまた、標本の完全性を維持する補助剤となる保存剤、安定剤又は抗菌剤によって処理されてもよく、又はこれらを含んでもよい。

#### 【0019】

本発明はまたP C I G F 遺伝子から誘導された精製されたポリヌクレオチド又はそのフラグメントをも提供する。精製されたポリヌクレオチドはP C I G F 遺伝子の核酸又はその相補体を選択的にハイブリダイズできる。さらに、組換え及び/又は合成技術により精製されたポリヌクレオチドを産生できる。精製された組換えポリヌクレオチドは組換えベクター内に含有され得る。本発明はさらに組換えベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を包含する。

#### 【0020】

本発明はさらにP C I G F から誘導されるオープン・リーディング・フレームを含む核酸配列を含んでなる組換え発現系を提供する。核酸配列は望ましい宿主に適合する調節配列に機能的に連結される。またこの組換え発現系でトランスフェクトされた細胞をも提供する。

#### 【0021】

本発明はまたP C I G Fによりコードされるポリペプチドをも提供する。組換え技術により産生できる、又は合成技術により産生できるポリペプチドを精製された形態で提供する。ポリペプチドは配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。

#### 【0022】

また、少なくとも1つのP C I G Fエピトープに特異的に結合する抗体が提供される。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。エピトープは配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたアミノ酸配列に由来する。被検サンプル中のP C I G F抗原又は抗P C I G F抗原の存在を判定するアッセイキットも含まれる。1つの実施態様では、アッセイキットは配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたアミノ酸配列に少なくとも50%の同一性を有する少なくとも1つのP C I G Fポリペプチドが収容された容器を含む。これらの検査キットはさらに、被検サンプル(例えば、血液、尿、唾液及び糞便)の収集に使用されるツールの付いた容器を含む。このようなツールには、採血用ランセット及び血液を収集し、安定させる吸取り紙又は布；唾液を収集し、安定させるスワブ；尿又は糞便のサンプルを収集し、安定させるコップなどがある。紙、布、スワブ、コップなどのような収集材料は、サンプルの変質又は不可逆的吸着を防止するために任意に処理し得る。これらの収集材料はまた、標本の完全性を維持する補助剤となる保存剤、安定剤又は抗菌剤によって処理されてもよく、又はこれらを含んでもよい。抗体を固相に付着させてもよい。

#### 【0023】

本発明の別の実施態様によれば、疾患又は状態の検出又は診断目的で患者の抗原の所在を検出又は造影するためにP C I G F抗原に対する抗体又はそのフラグメントを使用し得る。このような抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよく、又は、分子生物学の技術によって作製されてもよく、放射性同位体及び常磁性金属を非限定例とする種々の検出可能な標識によって標識され得る。さらに

、抗体又はそのフラグメントは、モノクローナル、ポリクローナル、又は分子生物学の技術によって作製されたもののいずれであっても、P C I G F 抗原の発現を特徴とする疾患を治療する治療薬として使用できる。治療用途の場合、抗体を誘導体化しないで使用してもよく、又は、放射性同位体、酵素、毒素、薬物、プロドラッグなどのような細胞障害性物質で誘導体化してもよい。

【0024】

被検サンプル中のP C I G F 抗原又は抗P C I G F 抗原の存在を判定する別のアッセイキットはP C I G F 抗原に特異的に結合する抗体が収容された容器を含み、ここでP C I G F 抗原は少なくとも1つのP C I G F コード化エピトープを含んでなる。P C I G F 抗原は配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたP C I G F コード化抗原の配列に少なくとも約60%の同一性を有する。これらの検査キットはさらに、被検サンプル（例えば、血液、尿、唾液及び糞便）の収集に使用されるツールの付いた容器を含む。このようなツールには、採血用ランセット及び血液を収集し、安定させる吸取り紙又は布；唾液を収集し、安定させるスワブ；尿又は糞便のサンプルを収集し、安定させるコップなどがある。紙、布、スワブ、コップなどのような収集材料は、サンプルの変質又は不可逆的吸着を防止するために任意に処理し得る。これらの収集材料はまた、標本の完全性を維持する補助剤となる保存剤、安定剤又は抗菌剤によって処理されてもよく、又はこれらを含んでもよい。抗体を固相に付着させてもよい。

【0025】

発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞をインキュベートすることからなる、少なくとも1つのP C I G F エピトープを含有するポリペプチドを産生する方法が提供される。このベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなり、ここでポリペプチドは配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたP C I G F アミノ酸配列に少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。

【0026】

P C I G F 抗原を含有する疑いのある被検サンプル中で該P C I G F 抗原の存

在を検出する方法もまた提供される。該方法は、被検サンプルを、少なくとも1つのPCIGF抗原のエピトープに特異的に結合する抗体又はそのフラグメントに、抗体/抗原複合体が形成される十分な条件下で十分な時間接触させること；及び被験サンプル中のPCIGF抗原の存在の指標として抗体を含有するこのような複合体の存在を検出することからなる。抗体を固相に付着させることができ、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれでもよい。さらに抗体は配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択された少なくとも1つのPCIGF抗原に特異的に結合する。

#### 【0027】

PCIGF抗原に特異的に結合する抗体を含有する疑いのある被検サンプル中で該抗体の存在を検出する方法もまた提供される。該方法は、被検サンプルを、少なくとも1つのPCIGFエピトープを含有するポリペプチドに接触させることからなり、PCIGFエピトープはPCIGFポリヌクレオチド又はそのフラグメントによりコードされるアミノ酸配列に少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸を含んでなる。接触は抗原/抗体複合体を形成するのに十分な条件下、十分な時間で実施する。ポリペプチドを固相に結合できる。さらにポリペプチドを配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたアミノ酸配列に少なくとも50%の同一性を有する組換えタンパク質又は合成ペプチドにできる。

#### 【0028】

本発明は少なくとも1つのPCIGF抗原のエピトープ又はそのフラグメントをコードするPCIGF核酸配列でトランスフェクトした細胞を提供する。

#### 【0029】

PCIGF抗原に対する抗体を産生する方法をも提供し、該方法は個体に単離された免疫原性ポリペプチド又はそのフラグメントを投与することからなり、ここで単離された免疫原性ポリペプチドは免疫応答を生じるのに十分な量の少なくとも1つのPCIGFエピトープを含んでなる。単離された免疫原性ポリペプチドは配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたアミノ酸配列を含んでなる。

## 【0030】

PCIGF抗原に特異的に結合する抗体を産生する方法を開示し、該方法は配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたアミノ酸配列から誘導された少なくとも1つのPCIGFエピトープをコードする核酸配列を含んでなるプラスミドを哺乳動物に投与することからなる。

## 【0031】

また少なくとも10～12個のヌクレオチドのPCIGFポリペプチド及びそのフラグメント又は相補体を含んで成る組成物が提供される。PCIGFポリヌクレオチドは少なくとも1つのPCIGFエピトープを有するアミノ酸配列をコードする。本発明により提供される別の組成物は約8～10個のアミノ酸の少なくとも1つのPCIGFエピトープを有するポリペプチドを含んでなる。ポリペプチドは配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択されたアミノ酸配列に少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。また配列番号6に少なくとも50%の同一性を有するPCIGFポリペプチドをコードする遺伝子又はそのフラグメント、及び配列番号1に少なくとも50%の同一性を有するDNAを含んでなる遺伝子又はそのフラグメントも提供される。

## 【0032】

配列番号1のヌクレオチド629～1201間のPCIGFの3'部分に実質的に同一であるcDNA配列は、前立腺癌において大きく上方制御されるという認識は本発明の目的の1つである。逆に、配列番号1の1～538ヌクレオチド間でPCIGFの5'部分と重複するcDNA配列は前立腺癌においてほとんど上方制御を示さない。さらに、公開の及び専有されているデータベースの数千の配列発現タグ(EST)を検索することにより、PCIGFの5'及び3'間に重複がないことが示された。このように、前記の4つの文献の遺伝子から派生した遺伝子が存在する可能性がある。遺伝子配列の3'部分が前立腺癌において差別的に発現されるというまた別の可能性がある。このように、本発明の配列が特異的癌診断に有用であるということは驚くべきことである。

## 【0033】

本発明のある態様では、ペプチド並びに生物学的に活性な診断上及び治療上有用なフラグメント、その類似体及び誘導体が提供される。本発明のポリペプチドはヒトに由来する。

## 【0034】

本発明の別の態様により、mRNA、DNA、cDNA、ゲノムDNA並びに類似体及び生物学的に活性な、及び診断上又は治療上有用なそのフラグメント及び誘導体などの単離された核酸分子が提供される。

## 【0035】

さらに本発明のさらなる態様では、ヒトPCIGF核酸配列を含有する組換え原核及び/又は真核宿主細胞を、該タンパク質の発現及びそれに続く該タンパク質の収集を促進する条件下で培養することからなる、組換え技術によるこのようなポリペプチドを産生する方法が提供される。

## 【0036】

さらに本発明のさらなる態様では、治療目的で、例えば前立腺癌を阻止するためにこのようなポリペプチド、又はこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用する方法が提供される。

## 【0037】

さらに本発明のさらなる態様では、このようなポリペプチドに対する抗体が提供される。またPCIGFポリペプチド(配列番号6)の種々ドメインに特異的なこのような抗体を誘導するために用いることができる特異的ペプチド配列もまた提供される。

## 【0038】

本発明のさらに別の態様では、このようなポリペプチドに対するアンタゴニストが提供され、該アンタゴニストを用いて、例えば腫瘍の処置においてこのようなポリペプチドの作用を阻止できる。

## 【0039】

さらに本発明のさらなる態様では、ヒトPCIGFポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの核酸分子を含んでなる核酸プローブ

が提供される。

【0040】

本発明のさらに別の態様では、P C I G Fポリペプチド（配列番号6）の過少発現及び過剰発現並びにこのようなポリペプチドをコードする核酸配列における変異に関連する疾患を検出するための診断用アッセイが提供される。

【0041】

さらに本発明のさらなる態様では、*in vitro*でのDNAの化学的研究、合成及びDNAベクターの製造に関連する目的で、このようなポリペプチド、又はこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用する方法が提供される。

【0042】

これらの及びその他の態様は本明細書の教示から当業者に明白である。

【0043】

図面の簡単な説明

以下の図面は本発明の実施態様を説明し、請求の範囲により包含される本発明の範囲を制限することを意味するものではない。

【0044】

図1及び2はP S Aタンパク質又はP C I G F合成ペプチド（配列番号9）の何れかに対する抗血清でプローブされた組織タンパク質抽出物のパネルにおいて実施されたウェスタンブロットの結果を示す。

【0045】

発明の詳細な説明

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを前立腺腫瘍からのc D N Aライブラリーに見出すことができるが、いくつかのその他の正常及び腫瘍組織、例えば副腎、結腸、膀胱、肺、膵臓島細胞、胎盤及び子宮にも見出すことができる。しかしながら、最も頻繁に見出されるのは前立腺腫瘍ライブラリーである。

【0046】

本発明はP C I G Fポリペプチド（配列番号6）をコードする塩基1～120

1 (配列番号1)間の遺伝子フラグメントを提供する。本発明はまたPCIGF合成ペプチド配列番号7、配列番号8及び配列番号9をも提供する。PCIGF合成ペプチド配列番号6はPCT特許出願#WO96/18730、発明者Hudsonら(公開日:1996年6月20日)にて同定されたポリペプチドの各々の部分と同一であり、日本特許出願番号平6-24885、発明者Katoら、(公開日:1995年10月3日);ジーンバンク登録GI1813326にて同定されたポリペプチドの各々の部分からの1個のアミノ酸残基が異なる。

#### 【0047】

本発明はまた、PCIGFと称する前立腺組織遺伝子の産物に関して被検サンプルを検定するアッセイ方法を提供し、該方法は、被験サンプル中のmRNAからcDNAを作製し、PCIGFの存在の指標としてcDNAを検出することからなる。該方法は増幅工程を含み、該工程では遺伝子又はそのフラグメントに対応するPCIGFからのmRNAの1つ又はそれ以上の部分が増幅される。PCIGFの翻訳産物を検定するための方法もまた提供される。本発明にて提供される方法により検定され得る被験サンプルは組織、細胞、体液及び分泌物である。本発明はまたこれらの方法を実施するのに有用な試薬例えばオリゴヌクレオチドプライマー及びポリペプチドをも提供する。

#### 【0048】

本明細書に開示する核酸配列の部分は、RNAの逆転写のため、もしくはcDNAの増幅のためのプライマーとして;又は被験サンプル中の特定のmRNA配列の存在を決定するためのプローブとして有用である。また診断用イムノアッセイの標準又は試薬としても、医薬スクリーニングアッセイの標的としても、及び/又は、種々の治療のための成分もしくは標的部位としても有用である。これらのポリペプチドに含まれている少なくとも1つのエピトープに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、PCIGFに関連する疾患又は状態、特に前立腺癌の治療薬のデリバリー物質として有用であり、また、診断試験及びスクリーニングに有用である。目的の遺伝子のその他の部分の配列の単離は核酸配列により誘導されるプローブ又はPCRプライマーを利用することにより達成できる。これにより目的のmRNA又はcDNAの別のプローブ及び対応するコード

化ポリペプチド配列を確立できる。これらの別の分子は、本明細書に開示するようなP C I G Fに特徴づけられる、前立腺癌のような前立腺疾患又は状態の検出、診断、病期判定（ステージング）、経過追跡（モニタリング）、予後判定、i n v i v o造影、予防もしくは処置又は疾病素質の判定に有用である。

#### 【0049】

アミノ酸配列の「類似性」を決定する技術は当業界で公知である。一般に、「類似性」は、2つ又はそれ以上のポリペプチドの適当な位置の正確なアミノ酸対アミノ酸比較において、アミノ酸が等しいか又は類似の化学的及び/又は物理的特性例えば電荷もしくは疎水性を有していることを意味する。いわゆる「類似性パーセント」は、比較されたポリペプチド配列間で決定され得る。核酸及びアミノ酸配列の同一性を決定する技術も当業界で公知であり、その遺伝子のmRNAのヌクレオチド配列（通常cDNA媒介による）を決定し、それによりコードされるアミノ酸配列を第二のアミノ酸配列に比較することから成る。一般に、「同一性」なる用語は、2つのポリヌクレオチド又はポリペプチドの各々正確な、ヌクレオチド対ヌクレオチド、又はアミノ酸対アミノ酸対応を意味する。2つ以上のポリヌクレオチド配列は、それらの「同一性パーセント」を決定することによって比較し得る。2つ以上のアミノ酸配列も同様に、それらの「同一性パーセント」を決定することによって比較し得る。Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group, Madison, WIから入手可能)で利用できるプログラム、例えばGAPプログラムは2つの配列、例えば各々2つのポリヌクレオチド間の同一性及び2つのポリペプチド配列間の同一性及び類似性の両方を算出できる。配列間の同一性又は類似性パーセントを計算する別のプログラムは当業界で公知である。

#### 【0050】

本明細書に記載の組成物及び方法によって前立腺組織の疾患又は状態の指標となる幾つかのマーカーを同定することが可能であろう。そこから得られた情報は、P C I G Fに関連する疾患又は状態、特に前立腺癌の検出、診断、病期判定、経過追跡、予後判定、i n v i v o造影、予防もしくは処置又は判定に役立つ

。試験方法としては例えば、本発明で提供される配列を利用し、またポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）及びハイブリダイゼーションのごとき核酸増幅反応を利用することもできるプローブアッセイなどがある。加えて、本発明により提供されるヌクレオチド配列は免疫原性エピトープが見出されるオープン・リーディング・フレームを含有する。このエピトープはPCIGFに関連する疾患又は状態に固有であると考えられている。またPCIGF遺伝子によりコードされるポリヌクレオチド又はポリペプチド及びタンパク質もまたマーカーとして有用であると考えられる。このマーカーは前立腺癌のごとき疾患において上昇するか、又は前立腺癌のごとき疾患において変化するか、又は正常なタンパク質として存在するが、不適切な体内区画において現れる。このエピトープの固有性を（i）PCIGF遺伝子によってコードされたタンパク質及びポリペプチドを対象とする抗体に対する該エピトープの免疫反応性及び特異性、及び（ii）他の任意の組織マーカーとの交差反応性の欠如、により判定できる。免疫反応性の判定方法は公知であり、その非限定例は例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、エンザイムリンクトイムノアブソルベントアッセイ（ELISA）、血球凝集反応（HA）、蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）、化学発光イムノアッセイ（CLIA）などである。適当な方法の幾つかの例が本文中に記載されている。

#### 【0051】

特記しない限り、以下の用語は以下の意味で使用されている。

#### 【0052】

特定の配列に「由来する」又は「特異的な」ポリヌクレオチドは、特定のヌクレオチド配列の領域に対応する、すなわち同一であるか、又は相補的である、おおよそで少なくとも約6個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約10～12個のヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも15～20個のヌクレオチドの隣接配列を含んでなるポリヌクレオチド配列を意味する。配列は、当該分野で公知の技術により決定される特定のポリヌクレオチド配列に固有である配列に相補的又は同一でよい。例えば、データベースでの配列比較を特定の配列の固有性を判定する方法として用い

ることができる。配列が由来する領域には、その非限定例としては特異的エピトープをコードする領域、並びに非翻訳及び/又は非転写領域などがある。

#### 【0053】

誘導されるポリヌクレオチドは試験中の目的のヌクレオチド配列から物理学的に誘導される必要はないが、非限定例としては化学合成、複製、逆転写又は転写などのいずれかの方法により作製でき、該方法はポリヌクレオチドが誘導される領域の塩基配列により提供される情報に基づく。このように、誘導されるポリヌクレオチドは元来のポリヌクレオチドのセンス又はアンチセンスのいずれかの配向を表し得る。加えて特定の配列の誘導ポリヌクレオチドに対応する領域の組み合わせを当該分野で公知の方法により修飾して使用目的に合致させることができる。

#### 【0054】

特定のポリヌクレオチドの「フラグメント」は、特定のヌクレオチド配列の領域に対応する、すなわち同一であるか、又は相補的である、おおよそ少なくとも約6個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約10～12個のヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも15～20個のヌクレオチドの隣接配列を含んでなるポリヌクレオチド配列を意味する。

#### 【0055】

「プライマー」なる用語は標的ヌクレオチド配列に相補的であり、標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズするために用いられる特異的オリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーはDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ又は逆転写酵素のいずれかにより触媒されるヌクレオチド重合の開始点として提供される。

#### 【0056】

「プローブ」なる用語は相補的配列を担持する被験サンプル中に存在する特異的ポリヌクレオチドを同定するために用いることができる規定の核酸セグメント（又はヌクレオチド類似体セグメント、例えば以後PNAとして定義するもの）を意味する。

## 【0057】

「によってコードされた」という用語は、ポリペプチド配列をコードする核酸配列を意味し、ここでポリペプチド配列又はその一部分は、核酸配列によってコードされたポリペプチドの少なくとも3～5個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸、さらに好ましくは少なくとも15～20個のアミノ酸を含む。従って、「ポリペプチド」、「タンパク質」又は「アミノ酸」配列は、P C I G F アミノ酸配列に少なくとも約50%の同一性、好ましくは約60%の同一性、より好ましくは約75～85%の同一性、最も好ましくは約90～95%以上の同一性を有している。さらに、P C I G F 「ポリペプチド」、「タンパク質」又は「アミノ酸」配列は、P C I G F のポリペプチド又はアミノ酸配列に少なくとも約60%の類似性、好ましくは少なくとも約75%の類似性、より好ましくは約85%の類似性、最も好ましくは約95%以上の類似性を有し得る。このアミノ酸配列を配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントからなる群から選択できる。

## 【0058】

“組換えポリペプチド”、“組換えタンパク質”又は“組換え技術によって産生されたポリペプチド”なる用語は本文中で互換的に使用されており、その起原又は操作が原因で、天然に結合するポリペプチドの全部又は一部に結合していないか及び/又は天然に結合するポリペプチド以外のポリペプチドに結合しているポリペプチドを意味する。組換えられた又はコードされたポリペプチド又はタンパク質は必ずしも指定の核酸配列から翻訳されない。また、化学合成又は組換え発現系の発現を含む任意の手段で作製され得る。

## 【0059】

本文中で使用された“合成ペプチド”なる用語は、当業者に公知の方法によって化学的に合成され得る任意の長さのアミノ酸の重合形態を意味する。これらの合成ペプチドは種々の用途に有用である。

## 【0060】

本明細書で用いられる「ポリヌクレオチド」なる用語はいずれかの長さのヌクレオチド、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの重合形

態を意味する。この用語は分子の1次構造のみを意味する。従って、この用語は二本鎖及び一本鎖DNA、並びに一本鎖及び二本鎖RNAを包含する。また、ポリヌクレオチドの修飾、例えばメチル化又はキャッピング及び非修飾形態をも包含する。本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴマー」、「オリゴヌクレオチド」及び「オリゴ」なる用語は互換的に用いられる。

#### 【0061】

「cDNA」に対応する配列とは特定のDNAにおける配列と同一であるか又は相補的であるポリヌクレオチド配列を含有する配列を意味する。cDNAに対する同一性又は相補性の程度(又は「パーセント」)はおよそ50%以上、好ましくは少なくとも約70%以上、及びさらに好ましくは少なくとも約90%以上である。同定されたcDNAに対応する配列は少なくとも約50ヌクレオチドの長さ、好ましくは少なくとも約60ヌクレオチドの長さ、及びより好ましくは少なくとも約70ヌクレオチドの長さである。目的の遺伝子又は遺伝子フラグメント及びcDNA間の対応を公知の方法により決定でき、該方法には例えば記載したcDNAとシーケンシングした物質との直接比較、又はハイブリダイゼーション及び一本鎖ヌクレアーゼでの消化、続いて消化したフラグメントの大きさの決定などがある。

#### 【0062】

「精製されたポリヌクレオチド」とは本質的に遊離の、例えば、ポリヌクレオチドが天然に結合するタンパク質の約50%未満、好ましくは約70%未満、及びより好ましくは約90%未満を含有する目的のポリヌクレオチド又はそのフラグメントを意味する。目的のポリヌクレオチドを精製するための技術は当該分野で公知であり、例えばカオトロピック剤によるポリヌクレオチドを含む細胞の破壊、及びイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及び密度に従う沈殿に準じた分離などがある。

#### 【0063】

“精製ポリペプチド”又は“精製タンパク質”は、問題のポリペプチドが天然に結合する細胞成分を本質的に含まないか又は約50%未満、好ましくは約70%未満、より好ましくは約90%未満で含むポリペプチドまたそのフラグメント

を意味する。問題のポリペプチドの精製方法は当業界で公知である。

【0064】

“単離された”という用語は、物質が本来の環境（例えば、天然産生物質の場合には自然環境）から取出されることを意味する。例えば、生存動物体内に存在する天然産生ポリヌクレオチド又はポリペプチドは単離されていないが、天然の系に共存する物質の幾つか又は全部から分離されている同じポリヌクレオチド又はDNA又はポリペプチドは単離されている。このようなポリヌクレオチドはベクターの一部でもよく、及び/又は、このようなポリヌクレオチド又はポリペプチドは組成物の一部でもよく、ベクター又は組成物が天然環境の一部でないときは、やはり単離されている。

【0065】

本明細書において「ポリペプチド」及び「タンパク質」は互換的に用いられ、共有結合及び/又は非共有結合により連結された少なくとも1個のアミノ酸分子鎖を示す。該用語は産物の特異的な長さに言及するものではない。このようにペプチド、オリゴペプチド及びタンパク質はポリペプチドの定義に含まれる。該用語はポリペプチドの翻訳後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。加えて、タンパク質フラグメント、類似体、変異又は変異タンパク質、融合タンパク質等はポリペプチドの意味に含まれる。

【0066】

特定ポリペプチドの“フラグメント”は、特定ポリペプチドに由来する少なくとも約3 - 5個のアミノ酸、好ましくは少なくとも約8 - 10個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約15 - 20個のアミノ酸から成るアミノ酸配列を意味する。

【0067】

“組換え宿主細胞”、“宿主細胞”、“細胞”、“細胞系”、“細胞培養物”、及び、その他の単細胞統一体として培養された微生物又はより高等な真核細胞系を表す同様の用語は、組換えベクター又はその他の転移されたDNAのレシピエントとして使用され得る又は使用された細胞を意味しており、トランスフェクトされた起原的細胞の起原的後代を包含する。

## 【0068】

本文中で使用された“レプリコン”は、細胞中の自律的ポリヌクレオチド複製単位として挙動するプラスミド、染色体又はウイルスのような遺伝子要素を意味する。

## 【0069】

“ベクター”は、別のポリヌクレオチドセグメントが結合されており、結合セグメントの複製及び/又は発現を生じさせるようなレプリコンを意味する。

## 【0070】

“コントロール配列”なる用語は、該配列に結合しているコーディング配列の発現を実行させるために必要なポリヌクレオチド配列を意味する。このようなコントロール配列の特性は宿主生物次第で異なる。原核生物では、このようなコントロール配列は一般に、プロモーター、リボソーム結合部位及びターミネーターを含む。真核生物では、このようなコントロール配列は一般に、プロモーター、ターミネーターを含み、幾つかの場合にはエンハンサーを含む。従って、“コントロール配列”なる用語は最小でも、その存在が発現に必要なすべての構成要素を含み、更に、その存在が有利であるような追加の構成要素、例えばリーダー配列を含み得る。

## 【0071】

「機能的に連結した」とは記載された成分が意図された様式で成分を機能させることができる関係にある状況を意味する。このように、例えばコーディング配列に「機能的に連結された」調節配列は、調節配列に適合する条件下でコーディング配列の発現を達成するような様式でライゲートされる。

## 【0072】

“読取り枠”又は“ORF”なる用語は、ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の領域を意味する。この領域がコーディング配列の一部を表してもよく、またコーディング配列の全部を表してもよい。

## 【0073】

“コーディング配列”は、適正な調節配列のコントロール下に配置されたときにmRNAに転写され、ポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列を意味

する。コーディング配列の境界は5' - 末端の翻訳開始コドンと3' - 末端の翻訳終止コドンとによって決定される。コーディング配列の非限定例は、mRNA、cDNA及び組換えポリヌクレオチド配列である。

【0074】

“ によって/として免疫学的に同定可能 ” という用語は、指定された（1つ又は複数の）ポリペプチド中に存在する該ポリペプチドに固有の（1つ又は複数の）エピトープ及び（1つ又は複数の）ポリペプチドの存在を意味する。免疫学的一致は抗体結合及び/又は結合競合によって決定され得る。これらの技術は当業者に公知であり、本文中にも記載されている。また、エピトープの固有性は、GenBankのような既知のデータベースのコンピュータサーチによってエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を探し出し、既知の別のタンパク質とのアミノ酸配列比較によって決定できる。

【0075】

本文中で使用された“ エピトープ ” は、ポリペプチド又はタンパク質の抗原決定基を意味する。エピトープは3つのアミノ酸をエピトープに固有の空間コンホメーションで含むと考えられる。一般に、1つのエピトープは少なくとも5個のこのようなアミノ酸から成り、より多くの場合には少なくとも8 - 10個のアミノ酸から成る。空間コンホメーションの試験方法は当業界で公知であり、例えば、X - 線結晶学及び二次元核磁気共鳴がある。

【0076】

“ コンホメーションナルエピトープ ” は、免疫学的に認識可能な構造の特定アミノ酸配置から成るエピトープである。このようなアミノ酸は同じポリペプチドに連続順序もしくは不連続順序で存在するか又は異なるポリペプチドに存在する。

【0077】

ポリペプチドは、該ポリペプチドに含まれている特異的エピトープの抗体認識によって抗体に結合するときは抗体に“ 免疫反応性 ” である。免疫反応性は、抗体結合によって、より特定のには抗体結合の動力学によって、及び/又は、抗体の対象であるエピトープを含む既知の（1つ又は複数の）ポリペプチドを（1つ又は複数の）競合物質として使用する結合の競合によって測定し得る。ポリペプ

チドが抗体に免疫反応性であるか否かを判定する方法は当業界で公知である。

【0078】

本文中で使用された“問題のエピトープを含有する免疫原性ポリペプチド”という用語は、天然に産生する問題のポリペプチド又はそのフラグメント、及び、別の手段、例えば化学合成もしくは組換え生物中のポリペプチドの発現のような手段によって調製されたポリペプチドを意味する。

【0079】

“トランスフェクション”なる用語は、原核性又は真核性の宿主細胞に外因性ポリヌクレオチドを導入することを意味する。導入に使用される方法は問わない。“トランスフェクション”なる用語は、ポリヌクレオチドの安定な導入及び一過性の導入の双方を意味しており、ポリヌクレオチドの直接取込み、形質転換、形質導入及びf-交配を包含する。宿主細胞にいったん導入された外因性ポリヌクレオチドは非組込みレプリコン、例えばプラスミドとして維持されてもよく、あるいは、宿主ゲノムに組込まれてもよい。

【0080】

“処置”は予防及び/又は治療を意味する。

【0081】

本文中で使用された“個体”なる用語は、脊椎動物、特に哺乳類の動物を意味しており、非限定例は、飼育動物、競走用動物、霊長類及びヒトである。より特定のにはこの用語はヒトを指す。

【0082】

本明細書で用いられる「センス鎖」又は「プラス鎖」（又は「+」）なる用語はポリペプチドをコードする配列を含む核酸を意味する。「アンチセンス鎖」又は「マイナス鎖」（又は「-」）なる用語は「プラス」鎖の配列に相補的である配列を含む核酸を意味する。

【0083】

“被検サンプル”なる用語は、分析物（例えば問題の抗原又は問題の抗体）のソースである個人の身体の成分を意味する。これらの成分は当業界で公知である。被検サンプルは典型的には、ターゲット配列を含有する疑いのある任意のサン

プルである。被検サンプルは例えば、個体から標本を採取し、必要ならば標本に含まれている任意の細胞を破壊し、これによってターゲット核酸を遊離させる当業界で公知の方法を用いて調製できる。これらの被検サンプルとしては、本文中に記載の本発明の方法によって試験され得る生物サンプルがあり、例えば全血、血清、血漿、脳脊髄液、気管支洗浄液、気管支吸引液、尿、リンパ液のようなヒト及び動物の体液、並びに、呼吸器、腸管及び尿生殖器の種々の外分泌物、涙、唾液、乳、白血球、骨髓腫など；細胞培養上清のような生物流体；固定され得る組織標本；及び、固定され得る細胞標本がある。

【0084】

“精製された産生物”は、常態で産生物と会合している細胞成分及び問題のサンプル中に存在し得る別の種類の細胞から産生物を単離することによって得られた調製物を意味する。

【0085】

「PNA」は標的の存在を決定するための本明細書に記載するアッセイのごとき方法に利用できる「ペプチド核酸類似体」を意味する。「MA」は標的の存在を決定するための本明細書に記載するアッセイのごとき方法に利用できる「モルフォリノ類似体」を意味する。例えば、米国特許第5378841号を参照（出展明示により本明細書の一部とする）。PNAはRNA標的又はDNAを対象とすることができる荷電していない部分である。例えば本発明のDNAプローブの代わりにアッセイにおいて用いることができるPNAプローブは、DNAプローブを用いた場合に達成できない利点を提供する。これらの利点には製造業性、大容量標識、再現性、安定性、イオン強度における変化に対する無反応性及びDNA又はRNAを利用する方法に存在する酵素分解に対する抵抗性などがある。これらのPNAを蛍光、放射性ヌクレオチド、化学ルミネセンス化合物等のようなシグナル発生化合物で標識（「結合」）できる。PNA又は、MAのごときその他の核酸類似体をアッセイにおいてDNA又はRNAの代わりに用いることができる。DNAプローブを用いるアッセイを本明細書に記載するが、アッセイにおいて必要とされれば、及び必要とされるとき、PNA又はMAを適当な変化を伴うRNA又はDNAと置換できることは通常技術者の範囲内である。

## 【0086】

本文中に使用された“分析物”なる用語は、被検サンプル中に存在し得る検出すべき物質を意味する。分析物は、天然の特異的結合要素（例えば抗体）が存在するか又は特異的結合要素の調製が可能な任意の物質でよい。従って、分析物は、アッセイ中に1つ又は複数の特異的結合要素に結合できる物質である。“分析物”はまた、任意の抗原性物質、ハプテン、抗体及びその組合せを包含する。分析物を特異的結合対の一方の要素となるので、天然の特異的結合パートナー（対）を利用して分析物を検出できる。例えば、ビタミンB12の検出には特異的結合対の要素として内因子タンパク質を使用し、葉酸の検出には葉酸塩結合タンパク質を使用し、糖質の検出には特異的結合対の一方の要素としてレクチンを使用し得る。分析物としては、タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、ヌクレオチドターゲットなどがある。分析物は、血液、血漿又は血清、尿などの体液に可溶性でもよい。分析物は、組織中に存在してもよく、細胞表面又は細胞内部に存在してもよい。分析物は、血液、尿、乳組織吸引液のような体液中に分散した細胞上もしくは細胞内に存在してもよく、又は生検サンプルとして得られてもよい。

## 【0087】

本明細書で用いられる「前立腺の疾患」又は「前立腺疾患」又は「前立腺の状態」とは、非限定例として良性前立腺肥大（BPH）、前立腺炎、前立腺上皮内新形成（PIN）及び癌などのいずれかの前立腺疾患又は状態を意味する。

## 【0088】

本明細書で用いる「前立腺癌」とは、非限定例としてアデノカルチノーマ、小型細胞未分化カルチノーマ及び粘液性（コロイド性）癌などの前立腺のいずれかの悪性疾患を意味する。

## 【0089】

“発現配列タグ”又は“EST”は、組織から抽出され、次いでベクターに挿入され、mRNAの逆転写によって作製されたcDNAインサートの部分配列を意味する。

## 【0090】

“転写物イメージ”は、ライブラリー中のESTの定量的分布を示す表又はリ

ストを意味しており、ライブラリーの作製に用いた組織中で活性の遺伝子を表す。

#### 【0091】

本発明は特異的結合要素を利用するアッセイを提供する。本文中で使用された“特異的結合要素”なる用語は、特異的結合対の1つの要素を意味する。即ち、一方の分子が化学的又は物理的手段を介して第二の分子に特異的に結合する異なる2つの分子のうちの1つの要素を意味する。従って、常用のイムノアッセイの抗原及び抗体から成る特異的結合対に加えて、ビオチンとアビジン、糖質とレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクター分子とレセプター分子、補因子と酵素、酵素インヒビターと酵素、などのような特異的結合対がある。更に、特異的結合対としては、原型の特異的結合要素の類似体である要素、例えば分析物-類似体がある。免疫反応性特異的結合要素としては、抗原、抗原フラグメント、モノクローナル及びポリクローナルの双方の抗体及び抗体フラグメント、その複合体があり、組換えDNA分子によって形成されるものも含む。

#### 【0092】

本文中で使用された“ハプテン”なる用語は、部分的抗原を意味するか、又は、抗体結合能力を有しているがキャリアタンパク質に結合しないと抗体形成を誘発できない非タンパク質結合要素を意味する。

#### 【0093】

本文中で使用された“捕獲試薬”なる用語は、サンドイッチアッセイでは分析物に特異的であり、競合アッセイでは指示薬もしくは分析物に特異的であり、間接アッセイではそれ自体が分析物に特異的な補助特異的結合要素に特異的であるような未標識の特異的結合要素を意味する。捕獲試薬は、アッセイ処理前又はアッセイ処理中に直接又は間接に固相物質に結合でき、これによって、固定された複合体を被検サンプルから分離し得る。

#### 【0094】

“指示薬”は、シグナル発生能を有しており特異的結合要素にコンジュゲートされた(“付着された”)外的手段によって検出され得る測定可能なシグナルを発生する“シグナル発生化合物”(“ラベル”)から成る。特異的結合対の抗体

要素であることに加えて、指示薬はまた、ハプテン - 抗 - ハプテン系のような任意の特異的結合対の一方の要素、例えば、ビオチン又は抗ビオチン、アビジン又はビオチン、糖質又はレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクター又はレセプター分子、酵素補因子と酵素、酵素インヒビター又は酵素、などでもよい。免疫反応性特異的結合要素は、サンドイッチアッセイで問題のポリペプチドに結合でき、競合アッセイで捕獲試薬に結合でき、間接アッセイで補助特異的結合要素に結合できる抗体、抗原、又は、抗体 / 抗原複合体である。プローブ及びプローブアッセイについて記述するときは、“リポーター分子”なる用語を使用し得る。リポーター分子は、カルバゾール又はアダマンタンなどの特異的結合対の特異的結合要素にコンジュゲートした上記のようなシグナル発生化合物から成る。

#### 【0095】

考えられる種々の“シグナル発生化合物”(ラベル)としては、色原体、酵素のような触媒、フルオレセイン及びローダミンのような発光化合物、ジオキセタン、アクリジニウム、フェナントリジニウム及びルミノールのような化学発光化合物、放射性元素並びに直接可視ラベルがある。酵素の例は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼなどである。特定ラベルの選択は決定要因ではない。しかしながらラベルは、単独でシグナルを発生するか又は1つもしくは複数の付加物質とのコンジャンクションによってシグナルを発生する能力を有していなければならない。

#### 【0096】

“固相”(“固体支持体”)は当業者に公知であり、反応トレーのウェル壁、試験管壁、ポリスチレンビーズ、磁性又は非磁性のビーズ、ニトロセルロースストリップ、膜、ラテックス粒子のようなマイクロ粒子、ヒツジ(又は他の動物)の赤血球、Duracytes(登録商標)(ピルビン酸アルデヒド及びホルムアルデヒドによって“固定された”赤血球、Abbott Laboratories, Abbott Park, ILから入手可能)などがある。“固相”は決定要因ではなく、当業者が選択できる。従って、ラテックス粒子、マイクロ粒子、磁性又は非磁性のビーズ、膜、プラスチック管、マイクロタイターウェルの壁、ガラス又はシリコンチップ、ヒツジ(又は他の動物の)赤血球及びDura

cytes (登録商標) はすべて好適例である。固相をペプチドに固定する適当な方法は、イオン性、疎水性又は共有結合性相互作用などである。本文中で使用された“固相”なる用語は、不溶性であるか又はその後の反応によって不溶化し得る任意の材料を意味する。固相は、捕獲試薬を吸引し固定し得る固有能力に基づいて選択され得る。あるいは固相が、捕獲試薬を吸引し固定する能力を有している付加的レセプターを保持し得る。付加的レセプターは、捕獲試薬自体又は捕獲試薬にコンジュゲートされた荷電物質に反対の電荷をもつ荷電物質でもよい。あるいはまた、レセプター分子が、固相に固定(付着)されており特異的結合反応を介して捕獲試薬を固定化する能力を有している任意の特異的結合要素でもよい。レセプター分子は、アッセイ処理前又はアッセイ処理中に捕獲試薬を固相材料に間接に結合させ得る。従って固相は、プラスチック、誘導プラスチック、磁性又は非磁性の金属、試験管のガラス又はシリコン表面、マイクロタイターウェル、シート、ビーズ、マイクロ粒子、チップ、ヒツジ(又は他の動物)の赤血球、Duracytes (登録商標) 及び平均的な当業者に公知の他の形状でよい。

#### 【0097】

また本発明の範囲内で、検出抗体がアクセスできる十分な多孔度を有しておりかつ抗原に結合する適当な表面親和性を有している任意の適当な多孔質材料を固相に使用することも考えられる。一般には微孔質構造が好ましいが、水和状態でゲル構造をもつ材料も使用できる。このような有用な固体支持体の非限定例は、ニトロセルロース及びナイロンである。本文中に記載のこのような多孔質固体支持体として、好ましくは約0.01 - 0.5 mm、特に好ましくは約0.1 mmの厚みのシートの形態が考えられる。細孔サイズは広い範囲内で変更でき、好ましくは約0.025 - 15ミクロン、特に約0.15 - 15ミクロンである。このような支持体の表面は、抗原又は抗体を支持体に共有結合させる化学的プロセスによって活性化され得る。しかしながら一般には、十分には解明されていない疎水性の力によって抗原又は抗体が多孔質材料に吸着されることによって抗原又は抗体が不可逆的に結合する。その他の適当な固体支持体は当業界で公知である。

## 【0098】

## 試薬

本発明は、目的の前立腺組織に由来し、PCIGFと称するポリヌクレオチド配列、それによりコードされるポリペプチド及びこれらのポリペプチドに特異的な抗体のような試薬を提供する。本発明はまた開示したポリヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチド及びこれらのポリヌクレオチドに相補的な核酸配列などの試薬をも提供する。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド又は抗体を、前立腺癌のような前立腺疾患及び状態の検出、診断、病期判定、経過追跡、予後判定、*in vivo*造影、予防もしくは処置、又は疾病素質の判定、などを可能にする情報を提供するために使用できる。本明細書に開示する配列はアッセイにおいて、又は遺伝子転写活性の特異的プロフィールを作製するために用いることができる固有のポリヌクレオチドを表す。このようなアッセイは欧州特許第0373203B1及び国際公開番号WO95/11995に開示されており、これらは出展明示により本明細書の一部とする

選択されたPCIGF由来のポリヌクレオチドを本明細書に記載する正常又は変化した遺伝子発現を検出する方法に用いることができる。このような方法ではPCIGFポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド、そのフラグメントもしくは誘導体、又はそれに相補的な核酸配列を用いることができる。

## 【0099】

本明細書に開示するポリヌクレオチド、その相補的配列又はいずれかのフラグメントをアッセイに用いて前立腺組織疾患及びそれに関連する状態に係る遺伝子、核酸、cDNA又はmRNAの検出、増幅又は定量をすることができる。またこれらを用いてPCIGFポリペプチドのコーディング配列全体を又は部分的に同定することもできる。さらにこれらをアッセイ用のキットの形態で個々の容器に収容して提供するか、又は個々の組成物として提供することができる。アッセイ用のキットとして提供される場合、その他の適当な試薬、例えばバッファー、コンジュゲート等を含むことができる。

## 【0100】

ポリヌクレオチドをRNA又はDNAの形態にできる。DNAの形態のポリヌ

クレオチド、cDNA、ゲノムDNA、核酸類似体及び合成DNAは本発明の範囲内である。DNAは二本鎖又は一本鎖の形態でよく、一本鎖の場合、コーディング(センス)鎖又は非コーディング(アンチセンス)鎖でよい。ポリペプチドをコードするコーディング配列は本発明にて提供するコーディング配列と同一であるか、又は異なるコーディング配列でよく、遺伝コードの冗長性又は縮重の結果、コーディング配列は本発明にて提供されるDNAと同一のポリペプチドをコードする。

#### 【0101】

このポリヌクレオチドはポリペプチドのコーディング配列のみ、又はポリペプチドのコーディング配列及びリーダーもしくは分泌配列もしくはプロタンパク質配列のような別のコーディング配列、又はポリペプチドのコーディング配列(及び所望により別のコーディング配列)及びポリペプチドのコーディング配列の非コーディング5'及び/又は3'配列のような非コーディング配列を含み得る。

#### 【0102】

加えて、本発明はポリヌクレオチド欠失、置換又は付加のような修飾を含むポリヌクレオチド変異;及びポリヌクレオチド配列変異から得られるいずれかのポリクローナル抗体ペプチド修飾体を含む。本発明のポリヌクレオチドはまた本発明にて提供されるコーディング配列の天然対立遺伝子変異であるコーディング配列をも有する。

#### 【0103】

加えて、ポリヌクレオチドのコーディング配列を同一の読み枠で、宿主細胞からのポリペプチドの発現及び分泌を補助するポリヌクレオチド配列、例えば細胞からのポリペプチドの輸送を調節する分泌配列として機能するリーダー配列に融合できる。リーダー配列を有するポリペプチドはプロタンパク質であり、宿主細胞により切断され、ポリペプチドを形成するリーダー配列を有することができる。ポリヌクレオチドはまたタンパク質に5'アミノ酸残基が付け加えられているプロタンパク質をもコードできる。プロ配列を有するタンパク質はプロタンパク質であり、プロタンパク質はタンパク質の不活性形態である場合もある。プロ配列を一度切断すると、活性タンパク質が残る。このように本発明のポリヌクレオ

チドはタンパク質を、又はプロ配列を有するタンパク質を、又はプレ配列（リーダー配列）及びプロ配列の両方を有するタンパク質をコードできる。

【0104】

本発明のポリヌクレオチドはまた本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列にフレーム内融合したコーディング配列をも有することができる。マーカー配列は、細菌宿主の場合マーカーに融合されたポリペプチドを精製するためにpQE-9ベクターにより供給されるヘキサヒスチジンタグでよく、又は、例えば哺乳動物宿主、例えばCOS-7セルラインを用いる場合、マーカー配列は赤血球凝集素（HA）タグでよい。HAタグはインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する。例えば、I. Wilsonら、Cell 37:767(1984)参照。

【0105】

ポリヌクレオチド及び配列間で少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、及びより好ましくは少なくとも90%の同一性がある場合、ポリヌクレオチドは本発明にて提供される配列にハイブリダイズすると考えると企図する。

【0106】

本発明はまた、ポリペプチドの少なくとも一部が、本発明で提供されるポリヌクレオチドから選択されたPCIGFポリヌクレオチドによりコードされる、精製されたPCIGFポリペプチドを用いて産生された抗体をも提供する。本発明にて提供される方法でこれらの抗体を用いて被験サンプル中のPCIGF抗原を検出できる。被験サンプル中のPCIGF抗原の存在は前立腺疾患又は状態の存在の指標である。また抗体を治療目的で用いて発現変化又は状態に関連するPCIGFポリペプチドの活性を中和させることができる。

【0107】

本発明は、本発明にて提供されたような推定アミノ酸配列及びこのようなポリペプチドのフラグメント、類似体及び誘導体のようなPCIGFポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは、組換えによって産生されてもよく、天然ソースから精製されてもよく、又は、合成されてもよい。PCIGFポリペプチドのフラグメント、誘導体又は類似体は、いずれかの構成ポリペプチド鎖の1つ又は

複数のアミノ酸残基が保存又は非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）によって置換され、このような置換アミノ酸残基が遺伝子コードによってコードされているかコードされていないポリペプチドであってもよく；1つ又は複数のアミノ酸残基が置換基を含むポリペプチドであってもよく；ポリペプチドがポリペプチドの半減期を延長する化合物（例えばポリエチレングリコール）のような別の化合物に融合したポリペプチドであってもよく；又は、付加アミノ酸がポリペプチド、例えばリーダー配列もしくは分泌配列又はポリペプチドもしくはプロタンパク質配列の精製に使用される配列に融合しているポリペプチドであってもよい。このようなフラグメント、誘導体及び類似体は本発明の範囲内に包含される。本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドは好ましくは単離形態で提供され、好ましくは精製されている。

#### 【0108】

従って、本発明のポリペプチドは、天然ポリペプチドのアミノ酸配列に同一であるアミノ酸配列を有するか、あるいは、1つ又は複数のアミノ酸置換に起因する小変異をもつアミノ酸配列を有し得る。変異は、置換アミノ酸が類似の構造的又は化学的特性を有するような「保存性変化」、例えばイソロイシンによるロイシンの置換又はセリンによるトレオニンの置換でもよい。対照的に、変異が非保存性変化、例えばトリプトファンによるグリシンの置換でもよい。同様の小変異はまた、アミノ酸の欠失又は挿入又はその双方でもよい。生物学的又は免疫学的な活性を変化させることなく置換、挿入又は欠失し得るアミノ酸の種類及び個数を決定する指針は、当業界で公知のコンピュータープログラム、例えばDNASTARソフトウェア（DNASTAR Inc., Madison, WI）を使用することによって見出される。

#### 【0109】

本発明のポリヌクレオチド配列により構築されたプローブを種々のアッセイ法において用いて種々の型の分析を提供できる。例えば、このようなプローブを蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）技術において用いて染色体分析を実施し、染色体における癌特異的構造変化、例えば染色体スプレッドから可視化できるか又はPCRにより生じた、及び/又は対立遺伝子特異的オリゴ

ヌクレオチドプローブ、対立遺伝子特異的増幅を用いて、又は直接シーケンシングにより検出できる欠失又は転移を同定できる。またプローブを放射性同位元素で直接的もしくは間接的に検出可能なハプテン、又は蛍光分子で標識でき、*in situ*ハイブリダイゼーション研究に用いて組織標本又は細胞のポリヌクレオチドを含んでなる遺伝子のmRNA発現を評価できる。

#### 【0110】

本発明はまた、本発明で提供されるポリペプチドの産生に関する教示を提供する。

#### 【0111】

##### プローブアッセイ

本発明にて提供される配列を用いて、被験サンプル中の核酸を検出するためのアッセイにおいて用いることができるプローブを作製できる。目的のポリヌクレオチドの保存ヌクレオチド領域から、又は目的のポリヌクレオチドの非保存ヌクレオチド領域からプローブを設計できる。アッセイを最適化するためのこのようなプローブの設計は通常技術者の技術範囲内である。一般に、特異性が最大であるのが望ましい場合、核酸プローブを非保存又は固有の領域から開発し、例えば多重遺伝子族の異なるメンバーに非常に関連性のあるヌクレオチド領域又はマウス及びヒトのような関連性のある種にあるヌクレオチド領域を検定する場合、保存領域から核酸プローブを開発する。

#### 【0112】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は核酸及びその混合物に含まれる望ましい核酸配列(標的)を増幅する技術である。PCRではプライマー対を過剰に用いて標的核酸の相補鎖にハイブリダイズする。各々鋳型として標的核酸を用いてポリメラーゼによりプライマーを伸長する。伸長産物はそれ自体標的配列になり、その後元来の標的鎖から解離される。次いで新規のプライマーをハイブリダイズし、ポリメラーゼにより伸長し、サイクルを繰り返して標的配列分子数を幾何級数的に増加させる。PCRは米国特許第4683195号及び第4683202号に開示されており、これは出展明示により本明細書の一部とする。

#### 【0113】

リガーゼ連鎖反応(LCR)は核酸増幅のための代替法である。LCRでは、2個の1次(第1及び第2)及び2個の2次(第3及び第4)プローブを含むプローブ対を用い、該プローブは全て標的に対して過剰のモル濃度で用いられる。第1プローブは標的鎖の第1セグメントにハイブリダイズし、第2プローブは標的鎖の第2セグメントにハイブリダイズし、第1及び第2セグメントは近接して、1次プローブが5'リン酸-3'ヒドロキシルの関係で互いに隣接し、リガーゼが2個のプローブを融合産物に共有結合により融合又はライゲートできる。加えて、類似の隣接様式で、第3(2次)プローブは第1プローブの部分にハイブリダイズでき、第4(2次)プローブは第2プローブの部分にハイブリダイズできる。もちろん、標的が最初二本鎖である場合、2次プローブはまず第1に標的相補体にハイブリダイズする。一度1次プローブのライゲートされた鎖が標的鎖から分離すると、ライゲートされて相補体、2次ライゲート産物を形成できる第3及び第4プローブにハイブリダイズする。ライゲート産物が標的又はその相補体のいずれかと機能的に等価であるということを認識することが重要である。ハイブリダイズ及びライゲーションのサイクルを繰り返すことにより、標的配列を増幅することができる。この技術はK. Backmanに対して1989年6月16日に公開されたEP-A-320308及びK. Backmanらに対して1991年7月31日に公開されたEP-A-439182においてさらに完全に記載されており、双方共に出展明示により本明細書の一部とする。

#### 【0114】

mRNAの増幅に関しては、mRNAをcDNAに逆転写し、続いてポリメラーゼ連鎖反応を行うこと(RT-PCR);又は米国特許第5322770号(出展明示により本明細書の一部とする)に記載されているような双方の工程のための単一の酵素を用いること;又はR. L. Marshallら、PCR Methods and Application 4:80-84(1994)(出展明示により本明細書の一部とする)に記載されているような、mRNAをcDNAに逆転写し、続いて非対称ギャップリガーゼ連鎖反応(RT-AGLCR)を行うことは本発明の範囲内である。

#### 【0115】

本発明にて利用できるその他の公知の増幅方法には、非限定例として、J. C. Guatelliら、PNAS USA 87:1874-1878(1990)により記載され、またJ. Compton、Nature 350(6313):91-92(1991)により記載されている、いわゆる「NASBA」又は「3SR」技術；公開欧州特許出願(EPA)番号4544610にて記載されているようなQベータ増幅；鎖置換増幅(G. T. Walkerら、Clin. Chem. 42:9-13(1996)に記載されている)及び欧州特許出願番号684315；並びに国際特許出願番号WO93/22461に記載されているような標的媒介増幅などがある。

#### 【0116】

現在当該分野で公知のこれらの検出法などのいずれかの適当な検出方法及び後に案出し得る検出計画を用いてPCIGFを検出できる。前記した現在公知の検出法の実例は出展明示により本明細書の一部とする。例えばCaskeyら、米国特許第5582989号、Gelfandら、米国特許第5210015号を参照。このような検出法の例としては標的増幅法及びシグナル増幅技術などがある。現在知られている検出法の例としてはPCR、LCR、NASBA、SDA、RCA及びTMAと称する核酸増幅技術などがある。例えば、Caskeyら、米国特許第5582989号、Gelfandら、米国特許第5210015号を参照。前記は全て出展明示により本明細書の一部とする。Snitmanら、米国特許第5273882号に開示されるもののようなシグナル増幅を用いて検出を達成することもできる。今のところ標的又はシグナルの増幅が好ましいが、増幅を必要としない超鋭敏検出法を本発明において使用できることは企図するところであり、本発明の範囲内である。

#### 【0117】

種々の同種及び異種検出様式を用いて増幅する及び増幅しない検出を(組み合わせ)実施できる。異種性検出様式の実例はSnitmanら、米国特許第5273882号、Albarellaら、EP84114441.9、Urdearaら、米国特許第5124246号、Ullmanら、米国特許第5185243号及びKourilskyら、米国特許第4581333号に開示されている

。前記の全てを出展明示により本明細書の一部とする。同種検出様式の実例はC a s k e yら、米国特許第5582989号、G e l f a n dら、米国特許第5210015号に開示されており、これらを出展明示により本明細書の一部とする。ハイブリダイゼーションアッセイにおける複数のプローブの使用は意図されるところであり、本発明の範囲内であり、それを使用することによりP C I G Fシグナルの感受性及び増幅が改善される。例えばC a s k e yら、米国特許第5582989号、G e l f a n dら、米国特許第5210015号（出展明示により本明細書の一部とする）を参照。

#### 【0118】

1つの実施態様において、本発明は概して標的ポリヌクレオチドを含有することが疑われる被験サンプルを増幅プライマー及びアンプリコン配列の内部領域とハイブリダイズできる検出プローブを含んでなる増幅反応試薬と接触させる工程を含む。本発明にて提供される方法により用いられるプローブ及びプライマーを捕捉及び検出標識で標識し、この場合プローブはある型の標識で標識され、プライマーは別の型の標識で標識される。さらにプローブ配列がプライマー配列よりも溶融温度が低くなるようにプライマー及びプローブを選択する。増幅試薬、検出試薬及び被験サンプルを増幅条件下におき、それにより標的配列の存在下、標的配列のコピー（アンプリコン）を作製する。通常の場合、プライマーが提供されて標的配列及びその相補鎖を増幅するので、アンプリコンは二本鎖である。次いで二本鎖アンプリコンを熱変成し一本鎖アンプリコンメンバーを産生する。一本鎖アンプリコンの形成時、混合物を冷却してプローブ及び一本鎖アンプリコンメンバー間で複合体形成させる。

#### 【0119】

一本鎖アンプリコン配列及びプローブ配列を冷却したとき、プローブ配列は一本鎖アンプリコンメンバーに優先的に結合する。予想に反して、一般にプローブ配列がプライマー配列よりも短くなるようにプローブ配列が選択されるという知見が得られる。従って、プライマーにより産生されたアンプリコンの溶融温度はまたプローブの溶融温度よりも高い。このように、混合物を冷却したとき、二本鎖アンプリコンの再形成が予測されよう。しかしながら、前記するように、この

場合はしない。プローブは一本鎖アンプリコンメンバーに優先的に結合することが見出される。さらにプライマー配列を過剰のプローブに加える場合でも、このプローブ/一本鎖アンプリコン結合の嗜好性が存在する。

#### 【0120】

プローブ/一本鎖アンプリコンメンバーハイブリッドが形成された後、これが検出される。標準的な異種アッセイ様式はプライマー及びプローブに存在する検出標識及び捕捉標識を用いてハイブリッドを検出するのに適している。ハイブリッドを捕捉標識により固相に結合でき、検出標識により検出できる。検出標識を直接検出できる場合、必要であれば標識に検出可能なシグナルを生じさせ、そしてシグナルを検出することにより固相上でのハイブリッドの存在を検出できる。標識を直接検出できない場合、捕捉ハイブリッドを、通常直接検出可能な標識に結合した結合メンバーを含んでなるコンジュゲートに接触させることができる。コンジュゲートは複合体に結合できるようになり、複合体でのコンジュゲートの存在を直接検出可能な標識で検出する。このように、固相試薬でハイブリッドの存在を決定できる。当業者は洗浄工程を用いてハイブリダイズされていないアンプリコン又はプローブ及び結合していないコンジュゲート洗去できる。

#### 【0121】

標的配列は一本鎖であると記載されているが、標的配列が実際は二本鎖であり、増幅プライマー配列とハイブリダイズする前にその相補体から分離されているだけである場合を含むことを意図している。この方法でPCRを用いる場合、標的配列の末端は通常既知である。LCR又はその修飾法を好ましい方法で用いる場合、通常全標的配列が既知である。典型的には、標的配列は例えばRNA又はDNAのような核酸である。

#### 【0122】

本発明にて提供される方法を熱サイクル反応混合物を含む公知の増幅反応、とりわけPCR及びギャップLCR (GLCR) において使用することができる。増幅反応は典型的にはプライマーを用いて標的核酸配列のコピーを作製し、該標的配列は通常さらに大きな核酸配列の小領域である。プライマーはそれ自体標的配列の領域に相補的である核酸配列である。増幅条件下でこれらのプライマーが

標的配列の相補的領域にハイブリダイズ又は結合する。標的配列のコピーは典型的にはポリメラーゼ又はリガーゼ活性を有する酵素を用いて別個に又は組み合わせて、ヌクレオチドをハイブリダイズされたプライマーに添加し、及び/又は隣接するプローブ対にライゲートするプライマー伸長及び/又はライゲーション方法により作製される。プライマー又はプローブに添加されたヌクレオチドもまた単量体、又は用いられたオリゴマーとして標的配列に対して相補的である。一度プライマー又はプローブが十分に伸長及び/又はライゲートされると、例えば反応混合物を相補的核酸鎖が解離する「溶融温度」まで加熱することにより、標的配列から分離される。このように標的配列に相補的な配列が形成される。

#### 【0123】

次いで新たな増幅サイクルが起こり得、いずれかの二本鎖を分離することにより標的配列数をさらに増幅し、プライマー又はプローブがその各々の標的にハイブリダイズすることが可能になり、ハイブリダイズされたプライマー又はプローブを伸長及び/又はライゲートし、再分離する。増幅サイクルにより作製された相補配列を鋳型として提供してプライマー伸長又は2個のプローブのギャップを充填し、標的配列数をさらに増幅する。典型的には反応混合物は20から100回循環し、さらに典型的には、反応混合物は25から50回循環する。サイクル数は通常の技術者により決定できる。この方法では、標的配列の複数のコピー及びその相補配列が作製される。このようにプライマーは増幅条件下にある場合、標的配列の増幅を開始する。

#### 【0124】

一般に、標的鎖の部分に相補的である2個のプライマー及びその相補体をPCRに使用する。LCRでは、4個のプローブのうち2個は標的配列に相補的であり、2個は標的の相補体に対して同様に相補性であるその4個のプローブを一般に使用する。プライマーセット及び前記の酵素に加えて、核酸増幅反応混合物はまた公知である別の試薬を含んでよく、非限定例としてはマンガン；マグネシウム；塩；ニコチンアミドジヌクレオチド(NAD)；並びにデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)、例えばデオキシアデニン三リン酸、デオキシグアニン三リン酸、デオキシシトシン三リン酸及びデオキシチミン三リン酸などが

ある。

#### 【0125】

増幅プライマーは標的配列の増幅を開始するが、一方検出（ハイブリダイゼーション）プローブは増幅に関与しない。一般に検出プローブは例えば国際特許出願番号WO92/20702に開示されたペプチド核酸；米国特許第5185444号、第5034506号及び第5142047号に開示されるモルフォリノ類似体；等のような核酸配列又は荷電していない核酸類似体である。プローブが担持する標識の型に依存して、プローブを用いる増幅反応により作製されたアンプリコンを捕捉又は検出する。プローブは標的配列の増幅に関与せず、従って付加dNTPをプローブに付加できないので、「伸長不可能」にならざるを得ない。本来は及び自然には、類似体は通常伸長不可能であり、プローブの3'末端をヒドロキシル基がもはや伸長できないように修飾することにより核酸プローブを伸長不可能にすることができる。例えば、捕捉又は検出標識によりヒドロキシル基を消費するか又はそうでなければ遮断する該捕捉又は検出標識でプローブの3'末端を機能的にできる。また別に、3'ヒドロキシル基を簡単に切断、置換又は修飾できる。1993年4月19日出願の米国特許出願番号07/049061を用いてプローブを伸長不可能にでき、これは出展明示により本明細書の一部とする。

#### 【0126】

プローブに対するプライマーの比率は重要ではない。従って、プローブ又はプライマーを反応混合物に過剰に加え、それにより一方の濃度を他方の濃度よりも大きくする。また別にプライマーとプローブを等濃度で用いることができる。しかしながら、好ましくはプライマーをプローブが過剰にある反応混合物に加える。従って、プローブに対するプライマーの比率を例えば5：1及び20：1にするのが好ましい。

#### 【0127】

プライマー及びプローブの長さは変化するが、プローブ配列を、溶融温度がプライマー配列よりも低くなるように選択する。このように一般にプライマー配列はプローブ配列よりも長い。典型的には、プライマー配列は20から50ヌクレ

オチドの長さの範囲であり、より典型的には20から30ヌクレオチドの長さの範囲である。典型的なプローブは10から25ヌクレオチドの長さの範囲である。

#### 【0128】

プライマー及びプローブを合成するための種々の方法は当該分野で公知である。同様に、標識をプローブに付着させる方法もまた当該分野で公知である。例えば、慣用的なヌクレオチドホスホラミダイト化学及びApplied Biosystems, Inc., (Foster City, CA)、Dupont (Wilmington, DE)又はMilligen (Bedford, MA)より入手可能な器具を用いて望ましい核酸プライマー又はプローブを合成するのは慣例的なことである。本発明のプライマー又はプローブのようなオリゴヌクレオチドを標識するたもの多くの方法が報告されている。Enzo Biochemical (New York, NY)及びClontech (Palo Alto, CA)の双方が報告されており、プローブ標識技術が市販されている。例えば、3'-Amine-ON CPG (商標) (Clontech, Palo Alto, CA)を用いて1級アミンを3'オリゴ末端に付着させることができる。同様に、Aminomodifier II (登録商標) (クロンテック)を用いて1級アミンを5'オリゴ末端に付着させることができる。加えて、1990年12月11日出願の係属出願米国第625566及び1990年12月20日出願の第630908号は各々5'及び3'末端でプローブを標識する方法を教示しており、各々出展明示により本明細書の一部とする。1992年6月25日公開の国際公開番号92/10505及び1992年7月9日公開のWO92/11388は各々5'及び3'末端でプローブを標識する方法を教示している。オリゴヌクレオチドを標識するためのある既知の方法によれば、標識ホスホラミダイト試薬を調製し、これを用いてその合成中にオリゴヌクレオチドに標識を加える。例えば、N. T. Thuongら、Tet. Letters 29 (46): 5905-5908 (1998); 又はJ. S. Cohenら、公開米国特許出願第07/246688号 (NTIS ORDER No. PAT-APPL-7-246688) (1989)を参照。好ましくはプローブをその

3'及び5'末端で標識する。

【0129】

捕捉標識をプライマー又はプローブに付着させることができ、固相試薬の特異的結合メンバーと結合対を形成する特異的結合メンバーにできる。プライマー又はプローブをそれ自体を捕捉標識として提供できることは理解されよう。例えば、固相試薬の結合メンバーが核酸配列である場合、それがプライマー又はプローブの相補部分に結合し、それによりプライマー又はプローブを固相に固定できるように選択し得る。プローブ自体が結合メンバーとして提供される場合、プローブが一本鎖アンプリコンメンバーに相補的でない配列又は「テイル」を含有することを当業者には理解されよう。プライマー配列に十分に相補的ではないようにプローブが選択されるので、プライマー自体が捕捉標識として提供される場合、少なくともプライマーの一部は固相上の核酸と自由にハイブリダイズするであろう。

【0130】

一般に、異種イムノアッセイを実施するのに通常用いられる技術を用いて、プローブ/一本鎖アンプリコンメンバー複合体を検出できる。好ましくは、この実施態様では、市販により袖手可能なAbbott LCx(商標)インストレーション(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)により用いられるプロトコルに従って検出を実施する。

【0131】

本発明にて開示されるプライマー及びプローブは典型的なPCRアッセイにおいて有用であり、この場合被験サンプルをプライマー対と接触させ、増幅を実施し、ハイブリダイゼーションプローブを加え、検出を実行する。

【0132】

本発明により提供される別の方法は被験サンプルを複数のポリヌクレオチドと接触させること(この場合、少なくとも1つのポリヌクレオチドは本明細書に記載するPCIGF分子である)、被験サンプルを複数のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせること、及びハイブリダイゼーション複合体を検出することからなる。ハイブリダイゼーション複合体を同定し、測定して前立腺組織疾患、例え

ば前立腺癌の指標であるプロフィールを集める。逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) などの当該分野で公知の方法によるDNA産物の増幅により発現されたRNA配列をさらに検出できる。

#### 【0133】

##### 薬剤スクリーニング及び遺伝子治療

本発明はまた、分子例えば本発明のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに由来するアンチセンスPCIGFを、前立腺組織疾患又は状態とりわけ前立腺癌に関連するポリヌクレオチドの異常発現に係る症状を有する患者に導入する遺伝子治療方法の使用をも包含する。アンチセンスRNA及びDNAフラグメント及びリボザイムなどのこれらの分子をPCIGF mRNAの翻訳を阻止するように設計し、PCIGFポリヌクレオチドの発現変化又は異常に関連する症状の処置において治療的に使用することができる。

#### 【0134】

また別に、前記したオリゴヌクレオチドを当該分野で公知の方法によりアンチセンスRNA又はDNAが*in vivo*で発現され、前記の方法でPCIGFポリペプチドの産生を阻止するように細胞に分配できる。従ってPCIGFポリヌクレオチドに対するアンチセンス構築物はPCIGF転写物の作用を逆転し、該アンチセンス構築物を前立腺組織疾患状態、例えば前立腺癌に使用できる。またこれらのアンチセンス構築物を腫瘍転移の処置に使用できる。

#### 【0135】

本発明は、PCIGFポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1つの化合物を同定するために、複数の化合物をPCIGFポリペプチド又はその任意のフラグメントに対する特異的結合に基づいてスクリーニングする方法を提供する。このような方法は、少なくとも1つの化合物を提供する工程と、PCIGFポリペプチドを各化合物に混合し、結合に適した条件下で結合に十分な時間維持する工程と、各化合物に対するPCIGFポリペプチドの結合を検出する工程とから成る。

#### 【0136】

このような試験に使用されるポリペプチド又はペプチドフラグメントは、溶液

中で遊離状態でもよく、固体支持体に固定されていてもよく、細胞表面に担持されていてもよく、又は、細胞内に配置されていてもよい。1つのスクリーニング方法では、ポリペプチド又はペプチドフラグメントを発現し得る組換え核酸を安定にトランスフェクトした真核性又は原核性の宿主細胞を使用する。薬剤、化合物又は他の任意の物質はこのようなトランスフェクト細胞に対する競合結合アッセイによってスクリーニングされ得る。例えば、ポリペプチドと被検物質との間の複合体の形成を生存細胞又は固定細胞中で測定し得る。

#### 【0137】

従って本発明は、PCIGFに関連する疾患を治療するために使用できる薬剤、化合物又は他の任意の物質のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、物質をポリペプチド複合体、ポリペプチド又はそのフラグメントに接触させ、物質とポリペプチドとの複合体の存在、又はポリペプチドと細胞との複合体の存在を検定する段階から成る。競合結合アッセイでは一般にポリペプチドを標識する。適当なインキュベーション後、遊離（即ち非複合）ポリペプチド又はそのフラグメントを結合形態で存在するポリペプチド又はそのフラグメントから分離し、遊離即ち複合体非形成ラベルの量を、特定物質のポリペプチド結合能力又はポリペプチド/細胞複合体妨害能力の尺度とする。

#### 【0138】

本発明はまた、ポリペプチドに特異的に結合し得る中和抗体がポリペプチド又はそのフラグメントに対する結合に関して被検物質と競合するような競合スクリーニングアッセイの使用を包含する。このように、本発明で提供されるPCIGFポリペプチドに共通の1つ又は複数の抗原決定基を有している被検サンプル中の任意のポリペプチドの存在を検出するために抗体を使用できる。

#### 【0139】

別のスクリーニング技術は、本発明で開示されたPCIGFの少なくとも1つのポリペプチドに適当な結合親和性を有している化合物を高処理量でスクリーニングし得る。簡単に説明すると、プラスチックピン又は他の任意の表面のような固相上で多数の異なる小ペプチドから成る被検化合物を合成する。被検ペプチド化合物をポリペプチドと反応させて洗浄する。このようにして固相に結合したポ

リペプチドを当業界で公知の方法によって検出する。また、本文中に記載のスクリーニング技術に使用するために精製ポリペプチドをプレートに直接コートしてもよい。更に、ポリペプチドを捕獲し固体支持体に固定させるために非中和抗体を使用してもよい。例えば、1984年9月13日公開の欧州特許EP84/03564参照。該特許の記載内容は参照によって本発明に含まれるものとする。

#### 【0140】

合理的な薬剤設計の目的は、考察中の生物活性ポリペプチド又は該ポリペプチドと相互作用するアゴニスト、アンタゴニストもしくはインヒビターのような小分子の構造的類似体を産生することである。このような構造的類似体は、より活性の形態もしくはより安定な形態のポリペプチドから成る薬剤又はポリペプチドの*in vivo*機能を増進もしくは妨害する薬剤を設計するために使用できる。J. Hodgson, *Bio/Technology* 9:19-21 (1991) 参照。該文献の記載内容は参照によって本発明に含まれるものとする。

#### 【0141】

例えば1つの方法では、ポリペプチド又はポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造をX線結晶学、コンピューターモデリング、又は、最も典型的には双方の併用によって決定する。分子の構造を解明し分子の(1つ又は複数の)活性部位を決定するためには、ポリペプチドの形態及び電荷を確認しなければならない。使用される機会は少ないが、ポリペプチドの構造に関する有用な情報はまた相同タンパク質の構造に基づくモデリングによって得られる。双方の場合に、類似のポリペプチド様分子を設計するため又は効率的なインヒビターを同定するために適当な構造情報が使用される。

#### 【0142】

合理的な薬剤設計の有用な例は、S. Braxtonら, *Biochemistry* 31:7796-7801 (1992) に示されたような改良された活性もしくは安定性をもつ分子、又は、S. B. P. Athaudaら, *J. Biochem. (Tokyo)* 113(6):742-746 (1993) によって示されたような天然型ペプチドのインヒビター、アゴニストもしくはアンタゴニストとして作用する分子である。これらの引用文献の記載内容は参照によって

本発明に含まれるものとする。

【0143】

また、上記のようなアッセイによって選択されたターゲット特異的抗体を単離し、次いでその結晶構造を決定することも可能である。原則としてこの方法は、以後の薬剤設計の基礎となるファーマコホア（薬作用発生団）を産生する。更に、薬理的に活性の機能性抗体に対する抗-イディオタイプ抗体（“anti-id”）を産生させることによってタンパク質結晶学を完全に無視することも可能である。鏡像の鏡像なのでanti-idの結合部位は起原レセプターの類似体である。次に、anti-idを使用して、化学的又は生物学的に産生されたペプチドバンクからペプチドを同定及び単離し得る。単離されたペプチドはファーマコホア（即ち、原型医薬）として作用し得る。

【0144】

本発明の組換えポリペプチド複合体は、X線結晶学のような分析的研究を行うために十分な量で提供される。更に、核酸配列から誘導され得るポリペプチドのアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に代替又は付加してコンピューターモデリング技術を使用する技術者に指針を提供するであろう。

【0145】

PCIGFに特異的な抗体（例えば抗-PCIGF抗体）は更に、ポリペプチド複合体に結合することによってポリペプチド複合体の生物作用を阻害するために使用され得る。このような場合、抗体を例えば前立腺癌及びその転移のような前立腺組織疾患を治療する治療方法で使用し得る。

【0146】

更に、このような抗体は被検サンプル中のPCIGFポリペプチドの有無を検出でき、従って、前立腺組織の疾患又は状態、特に前立腺癌を診断する診断用マーカーとして有用である。このような抗体はまた、前立腺癌のような前立腺組織疾患状態の診断用マーカーとして機能し得る。

【0147】

本発明はまた、本発明のポリペプチドのアンタゴニスト及びインヒビターを目的とする。アンタゴニスト及びインヒビターは、ポリペプチド複合体の機能を阻

害又は排除する因子である。従って例えば、アンタゴニストは本発明のポリペプチドに結合し、該ポリペプチドの機能を阻害又は排除し得る。アンタゴニストは例えば、PCIGFポリペプチドに結合することによってPCIGFポリペプチドの活性を除去する抗ポリペプチド抗体でもよく、又は、幾つかの場合にはアンタゴニストがオリゴヌクレオチドでもよい。小分子インヒビターの非限定例は、小ペプチド又はペプチド様分子である。

#### 【0148】

アンタゴニスト及びインヒビターは、生理的食塩水、緩衝生理的食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール及びその混用を非限定例とする医薬として許容される担体に組合せた組成物として使用され得る。PCIGFポリペプチドインヒビターは全身性投与で使用されるのが好ましい。本発明はまた、このようなポリペプチド複合体の作用を阻害する抗体を提供する。

#### 【0149】

アンチセンス技術を用いて三重らせん形成又はアンチセンスDNAもしくはRNAにより遺伝子発現を低減でき、その双方の方法はDNA又はRNAに対するポリヌクレオチドの結合に基づいている。例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コーディング部分を用いて10~40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計する。DNAオリゴヌクレオチドは転写に關与する遺伝子の領域に相補的であり、それによりPCIGFポリペプチドの転写及び産生を防御するように設計される。三重らせんに関しては、例えばLeeら、Nuc. Acids Res. 6:3073(1979); Cooneyら、Science 241:456(1988); 及びDer vanら、Science 251:1360(1991)を参照。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはin vivoでmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子のPCIGFポリペプチドへの翻訳を遮断する。アンチセンスに関しては、例えばOkano, J. Neurochem. 56:560(1991); 及び「Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression」、CRC Press、Boca Raton、Fla(1988)を参照。アンチ

センスオリゴヌクレオチドは、分子にヌクレオチド溶解性の切断に対する抵抗性を付与する人工的なヌクレオチド内結合を含むように修飾した場合、非常に効率よく作用する。このような人工的なヌクレオチド内結合には、非限定例としてはメチルホスホネート、ホスホロチオレート及びホスホロアミデートヌクレオチド内結合などがある。

#### 【0150】

##### 組換え技術

本発明は、本発明のP C I G F ポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞及び発現ベクターを提供し、並びにこれらによってコードされるポリペプチドの産生方法を提供する。このような方法は、P C I G F ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からP C I G F ポリペプチドを回収することから成る。

#### 【0151】

本発明はまた、本発明のP C I G F ポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターによって遺伝子操作された宿主細胞、並びに組換え技術による本発明のポリペプチドの産生を提供する。

#### 【0152】

クローニングベクター又は発現ベクターから成るベクターによって宿主細胞を遺伝子操作（トランスフェクト、形質導入又は形質転換）する。ベクターは、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態でよい。操作した宿主細胞を、プロモーターを活性化し、トランスフェクト細胞を選択するか又はP C I G F 遺伝子を増幅するように適宜改質した慣用の栄養培地で培養し得る。温度、pHなどの培養条件は、選択された発現用宿主細胞に従来から使用されている培養条件であり、平均的な当業者に明らかであろう。

#### 【0153】

組換え技術によってポリペプチドを産生させるためにポリヌクレオチドを使用し得る。従って、ポリペプチドを発現させる多様な発現ビヒクル、特にベクター又はプラスミドのいずれかにポリヌクレオチド配列を含ませるとよい。このようなベクターとしては、染色体DNA配列、染色体性DNA配列及び合成DNA配

列、例えばSV40誘導体；細菌プラスミド；ファージDNA；酵母プラスミド；プラスミドとファージDNA、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス及び偽狂犬病ウイルスのようなウイルスDNAとの組合せに由来するベクターがある。しかしながら、宿主体内で複製可能であり生存可能であるならば他の任意のプラスミド又はベクターを使用し得る。

#### 【0154】

適当なDNA配列を多様な手順によってベクターに挿入し得る。一般に、当業者に公知の手順によってDNA配列を適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入する。このような手順及びその他の手順は当業者の知識の範囲内にあると考えてよい。発現ベクター中のDNA配列は、mRNA合成を指令する（1つ又は複数の）適当な発現コントロール配列（プロモーター）に機能的に連結されている。このようなプロモーターの非限定的代表例は、LRT又はSV40プロモーター、大腸菌lac又はtrp、ラムダファージPsubLプロモーター、並びに、原核細胞もしくは真核細胞もしくはそれらのウイルス中で遺伝子発現をコントロールすることが判明している他のプロモーターである。発現ベクターはまた、翻訳開始用リボソーム結合部位と転写ターミネーターとを含む。ベクターはまた、適当な発現増幅配列を含む。加えて発現ベクターは好ましくは、真核細胞培養物のジヒドロ葉酸レダクターゼもしくはネオマイシン耐性又は大腸菌のテトラサイクリン耐性もしくはアンピシリン耐性のようなトランスフェクトされた宿主細胞を選択するための表現形質を与える遺伝子を含む。

#### 【0155】

上記のような適当なDNA配列と適当なプロモーター又はコントロール配列とを含むベクターを適当な宿主にトランスフェクトし、宿主にタンパク質を発現させるために使用し得る。適当な宿主の代表例としては、大腸菌（E. coli）、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、放線菌（Streptomyces sp）のような細菌細胞；酵母のような菌類細胞；ショウジョウバエ（Drosophila）及びSf9のような昆虫細胞；CHO、COS又はBowesメラノーマのような動物細胞；植物細胞、などがある。適当な宿主の選択は本文中の教示から当業者が想到し得ると考えられる。

## 【0156】

より特定的には本発明はまた、上記に広義に定義された1つ又は複数の配列を含む組換え構築物を包含する。構築物は、本発明の配列が順方向又は逆方向に挿入されたプラスミド又はウイルスベクターのようなベクターから成る。この実施態様の好ましい特徴は、構築物が更に、配列に作動的に連結された調節配列例えばプロモーターを含むことである。多数の適当なベクター及びプロモーターが当業者に公知であり市販されている。以下のようなベクターを例示し得る。細菌性ベクター：pINCY (Incyte Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, CA)、pSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD)、pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBs、phagescript、psiX174、pBluescript SK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene)；pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)；真核性ベクター：pWLneo、pSV2cat、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia)。しかしながら、宿主体内で複製可能及び生存可能である限り、他の任意のプラスミド又はベクターを使用し得る。

## 【0157】

プラスミドpINCYは、ポリリンカー（多重クローニング部位）に2つの修飾を有している以外はプラスミドpSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) にほぼ一致する。これらの修飾は、(1) HindIII制限部位が欠失している、(2) EcoRI制限部位が異なる位置に存在する、ことである。pINCYは、pSPORT1をHindIII及びEcoRIで開裂し、ポリリンカーの切除フラグメントを合成DNAフラグメント（配列番号2-3）で置換することによってpSPORT1から作製される。この置換は平均的な当業者に公知の任意の方法で行われる。例えば、5'末端ホスフェートをもつ2つのヌクレオチド配列、即ち、配列2-3を合成的に作製し、一緒に混合し、次いで、HindIII及びEcoRIで切断され

た pSPORT1 プラスミドに、付着末端の結合が生じる標準条件下で結合させる。次に、適当な宿主細胞（例えば大腸菌 DH5  $\mu$  細胞）に結合 DNA をトランスフェクトし、組換えクローンをアンピシリン耐性に基づいて選択する。次に、プラスミド DNA を個々のクローンから調製し、制限酵素分析又は DNA 配列決定を行って、適正方向の挿入配列の存在を確認する。平均的な当業者に公知の別のクローニング戦略も使用し得る。

【0158】

プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクター又は選択可能マーカーをもつ他のベクターを使用して所望の任意の遺伝子から選択できる。2つの適当なベクターは、pKK232-8及びpCM7である。特定の名称の細菌プロモーターは、lacI、lacZ、T3、SP6、T7、gpt、ラムダ P<sub>sub</sub> R、P<sub>sub</sub> L及びtrpである。真核性プロモーターとしては、サイトメガロウイルス（CMV）の前初期プロモーター、ヘルペス単純ウイルス（HSV）チミジンキナーゼ、初期及び後期SV40、レトロウイルス及びマウスメタロチオネイン-Iに由来のLTRがある。適当なベクター及びプロモーターの選択は平均的な当業者のレベルの十分に範囲内である。

【0159】

別の実施態様において本発明は、上記の構築物を含有する宿主細胞を提供する。宿主細胞は、哺乳類細胞のような高等真核細胞でもよく、又は、酵母細胞のような下等真核細胞でもよく、あるいは、細菌細胞のような原核細胞でもよい。宿主細胞に構築物を導入するためには、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション又は電気穿孔を使用し得る〔L. Davisら, Basic Methods in Molecular Biology, 2nd edition, Appleton and Lang, Paramount Publishing, East Norwalk, CT (1994)〕。

【0160】

宿主細胞中の構築物は組換え配列によってコードされた遺伝子産物を産生する

ために慣用の方法で使用され得る。あるいは、本発明のポリペプチドは慣用のペプチドシンセサイザーによって合成的に製造し得る。

#### 【0161】

組換えタンパク質は哺乳類細胞、酵母、細菌又はその他の細胞中で適正なプロモーターのコントロール下で発現され得る。また、DNA構築物に由来のRNAを使用してこのようなタンパク質を産生させるために無細胞翻訳系を使用できる。原核性及び真核性の宿主と共に使用できる適当なクローニングベクター及び発現ベクターは、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (Cold Spring Harbor, NY, 1989)に記載されている。該文献の記載内容は参照によって本発明に含まれるものとする。

#### 【0162】

高等真核細胞による(1つ又は複数の)本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増進される。エンハンサーは、通常は約10 - 300bpのDNAのシス作用性要素であり、転写を増進するようにプロモーターに作用する。その例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100 - 270bp)、サイトメガロウイルス初期プロモーターのエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーがある。

#### 【0163】

一般に、組換え発現ベクターは、複製起点と、宿主細胞にトランスフェクションさせ得る選択可能マーカー、例えば大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子、酵母菌(*S. cerevisiae*)のTRP1遺伝子と、高度に発現された遺伝子に由来し下流の構造配列の転写を指令するプロモーターとを含む。このようなプロモーターは特に、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)、アルファ因子、酸ホスファターゼ又は熱ショックタンパク質のような解糖酵素をコードするオペロンに由来し得る。ヘテロロガスな構造配列を翻訳開始配列、終止配列、及び、好ましくは翻訳されたタンパク質を細胞周辺腔又は細胞外培地に分泌するように指令し得るリーダー配列に適正フェーズで組立てる。ヘテロロガス配列は任意に

、発現された組換え産物の安定化又は精製容易化のような所望の特性を与えるN-末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードし得る。

【0164】

細菌に使用し得る発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を適当な翻訳開始シグナル及び終止シグナルと共に機能性プロモーターに対して作動可能な読取りフェーズで挿入することによって構築される。ベクターは1つ又は複数の表現型選択可能マーカーとベクターの維持を確保し所望の場合には宿主体内で増幅させる複製起点とを含むであろう。トランスフェクションに適当な原核性宿主は、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、及び、*Pseudomonas*、放線菌 (*Streptomyces*) 及びブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属に含まれる様々な種であり、また、使用可能なその他の宿主も常法で選択できよう。

【0165】

細菌に使用される有用な発現ベクターは、選択可能マーカーと、公知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝子要素を含むプラスミドに由来の細菌複製起点とを含む。その他のベクターの非限定例は、PKK 223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 及び GEM1 (Promega, Biotec, Madison, WI) である。これらの pBR322 の“主鎖”セクションを適正プロモーター及び発現させるべき構造配列に組合せる。

【0166】

適当な宿主をトランスフェクションし宿主を適正な細胞密度まで増殖させた後、選択されたプロモーターを適当な手段 (例えば温度シフト又は化学的誘発) によって抑制解除し、細胞を追加期間培養する。細胞を、典型的には遠心によって収集し、物理的又は化学的手段によって破壊し、得られた粗抽出物を取り出して更に精製する。タンパク質の発現に使用された微生物細胞を、凍結-解凍の繰返し、音波処理、機械的破壊のような慣用の方法又は細胞溶解剤の使用によって破壊し得る。このような方法は平均的な当業者に公知である。

## 【0167】

種々の哺乳類細胞培養物もまた組換えタンパク質を発現させるために使用できる。哺乳類発現系の例は、Gluzman, Cell 23:175 (1981) に記載されたサル腎臓線維芽細胞系COS-7、並びに、C127、HEK-293、3T3、CHO、HeLa及びBHK細胞系のような相溶性ベクターを発現し得るその他の細胞系である。哺乳類発現ベクターは、複製起点と適当なプロモーター及びエンハンサーとを含み、また必要なリボソーム結合部位、ポリアダニル化部位、スプライスのドナー及びアクセプター部位、転写終了配列及び5'フランキング非転写配列を任意に含むであろう。例えばSV40ウイルスゲノム、例えばSV40起点、初期プロモーター、エンハンサー、スプライス及びポリアダニル化部位に由来のDNA配列を、必要な非翻訳遺伝子要素を提供するために使用し得る。有用なベクターの代表はpRc/CMV及びpcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CAから入手可能) である。

## 【0168】

ポリペプチドを、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー又はレクチンクロマトグラフィーなどの公知の方法で組換え細胞培養物から回収し精製し得る。精製中に低濃度(約0.1-5mM)のカルシウムイオンを存在させるのが好ましい〔Priceら, J. Biol. Chem. 244:917 (1969)〕。ポリペプチドの配置(configuration)を完成するために必要に応じてタンパク質の再生段階を使用し得る。最後に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を最終精製段階として使用し得る。

## 【0169】

従って、本発明のポリペプチドは高発現細胞系から発現された天然精製産物でもよく、又は化学合成手順の生成物でもよく、又は原核性もしくは真核性の宿主(例えば、細菌、酵母、高等植物、昆虫及び哺乳類細胞の培養物)から組換え技術によって産生されてもよい。組換え産生手順に使用される宿主次第で、本発明

のポリペプチドは哺乳類もしくはその他の真核生物の糖質によってグリコシル化されていてよく又は非グリコシル化でもよい。本発明のポリペプチドはまた、開始アミノ酸としてメチオニン残基を含んでもよい。

#### 【0170】

出発プラスミドは周知の手順に従い、有用なプラスミドから構築できる。さらに、ここに記載の同等のプラスミドは当分野で既知であり、当分野の通常の技術者には明らかである。

#### 【0171】

以下はcDNAクローンを単離及び分析するための一般的な方法である。本発明に開示する特定の実施態様では、mRNAを前立腺組織から単離し、cDNAライブラリーの作製に使用する。外科的切除により患者から前立腺組織を入手し、病理学者により腫瘍又は非腫瘍組織として分類する。

#### 【0172】

前立腺組織ライブラリーからランダムに単離したcDNAインサートを部分的にシーケンシングし、実施例に記載するように詳細に分析する。

#### 【0173】

DNAシーケンシングの方法は当該分野で公知である。慣用的な酵素法ではDNAポリメラーゼ、クレノウフラグメント、セクエナーゼ(US Biochemical Corp., Cleveland, OH)又はTaqポリメラーゼを用いて目的のDNA鋳型にアニーリングしたオリゴヌクレオチドプライマーからDNA鎖を伸長する。一本鎖及び二本鎖の双方を使用するように方法を開発した。鎖終止反応産物を尿素/ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動にかけ、オートラジオグラフィ(放射性核標識前駆体に関して)又は蛍光(蛍光標識前駆体に関して)のいずれかにより検出できる。最近改善された、蛍光検出法を用いる機械化反応調製、シーケンシング及び分析では、Applied Biosystems 377 DNA Sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA)のような機械を用いて1日あたりに判定できる配列数が拡大された。

#### 【0174】

ヌクレオチド配列の読み枠を数種の分析により確認できる。第1に、コーディング配列内に含まれる読み枠を出発コドンATG及び停止コドンTGA、TAA又はTAGの存在に関して分析できる。典型的には1つの読み枠がcDNA配列の主要な部分に渡って続くが、別の読み枠は多数の停止コドンを含む傾向がある。このような場合、さらなる分析が必要とされる。

#### 【0175】

各々の推定コドントリプレットにて個々のヌクレオチド塩基の存在を分析するためにアルゴリズムが作製された。例えば、Nuc. Acids. Res. 10: 5303 (1982)を参照。特定の生物(最近、植物及び動物)のコーディング配列は特定のトリプレット周期内に特定のヌクレオチドを含む傾向があり、例えば第3コドン位置ではピリミジンに対する偏好性が著明である。これらの偏好性は、規定のDNA伸長のコーディングの可能性(及びフレーム)を判定するのに用いることができる広く入手可能なソフトウェアに組み込まれている。出発/停止コドン情報と組み合わせたアルゴリズム誘導情報を用いて、高い確実性で適切なフレームを判定できる。今度はこれにより正確な読み枠で適当な発現ベクターに配列をクローニングすることが可能になる。

#### 【0176】

十分に確立されたDNA組換え技術により、本発明で開示された核酸配列を種々のその他のポリヌクレオチド配列及び目的のベクターに結合できる。J. Sambrookら、前出を参照。目的のベクターはクローニングベクター、例えばプラスミド、コスミド、ファージ誘導體、ファゲミド、並びにシーケンシング、複製及び発現ベクター等がある。一般にこのようなベクターは少なくとも1つの生物において機能する複製起点、都合のよい制限エンドヌクレアーゼ消化部位及び特定の宿主細胞に適した選別可能なマーカーを含む。当業者に公知の種々手段により、次いで望ましいDNA、RNA又はポリペプチドを産生する適切な宿主細胞にベクターを移すことができる。

#### 【0177】

時折シーケンシング又はランダム逆転写エラーが適切なオープン・リーディング・フレーム又は制御エレメントの存在を遮蔽する。このような場合、ポリペ

プチドの発現を試み、標準的なペプチドマッピング及びシーケンシング技術によりアミノ酸配列を決定することにより、正確な読み枠を決定することが可能である。F. M. Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY (1989)を参照。さらに、規定のヌクレオチド配列の実際の読み枠を3つの可能な読み枠すべてを含有するベクターで宿主細胞をトランスフェクトすることにより決定できる。正確な読み枠でヌクレオチド配列を有するこれらの細胞のみが予想される長さのペプチドを産生する。

#### 【0178】

本発明にて提供されるヌクレオチド配列は現在の最先端技術の自動化法により調製され、このように未同定ヌクレオチドを含み得る。これらは本発明を実行することを希望する当業者にとって問題ではない。J. Sambrook (前出)に報告された標準的な組換え技術又はそれを定期的に更新した技術を用いるいくつかの方法を使用して喪失された配列情報を完全にできる。本明細書に記載される、全長配列を得るために用いられる同一の技術を用いてヌクレオチド配列を得ることができる。

#### 【0179】

cDNAを適当な発現ベクターにサブクローニングし、このベクターを適当な発現宿主にトランスフェクトすることにより特定のcDNAを発現させることができる。前立腺組織cDNAライブラリーを作製するために用いられるクローニングベクターを用いて特定のcDNAのmRNAを転写でき、該ベクターはガラクトシダーゼのプロモーター、アミノ末端Met及びそれに続くガラクトシダーゼの7個のアミノ酸残基を含有する。これらにすぐ続く8個の残基が人工的なプライミング及び転写に有用な操作されたバクテリオファージプロモーター、並びにEcoRIなどのクローニングのための多数の固有の制限部位である。ベクターを適当な大腸菌(E. coli)の宿主株にトランスフェクトできる。

#### 【0180】

標準的な方法を用いて単離された細菌の株をイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)で誘導し、ガラクトシダーゼの第1の7個の残基、リンカーの約1

5個の残基及びcDNA内でコードされたペプチドを含有する融合タンパク質を産生する。cDNAクローンインサートを本質的にランダムな方法により作製するので、含まれるcDNAが適切に翻訳されるために正確な枠内に位置するチャンスは3回に1回である。DNAが適切なリーディングフレームにない場合、*in vitro*変異誘発、エクソヌクラーゼIIIもしくは緑豆ヌクラーゼによる消化又はオリゴヌクレオチドリナーの包含などの公知の方法により、適当な数の塩基を欠失又は挿入することにより正確な枠を得ることができる。

#### 【0181】

cDNAを特定宿主体内でタンパク質を発現させるために有用な別の既知のベクターにシャトルさせてもよい。ターゲットcDNAの両端の直鎖(stretch)にハイブリダイズする十分なクローニング部位とDNAセグメントとを含むオリゴヌクレオチドプライマーは標準方法で化学合成できる。次にこれらのプライマーを使用して所望の遺伝子セグメントをPCR増幅させる。得られた新しい遺伝子セグメントを標準条件下で適正な制限酵素で消化し、ゲル電気泳動で単離する。あるいは、同様の遺伝子セグメントを産生するために、cDNAを適正な制限酵素で消化し、欠失した遺伝子セグメントを化学合成オリゴヌクレオチドで充填してもよい。2つ以上の遺伝子に由来のコーディング配列のセグメントを互いに結合し、組換え配列を最適に発現できる適正なベクターにクローニングし得る。

#### 【0182】

このようなキメラ分子に適した発現宿主の非限定例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胚性腎(HEK)293細胞のような哺乳類細胞、Sf9細胞のような昆虫細胞、*Saccharomyces cerevisiae*のような酵母細胞、大腸菌のような細菌である。これらの細胞系の各々に対して有用な発現ベクターも、細菌中の増殖を可能にする複製起点と、細菌中の選択を可能にするベータ-ラクタマーゼ抗生物質耐性遺伝子のような選択可能マーカールを含むであろう。更にベクターは、トランスフェクトされた真核宿主細胞中の選択を可能にするネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子のような第二の選択可能マーカールを含み得る。問題の配列にポリAが欠失しているときは、

真核発現宿主に使用するベクターに3'ポリAテールを付加することが必要であろう。

#### 【0183】

ベクターは更に、遺伝子発現を増進させるプロモーター又はエンハンサーを含み得る。このようなプロモーターは宿主特異的であり、その非限定例は、CHO細胞用のMMTV、SV40又はメタロチオニンプロモーター；細菌宿主用のtrp、lac、tac又はT7プロモーター；酵母用のアルファ因子、アルコールオキシダーゼ又はPGHプロモーターである。ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーのような転写エンハンサーを任意に有するアデノウイルスベクターは哺乳類細胞系におけるタンパク質発現を誘発するために使用され得る。組換え細胞の均質培養物が得られると、大量の組換え産生タンパク質をならし培地から回収し、当業界で公知のクロマトグラフィー方法を用いて分析する。大量の分泌タンパク質を産生させる代替方法では、哺乳動物胚をトランスフェクションし、トランスジェニック雌牛、ヤギ、ヒツジなどの産乳から組換えタンパク質を回収する。ポリペプチド及び近縁分子はタンパク質を容易に精製できるような方法で組換え発現され得る。1つの方法では、ヒトのポリペプチドに天然には存在しない1つ又は複数の追加のポリペプチドドメインを含むキメラタンパク質を発現させる。精製を容易にするこのようなドメインの非限定例は、固定金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンドメインのような金属キレート化ペプチド、固定免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、FLAG伸長/アフィニティ精製系(Immunex Corp, Seattle, WA)に使用されるドメインである。Factor XA又はInvitrogen(San Diego, CA)のエントロキナーゼのような開裂可能なリンカー配列をポリペプチド配列と精製ドメインとの間に混在させることもポリペプチドの回収に役立つであろう。

#### 【0184】

##### イムノアッセイ:

そのフラグメント、誘導體、類似体を含むPCIGFポリペプチド又は、そのようなポリペプチドを発現する細胞などは種々のアッセイに使用し得る。前立腺

組織に対する抗体を検出するための多くのアッセイが本文中に記載されている。これらのポリペプチドはまた、抗体を産生させるために免疫原として使用できる。これらの抗体は例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、Fabフラグメント、又は、Fab発現ライブラリーの産物である。当業界で公知の種々の手順をこのような抗体及びフラグメントの産生に使用し得る。

【0185】

例えば本発明の配列を含んでなるポリペプチドに対して産生される抗体は、ポリペプチドをマウス、ウサギ、ヤギ又はヒトのような動物に直接注入するか又はポリペプチドを動物に投与することによって得ることができる。マウス、ウサギ又はヤギが好ましい。ポリペプチドは、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択される。このように得られた抗体はポリペプチド自体に結合する。このように、ポリペプチドのフラグメントだけをコードする配列を使用して、天然型(native)ポリペプチドに結合する抗体を産生させ得る。このような抗体を次に、該多量体ポリペプチドを含むと疑われる組織のような被検サンプルからポリペプチドを単離するために使用できる。モノクローナル抗体を調製する場合には、連続細胞系培養物によって産生される抗体を供給する任意の技術を使用できる。例としては、Kohler及びMilstein, Nature 256:495-497(1975)により記載されるようなハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、Kozborら、Immun. Today 4:72(19883)により記載されるようなヒトB-細胞ハイブリドーマ技術、Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc, New York, NY, pp. 77-96(1985)により記載されるようなヒトモノクローナル抗体を産生するEBV-ハイブリドーマ技術がある。一本鎖抗体を産生するために記載された技術を、本発明の免疫原性ポリペプチド産生物に対する一本鎖抗体の産生に応用できる。例えば、米国特許第4946778号参照。該特許の記載内容は出展明示により本明細書の一部とする。

【0186】

「サンドイッチ」イムノアッセイ及びプローブアッセイなどの種々のアッセイフォーマットで本発明の抗体を使用し得る。例えば、被検サンプル中にP C I G F 抗原が存在するならば該抗原の存在を判定し得る種々のアッセイ系で本発明の抗体又はそのフラグメントを使用し得る。例えば、第1のアッセイフォーマットでは、固相にコーティングしておいたポリクローナルもしくはモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント又はこれらの抗体の組合せを被検サンプルに接触させて第1混合物を形成する。この第1混合物を抗原/抗体複合体が形成される十分な条件下で十分な時間インキュベートする。次いで、シグナル発生化合物を付着させたモノクローナルもしくはポリクローナル抗体もしくはそのフラグメント又はこれらの抗体の組合せから成る指示薬を抗原/抗体複合体に接触させて第2混合物を形成する。この第2混合物を次に、抗体/抗原/抗体複合体が形成される十分な条件下で十分な時間インキュベートする。被検サンプル中に固相に捕獲されたP C I G F 抗原が存在するならば、シグナル発生化合物によって発生された測定可能なシグナルを検出することによって該抗原の存在が判定される。被検サンプル中に存在するP C I G F 抗原の量は発生シグナルに比例する。

【0187】

代替的アッセイフォーマットにおいては、(1) P C I G F 抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、又は、固体支持体に結合したこのような抗体の組合せと；(2) 被検サンプルと；及び(3) シグナル発生化合物を付着させた異なるP C I G F 抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はそのフラグメント（又はこれらの抗体の組み合わせ）から成る指示薬と；を接触させることにより混合物を形成する。この混合物を抗体/抗原/抗体複合体が形成される十分な条件下で十分な時間インキュベートする。被検サンプル中に存在し固相に捕獲されたP C I G F 抗原が存在するならば、その存在をシグナル発生化合物によって発生された測定可能なシグナルを検出することによって判定する。被検サンプル中に存在するP C I G F 抗原の量は発生シグナルに比例する。

【0188】

別のアッセイフォーマットでは、本明細書の少なくとも2つのモノクローナル

抗体の1つ又は組み合わせをPCIGF抗原に対する抗体を検出するための競合プローブとして用いることができる。例えば本発明に開示する組換え抗原のようなPCIGFポリペプチドを単独で、又は組み合わせて固相をコーティングする。次いでPCIGF抗原に対する抗体を含有する疑いのある被験サンプルをシグナル発生化合物を含んでなる指示薬及び少なくとも1つの本発明の抗体と、被験サンプル及び固相に結合した指示薬又は固相に結合した指示薬のいずれかの抗原/抗体複合体を形成するのに十分な条件下で十分な時間インキュベートする。固相に対するモノクローナル抗体の結合の低下を定量的に測定できる。

#### 【0189】

また別の検出方法では、本発明のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の各々を、免疫組織化学分析によって組織切片中及び細胞中のPCIGF抗原を検出するために使用し得る。組織切片を組織の凍結サンプル又は化学的に固定したサンプルから作製する。細胞内の抗原を検出する場合には、細胞を血液、尿、前立腺組織吸引液又はその他の体液から単離し得る。細胞は外科的又は穿刺による生検から得られる。本発明の抗体で染色すべき細胞の特定画分を富化するために磁気粒子又はフェロ流体で標識した後で、細胞を遠心又は磁気吸引によって単離し得る。疾患の組織病理学を追跡するためにこれらの抗体を直接標識するか（例えば、フルオレセイン、コロイド金、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどによって標識）、又は、第2の標識抗-種抗体（本文中に例示の種々の標識）を使用して標識する細胞化学分析も本発明の範囲に包含される。

#### 【0190】

さらに、これらのモノクローナル抗体をCNBr-活性化セファロースに類似のマトリックスに結合させると、例えば組換えタンパク質及び天然型タンパク質を精製するなどの目的で細胞培養物又は生物組織から特異的PCIGFポリペプチドをアフィニティ精製するために使用できる。

#### 【0191】

本発明のモノクローナル抗体はまた、治療目的又は他の同様の用途のキメラ抗体の製造に使用され得る。

## 【0192】

モノクローナル抗体又はそのフラグメントはP C I G F 抗原を検出するために個別に提供され得る。本発明で提供されるモノクローナル抗体（及びそのフラグメント）は、本発明の少なくとも1つのP C I G F 抗体が別のP C I G F 領域に特異的に結合する抗体と共に存在し、各抗体が異なる結合特異性を有しているような混合物即ち「カクテル」の成分として組合せ使用してもよい。従ってこのカクテルは、本明細書に開示されたP C I G F ポリペプチドに指向する本発明のモノクローナル抗体、及び、P C I G F 抗原又は別の近縁タンパク質の別の抗原決定基に特異的な別のモノクローナル抗体を含むであろう。

## 【0193】

アッセイフォーマットに使用できるポリクローナル抗体又はそのフラグメントは、アッセイに付加的に使用されるP C I G F ポリペプチド又はその他のP C I G F ポリペプチドに特異的に結合しなければならない。使用されるポリクローナル抗体は好ましくは、P C I G F ポリペプチドに結合するヒト、ヤギ、ウサギ又はヒツジのポリクローナル抗体のような哺乳類起原の抗体である。最も好ましくは、ポリクローナル抗体はウサギ起原の抗体である。アッセイに使用されるポリクローナル抗体は単独で使用されてもよく、又は、ポリクローナル抗体のカクテルとして使用されてもよい。アッセイフォーマットに使用されるカクテルはP C I G F ポリペプチドに対して異なる結合特異性を有するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれかから成るので、これらのカクテルは、前立腺癌のような前立腺疾患又は状態の検出、診断、病期判定、経過追跡、予後判定、i n v i v o 造影、予防もしくは処置、又は疾病素質の決定に有用である。

## 【0194】

また、組換え抗原を使用するアッセイ、及びP C I G F のアミノ酸配列を含む合成ペプチド又は精製ペプチドを使用するアッセイで、P C I G F 抗原を検出することも本発明の範囲内で考えられる。このようなポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそのフラグメントから成る群から選択される。本発明の範囲内ではまた、P C I G F の種々のエピートプを認識する種々の合成ペプチド、組換えペプチド又は精製ペプチドの組合せ

を、前立腺癌のような前立腺疾患及び状態の検出、診断、病期判定、経過追跡、予後判定、*in vivo*造影、予防もしくは処置、又は疾病素質の判定を行うアッセイに使用できる。この場合、これらのペプチドの全部を1つの固相にコーティングしてもよいか；あるいは、個別のペプチドの各々を微粒子のような個別の固相にコーティングし、次いで組合せてペプチドの混合物を形成し、その後のアッセイに使用してもよい。さらに、種々の抗原のエピトープを規定する多数のペプチドを、前立腺癌のような前立腺疾患及び状態の検出、診断、病期判定、経過追跡、予後判定、*in vivo*造影、予防、もしくは処置、又は疾病素質の判定に使用できると考えられる。固相にコーティングされたか又は検出可能な標識で標識されたペプチドを限定量の抗体に対して患者サンプル中に存在する（かもしれない）ペプチドと競合させる。（1つ又は複数の）抗体に対する合成ペプチド、組換えペプチド又は精製ペプチドの結合の減少が患者サンプル中の多量体ポリペプチド抗原の存在の指標となる。P C I G F 抗原の存在は患者体内の前立腺組織疾患、特に前立腺癌の存在の指標となる。アッセイフォーマットの変形は平均的な当業者に公知であり、その多くを以下に記載する。

#### 【0195】

別のアッセイフォーマットでは、抗 - P C I G F 抗体及び / 又は多量体ポリペプチド抗原の存在を以下のような同時アッセイで検出できる。被検サンプルを第一分析物の捕獲試薬と第二分析物の捕獲試薬とに同時に接触させて混合物を形成する。第一分析物の捕獲試薬は、固相に付着させた第一分析物に特異的な第一結合要素を含み、第二分析物の捕獲試薬は第二固相に付着させた第二分析物に対する第一結合要素を含む。この混合物を、捕獲試薬 / 第一分析物及び捕獲試薬 / 第二分析物の複合体が形成される十分な条件下で十分な時間インキュベートする。このようにして形成された複合体を、シグナル発生化合物で標識した第一分析物に特異的な結合対の1つの要素を含む指示薬と、シグナル発生化合物で標識した第二分析物に特異的な結合対の1つの要素を含む指示薬とに接触させて、第二混合物を形成する。この第二混合物を、捕獲試薬 / 第一分析物 / 指示薬複合体及び捕獲試薬 / 第二分析物 / 指示薬複合体が形成される十分な条件下で十分な時間インキュベートする。一方又は双方の固相に形成された複合体に関して発生された

シグナルを検出することによって1種又は複数の分析物の存在を判定し、被検サンプル中の1種又は複数の分析物の存在の指標とする。このアッセイフォーマットでは、本発明で開示された発現系に由来する組換え抗原を使用でき、また、本発明で開示された発現系に由来のタンパク質から産生されたモノクローナル抗体を使用できる。例えばこのアッセイ系では多量体ポリペプチド抗原が第一分析物である。このようなアッセイ系は欧州特許公開0473065により詳細に記載されている。

#### 【0196】

また別のアッセイフォーマットでは、本発明で開示されたポリペプチドを、被検サンプル中のPCIGF抗原に対する抗体の存在を検出するために使用し得る。例えば、被検サンプルを、組換えタンパク質又は合成ペプチドのような少なくとも1つのポリペプチドを付着させておいた固相と共にインキュベートする。ポリペプチドは、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9及びそれらのフラグメントから成る群から選択される。これらを抗原/抗体複合体が形成される十分な条件下で十分な時間反応させる。インキュベーション後、抗原/抗体複合体を検出する。選択したアッセイ系次第で、検出を容易にする指示薬も使用し得る。別のアッセイフォーマットでは、被検サンプルを、本発明に記載のごとく産生させた組換えタンパク質を付着させた固相に接触させ、また、好ましくは指示薬で標識しておいたタンパク質特異的モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体に接触させる。抗体/抗原複合体が形成される十分な条件下で十分な時間インキュベーション後、固相を遊離相から分離し、固相中又は遊離相中のラベルを検出して、多量体ポリペプチド抗原に対する抗体の存在の指標とする。本発明で開示された組換え抗原を使用する別のアッセイフォーマットも考えられる。これらのアッセイフォーマットは、被検サンプルを、第一ソースに由来の少なくとも1つの抗原を付着させた固相に接触させ、固相と被検サンプルとを抗原/抗体複合体が形成される十分な条件下で十分な時間インキュベートし、次いで第一ソースとは異なる第二ソースに由来の標識抗原に固相を接触させる。例えば、大腸菌のような第一ソースに由来の組換えタンパク質を固相上の捕獲抗原として使用し、このように調製した固相に被検サンプルを添加し、望ましい又は必要な標準

インキュベーション及び洗浄段階後に、異なるソース（即ち、非大腸菌）に由来の組換えタンパク質を、後で検出される指示薬の一部として使用する。同様に、固相上の組換え抗原と指示薬相中の合成ペプチドとの組合せも可能である。第一ソースから産生または誘導されるP C I G Fに特異的な抗原を捕獲抗原として使用し、かつ、異なる第二ソースに由来のP C I G Fに特異的な抗原を使用するアッセイフォーマットも考えられる。従って、組換え抗原の種々の組合せ、合成ペプチド、精製タンパク質の使用、などは本発明の範囲内である。これらのアッセイ及びその他のアッセイは、共有米国特許第5,254,458号に記載されている。該特許の記載内容は参照によって本発明に含まれるものとする。

#### 【0197】

その他の種々の固相を使用する別の実施態様も考えられ、本発明の範囲に含まれる。例えば、固定化可能な反応複合体を負荷電ポリマーで固定化するイオン捕獲手順（欧州特許公開E P 0 3 2 6 1 0 0及びE P 0 4 0 6 4 7 3に記載）を本発明に従って使用し、高速溶液相免疫化学反応を惹起し得る。負荷電ポリマー/免疫複合体と予め処理した正荷電多孔質マトリックスとの間のイオン相互作用によって、固定化可能な免疫複合体を反応混合物の残りから分離し、先行文献に記載された種々のシグナル発生系を使用することによって検出する。このような系として例えば、公開されたE P O出願であるE P 0 2 7 3 1 1 5に記載のような化学発光シグナル測定に記載された系がある。

#### 【0198】

本発明方法はまた、マイクロ粒子（磁性又は非磁性）を固相とする全自動又は半自動の系を含むマイクロ粒子技術を使用する系に応用できる。このような系は、例えば、E P O出願公開E P 0 4 2 5 6 3 3及びE P 0 4 2 4 6 3 4に記載されている。

#### 【0199】

イムノアッセイ用走査型プローブ顕微鏡法（S P M）の使用も本発明のモノクローナル抗体を容易に応用できる技術である。走査型プローブ顕微鏡法、特に原子力顕微鏡法では、捕獲相、例えば本発明のモノクローナル抗体の少なくとも1つを固相に付着させ、走査型プローブ顕微鏡を使用して、固相の表面に存在する

ならば抗原/抗体複合体を検出する。走査型トンネリング顕微鏡法を使用するならば、多くのイムノアッセイ系が抗原/抗体複合体を検出するために通常は必要とするラベルの使用が不要になる。特異的結合反応をモニターするためにSPMを種々の方法で使用し得る。1つの実施態様では、特異的結合パートナーの一方の要素(本発明のモノクローナル抗体である分析物特異的物質)を走査に適した表面に付着させる。分析物特異的物質の付着は、平均的な当業者に公知の方法に従って、プラスチック又は金属表面の固相から成る試験ピースに吸着させることによって行う。又は、誘導プラスチック、金属、シリコンまたガラスの固相から成る試験ピースに特異的結合パートナー(分析物特異的物質)を共有結合によって付着させる方法を使用してもよい。共有結合による付着方法は当業者に公知であり、特異的結合パートナーを試験ピースに不可逆的に結合させる多様な手段が存在する。試験ピースがシリコン又はガラスの場合、特異的結合パートナーを付着させる前に表面を活性化しなければならない。また、技術及び化学を使用することによって試験ピースの表面に特異的結合パートナーを固定化するために高分子電解質相互作用を使用してもよい。好ましい付着方法は共有結合である。特異的結合要素を付着させた後、非特異的結合を最小に抑制するために表面を血清、タンパク質又はその他のブロッキング剤のような物質で更に処理してもよい。また、アッセイ目的に対する適性を確認するために製造現場又は使用時点で表面を走査してもよい。走査プロセスが試験ピースの特異的結合特性を変質させるとは考えられない。

#### 【0200】

本発明は固相の使用が好ましいことを開示したが、本発明の抗体、タンパク質及びペプチドのような試薬は非固相のアッセイ系にも使用し得る。これらのアッセイ系は当業者に公知であり、本発明の範囲に包含される。

#### 【0201】

アッセイに使用される試薬を、バイアル又は瓶のような1つ又は複数の容器を含む検査キットの形態で提供することも考えられる。各容器が、アッセイに使用されるプローブ、プライマー、モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体カクテル又はポリペプチド(例えば、組換え的に、合成的に産生又は精製されたもの

)のような個別の試薬を収容している。ポリペプチドは、配列番号6、配列番号7、配列番号8及びそれらのフラグメントから成る群から選択される。バッファ、対照、などのような平均的な当業者に公知の他の成分をこのような検査キットに含ませてもよい。また、採取可能な体液又は老廃物、例えば血液、尿、唾液及び糞便のような被検サンプルを採取する手段を含む検査キットを提供することも考えられる。このような採取用ツール(“採取材料”)としては、血液を採取し安定させるランセット及び吸取り紙又は布;唾液を採取し安定させるスワブ;尿又は糞便サンプルを採取し安定させるコップがある。採取材料、紙、布、スワブ、コップなどはサンプルを変質させたり又は不可逆的に吸着したりしないように任意に処理してもよい。また、標本の完全性を維持する助けになるように、保存剤、安定剤又は抗菌剤で採取材料を処理するか又はこれらを採取材料に含有させてもよい。手術又は針生検によって得られた被検標本を収集、安定化及び保存するように設計された検査キットも有用である。全部のキットを、別々に提供され得る2つの部品から構成し、一方の部品が標本の採取及び運搬、他方の部品が標本の分析に使用されるようにしてもよい。例えば、採取用部品は一般ユーザーに市販され、分析用部品は分析物の有無又は量を判定する試験所の技師のような一般ユーザー以外に提供される。更に、素人が使用するよう設計された被検標本の採取、安定化及び保存用キットが在宅使用向けに市販され、在宅使用後に被検サンプル分析研究所に送付されてもよい。

## 【0202】

### 抗体の *in vivo* 使用

本発明の抗体は *in vivo* で使用できる。即ち、前立腺疾患が疑われるか又は前立腺疾患に罹患した患者の体内に診断目的又は治療目的で注入され得る。*in vivo* 診断のために抗体を使用することは当業界で公知である。Sumertonら, Nucl. Med. Biol. 17:247-254 (1990) は、インジウム-IIIをラベルとして使用して癌胎児性抗原(CEA)を発現している腫瘍のラジオイムノシンチグラフィック造影に最適な抗体-キレート剤を記載している。Griffinら, J Clin Onc 9:631-640 (1991) は、再発結腸直腸癌が疑われる患者の腫瘍を検出するためにこ

の薬剤を使用することを記載している。磁気共鳴造影用ラベルとして常磁性イオンと共に同様の薬剤を使用することは当業界で公知である ( R . B . L a u f f e r , M a g n e t i c R e s o n a n c e i n M e d i c i n e 22 : 339 - 342 ( 1991 ) ) 。 P C I G F 抗原に対する抗体は、患者の病状診断また病期判定の目的で前立腺癌のような前立腺疾患の疑いのある患者に注入できると期待できる。使用されるラベルは選択された造影方法に依存する。平面走査又は単一光子放出演算トモグラフィー ( S P E C T ) にはインジウム - I I I 、テクネチウム - 99m、又はヨウ素 - 131のような放射性ラベルを使用できる。また、フッ素 - 19のようなポジトロン放出ラベルはポジトロン放出トモグラフィー ( P E T ) に使用できる。MRIには、ガドリニウム ( I I I ) 又はマンガン ( I I ) のような常磁性イオンを使用できる。前立腺内又は前立腺外のラベルの所在から、疾患の拡がりを判断できる。前立腺内のラベルの量から前立腺癌の有無を判断できる。

#### 【0203】

前立腺疾患に罹っていることが判明している患者の場合、P C I G F 抗原に対する抗体の注入は治療効果を有するであろう。抗体は組織又は器官の上又は中で発現されたP C I G F 抗原に結合することによって付着物質を使用しないで効果を発揮し得る。あるいは、治療効果を増強するために抗体を薬物、毒素又は放射性核種のような細胞障害性物質に結合させてもよい。G a r n e t t a n d B a l d w i n , C a n c e r R e s e a r c h 46 : 2407 - 2412 ( 1986 ) は、薬物 - モノクローナル抗体コンジュゲートの調製を記載した。P a s t a n ら , C e l l 47 : 641 - 648 ( 1986 ) は、種々の癌を治療するためにモノクローナル抗体にコンジュゲートされた毒素の使用を記載した。G o o d w i n a n d M e a r e s , C a n c e r , S u p p l e m e n t 80 : 2675 - 2680 ( 1997 ) は、正常組織の毒性を抑制しながら腫瘍に対する投与量を最大にする種々の戦略でイットリウム - 90 標識モノクローナル抗体を使用することを記載した。その他の公知の細胞障害性放射性核種は、銅 - 67、ヨウ素 - 131及びレニウム - 186である。これらはすべて、前立腺癌治療用P C I G F 抗原に対するモノクローナル抗体を標識するために使

用できる。

#### 【0204】

本発明の実施例を以下に示す。これらの実施例は本発明の範囲を代表するが本発明の範囲を限定しない。

#### 【0205】

##### 実施例

実施例1：前立腺組織ライブラリーPCIGF遺伝子特異的クローンの同定  
発現配列タグ(EST)又は転写造影のライブラリー比較

cDNAクローンインサートの部分配列、いわゆる“発現配列タグ”(EST)を、前立腺腫瘍組織、前立腺非腫瘍組織並びに腫瘍及び非腫瘍の多数の別の組織から作製されたcDNAライブラリーから入手し、データベース(LIFESEQ™データベース、Incyte Pharmaceuticals製、Palo Alto, CA)に遺伝子転写物イメージとして入力した。国際公開WO95/20681参照。(転写物イメージは、所与の組織ライブラリーに示されている遺伝子の各々に関するESTの番号表である。相互配列オーバーラップのEST共有領域をクラスターに分類する。代表5'ESTからクラスターにクローン番号を割当てて。しばしば、考察中のクラスターのコンセンサス配列を全自動クラスター化基準に適合しなかった別のESTの配列に比較することによって該クラスターを延長し得る。得られたクラスターの全部と単独ESTとを位置合せすることによって、コンセンサス配列のもとになるcontigが得られる。)次いで、転写物イメージを評価して、乳組織ライブラリーの主要な代表EST配列を同定した。これらのターゲットクローンを次に、ターゲットライブラリー中の数度(出現数)及びバックグラウンドライブラリー中の非存在に従ってランク付けした。クローンのバックグラウンド出現数が少なく数度が高いほど、高い研究優先度をクローンに与えた。ヌクレオチド1~538間のPCIGFの5'領域(配列番号1、又はそのフラグメント)に対応するESTが前立腺癌ライブラリーの53.8%(17のうち10)に、及び前立腺非癌組織ライブラリー(正常及び良性前立腺肥大)の40%(20のうち8)に見出された。対称的に、ヌクレオチド629~1201間のPCIGFの3'領域(配列番号1、又は

そのフラグメント)に対応するESTが前立腺癌の41.1%(17のうち7)に、及び前立腺非癌組織ライブラリー(正常及び良性前立腺肥大)の10%(20のうち2)に見出された。

#### 【0206】

##### 実施例2: PCIGF EST特異的クローンのシーケンシング

公知の方法に従って、色素ターミネーターを用いるジデオキシ終止シーケンシングを用いて、PCIGF遺伝子コンティグの最上流及び最下流のESTを含んでなるクローンのDNA配列を決定する(F. Sangerら、PNAS 74:5463(1977))。

#### 【0207】

pSPORT1(Life Technologies, Gaithersburg, MD)及びpINCY(Pharmaceuticals, Inc. Palo Alto, CAより入手可能)のようなベクターはインサートの3'及び5'ライゲーション接合部にちょうど隣接してユニバーサルプライミング部位を含むので、ユニバーサルプライマー、配列番号4及び配列番号5(各々、New England Biolabs, Beverly, MA及びApplied Biosystems Inc, Foster City, CA.)を用いて両方向にインサートをシーケンシングする。シーケンシング反応物をポリアクリルアミド変成ゲルに流し、Applied Biosystems 377 Sequencer(Applied Biosystems Inc, Foster City, CA.より入手可能)又はその他のシーケンシング装置により配列を決定する。

#### 【0208】

##### 実施例3: 核酸

###### A. 組織からのRNA抽出

前立腺組織及び前立腺以外の組織から全RNAを単離する。非限定例としてはKatoら(J. Virol. 61:2182-2191(1987))により報告されている塩化リチウム/尿素技術及びTRIzol(商標)(Gibco-BRL, Grand Island, NY)などの種々の方法を利用する。

## 【0209】

簡単には、組織を滅菌コニカルチューブ中氷上に置き、3M LiCl 10~15容量、6M 尿素、5mM EDTA、0.1M  $\beta$ -メルカプトエタノール、50mM トリス-HCl (pH7.5)を加える。Polytron (登録商標)ホモジナイザー (Brinkman Instruments, Inc., Westbury, NY)を用いて氷上で30~50秒間組織をホモジナイズする。溶液を15mlプラスチック遠心管に移し、-20で一晩放置する。チューブを0~4、9000xgで90分間遠心し、上澄を即座にデカンテーションする。3M LiCl 10mlを加え、チューブを5秒間振盪する。チューブを0~4、11000xgで45分間遠心する。デカンテーション、LiCl中に再懸濁及び遠心を繰り返し、最終的なペレットを空気乾燥し、1mM EDTA、0.5% SDS、10mM トリス-HCl (pH7.5) 2ml中に懸濁する。プロテイナーゼK (20mg/ml) 20 $\mu$ lを加え、溶液を時々混和しながら37で30分間インキュベートする。3M NaClの1/10容量を加え、溶液を振盪した後フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI) 2mlを収容する別のチューブに移す。チューブを1~3秒間振盪し、10、3000xgで20分間遠心する。PCI抽出を繰り返し、続いてクロロホルム/イソアミルアルコール (CI) 2回類似の抽出を行う。最終的な水溶液を予め冷却した、無水エタノール6mlを収容する15ml コレックスガラスチューブに移し、チューブをパラフィンで覆い、-20で一晩放置する。チューブを0~4、10000xgで30分間遠心し、即座にエタノール上澄をデカンテーションする。RNAペレットを75% 氷冷エタノール 10mlで4回洗浄し、室温で15分間空気乾燥する。RNAを10mM TE (pH7.6、1mM EDTA) 0.5mlに懸濁し、分光測光によりその濃度を決定する。RNAサンプルを等分し、エタノール沈殿として-70で保存する。

## 【0210】

アガロースゲル電気泳動によりRNAの品質を決定し (実施例5、ノーザンブロット分析を参照)、0.5 $\mu$ g/ml 臭化エチジウムで1時間染色する。完

全な rRNA を含有しない RNA サンプルを該実験より排除する。

【0211】

また別に、RT-PCR 分析に関しては、ウルTRASベック RNA 試薬 1 ml を 2.0 ml ポリプロピレンマイクロフュージ管に収容された微粉状組織 120 mg を加え、Polytron (登録商標) ホモジナイザー (Brinkman Instruments, Inc., Westbury, NY) を用いて 50 秒間ホモジナイズし、氷上で 5 分間放置する。次いでクロロホルム 0.2 ml を各サンプルに加え、続いて 15 秒間振盪する。サンプルをさらに 5 分間氷上に放置し、続いて 4、12000 x g で 15 分間遠心する。上層を回収し、別の RNアーゼ不含有の 2.0 ml マイクロフュージ管に移す。等容量のイソプロパノールを各サンプルに加え、溶液を氷上で 10 分間放置する。サンプルを 4、12000 x g で 10 分間遠心し、上澄をデカンテーションする。残りのペレットを冷 75% エタノールで 2 回洗浄し、振盪して再懸濁し、次いで再懸濁した物質を 4、7500 x g で 5 分間遠心してペレット状にする。最終的に、RNA ペレットを Speedvac (Savant, Farmingdale, NY) 中 5 分間乾燥し、RNアーゼ不含有水中で再構成する。

【0212】

B. 血液単核細胞からの RNA 抽出

以下のように Ficoll-Hypaque を用いて、遠心により患者の血液サンプルから単核細胞を単離する。全血 10 ml 容量を等容量の RPMI Medium (Gibco-BRL, Grand Island, NY) と混合する。次いでこの混合物を Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ) 10 ml の下に積層し、200 x g で 30 分間遠心する。単核細胞を含む Buffy-coat を取り出し、ダルベッコ PBS (Gibco-BRL, Grand Island, NY) で 50 ml に希釈し、混合物を 200 x g で 10 分間遠心する。2 回洗浄した後、得られたペレットをダルベッコ PBS に再懸濁し、最終容量を 1 ml にする。

【0213】

N. Katoら、J. Virology 61:2182-2191 (198

7) により報告されるように、単離された単核細胞からRNAを調製する。簡単には、ペレット状の単核細胞を最終容量1mlにし、PBS 250 $\mu$ lに再懸濁し、3M LiCl、6M 尿素、5mM EDTA、0.1M 2-メルカプトエタノール、50mM トリス-HCl (pH7.5) 2.5mlと混合する。得られた混合物をホモジナイズし、-20 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。ホモジネートをBeckman J2-21Mローター中0~4、10000rpmで45分間遠心する。次いで再懸濁工程及びペレット形成工程を繰り返す。ペレットを1mM EDTA、0.5% SDS、10mM トリス (pH7.5) 2mlに再懸濁し、プロテイナーゼK 400 $\mu$ gと共に振盪し、次いで攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートする。次いで3M NaClの1/10容量を加え、混合物を振盪する。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(PCI)で2サイクル抽出し、次いでクロロホルム/イソアミルアルコール(CI)で1回抽出してタンパク質を除去する。無水エタノール6mlを添加することによりRNAを沈殿させ、続いて-20 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。沈殿したRNAを遠心により回収した後、75% エタノールで4回ペレットを洗浄する。次いでペレット状にしたRNAを1mM EDTA、10mM トリス-HCl (pH7.5)を含有する溶液に溶解する。

#### 【0214】

前立腺以外の組織を陰性対照として用いる。ポリアデニル化RNAを単離するために、オリゴdTセルローススピンカラム(Pharmacia, Uppsala, SwedenのRediCol(商標))のような市販のキットを用いて、全RNAからmRNAをさらに単離できる。リボヌクレアーゼ保護アッセイにおいて分析するために、全RNA又はmRNAを溶解バッファー(5M グアニジンチオシアネート、0.1M EDTA、pH7.0)に溶解できる。

#### 【0215】

##### C. ポリソームからのRNA抽出

組織を4 $^{\circ}$ Cで生理食塩水中細かく刻み、6mM 2-メルカプトエタノールを含有するTK<sub>150</sub>M(150mM KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM トリスHCl、pH7.4)溶液中0.8M スクロースの2.5容量と混合す

る。B. Mechler、Methods in Enzymology 152:241-248(1987)に記載されるように、テフロン(登録商標)ガラスPotterホモジナイザー中100~200rpmで5ストローク、続いてDounceホモジナイザー中6ストロークで組織をホモジナイズする。次いでホモジネートを4、12000×gで15分間遠心し、核を沈殿させる。上澄をTK<sub>150</sub>M中0.8Mスクロース6mlと混合し、この混合物を38mlポリアロマーチューブにおいてTK<sub>150</sub>M中2.5Mスクロース4ml上に積層し、ポリソームを単離する。抽出分画上にさらにスクロースTK<sub>150</sub>M溶液を連続的に積層し、第1層2.05Mスクロース13mlの次に第2層1.3Mスクロース6mlがくる。4、90000×gで5時間、グラジエントを遠心してポリソームを単離する。次いでシリコン処理したピペットで1.3Mスクロース/2.05Mスクロースの境界面から分画を採り、等容量のTE(10mM トリスHCl、pH7.4、1mM EDTA)で希釈する。等容量の90のSDSバッファー(1% SDS、200mM NaCl、20mM トリスHCl、pH7.4)を加え、沸騰浴中2分間インキュベートする。次にプロテイナーゼK消化(50mg/ml)を用いて37で15分間タンパク質を消化する。3容量のフェノール・クロロホルム抽出物で精製し、続いて2M 酢酸ナトリウム(pH5.2)0.1容量及び100% エタノール2容量で-20で一晩沈殿させる。沈殿させたRNAを4、12000×gで10分間遠心して回収する。RNAを乾燥し、TE(pH7.4)又は蒸留水に再懸濁する。次いで再懸濁したRNAをPCIGF mRNAの存在に関してスロットプロット又はドットプロットハイブリダイゼーションアッセイに用いることができる(実施例6を参照)。

#### 【0216】

核酸及びタンパク質の品質は用いた調製法に依存する。標的分子の単離効率を最大にするために、各サンプルには異なる調製技術が必要であろう。これらの調製技術は通常の当業者の技術範囲内である。

#### 【0217】

実施例4：リボヌクレアーゼ保護アッセイ

#### A. 標識された相補的RNA (cRNA) ハイブリダイゼーションプローブ及び未標識センス鎖の合成

標識アンチセンス及び未標識センスリボプローブをSP6又はT7のような5' RNAポリメラーゼプロモーターを含有するPCIGF遺伝子cDNA配列から転写する。配列は適当なPCIGF cDNAインサートを含有するベクターに由来するか、又は5' RNAポリメラーゼプロモーター配列を組み込んだPCRプライマーを用いたインサートのPCR産生物に由来してよい。例えば、PCIGF遺伝子cDNA配列を含有し、対するSP6及びT7又はその他のRNAポリメラーゼプロモーターでフランキングされるpINCY又はpSPORT1プラスミドをQiagen Plasmid Purification Kit (Qiagen, Chatsworth, CA)を用いて精製する。次いでプラスミドDNA 10 µgをDde Iのような適当な制限酵素で、37 °Cで1時間切断して直線化する。直線化したプラスミドDNAをQIAprep Kit (Qiagen, Chatsworth, CA)を用いて精製し、供給者の指示書に従って、in vitro Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI)で、標識として(アルファ<sup>32</sup>P)CTP (Amersham Life Sciences, Inc. Arlington Heights, IL)又はビオチン化CTPのいずれかを組み込んだRiboprobe (登録商標)を用いて適当なプロモーターからのアンチセンス転写物の合成に使用する。センス鎖を作製するために、精製プラスミドDNA 10 µgをXba I及びNot Iのような制限酵素で切断し、前記のように適当なプロモーターから転写する。スピンカラムクロマトグラフィーによりセンス鎖及びアンチセンス鎖の双方を単離する。260 nmにおけるUV吸収により未標識センス鎖を測定する。

#### 【0218】

#### B. 標的に対する標識プローブのハイブリダイゼーション

液体窒素下、凍結組織を微粉状にし、Direct Protect (商標) Lysate RNase Protection Kit (Ambion, Inv., Austin, TX)の構成成分として利用できる溶解バッファー1m

1に溶解する。さらに組織ホモジナイザーを用いて分解することができる。加えて、陽性対照として使用するために、マウス肝臓ライゼートのセンス鎖の既知量の一連の希釈物を作製する。最終的に、可溶化組織又は希釈したセンス鎖45 $\mu$ lを；1)放射性標識プローブ $1 \times 10^5$  cpm、又は2)溶解バッファー5 $\mu$ l中非同位元素標識プローブ250 pg；のいずれかと直接混合する。37 $^{\circ}$ で一晩ハイブリダイゼーションを進行させる。T. Kaabacheら、Anal. Biochem. 232: 225 - 230 (1995)を参照。

#### 【0219】

##### C. RNアーゼ消化

RNアーゼA及びRNアーゼT1の溶液を用いてDirect Protect (商標)により、37 $^{\circ}$ で30分間プローブにハイブリダイズしないRNAを反応物から除去し、続いてサルコシルナトリウムの存在下プロテイナーゼK消化により除去する。次いで等容量のイソプロパノールを添加することにより、消化から保護されたハイブリダイズされたフラグメントを沈殿させ、-70 $^{\circ}$ で3時間放置する。12000 $\times$ gで20分間遠心することにより沈殿物を収集する。

#### 【0220】

##### D. フラグメント分析

沈殿物を色素負荷変成ゲル(80% ホルムアミド、10mM EDTA (pH 8.0)、1mg/ml キシレンシアノール、1mg/ml ブロモフェノールブルー)に溶解し、熱変成し、6% ポリアクリルアミド TBE、8M 尿素変成ゲルで電気泳動にかける。ゲルを造影し、STORM (商標) 保存蛍光オートラジオグラフィシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を用いて分析する。被験サンプルから得られたピーク面積を陽性対照センス鎖の既知希釈物から得られたピーク面積と比較することにより、フェムトグラム (fg) で現れる保護フラグメントバンドを定量する (セクションB参照、前出)。結果をPCIGF RNA分子/細胞で、及び造影評点として表す。非同位元素標識を用いる場合、プロットングによりハイブリッドをゲルから膜 (ナイロン又はニトロセルロース) に移し、次いでストレプトアビジンホスファターゼコンジュゲート及び化学ルミネサンス又は化学蛍光試薬

を使用する検出系を用いて分析する。

#### 【0221】

配列番号1及びそのフラグメント又は相補体の配列を含んでなる産生物の検出はPCIGF mRNAの存在の指標であり、これは前立腺疾患又は状態、例えば前立腺癌の診断を示唆している。

#### 【0222】

##### 実施例5：ノーザンブロットティング

ノーザンブロット技術を用い、ゲル電気泳動及び核酸ハイブリダイゼーションを用いてRNAの複合集団から特異的な大きさのRNAフラグメントを同定する。ノーザンブロットティングは当該分野で公知の技術である。簡単には、全RNA 5~10 µg (実施例3参照)を40 mM モルフィリノプロパンスルホン酸(MOPS) (pH 7.0)、10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA、2.2 Mホルムアルデヒド、50容量/容量%ホルムアミドを含有する溶液15 µl中65 °Cで15分間インキュベートする。変成RNAを負荷バッファー(50%グリセロール、1 mM EDTA、0.4%プロモフェノールブルー、0.4%キシレンシアノール)2 µlと混合し、40 mM MOPS (pH 7.0)、10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA及び2.2 Mホルムアルデヒドを含有する変成1.0%アガロースゲルに負荷する。60Vで1.5時間電気泳動し、RNAアーゼ不含有水ですすぐ。アルカリ性キャピラリー下方移動法(Chomczynski, Anal. Biochem. 201:134-139 (1992))を用いて、RNAをゲルからナイロン膜(BrightStar-Plus, Ambion, Inc., Austin, TX)に1.5時間移す。1X SSCでフィルターをすすぎ、Stratalinker(商標)(Stratagene, Inc., La Jolla, CA)を自動架橋モードで用いてRNAをフィルターに架橋し、15分間乾燥する。次いで膜を、予め加熱したハイブリダイゼーション溶液(5X SSC、50%ホルムアミド、5X デンハーツ溶液、100 µg/ml 変成サケ精子DNA)20 mlを含有するハイブリダイゼーションチューブに入れ、42 °Cのハイブリダイゼーションオープン中で少なくとも3時間インキュベートする。プロットをプレハイブリ

ダイズするが、製造者の指示書に従ってRandom Primer DNA Labeling System (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) を用いて、PCIGFインサートフラグメント (pSPOTR又はpINCYクローン又は別の適合するクローンをXbaIXbaI及びNotIで消化することにより得られる) を用いて<sup>32</sup>P標識ランダムプライミングされたプローブを作製する。プローブの半分を10分間煮沸し、即座に氷上で冷却し、ハイブリダイゼーションチューブに加える。42

で少なくとも12時間ハイブリダイゼーションを実施する。ハイブリダイゼーション溶液を捨て、フィルターを3X SSC、0.1% SDS 30mlで42で15分間、続いて3X SSC、0.1% SDS 30mlで42で15分間洗浄する。フィルターをサランラップで包み、Kodak XAR-Omatフィルムに8~96時間暴露し、フィルムを分析用に現像する。配列番号1、及びそのフラグメント又は相補体から選択される配列に対応するmRNAの高レベル発現はPCIGF mRNAの存在の指標であり、これは前立腺組織疾患又は状態、例えば前立腺癌の診断を示唆している。

#### 【0223】

##### 実施例6：ドットプロット/スロットプロット

ドット及びスロットプロットアッセイは核酸の複合混合物中の特異的核酸配列の存在を評価するための迅速な方法である。このようなアッセイを実施するために、RNA 50 µgまでを50%ホルムアミド、7%ホルムアルデヒド、1X SSC 50 µlに混合し、68で15分間インキュベートし、次いで氷上で冷却する。次いで、20X SSC 100 µlをRNA混合物に加え、真空下、調製ニトロセルロース又はナイロン膜を有するマニホルド装置に負荷する。膜を水、20X SSCに1時間浸し、20X SSCで予め湿らせたワットマン#3濾紙2枚の上に載せ、スロットプロット又はドットプロット真空マニホルド装置に負荷する。実施例4、前出に記載されているように調製及び標識されたプローブでスロットプロットを分析する。配列番号1及びそのフラグメント又は相補体から選択される配列に対応するmRNAの検出はPCIGFの存在の指標であり、前立腺疾患又は状態、例えば癌の診断を示唆する。

## 【0224】

実施例5及び6で記載される方法に利用できるその他の方法及びバッファーは、本明細書にて特記しない場合、当該分野で公知であり、J. Sambrookら、前出（これは出展明示により本明細書の一部とする）に記載されている。

## 【0225】

実施例7：in situ ハイブリダイゼーション

この方法は、検出可能な核酸ハイブリダイゼーションプローブを用いて細胞における特異的標的核酸配列を直接検出するのに有用である。

## 【0226】

パラホルムアルデヒド又はグルタルアルデヒドのような架橋により固定可能な物質で、細胞のRNA保有を最大にするように組織を調製する。L. Angererら、Methods in Cell Biol. 35:37-71 (1991) 参照。簡単には、50mM リン酸ナトリウム、pH7.5中1% グルタルアルデヒド5容量以上の中に、組織を4 で30分間置く。溶液を新鮮なグルタルアルデヒド溶液（50mM リン酸ナトリウム中1% グルタルアルデヒド、pH7.5）と交換し、さらに30分間固定する。固定溶液はおよそ0.375% NaClのオスモル濃度を有していなければならない。組織を等張NaClで1回洗浄し、リン酸塩を除去する。

## 【0227】

次いで固定した組織を一連の漸増濃度のエタノールで各15分間脱水する：50%（2回）、70%（2回）、85%、90%次いで100%（2回）。次に、キシレンを2回交換して組織を室温で各20分間浸す。次いで組織をキシレン及びパラフィン1：1混合物を2回交換して各60 で20分間；次いでパラフィンを最終3回交換して各15分間、組織を浸す。

## 【0228】

次に、標準的なマイクロトームを用いて組織を5  $\mu$ mに切断し、予め3-アミノプロピルトリエトキシシランのような組織付着剤で処理したスライドに載せる。

## 【0229】

10分間キシレン浸漬、及び一連の漸減濃度のエタノール：99%2回、95

%、85%、70%、50%、30%、次いで蒸留水2回で再度脱水することにより、パラフィンを組織から除去する。切片を0.2M HClで10分間予め処理し、2µg/ml プロテイナーゼKで、37℃で15分間浸透できるようにする。

#### 【0230】

PCIGF遺伝子プラスミドから転写した標識リボプローブ(実施例4参照)を調製した切片にハイブリダイズし、3X標準生理食塩水抽出物及び50%ホルムアミド中56℃で一晩インキュベートする。2X標準生理食塩水クエン酸塩及び50%ホルムアミドで洗浄して過剰なプローブを除去し、続いて100µg/ml RNアーゼAを用いて37℃で30分間消化する。顕微鏡下紫外(UV)光の照明で蛍光プローブを可視化する。細胞質の蛍光はPCIGF mRNAの指標である。また別に、切片をオートラジオグラフィーにより可視化できる。

#### 【0231】

実施例：8逆転写PCR

A. 1工程RT-PCRアッセイ

公知の方法を用いる逆転写PCRにより標的特異性プライマーを前記の標的配列を検出するように設計する。1工程RT-PCRを1回の反応混合物のRT及びPCRの双方を実施する一連の方法である。50mM(N,N'-ビス[2-ヒドロキシエチル]グリシン)、pH8.15、81.7mM KOAc、33.33mM KOH、0.001mg/ml ウシ血清アルブミン、0.1mM エチレンジアミン四酢酸、0.02mg/ml NaN<sub>3</sub>、8重量/容量%グリセロール、150µM 各dNTP、0.25µM 各プライマー、5単位rTthポリメラーゼ、3.25mM Mn(OAc)<sub>2</sub>及び標的RNA(実施例3参照)5µlを含有する反応混合物200µl中で該方法を実施する。RNA及びrTthポリメラーゼ酵素はMn(OAc)<sub>2</sub>の存在下では不安定であるので、Mn(OAc)<sub>2</sub>は標的を添加する直前に添加すべきである。cDNA合成及び熱循環の最適条件は当業者に容易に決定できる。反応物をPerkin-Elmer Thermal Cycler 480中でインキュベートする。

有用であることが解っている条件には、60 ~ 70 で15 ~ 45分間、及び94 で30 ~ 45増幅サイクル、1分；55 ~ 70 、1分；72 、2分でのcDNA合成などがある。1工程RT-PCRはまたTaqポリメラーゼ及び逆転写酵素を用いる二重酵素法、例えばMMLV（モロニーネズミ白血球ウイルス）又はAMV（鳥類骨髄芽球症ウイルス）RT（逆転写）酵素を用いて実施することもできる。

#### 【0232】

##### B. 従来のRT-PCR

また別に、以下のようにK. Q. Huら*Birology* 181:721-726 (1991)に記載される従来の2工程RT-PCR反応を実施する10 mM トリスHCl、pH8.3、5 mM MgCl<sub>2</sub>、500 μM dNTP、20単位 RNアシン、1 μM アニチセンスプライマープライマープライマー及び25単位 AMV又はMMLV逆転写酵素を含有する反応混合物25 μl中。抽出されたmRNAを転写する。逆転写は37 ~ 45 で30 ~ 60分、続いて95 で5分さらにインキュベートしてRTを不活性化する。10 mM トリスHCl (pH8.3)、5 mM KCl、200 μM dNTP、0.5 μM 各プライマー及び2.5単位 Taqポリメラーゼを含有する最終PCR反応物50 μl中cDNA10 μlを用いてPCRを実施する。cDNA合成及び熱循環の最適条件は当業者に容易に決定できる。反応物をPerkin-Elmer Thermal Cycler 480又はその他の適合する装置中でインキュベートする。有用であることが解っている条件には、30 ~ 45増幅サイクル(94 、1分；55 ~ 70 、1分；72 、2分)、最終伸長(72 、10分)、及び4 で浸漬などがある。

#### 【0233】

##### C. PCRフラグメント分析

次いでSYBR（登録商標）Green I核酸ゲル染色（Molecular Probes, Eugene, OR）を用いるゲル電気泳動を使用して大きさを決定することにより正確な産生物を確認でき、STORM造影系を使用して造影できるか、又はPCR産生物の内部配列に対する標識プローブを使用してサ

ザンドットもしくはスロットプロット分析により確認することもできる。プローブはまたモルフォリノ又はペプチド核酸類似体(PNA)のようなポリヌクレオチド類似体でもよい。配列番号1及びそのフラグメント又は相補体から選択される配列を含んでなる産物の検出はPCIGF mRNAの存在の指標であり、これは前立腺組織疾患又は状態、例えば前立腺癌の診断を示唆している。

#### 【0234】

実施例9：OH-PCR

##### A．プローブ選別及び標識

標的特異的プライマー及びプローブを、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションPCRにより前記の標識配列を検出するように設計する。1992年6月25日公開の国際公開番号WO92/10505及び1992年7月9日公開のWO92/11388は各々5'及び3'末端でオリゴヌクレオチドを標識する方法を教示している。オリゴヌクレオチドを標識するためのある公知の方法によれば、標識ホスホラミダイト試薬を調製し、これを用いて合成中に標識にオリゴヌクレオチドを添加する。例えばN.T.Thuongら、Tet.Letters 29(46):5905-5908(1988);又はJ.S.Cohenら、公開米国特許出願07/246688(NTIS ORDER No.PAT-APPL-7-246688)(1989)を参照。好ましくは、プローブをその3'末端で標識し、PCRへの関与及び望ましくない伸長産物の形成を防御する。1工程RT-PCRでは、プローブはプライマーのTM以下で少なくとも15のTMを有するべきである。プライマー及びプローブを、検出標識を有しても、有さなくても、標準的なホスホラミダイト化学及び/又は当業者に公知の合成後標識法を用いて特異的結合メンバーとして利用する。

#### 【0235】

##### B．1工程オリゴハイブリダイゼーションPCR

50mM(N,N,-ビス[2-ヒドロキシエチル]グリシン)、pH8.15、81.7mM KOAc、33.33mM KOH、0.01mg/ml ウシ血清アルブミン、0.1mM エチレンジアミン四酢酸、0.02mg/ml NaN<sub>3</sub>、8重量/容量% グリセロール、150µM 各dNTP、0.

25  $\mu$ M 各プライマー。3.75 nM プローブ、5単位 rTthポリメラーゼ、3.25 mM Mn(OAc)<sub>2</sub>及び5  $\mu$ l 標的物質の血液等価物を含む反応物200  $\mu$ lでOH-PCRを実施する。RNA及びrTthポリメラーゼ酵素はMn(OAc)<sub>2</sub>存在下では不安定なので、Mn(OAc)<sub>2</sub>は標的物質を添加する直前に添加すべきである。反応物をPerkin-Elmer Thermal Cycler 480中でインキュベートする。cDNA合成及び熱循環に最適な条件は、当業者に容易に決定できる。有用であることが解っている条件には、cDNA合成(60、30分)、30~45増幅サイクル(94、40秒; 55~70、60秒; 55~70、60秒)、オリゴハイブリダイゼーション(97、5分; 15、5分; 15 浸漬)などがある。適当な反応産物は少なくとも1つのPCR産物の鎖及び内部でハイブリダイズされたプローブを含有する。

#### 【0236】

##### C. OH-PCR産物分析

増幅反応産物をLCx(登録商標)Analyzerシステム(Abbott Laboratories, Abbott Park, ILより入手可能)で検出する。簡単には、適切な反応産物をPCR産生鎖又はハイブリダイゼーションプローブのいずれかの捕捉部位で抗体標識微粒子により捕捉され、複合体はプローブ又はPCR鎖のいずれかの検出可能部位にコンジュゲートする検出可能な抗体の結合により検出する。内部プローブにハイブリダイズするPCR鎖を含有する複合体のみを検出する。そしてこの複合体の検出はPCIGF mRNAの存在の指標であり、前立腺疾患又は状態、例えば前立腺癌の診断を示唆する。

#### 【0237】

増幅された、又は増幅されていないPCIGF由来の核酸配列の存在を検出するための当業者に使用できる、及び/又は修飾できる多くのその他の検出様式には、非限定例としては、リガーゼ連鎖反応(LCR、Abbott Laboratories, Abbott Park, IL); Qベータレプリカーゼ(Gene-Tark(商標)、Naperville, Illinois)、分岐鎖反応(Chiron, Emeryville, CA)及び鎖置換アッセイ(B

ecton Dickinson, Research Triangle Park, NC)がある。

#### 【0238】

実施例10：合成ペプチド産生

合成ペプチドを設計し、次いでPCIGFペプチド配列[配列番号6(実施例1を参照)]の予想アミノ酸配列に基づいて調製する。とりわけ、配列番号7、配列番号8及び配列番号9のペプチドなどの配列番号6に由来する多くのPCIGFペプチドを調製する。Symphony Peptide Synthesizer(Rainin Instrument Co, Emeryville, CAより入手可能)又はFMOC化学、標準サイクル及びin-situ HBTU活性化を用いる同様の装置で全てのペプチドを合成する。切断及び脱保護条件は以下のとおりである：切断試薬(77.5容量/容量% トリフルオロ酢酸、15容量/容量% エタンジチオール、2.5容量/容量% 水、5容量/容量% チオアニソール、1-2重量/容量% フェノール)2.5ml容量を樹脂に加え、室温で2~4時間攪拌する。次いで口液を除去し、切断試薬から冷ジエチルエーテルでペプチドを沈殿させる。各ペプチドを濾過し、水/アセトニトリル/0.1% TFAグラジエントを用いて逆相調製用HPLCにより精製し、凍結乾燥する。質量分析(実施例12参照)により産生物を確認する。

#### 【0239】

以下のような自己酸化条件を用いてジスルフィド結合形成を実施する：ペプチドを最低容量(およそ10ml)のDMSOに溶解した後0.3~0.8mg/mlの濃度までバッファー(0.1M トリスHCl、pH6.2)を加える。ジスルフィド結合の形成が完了するまでHPLCにより反応を経過観察し、続いて水/アセトニトリル/0.1% TFAグラジエントを用いる逆相調製用HPLCに供し、凍結乾燥する。次いで質量分析(実施例12参照)により産生物を確認する。

#### 【0240】

精製されたペプチドをKeyhole Limpet Hemocyanin又はその他の免疫反応性分子をグルタルアルデヒドと共にアジュバントと混合し

たものにコンジュゲートし、動物に注入する。

【0241】

実施例11a：プラスミド577細胞系におけるタンパク質の発現

A．PCIGF発現プラスミドの構築

1995年6月7日出願の米国特許出願番号08/478073（出展明示により本明細書の一部とする）に記載されるプラスミド577を永久細胞系において分泌抗原を発現するように構築した。このプラスミドは以下のDNAセグメントを含有する：（a）細菌性ベータラクタマーゼ及びDNA複製起点を含有するpBR322；（b）HSV-1チミジンキナーゼプロモーター及びポリA付加シグナルの調節下ネオマイシン抵抗性遺伝子の発現を指示する1.8kbのカセット；（c）シミアンウイルス40（SV40）プロモーター及びポリA付加シグナルの調節下ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子の発現を指示する1.9kbのカセット；（d）シミアンウイルス40T-Agプロモーター及び転写エンハンサー、B型肝炎表面抗原（HBsAg）エンハンサーI続いてポリA付加シグナルを提供する単純疱疹ウイルスI（HSV-1）ゲノムの調節下修飾C型肝炎ウイルス（HCV）E2タンパク質に融合するウサギ免疫グロブリン重鎖シグナル配列の発現を指示する3.5kbのカセット；（e）このプラスミドにおいて機能しないSV40ゲノム後期領域の残りの0.7kbフラグメント。分子生物学の当業者に公知の標準的な方法によりベクターの全てのセグメントを組み立てた。

【0242】

以下のように、プラスミド577のC型肝炎E2タンパク質コーディング配列を配列番号1及びそのフラグメント又は相補体から選択されるPCIGFのポリヌクレオチドのコーディング配列と置換することにより分泌可能なPCIGFポリペプチドを発現するためのプラスミドを構築する。プラスミド577をXbaIで消化してC型肝炎E2遺伝子フラグメントを遊離する。得られたプラスミドバックボーンにより、発現されたタンパク質を細胞の分泌経路に指向させるウサギ免疫グロブリン重鎖シグナル配列の下流にPCIGF cDNAの挿入が可能になる。PCIGF cDNAフラグメントは標準的な方法を用いるPCRによ

り作製される。センスPCRプライマー配列にコード化されるのはXbaI部位であり、すぐ後に培養液中のシグナルプロテアーゼプロセッシング、効果的な分泌及び最終産物の安定を促進するアミノ酸配列Ser-Asn-Glu-Leu(「SNEL」)をコードする12ヌクレオチド配列が続く。この12ヌクレオチド配列のすぐ後に、プライマーはPCIGF遺伝子のアミノ酸をコードする鋳型配列に相補的なヌクレオチドを含有する。アンチセンスプライマーは停止コドンの直前に以下の8個のアミノ酸: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys(配列番号10)をコードする配列を組み込む。この配列内にPCIGFポリペプチド産物を分析及び精製を補助する認識部位が組み込まれる。抗FLAG M2(Eastman Kodak, Co., New Haven, CT)と称する市販により入手可能なモノクローナル抗体により認識される認識部位(「FLAG」と称する)、並びにその他の適合配列及びその対応する抗体を利用できる。例えば、Perkin-Elmer-Cetusより入手したGeneAmp(登録商標)試薬を用いて供給者の指示書によりPCRを実施する。PCRプライマーを最終濃度0.5 µMで使用する。反応物100 µl中PCIGFプラスミド鋳型で、35サイクル(94、30秒; 55、30秒; 72、90秒)、続いて72、10分の伸長サイクルでPCRを実施する。

#### 【0243】

B. ジヒドロ葉酸リダクターゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞のトランスフェクション

前出のプラスミドをCHO/dhfr細胞にトランスフェクトする(DXB-111、Uriaciorら、PNAS 77:4451-4466(1980))。これらの細胞は受け入れ番号CRL 9096で、A.T.C.C., 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20825より入手できる。P.L.Felgnerら、PNAS 84:7413-7417(1987)に記載されるカチオン性リポソーム媒介法を用いてトランスフェクションを実施する。とりわけ、CHO/dhfr細胞を10%ウシ胎児血清、L-グルタミン(1mM)を含有するHamのF-12培地で培養し、フラスコあたり5~8×10<sup>5</sup>セルの密度でフラスコに新たに播種する。トランスフ

エクシヨンのために細胞を60から80%の単層集密度まで成長させる。プラスミドDNA 20  $\mu$ gをOpti-MEM I培地1.5mlに加え、リポフェクチン試薬(Gibco-BRL; Grand Island, N.Y.) 100  $\mu$ lを別のOpti-MEM I培地1.5mlに加える。2つの溶液を混合し、室温で20分間インキュベートする。細胞から培養培地を除去した後、Opti-MEM I培地5mlで3回細胞をすすぐ。次いでOpti-MEM I-リポフェクチン-プラスミドDNA溶液を細胞に積層する。細胞を37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートし、その後選別前にさらに24時間、Opti-MEM I-リポフェクチン-DNA溶液を培養培地と交換する。

#### 【0244】

##### C. 選別及び増幅

トランスフェクションに1日後、細胞を1:3継代培養し、dhfr/G418選別培地(以後「F-12 マイナスメジウムG」と称する)でインキュベートする。選別培地はL-グルタミン含有、ヒポキサンチン、チミジン及びグリシン不含HamのF-12(JRH Biosciences, Lenexa, Kansas)及びG418(Gibco-BRL; Grand Island, N.Y.)mlあたり300  $\mu$ gである。25cm<sup>2</sup>あたり5mlの培地容積対表面面積比を維持する。およそ2週間後、DHFR/G418細胞を広げて継代培養し、続けてF-12 マイナスメジウムG中に保持する。

#### 【0245】

メソトレキセートを用いるDHFR<sup>+</sup>、G418<sup>+</sup>細胞の段階的選別により(R. Schimke, Cell 37:705-713(1984)参照)、トランスフェクトされたPCIGF cDNA配列の各々を増幅する。150nMメソトレキセート(MTX)(Sigma, St. Louis, MO)を含有するF-12 マイナスメジウムGと共に、抵抗性コロニーが出現するまでおよそ2週間、細胞をインキュベートする。さらに5  $\mu$ M MTXで150nMの適用細胞を選別することにより遺伝子増幅を達成する。

#### 【0246】

##### D. 抗原産生

5  $\mu$ M MTXを補充したF - 12マイナスメジウムGを5% CO<sub>2</sub>中37で12~24時間、ちょうど全面成長した単層に積層する。成長培地を除去し、細胞をダルベッコリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)(カルシウム及びマグネシウムを含む)(Gibco-BRL; Grand Island, NY)で3回すすぎ、存在し得る残留培地/血清を除去する。次いで細胞をVASカスタム培地(L-グルタミン含有、HEPES含有、フェノールレッド不含のVASカスタム処方、JRH Bioscienceより入手可能; Lenexa, KS, 製品番号52-08678P)と共に5% CO<sub>2</sub>中37で1時間インキュベートする。次いで産生するためにTフラスコあたり5mlで細胞をVASに積層する。インキュベーションの7日後培地を除去し、保持し、次いで回収2、3及び4で精製するまで凍結する。7日以後に回収する3つでは単層をVASで積層する。

#### 【0247】

##### E. 前立腺組織遺伝子PCIGF抗原発現の分析

PCIGFポリペプチド構築物を発現する細胞からのVAS上澄を当該分野で公知の標準的な方法及び試薬(ラエムリ不連続ゲル)を用いるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)か、又は質量分析のいずれかにより分析する。

#### 【0248】

##### F. 精製

ヒドラジン結合によりアガロースに共有結合により付着した抗FLAG M2モノクローナル抗体を含んでなるアフィニティマトリックス(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより、FLAG配列を含有するPCIGFポリペプチドの精製を行う。アフィニティ精製を行う前に、プールしたローラーボトルからのVAS培地回収物のタンパク質をSephadex G-25(Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden)カラムを用いて50mM トリスHCl(pH7.5)、150mM NaClバッファー中に交換する。このバッファー中のタンパク質を抗FLAG M2抗体ア

フィニティーカラムに適用する。50mM トリスHCl (pH7.5)、150mM NaClバッファーを用いてカラムを洗浄し、非結合タンパク質を溶出する。50mM トリスHCl (pH7.5)、150mM NaCl中過剰のFLAGペプチドを用いて結合タンパク質を溶出する。ゲル電気泳動又はHPLCにより精製されたPCIGFポリペプチドから過剰のFLAGペプチドを除去できる。

#### 【0249】

プラスミド577をこの実施例で使用するが、その他の適合する発現系、例えばCMVに試薬及び/又は技術に適切な修飾を加えて本発明で使用できることは当業者に周知であり、通常の技術者の技術範囲内である。

#### 【0250】

PCIGF遺伝子のコーディング領域を含有する最大のクローンインサートを、次に(i)例えばサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター及び/又はタンパク質発現及び検出を補助するタンパク質可融性配列を含有し得る真核性発現ベクター又はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)及びCMP-KDOシンターゼ(CKS)又はタンパク質配列を発現するためのその他のタンパク質融合遺伝子を含有する細菌性発現ベクター(ii)のいずれかにサブクローニングする。SODの融合配列を含有するポリペプチドの産生に有用な方法及びベクターは1986年10月1日公開のEPO0196056に記載されており、これは出展明示により本明細書の一部とし、CKSの融合配列を含有するポリペプチドは1988年9月13日公開のEPO公開番号0332961に記載されており、これもまた出展明示により本明細書の一部とする。このように精製したタンパク質を、非限定例としては動物免疫実験、固相イムノアッセイ等の種々の技術に用いることができる。

#### 【0251】

実施例11b: pcDNA3.1/MyC-Hisを用いる細胞系におけるタンパク質の発現

##### A. PCIGF発現プラスミドの構築

従来たいの哺乳動物細胞系による分泌抗原の発現に用いられたプラスミド

p c D N A 3 . 1 / M y c - H i s ( C a t . # V 8 5 5 - 2 0 , I n v i t r o g e n , C a r s b a d , C A ) を構築した。発現されたタンパク質インサートをmyc-hisペプチドタグに融合する。myc-hisタグ(配列番号11)は抗myc又は抗hisアフィニティーカラム又はメタロタンパク質結合タンパク質のいずれかを用いることにより発現された融合タンパク質を精製するのに有用であるc-myc腫瘍性タンパク質エピトープ及びポリヒスチジン配列を含んでなる。

#### 【0252】

分泌可能なP C I G F タンパク質を発現するためのプラスミドを、配列番号1及びそのフラグメント又は相補体から選択されるP C I G F ポリヌクレオチド配列を挿入することにより構築する。P C I G F 発現プラスミドを構築する前に、最初に以下のようにP C I G F c D N A を p C R (登録商標) - B l u n t ベクターにクローニングする：

標準的な方法を用いてP C R によりP C I G F c D N A フラグメントを作製する。例えば、製造者に指示されるように、S t r a t a g e n e (登録商標) , I n c . ( L a J o l l a , C A ) の方法及び試薬によりP C R を実施する。P C R プライマーは最終濃度0.5 μ M で使用する。50 μ l 反応物中、P C I G F プラスミド鑄型(実施例2参照)で、p f u ポリメラーゼ5単位を用いるP C R (S t r a t a g e n e , L a J o l l a , C A ) を30サイクル(94、1分; 65、1.5分; 72、3分)、続いて72で8分の伸長サイクルを実施する。(センスP C R プライマー配列はP C I G F 遺伝子インサートのすぐ上流のp I N C Y ベクターに相補的であるか、又は5' E c o R I 制限部位を組み込むヌクレオチド、下流に隣接するタンパク質翻訳コンセンサスイニシエーター、及びP C I G F c D N A インサートのたいていの5'末端と同一のセンスである3'核酸配列を含んでなる。アンチセンスP C R プライマーは5' N o t I 制限配列及び3'のたいていの、フレーム内停止コドンのすぐ上流のP C I G F c D N A インサートの3'末端に相補的である配列を組み込む。) 得られたプラント末端P C R 産生物5 μ l を直線化p C R - B l u n t ベクター(I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) 25 ng にライゲートし、

ベクターの致死 *ccdB* 遺伝子を妨害する。One Shot (商標) Transformation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、製造者の指示書に従って、得られたライゲートされたベクターを TOP10 大腸菌 (*E. coli*) (Invitrogen, Carlsbad, CA) に形質転換する。形質転換した細胞を LB-Kan (50 µg/ml カナマイシン) 選別プレート上 37 °C で成長させる。妨害された *ccdB* 遺伝子を有するプラスミドを含有する細胞のみが形質転換後成長する (Grat, S. G. N., PNAS 87: 4645 - 4649 (1990))。形質転換されたコロニーを採り、LB-Kan ブロス 3ml 中 37 °C で成長させる。QIAprep (登録商標) (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA) 法を用いて製造者に指示されるようにプラスミド DNA を単離する。EcoRI 又は SnaBI、及び NotI 制限酵素で DNA を切断し、PCIGF インサートフラグメントを遊離する。フラグメントを 1% Seaken (登録商標) LE アガロース / 0.5 µg/ml 臭化エチジウム / TE ゲルに流し、UV 照射により可視化し、切除し、QIAquick (商標) (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA) を用いて供給者の指示書に指示されるように精製する。

#### 【0253】

p cDNA 3.1 / Myc - His プラスミド DNA を EcoRI 又は SnaBI 及びプラスミド DNA のポリリンカー領域の NotI で消化することにより直線化する。得られたプラスミド DNA バックボーンにより、哺乳動物細胞においてタンパク質の発現を指示する CMV プロモーターの下流で PCIGF 精製 cDNA フラグメント (前出) の挿入が可能になる。ライゲートされたプラスミドを製造者に指示されるように、DH5 アルファ (商標) 細胞 (Gibco BRL Grand Island, NY) に形質転換する。簡単には、PCIGF インサートを含有する p cDNA 3.1 / Myc - His 10 ng をコンピテント DH5 アルファ細胞 50 µl に加え、内容物を穏やかに混合する。混合物を氷上で 30 分間インキュベートし、37 °C で 20 秒間熱ショックを与え、さらに 2 分間氷上に置く。LB 培地 0.95 ml を添加したとき、混合物を 225 r

pmで振盪しながら37℃で1時間インキュベートする。次いで形質転換した細胞を100mm LB/Amp (50 µg/ml アンピシリン) プレートに載せ、37℃で成長させる。コロニーを採り、LB/Ampブロスで成長させる。QIAprep Kitを用いてプラスミドDNAを精製する。インサートの存在を、非限定例としては制限消化及びゲル分析などの当業者に公知の方法を用いて確認する。(J. Sambrookら、前出。)

#### B. ヒト胚性腎細胞293細胞のトランスフェクション

セクションA (前出) に記載したPCIGF発現プラスミドでDH5アルファ細胞を再び形質転換し、LB/アンピシリン寒天で平板培養し、前記するように10mlのLB/アンピシリンブロス中で増殖させる。プラスミドを、QIAfilter (商標) Maxiキット (Qiagen, Chatsworth, CA) を使用して精製し、HEK293細胞にトランスフェクトした (F. L. Grahamら, J. Gen. Vir. 36:59-72 (1977))。これらの細胞はA.T.C.C., 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD20852から受け入れ番号CRL1573で入手できる。トランスフェクションは、P. Hawley-Nelsonら, Focus 15:73 (1993) に記載されたカチオン性リポフェクタミン介在法で行う。より詳細には、HEK293細胞を、10%ウシ胎仔血清 (FBS)、L-グルタミン (2mM) を補充した10mlのDMEM培地で培養し、100mmの培養皿に1培養皿あたり $9 \times 10^6$ セルの密度で新たに播種する。トランスフェクション用細胞を37℃で70%~80%の単層集密度まで増殖させた。プラスミドDNA8 µgをOpti-MEM I (登録商標) 培地 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 800 µlに添加し、Lipofectamine (商標) 試薬 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 48~96 µlを別のOpti-MEM I培地800 µlに添加する。2つの溶液を混合し、室温で15~30分間インキュベートする。細胞から培養培地を除去した後、血清不含DMEM10mlで1回細胞を洗浄する。Opti-MEM I-Lipofectamine-プラスミドDNA溶液を血清不含DMEM6.4mlで希釈し、次いで細胞に積層する。細胞を37℃で5時間

インキュベートし、その後さらに20% FBSを含むDMEM 8mlを添加する。18~24時間後、古い培地を吸引し、5% FBSを含む新しいDMEM 5mlを細胞に積層する。トランスフェクションの72時間後、PCIGF遺伝子活性に関して上澄及び細胞抽出物を分析する。

#### 【0254】

##### C. 前立腺組織遺伝子PCIGF抗原発現の分析

培養上澄(前出)をサイトチューブに移し、氷上で保持する。ダルベッコPBS 10mlで2回洗浄してHEK293細胞を回収し、CAT溶解バッファー(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 1.5mlを添加して溶解し、続いて室温で30分間インキュベートする。ライゼートを1.7mlポリプロピレンマイクロフュージ管に移し、1000×gで10分間遠心する。上澄を新たなサイトチューブに移し、氷上で保存する。細胞からの上澄のアリコート及びPCIGFポリペプチド構築物を発現する細胞のライゼートをPCIGF組換えタンパク質の存在に関して分析する。当該分野で公知の標準的な方法及び試薬を用いて、アリコートをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけることができる。(J. Sambrookら、前出)次いでこれらのゲルを固体培地、例えばニトロセルロース、ニトラン等にプロットングし、抗mycエピトープもしくは抗ヒスチジンモノクローナル抗体(Invitrogen, Carlsbad, CA)又は抗PCIGFポリクローナル血清を用いるウェスタンプロットング技術を使用してPCIGFポリペプチドバンドを可視化できる(実施例4参照)。また別に、発現したPCIGF組換えタンパク質を質量分析により分析できる(実施例12参照)。

#### 【0255】

##### D. 精製

ポリヒスチジン残基に特異的に結合するニッケル荷電アガロース樹脂を含有するXpress(登録商標)アフィニティークロマトグラフィー系(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてmyc-his配列を含有するPCIGF組換えポリペプチドの精製を行う。前出で記載されるように調製した10×100mmプレートからの上澄をプールし、ニッケル荷電カラムを通す。

50 mM トリスHCl (pH 7.5) / 150 mM NaClバッファーでカラムを洗浄して非結合性タンパク質を溶出し、mys-his融合タンパク質のみを残す。次いで過剰のイミダゾール又はヒスチジン、又は低pHバッファーのいずれかを用いてカラムから結合PCIGF組換えポリペプチドを溶出する。また別に、mys-his配列でヒドラジド又はその他の結合を介してアガロース樹脂にコンジュゲートした抗mys又は抗ヒスチジンモノクローナル抗体からなるアフィニティーカラムに結合し、各々過剰のmycペプチド又はヒスチジンで溶出することにより組換えタンパク質を精製することもできる。

#### 【0256】

精製された組換えタンパク質を次いで、供給者の指示書に指示されるように、固相、例えばN-ヒドロキシサクシンイミド活性化セファロースカラム (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) に共有結合により架橋できる。次いで共有結合したPCIGF組換えタンパク質を含有するこれらのカラムを用いてウサギ又はマウス血清から抗PCIGF抗体を精製することができる (実施例13及び14参照)。

#### 【0257】

E. PCIGF発現タンパク質でのマイクロタイタープレートのコーティング  
前出で記載されるように100 mmプレートからの上澄を適当な容量のPBSで希釈する。次いで得られた混合物100 µlをReacti-Bind (商標) 金属キレートマイクロタイタープレート (Pierce, Rockford, IL) の各ウェルに配置し、振盪しながら室温でインキュベートし、続いて0.05% Tween (登録商標) 20含有PBS各200 µlで3回洗浄する。次いで調製したマイクロタイタープレートを用いてPCIGF抗体の存在に関してポリクローナル抗血清をスクリーニングできる (実施例17参照)。

#### 【0258】

この実施例ではpcDNA3.1/Myc-Hisを使用するが、その他の適合する発現系の試薬及び/又は技術に適切な修飾を加えて本発明にて使用できることは当業者に周知であり、当該分野の通常の技術範囲内である。PCIGF遺伝子のコーディング領域を含有する最大のクローン化インサートを(i) 例えば

サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター及び/もしくはタンパク質の発現及び検出を助ける融合可能なタンパク質配列を含有し得る真核細胞発現系、又は (ii) スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 及びCMP-KDOシンセターゼ (CKS) もしくはタンパク質配列を発現するためのその他のタンパク質融合配列を含有する細菌性発現ベクターのいずれかにサブクローニングする。SODの融合配列を含有するポリペプチドの産生に有用な方法及びベクターは1986年10月1日公開の公開EPO出願番号EP0196056 (出展明示により本明細書の一部とする) に記載されており、CKSの融合配列を含有するベクターは1989年9月13日公開の公開EPO出願番号EP0331961 (出展明示により本明細書の一部とする) に記載されている。精製されたタンパク質を、非限定例としては動物免疫研究、固相イムノアッセイ等の種々の技術に使用できる。

#### 【0259】

##### 実施例12：前立腺組織タンパク質の化学分析

##### A. MSを用いるトリプシン消化ペプチドフラグメントの分析

標準的な方法を用い、クーマシーブルーで染色する、ポリアクリルアミドゲルに前立腺疾患、例えば前立腺癌の患者の血清、前立腺疾患でない患者の血清、前立腺疾患、例えば前立腺癌の患者の前立腺組織又は細胞の抽出物、前立腺疾患でない患者の前立腺組織又は細胞の抽出物、及び患者のその他の疾患でない、又は疾患の器官の組織又は細胞の抽出物を流す。未知のポリペプチドの含有が疑われるゲル区画を切除し、ゲル中還元、アセトアミド化及びトリプシン消化に供する。P. Jenová、Anal. Bio. 224: 451-455 (1995) 及びJ. Rosenfeldら、Anal. Bio. 203: 173-179 (1992)。ゲル区画を100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  及びアセトニトリルで洗浄する。収縮したゲル切片を消化バッファー (50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、5mM  $\text{CaCl}_2$  及び12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシン) 中4 で45分間膨張させる。上澄を吸引し、トリプシン不含の消化バッファー5~10  $\mu\text{l}$  と置換し、37で一晩インキュベートする。ペプチドを5% ギ酸及びアセトニトリルで3回交換して抽出し、蒸発乾固する。ペプチドを5% ギ酸10  $\mu\text{l}$  に溶解し、それを

ガスクロマトグラフィーの吸入キャピラリーに通すことにより、該キャピラリーチューブのチップにトラップしたPOROS R2ソルベント(Perseptive Biosystems, Framingham, Massachusetts)およそ0.1  $\mu$ lに吸着させる。吸着されたペプチドを水で洗浄し、60%メタノール中5%ギ酸で溶出する。ナノエレクトロスプレー質量分析で分析するために、溶出剤をAPI III質量分析器(Perkin-Elmer Sciex, Thornhill, Ontario, Canada)のスプレーキャピラリーに直接通す。M. Wilmsら、Int. J. Mass Spectrom. Ion Process 136:167-180(1994)及びM. Wilmsら、Anal. Chem. 66:1-8(1994)。最初の4極子から得られた質量スペクトルからトリプシン消化したペプチドの質量を決定する。予想されるペプチドに対応する質量をMS/MSモードでさらに分析し、ペプチドのアミノ酸を得ることができる。

#### 【0260】

##### B. LC/MSを用いるペプチドフラグメント分析

過形成疾患組織で見出されるmRNAから予想されるポリペプチドの存在を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析(LC/MS/MS)を用いて確認することもできる。D. Hessら、METHODS, A Companion to Methods in Enzymology 6:227-238(1994)。患者の血清標本又は腫瘍抽出物をSDSで変成し、ジチオスレイトール(1.5 mg/ml)で90 で30分間還元し、続いてヨードアセタミド(4 mg/ml)で25 で15分間アルキル化する。アクリルアミド電気泳動の後、ポリペプチドをカチオン性膜にエレクトロブロッティングし、クーマシーブルーで染色する。染色後、膜を洗浄し、満ちポリペプチドが含まれると考えられる区画を切除し、小片に切断する。膜を500  $\mu$ lマイクロ遠心管に配置し、タンパク質溶解性消化バッファー(0.1 M NaCl、10% アセトニトリル、2 mM CaCl<sub>2</sub>及び5  $\mu$ g/ml トリプシンを含有する100 mM トリスHCl、pH 8.2)(Sigma, St. Louis, MO)10~20  $\mu$ lに浸す。37 で15時間後、飽和尿素3  $\mu$ l及び100  $\mu$ g/ml トリ

ブシン 1  $\mu$ l を加え、さらに 37 で 5 時間インキュベートする。消化混合物を 10% トリフルオロ酢酸 3  $\mu$ l で酸性にし、遠心して膜から上澄を分離する。上澄を逆相 HPLC カラムのマイクロボアに直接注入し、0.05% トリフルオロ酢酸中アセトニトリルの直線グラジエントで溶出する。物質の容量を調整する必要がある場合、分流器 (stream splitter) を通した後、溶出液をエレクトロスプレー質量分析器に直接供給する。実施例 12、セクション A で示す方法に従って、データを分析する。

### 【0261】

#### 実施例 13：遺伝子免疫プロトコル

##### A. in vivo 抗原発現

遺伝子免疫は適当な発現ベクターを接種した後、抗原を in vivo で直接発現することにより、タンパク質精製工程を回避する。また、タンパク質を哺乳動物組織において産生するので、この方法によって抗原を産生することにより正確なタンパク質フォールディング及びグリコシル化が可能になる。該方法は CMV プロモーターを含有するプラスミドへの遺伝子配列の挿入、プラスミドの伸長及び精製、並びに動物の筋肉組織へのプラスミド DNA の注入を利用する。好ましい動物にはマウス及びウサギなどがある。例えば、H. Davisら、Human Molecular Genetics 2:1847-1851 (1993) 参照。1又は2回のブースター投与後、次に動物を出血させ、腹水を収集することができ、又は動物の脾臓を回収してハイブリドーマを産生させることができる。

### 【0262】

##### B. プラスミド調製及び精製

実施例 11 に記載される方法に従って、適切な 5' 制限部位を含有する適当な PCR プライマーを用いて、PCIGF cDNA 含有ベクターから PCIGF cDNA 配列を作製する。適当な制限酵素で PCR 産物を切断し、CMV プロモーター (例えば、Invitrogen, San Diego, CA の pRc / CMV 又は pcDNA3 ベクター) を含有するベクターに挿入する。次いでこのプラスミドを適当な細菌株中で伸長し、CsCl グラジエント又は Qiagen

プラスミドDNA精製カラムを用いて細胞ライゼートから精製する。これらの技術は全て分子生物学の通常の技術者に周知である。

#### 【0263】

##### C. 免疫プロトコル

PBSで希釈した精製プラスミド0.1~100 $\mu$ g又はその他のDNA取り込みエンハンサー(Cardiotoxin、25%スクロース)を筋肉内投与することにより麻酔動物を免疫する。例えば、H. Dabisら、Human Gene Therapy 4:733-740(1993);及びP. W. Wolffら、Biotechniques 11:474-485(1991)参照。月間隔で1又は2回のブースター注射を行う。

#### 【0264】

##### D. 抗血清の試験及び使用

動物を出血させ、当該分野で公知の技術、例えばウェスタンブロッティング又はEIA技術を用いて、既知遺伝子配列から合成したペプチド(実施例16参照)を用いて抗体に関して得られた血清を試験する。この方法により産生した抗血清を用いて患者の組織又は細胞抽出物における抗原の存在を検出でき、ELISA又はウェスタンブロッティング技術、例えば実施例15~18に記載される技術により患者血清中の抗原の存在を検出できる。

#### 【0265】

##### 実施例14: PCIGFに対する抗体の産生

##### A. ポリクローナル抗血清の産生

ウサギにPCIGFヌクレオチド配列(配列番号1)のアミノ酸配列に由来する配列を有するペプチドを注射してPCIGFに対する抗血清を調製した。ペプチド(配列番号7、配列番号8及び配列番号9)の合成については実施例10に記載されている。免疫原として用いられるペプチドはキャリアー、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、KLHにコンジュゲートしていない免疫原として使用した(すなわちこれらはコンジュゲートされていなかった)。

#### 【0266】

動物免疫 体重2kg以上の雌のニュージーランド白ウサギをポリクローナル

抗血清の感作に使用する。1匹の動物をコンジュゲートされていないペプチド（配列番号7、配列番号8及び配列番号9）で免疫した。初回免疫の1週前に5～10mlの血液を動物から採取し、非免疫プレブリードサンプルとして使用した。

#### 【0267】

コンジュゲートされていないペプチド配列番号7、配列番号8及び配列番号9を用いて、完全フロインドアジュバント（CFA）（Difco, Detroit, MI）0.5mlを含有するPBS（pH7.2）中2mg/mlの濃度のペプチド0.5mlを乳化することによって一次免疫原を調製した。免疫原を、皮下、腹腔内及び/又は筋肉内の投与経路で動物の複数の部位に注入する。初回免疫の4週後にブースター免疫を投与する。ブースター免疫の投与に使用する免疫原は、ペプチドを不完全フロインドアジュバント（IFA）（Difco, Detroit, MI）0.5mlで1mg/mlに希釈する以外は初回免疫に使用したのと同じコンジュゲートされていないペプチド0.5mlを乳化することによって調製した。ブースターの場合にも、ブースター用量を皮下、腹腔内及び筋肉内注入の経路で複数の部位に投与した。ブースター免疫の2週後に動物から採血（5ml）し、以下に記載の方法でペプチドに対する血清の免疫反応性を試験した。適当な抗体価が得られるまでブースター及び採血のスケジュールを4週毎に繰り返した。抗血清の力価又は濃度を以下の実施例17に記載するようにマイクロタイターEIAで、コンジュゲートされていないペプチドを用いて測定した。1:500以上の抗体価を以後の使用及び試験に好適な適正抗体価と判定した。

#### 【0268】

表1. ウサギ抗PCI GFペプチド抗血清のタイター（11週）

ペプチド免疫原	タイター
PCI GF . 1	43,000
PCI GF . 2	58,000
PCI GF . 3	>62,500

B. モノクローナル抗体の産生

## 1. 免疫プロトコル

マウス体内でモノクローナル抗体を産生させるために使用したコンジュゲートされていない、又はコンジュゲートされたペプチドの量をウサギ体内でポリクローナル抗血清を産生させるために使用した量の1/10にする以外は、キャリアー例えばKLHにコンジュゲートされていてもよい(以下のように調製されるか、又はコンジュゲートされていない(すなわちキャリアー例えばKLHにコンジュゲートされていない))ペプチドを用いてマウスを免疫する。即ち、一次免疫原は0.1mlのCFA中のコンジュゲートされているか又はコンジュゲートされていないペプチド100µgのエマルジョンから成り、一方ブースター免疫に使用した免疫原はIFA0.1ml中コンジュゲートされているか又はコンジュゲートされていないペプチド50µgから成る。モノクローナル抗体産生用のハイブリドーマを標準技術で調製しスクリーニングする。モノクローナル抗体産生に使用した方法は、Kohler and Milstein, Nature 256:494(1975)に詳細に記載され、J.G.R. Hurrell, ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL(1982)に概説されているような当業界で公知の方法に従う。Kohler and Milstein法に基づく別のモノクローナル抗体産生方法は、L.T. Mimmsら, Virology 176:604-619(1990)(これは出展明示により本明細書の一部とする)の方法である。

### 【0269】

(マウスあたりの)免疫感作計画は、1回の初回免疫と複数の追加ブースター免疫とから成る。初回免疫に使用した一次免疫原は、50µlのCFAで予め乳化した50µlのPBS(pH7.2)中の100µgの非コンジュゲート又はコンジュゲートペプチドから成る。初回免疫のほぼ2週間後及び4週間後に行うブースター免疫は50µlのIFAで乳化した50µlのPBS(pH7.2)中の50µgの非コンジュゲート又はコンジュゲートペプチドから成る。合計100µlのこの免疫原を各マウスの腹腔内及び皮下に接種する。3回目の免疫感作の

ほぼ4週後に実施例3に記載のようなマイクロタイタープレートエンザイムイムノアッセイ(EIA)によって個々のマウスを免疫応答に基づいてスクリーニングする。3回目の免疫感作のほぼ15週後にPBS(pH7.2)中の50 $\mu$ gの非コンジュゲート又はコンジュゲートペプチドをマウスの静脈内、脾臓内又は腹腔内に接種する。

#### 【0270】

この静脈内ブーストの3日後に、ポリエチレングリコール(PEG)法を使用して脾細胞を例えばSp2/0-Ag14ミエローマ細胞(Milstein Laboratories, England)に融合させる。10%のウシ胎仔血清(FCS)と1%のヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン(HAT)を含有するダルベッコの改質イスコフ培地(DMEM)で融合物を培養する。バルク培養物を実施例17のプロトコルに従ってマイクロタイタープレートEIAによってスクリーニングした。免疫原として使用したペプチドに反応性でその他のペプチドに反応性でないクローンを最終膨張用を選択する。このように選択したクローンを膨張させ、アリコートに分け、10%FCSと10%ジメチルスルホキシドとを含有するDMEM中で凍結させる。

#### 【0271】

##### 2. ペプチドコンジュゲーション

ペプチドをマレイミド活性化KLH(ImjectAEとして市販されており、Pierce Chemical Company, Rockford, ILより入手可能)にコンジュゲートさせる。ImjectAEはヘモシアニンのモルあたり約250モルの反応性マレイミド基を含有する。活性化KLHをリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS、pH8.4)に約7.7mg/mlの濃度で溶解する。ペプチド配列中に生じるシステインを介して、又は付着点を提供するために合成したペプチドに予め付加したシステインにペプチドをコンジュゲートする。ペプチドをDMSO(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)に溶解し、KLHに付着した反応性マレイミドのモルあたりペプチド約1.5モルのモル比で活性化KLHと反応させる。ペプチドをコンジュゲートする方法は以下に提示する。このような方法の量、時間及び条件をペプ

チドコンジュゲートを最適化するために変化させることができるのは通常の業者に周知である。

【0272】

以下に記載するコンジュゲーション反応は反応性マレイミド基約0.77マイクロモルを含有するKLHペプチドコンジュゲート (i conjugated peptide) 3mgを得るに基づいている。このペプチドコンジュゲートの量はウサギにおいてポリクローナル抗血清を産生するための初回注射及び4回のブースター注射に十分である。簡単には、ペプチドをDMSO 100  $\mu$ lあたり1.16マイクロモルの濃度でペプチドをDMSOに溶解する。DMSO溶液100  $\mu$ lを前記のように調製した活性化KLH溶液380  $\mu$ lに加え、PBS (pH 8.4) 20  $\mu$ lを加えて500  $\mu$ lの容量にする。反応物を攪拌しながら室温で一晩インキュベートする。反応混合物中の未反応チオール量を測定することにより反応の程度を判定する。チオールの出発濃度及び最終濃度の差は活性化KLHにカップリングしたペプチドの濃度であると考えられる。残留チオールの量をエルマン試薬 (5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)、Pierce Chemical Company, Rockford, IL) を用いて測定する。PBS (pH 7.2) 10ml中システインHCl (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) 35mgを溶解し、保存溶液を望ましい濃度に希釈することにより、0、0.1、0.5、2、5及び20mMの濃度でシステイン標準を作製する。Immulon 2 AEマイクロウェルプレート (Dynex Technologies, Chantilly, VA) の各ウェルにPBS (pH 8.4) 200  $\mu$ lを入れることにより、チオール濃度の光度測定による判定を行う。次に、標準又は反応混合物10  $\mu$ lを各ウェルに加える。最終的に、エルマン試薬20  $\mu$ lをPBS (pH 8.4) 中1mg/mlの濃度で各ウェルに加える。ウェルを室温で10分間インキュベートし、マイクロプレートリーダー (例えばBioRad 3550モデル、BioRad, Richmond, CA) を用いて全ウェルの吸収を415nmで計測する。標準の吸収を用いて標準曲線を構築し、標準曲線から反応混合物のチオール濃度を決定する。遊離チオールの濃度の減少はコンジュゲート

反応の成功の指標である。PBS (pH 7.2) に対して室温で6時間透析することにより未反応ペプチドを除去する。直ぐに使用する場合はコンジュゲートを2~8℃で保存し; そうでない場合は-20℃未満で保存する。

#### 【0273】

3. モノクローナル抗体を含有する腹水の産生。上記のごとく調製した凍結ハイブリドーマ細胞を解凍し、膨張培養した。生存ハイブリドーマ細胞をプリスタン処理マウスの腹腔内に接種した。マウスから腹水を採取し、プールし、0.2μmフィルターで濾過し、免疫グロブリンクラスG (IgG) 分析を行って、精製に必要なプロテインAカラムの容量を決定した。

#### 【0274】

4. 腹水又は細胞培養上清からのモノクローナル抗体の精製。プロテインA、プロテインG及びプロテインLカラムクロマトグラフィー又は沈降のような様々な方法を使用して腹水又は細胞培養上清からモノクローナル抗体を精製し得る。Immunopure (G) IgG精製キット (Pierce) を使用してモノクローナル抗体H85C21を精製した。29μg/mLのIgGを含有していた47mLのH85C21培養上清を、100mLの結合バッファ(0.02Mのリン酸ナトリウム, pH7.0) (Pierce) と混合した。145mLの混合物を、結合バッファで平衡させたプロテインGカラムに通した。次にカラムを溶出バッファ(0.1Mのグリシン-HCl, pH2.7) (Pierce) で溶出させた。1mLの画分を中和用の100μLの1Mの炭酸水素ナトリウムを入れた試験管に集めた。画分の280nmの吸光度をモニターした。適正な画分をプールし、PBS (pH7.2) に2-8℃で一夜透析した。280nmの吸光度は、プロテインGカラムから1.51mgのIgGが回収されたことを示した。このようにして調製し特性決定した精製モノクローナル抗体を-80℃で長期保存した。

#### 【0275】

5. モノクローナル抗体のさらなる特徴づけ

前記のように産生されたモノクローナル抗体のイソタイプ及びサブタイプを市販のキット (Amersham Inc., Arlington Height

s, IL)を用いて決定できる。モノクローナル抗体のアリコート量を2~8で継続保存し、規定の時間中光学密度(OD)の読みを評価することにより、モノクローナル抗体に関して安定性試験を実施することもできる。

#### 【0276】

##### C. 免疫原としての組換えタンパク質の使用

前記のように作製された組換えタンパク質を、当業者に公知の試薬及び技術に対応する変更を加えて、ポリクローナル及びモノクローナル抗体の産生において免疫原として使用できることは本発明の範囲内である。

#### 【0277】

##### 実施例15: PCIGFペプチドに特異的に結合する血清抗体の精製

実施例10に記載されるように調製された固定合成ペプチド、又は実施例11に記載されるように調製された組換えタンパク質を用いて、前記の実施例13及び/又は14に記載されるように得られた免疫血清をアフィニティー精製する。希釈された粗製抗血清をプロテインAカラム(Affi-GelプロテインA、Bio-Rad, Hercules, CA)に通すことにより抗血清のIgG分画が得られる。バッファー(バインディングバッファー、製造者により供給)での溶出により免疫グロブリンでない全てのタンパク質を実質的に除去する。0.1M 緩衝グリシン(pH3)で溶出することによりアルブミン及びその他の血清タンパク質を実質的に含まない免疫グロブリン調製物が得られる。

#### 【0278】

特異的抗原結合抗体を高い割合で含む調製物を得るためにイムノアフィニティークロマトグラフィーを実施する。抗血清を感作するために使用したペプチドをクロマトグラフィー樹脂に固定し、そのエピトープに特異的な抗体を樹脂に吸着させる。未結合の成分を洗浄によって除去し、特異的抗体を0.1Mのグリシンバッファ、pH2.3で溶出させる。免疫反応性を保存するために抗体画分を1.0Mのトリスバッファ(pH8.0)で直ちに中和する。選択されるクロマトグラフィー樹脂は、ポリペプチド中に存在する反応性基に依存する。ペプチドがアミノ基を有するとき、Affi-Gel 10又はAffi-Gel 15のような樹脂を使用する(Bio-Rad, Hercules, CA)。ペプチドの

カルボキシ基によるカップリングを望むならば、Affi-Gel 102を使用し得る(Bio-Rad, Hercules, CA)。ペプチドが遊離スルフィドリル基を有しているならば、Affi-Gel 501のような有機水銀性樹脂を使用し得る(Bio-Rad, Hercules, CA)。

#### 【0279】

あるいは、脾臓を摘出し、モノクローナル抗体製造用ハイブリドーマを作製するために前述のような当業界に公知の常法に従って使用できる。

#### 【0280】

##### 実施例16：組織サンプルのウェスタンブロットティング

0.1M トリスHCl (pH7.5)、15重量/容量% グリセロール、0.2mM EDTA、1.0mM 1,4-ジチオスレイトール、10µg/ml ロイペプチン及び1.0mM フッ化フェニルメチルスルフォニル中組織サンプルをホモジナイズしてタンパク質抽出物を調製した(S.R.Kainら、Biotechniques 17:982(1994))。ホモジナイズの後ホモジネートを4で5分間遠心し、粉砕片から上澄を分離する。タンパク質を定量するために、上澄3~10µlをビシンコニン酸試薬(Sigma, St. Louis, MO)1.5mlに加えて得られる562nmにおける吸収を測定した。

#### 【0281】

SDS-PAGEでは、サンプルをTricineバッファー(Novex, San Diego, CA)で望ましいタンパク質濃度に調整し、2X Tricineサンプルバッファー(Novex, San Diego, CA)等量と混合し、サーマルサイクラー中100で5分間加熱した。次いでサンプルを電気泳動用のNovex10~20% Precast Tricineゲルに適用する。電気泳動の後、サンプルをゲルからNovex Tris-Glycine Transferバッファーのニトロセルロース膜に移した。次いでWestern Lights Plus又はWestern Lights(Tropix, Bedford, MA)化学ルミネサンス検出キットで提供される試薬及び方法を用いて膜を特異的抗ペプチド抗体でプローブした。

## 【0282】

色素産生性基質5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドニルホスフェート (BCIP) の添加し、顕色することにより、バンドを膜上で直接可視化した。この色素産生性溶液は0.016% BCIP、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>及び100mM トリスHCl、pH9.5を含有する。フィルターを溶液中室温で望ましい強度にバンドが顕色されるまでインキュベートした。予め染色した分子量標準 (Novex, San Diego, CA) 及びビオチン化分子量標準 (Tropix, Bedford, MA) の可動性に基づいて分子量を決定した。

## 【0283】

図1及び2は各々PSA及びPCIGFペプチド (配列番号9) に対する抗血清を用いて組織抽出物のパネルで実施したウェスタンブロットの結果を示す。図1及び2の各々のレーンは異なる組織タンパク質抽出物 (1~6、乳癌; 7~10、BPH; 11~13、前立腺癌; 14、マーカー) を表す。図1では、BPHサンプルの4個全て及び前立腺癌の3個のうち2個のサンプルで31kDに強いバンドが認められるが、前立腺癌の1個では弱いバンドが認められる。乳癌サンプルでは31kDにバンドが認められない。

## 【0284】

図2では、3個の前立腺癌サンプルのうち2個に6.5kD及び14kDの間にバンドが認められるが、その他のいずれの組織でもバンドは認められない。

## 【0285】

以下の例外以外は前記と類似の方法で競合実験を実施した: 1次抗体 (抗ペプチドポリクローナル抗血清) をペプチド免疫原の濃度を变化させて4で一晩ブレインキュベートし、その後ニトロセルロースフィルターに暴露した。ウェスタンブロットの顕色を前記のように続けた。6.5kDでバンドに結合する抗体はPCIGF合成ペプチド (配列番号8) 3.6µMの濃度で阻止された

## 実施例17: EIAマイクロタイタープレートアッセイ

好ましくは実施例14で記載するようにウサギから得られた抗血清の免疫反応性を以下のようにマイクロタイタープレートEIAにより判定した。簡単には、

実施例10で記載される世に調製された合成ペプチド、配列番号7、配列番号8及び配列番号9を炭酸塩バッファー(50mM、pH9.6)に溶解し、最終濃度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ にした。次にペプチド又はタンパク質溶液 $100\mu\text{l}$ をImmulon 2AEマイクロタイタープレート(Dynex Technologies, Chantilly, VA)の各ウェルに入れた。プレートを室温で一晩インキュベートし、次いで脱イオン水で4回洗浄した。適当なタンパク質遮断剤例えばSuperblockAE(Pierce Chemical Company, Rockford, IL) $125\mu\text{l}$ を各ウェルに添加してウェルを遮断し、次いで即座に溶液を捨てた。この遮断方法を3回行った。前記するように調製した免疫ウサギ又はマウスから得られた抗血清を0.05% Tween-20AE(モノラウレート・ポリオキシエチレンエーテル)(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)及び0.05% アジドナトリウムを含有するPBS中1:100、1:500、1:2500、1:12500及び1:62500の希釈でタンパク質遮断剤(例えば3% SuperblockAE溶液)で希釈し、コーティングされたマイクロタイタープレートの各ウェルに配置した。次いでウェルを室温で3時間インキュベートした。各ウェルを脱イオン水で4回洗浄した。0.05% Tween20AE及び0.05% アジドナトリウムを含有するリン酸塩緩衝生理食塩水中1:2000に希釈した3% SuperblockAE溶液アルカリ性ホスファターゼコンジュゲート・ヤギ抗ウサギIgG又はヤギ抗マウスIgG抗血清(Southern Biotech, Birmingham, AB) $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加えた。ウェルを室温で2時間インキュベートした。次に各ウェルを脱イオン水で4回洗浄した。次いでパラニトロフェニルホスフェイト基質(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加えた。ウェルを室温で30分間インキュベートした。各ウェルで405nmにおける吸光度を測定した。405nmにおける吸光度が試験ウェルにおいて非免疫血清による吸光度(陰性対照)よりも増加している場合、陽性と決定する。陽性反応は検出可能な抗PCI GF抗体の存在の指標であった。抗ペプチド抗血清の力価を前記した抗血清の希釈から算

出し、算出希釈として決定し、ここで $A_{405\text{nm}} = 0.0D$ である。

#### 【0286】

##### 実施例18：固相粒子のコーティング

##### A．PCI GF 抗原に特異的に結合する抗体での微粒子のコーティング

PCI GF ポリペプチド（実施例15参照）に特異的に結合するアフィニティー精製した抗体をポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレン、ポリメチルアクリレート又は半径約 $0.1 \sim 20 \mu\text{m}$ の範囲の類似の粒子にコーティングする。微粒子を受動的又は能動的のいずれかでコーティングできる。あるコーティング法はEDAC（塩酸1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド（Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI））活性化カルボキシル化ラテックス粒子をPCI GF ポリペプチドに特異的に結合する抗体で以下のようにコーティングすることがからなる。簡単には、適当な容器中で最終濃度 $0.375\%$ の樹脂の固体懸濁液洗浄カルボキシル化ラテックス粒子（Bangs Laboratories, Carmel, IN又はSerodyn, Indianapolis, IN）を $50\text{mM}$  MESバッファー、 $\text{pH}4.0$ 及び $150\text{mg/l}$  アフィニティー精製した抗OCI GF 抗体（実施例14参照）を含有する溶液中25分間混合する。EDACカップリング試薬を混合物に加えて最終濃度 $5.5 \mu\text{g/ml}$ にし、室温で2.5時間混合する。

#### 【0287】

次いで $0.2 \mu\text{m}$  Midrogon濾過モジュールを用いて接線方向のフロー・フィルトレーションにより、微粒子を8容量のTerrn20（登録商標）/リン酸ナトリウム洗浄バッファー（ $\text{pH}7.2$ ）で洗浄する。洗浄した微粒子を、通常は溶解界面活性剤及びタンパク質を遮断剤として含む適当なバッファー中で保存する。

#### 【0288】

##### B．1/4インチビーズのコーティング

当該分野の常法により、PCI GF 抗原に特異的に結合する抗体で1/4インチビーズポリスチレンビーズすることもでき（Snitmanら、米国特許第5

273882号、出展明示により本明細書の一部とする)、競合結合又はEIAサンドウィッチアッセイに使用できる。

#### 【0289】

最初にポリスチレンビーズを10mM NaHCO<sub>3</sub>バッファー中、pH8.0で約15秒間超音波処理して清浄する。次いで全ての微細物質を除去するまでビーズを脱イオン水で洗浄する。次いでビーズを10mM 炭酸塩バッファー(pH8~9.5)の抗体溶液に浸す。高アフィニティーモノクローナル抗体の場合、抗体溶液を1µg/mlに希釈するか、又はアフィニティー精製しなかったポリクローナル抗体では約500µg/mlの濃度にする。ビーズを室温で少なくとも12時間コーティングし、次いで脱イオン水で洗浄する。ビーズを空気乾燥するか又は湿らせて(PBS中、pH7.4)保存することができる。これらをまたタンパク質安定剤(例えばスクロース)又は非特異的結合遮断剤として用いられるタンパク質遮断剤(例えば無関係なタンパク質、Carnationスキムミルク、Superblock(登録商標)、等)で保護コーティングできる。

#### 【0290】

実施例19:微粒子酵素イムノアッセイ(MEIA)

標準的な抗原競合EIA又は抗体サンドウィッチEIAを実施することにより、又は固相例えば微粒子(MEIA)を利用することにより患者の被験サンプル中のPCIGFを検出する。自動分析器、例えばIMx(登録商標)アナライザー(Abbott Laboratories, Abbott, Park, IL)でアッセイを実施できる。

#### 【0291】

A.抗体サンドウィッチアッセイ

簡単には、PCIGF抗原の含有が疑われるサンプルを抗PCIGF抗体コーティング微粒子(実施例17に記載のように調製)の存在下インキュベートし、抗原/抗体複合体を形成する。次いで微粒子を洗浄し、シグナル発生化合物にコンジュゲートした抗体を含んでなるインジケータ試薬(すなわち酵素、例えばアルカリ性ホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ)を抗原/抗体複合

体又は微粒子に加え、インキュベートする。微粒子を洗浄し、シグナルアッセイ化合物と反応して測定可能なシグナルを生じる基質（例えば各々4-メチルアンベリフェリルホスフェート（MUP）又はOPD/ペルオキサイド）を添加して結合抗体/抗原/抗体複合体を検出する。被験サンプル中で上昇したシグナルを陰性対照により生じたシグナルと比較し、PCIGF抗原の存在を検出する。被験サンプル中のPCIGF抗原の存在は前立腺疾患又は状態、例えば前立腺癌の診断の指標である。

#### 【0292】

##### B. 競合結合アッセイ

競合結合アッセイでは、標識ペプチドが微粒子をコーティングする抗ペプチド抗体に接触した場合に測定可能なシグナルを生じるペプチド又はタンパク質を使用する。このアッセイをIMx（登録商標）アナライザー（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）で実施できる。PCIGF抗原の含有が疑われる被験サンプルの存在下、標識されたペプチドをPCIGF抗体コーティング微粒子（実施例17で記載のように調製）に添加し、標識PCIGFペプチド（又は標識タンパク質）/結合抗体複合体及び/又は患者PCIGF抗原/結合抗体複合体を形成するのに十分な条件下、十分な時間インキュベートする。被験サンプル中のPCIGF抗原は微粒子上の結合部位を標識PCIGFペプチド（又はPCIGFポリペプチド）と競合する。アッセイでは被験サンプル中のPCIGF抗原が標識ペプチド及び微粒子上にコーティングされた抗体の結合を低下させ、PCIGFペプチド又はPCIGFポリペプチドが抗体結合部位に関して競合する。シグナルの低下（対照と比較）は被験サンプル中のPCIGF抗原の存在を示す。PCIGF抗原の存在は前立腺疾患又は状態、例えば前立腺癌の診断を示唆する。

#### 【0293】

前記で提示され、記載されたPCIGFポリヌクレオチド及びそれによりコードされるタンパク質は前立腺組織疾患、とりわけ前立腺癌のマーカーとして有用である。被験サンプル、例えば血液、血漿又は血清中のこのマーカーの出現に基づく試験は、医師が癌の診断をし、治療プロトコルを選択するのを助け、又は選

択した治療の成功を経過観察するのを補助する、安価で非侵襲性の診断情報を提供できる。このマーカーは免疫学的方法により検出される疾患組織に由来する抗原として入手しやすい体液例えば血液、尿又は糞便中に現れる。このマーカーは疾患状態で上昇し、疾患状態で変化するか、又は不適切な体内区画において出現する正常前立腺タンパク質であり得る。

#### 【0294】

##### 実施例20：PCIGFタンパク質の免疫組織化学的検出

前記の実施例14に記載するPCIGFポリペプチド配列に由来するPCIGF合成ペプチド(配列番号7、配列番号8及び配列番号9)に対する抗血清を用いて、標準的な方法を用いて種々の正常及び疾患組織を免疫組織化学的に染色する。簡単には、組織の凍結塊を6ミクロンの切片に切断し、顕微鏡スライドに載せる。冷アセトンで固定し、切片を室温で乾燥し、次いでリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄し、遮断する。スライドをPCIGFタンパク質配列(配列番号6)に由来する合成ペプチドに対する抗血清を1:500に希釈したものと共にインキュベートし、洗浄し、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体と共にインキュベートし、再度洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したアビジンと共にインキュベートする。最後の洗浄の後、スライドを赤色に染色する3-アミノ-9-エチルカルバゾール基質と共にインキュベートする。スライドをヘマトキシリンと共に対比染色、マウントし、病理学者が顕微鏡下で試験する。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

PSAタンパク質又はPCIGF合成ペプチド(配列番号9)の何れかに対する抗血清でプローブされた組織タンパク質抽出物のパネルにおいて実施されたウェスタンブロットの結果を示す。

##### 【図2】

PSAタンパク質又はPCIGF合成ペプチド(配列番号9)の何れかに対する抗血清でプローブされた組織タンパク質抽出物のパネルにおいて実施されたウェスタンブロットの結果を示す。

#### 【配列表】

## Sequence Listing

<110> Patricia Billing-Medel  
 Maurice Cohen  
 Tracey L. Colpitts  
 Julian Gordon  
 Edward N. Granados  
 John C. Russell  
 Stephen D. Stroupe

<120> Reagents and Methods Useful for  
 Detecting Disease of the Prostate

<130> 6397.US.01

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1201

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

```

agtcccagct cagagccgca acctgcacag ccatgcccg gcaagaactc aggacgctga      60
atggctctca gatgctcctg gtgttgctgg tgctctctg gctgccgcat gggggcgccc      120
tgtctctggc cgaggcgagc cgcgcaagt tcccgggacc ctcagagttg cacaccgaag      180
actccagatt ccgagagttg cggaaacgct acgaggacct gctaaccagg ctgcgggcca      240
accagagctg ggaagattcg aacaccgacc tcgtcccggc ccctgcagtc cggatactca      300
cgccagaagt ggggctggga tccggcggcc acctgcacct gcgtatctct cggggccgccc      360
ttcccagggg gtcceccgag gctcccggc ttcaccgggc tctgttccgg ctgtccccga      420
ogggcgtcaag gtcgtgggac gtgacacgac ctctcgggcg tcagctcagc cttgcaagac      480
cccaggcgcc cgcgctgcac ctgcgactgt cgcgcccgcc gtcgcagtcg garccaactgc      540
tggcagaatc ttcgtccgca cggccccagc tggagttgca cttgcggccg caagccgcca      600
ggggcgcccg cagagcgcgt ggcgcgcaac gggaccactg tccgctcggg cccggggcgtt      660
gctgcccgtc gcacacggtc cgcgcgtcgc tggaaagacct ggggctgggc gattgggtgc      720
tgtcggccac ggaggtgcaa gtgacctatg gcatcggcgc gtgcccgagc cagttccggg      780
cggcaaacat gcacgcgcag atcaagacga gcctgcaccg cctgaagccc gacacgggtgc      840
cagcgcctct ctgcgtgccc gccagctaca atcccattgt gctcattcaa aagaccgaca      900
ccgggtgtgc gctccagacc tatgatgact tgtagccaa agactgccac tgcataatgag      960
cagtcctggg ccttccactg tgcacctgcg cgggggaggg gacctcagtt gtcctgcctt      1020
gtggaatggg ctcaaggttc ctgagacacc cgattcctgc ccaaacagct gtatttata      1080
aagtctgtta tttattatta atttattggg gtgaccttct tggggactcg ggggctggtc      1140
tgatggaact gtgtatttat ttaaaactct ggtgataaaa ataaagctgt ctgaactggt      1200
c                                                                                   1201

```

<210> 2

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Restriction site

<400> 2

```

agctcggaa tccgagcttg gatcctctag agcggccgcc gactagtgag ctgctcgacc      60
cgggaatt                                                                                   68

```

<210> 3

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Restriction site

<400> 3  
aattaattcc cgggtcgacg agctcactag tcggcgccg ctctagagga tccaagctcg 60  
gaattccg 68

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Universal Primer

<400> 4  
agcggataac aatttcacac agga 24

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Universal primer

<400> 5  
tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 6  
<211> 308  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Met Pro Gly Gln Leu Arg Thr Leu Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu  
1 5 10 15  
Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Ser Leu  
20 25 30  
Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro Gly Pro Ser Glu Leu His Thr  
35 40 45  
Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu  
50 55 60  
Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu  
65 70 75 80  
Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly  
85 90 95  
Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu  
100 105 110  
Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser  
115 120 125  
Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln  
130 135 140  
Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser  
145 150 155 160  
Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala  
165 170 175  
Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg  
180 185 190

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly  
 195 200 205  
 Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly  
 210 215 220  
 Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys  
 225 230 235 240  
 Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln  
 245 250 255  
 Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro  
 260 265 270  
 Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr  
 275 280 285  
 Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp  
 290 295 300  
 Cys His Cys Ile  
 305

<210> 7  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 Asp Asp Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro  
 20 25 30  
 Arg Glu Val Gln  
 35

<210> 8  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu  
 1 5 10 15  
 His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala  
 20 25 30  
 Ser Tyr

<210> 9  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile  
 20 25

<210> 10  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Affinity purification system recognition site

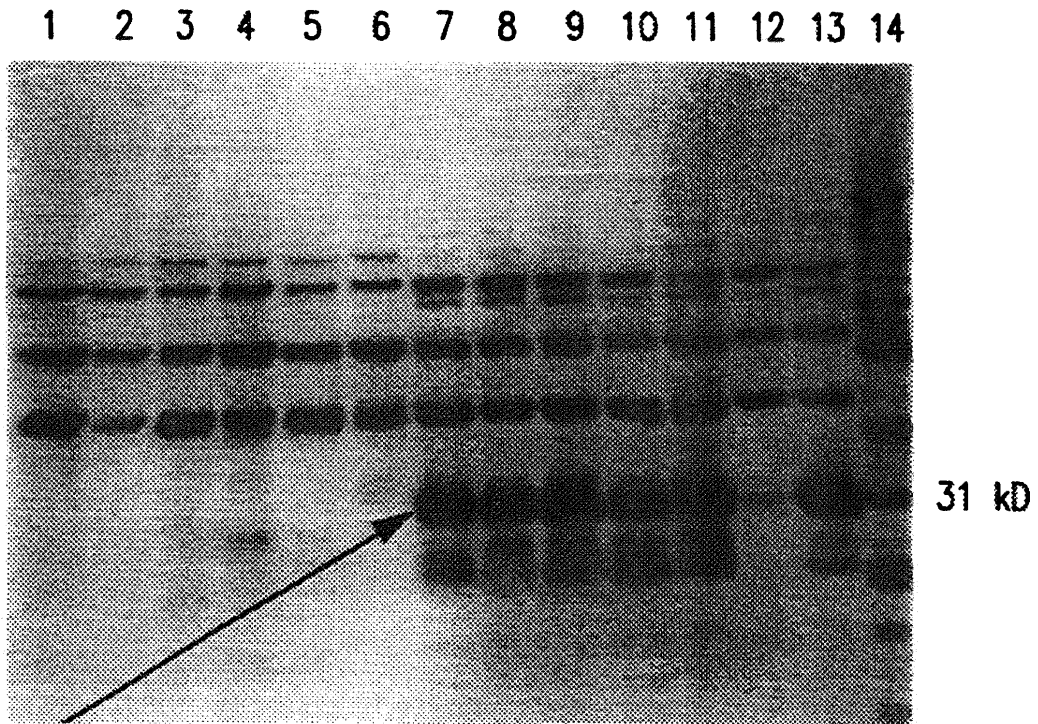
<400> 10  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Affinity purification system recognition site

<400> 11  
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Glu His  
 1 5 10 15  
 His His His His His  
 20

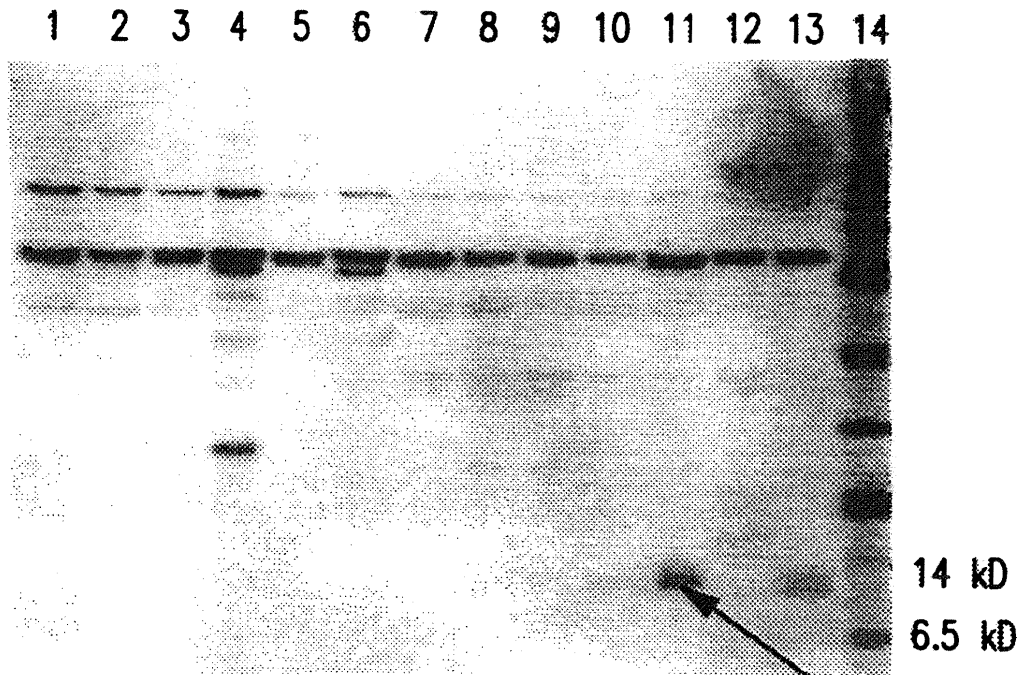
【図1】



レーン	組織	レーン	組織
1	乳癌	8	BPH
2	乳癌	9	BPH
3	乳癌	10	BPH
4	乳癌	11	前立腺癌
5	乳癌	12	前立腺癌
6	乳癌	13	前立腺癌
7	BPH	14	分子量マーカ-

FIG.1

【図2】



レーン	組織	レーン	組織
1	乳癌	8	BPH
2	乳癌	9	BPH
3	乳癌	10	BPH
4	乳癌	11	前立腺癌
5	乳癌	12	前立腺癌
6	乳癌	13	前立腺癌
7	BPH	14	分子量マーカー

FIG.2

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

					International Application No. PCT/US 00/07945	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	A61K38/17	C07K14/47	C07K16/30	C12N5/10	C12N15/63	
	C12Q1/68	G01N33/53	G01N33/574	G01N33/577		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
B. FIELDS SEARCHED						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)						
IPC 7	G01N	C12Q	C07K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
EPO-internal, WPI Data, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	WO 96 18730 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;HE WEI WU (US); ROSEN CRAIG A (US); HUD) 20 June 1996 (1996-06-20) cited in the application page 23, line 11 - line 19					1-51
X	BOOTCOV M R ET AL: "MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 94, no. 21, October 1997 (1997-10), pages 11514-11519, XP002180665 the whole document					12-46
-/-						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents:						
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention			
*E* earlier document but published on or after the international filing date			*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone			
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)			*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.			
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			*Z* document member of the same patent family			
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed						
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report		
19 October 2001				31/10/2001		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016				Authorized officer  Teysnier, B		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/07945

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>THOMAS R ET AL: "Differential expression of placental bone morphogenetic protein (PLAB) gene during prostate cancer progression to bone." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, no. 41, March 2000 (2000-03), page 587 XP002180666 91st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; San Francisco, California, USA; 1-5 April 2000 abstract 3737</p> <p>-----</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/07945

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9618730 A	20-06-1996	WO 9618730 A1	20-06-1996
		AU 1830195 A	03-07-1996
		US 5994102 A	30-11-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
C 1 2 N	1/21	C 1 2 P 21/02	C
	5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q	1/68		N
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
(72)発明者	コーエン, モーリス アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイ ランド・パーク、ディアフィールド・ロー ド・2026		
(72)発明者	コルピッツ, トレイシー・エル アメリカ合衆国、イリノイ・60073、ラウ ンド・レイク、ノース・サークル・ドライ ブ・34365		
(72)発明者	ゴードン, ジュリアン アメリカ合衆国、イリノイ・60044、レイ ク・ブラフ、イースト・シエリダン・ロー ド・307		
(72)発明者	グラナドス, エドワート・エヌ アメリカ合衆国、イリノイ・60061、パー ノン・ヒルズ、モンゴメリー・19		
(72)発明者	ラツセル, ジョン・シー アメリカ合衆国、ウイスコンシン・53158、 プレゼント・プレイリイ、シツクスティフ オース・コート・8275		
(72)発明者	ストローブ, ステイブ・デー アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバ ティビル、ウイルシヤー・ドライブ・945		

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 CA07  
CA09 CA12 CA20 DA02 DA03  
DA06 EA04 FA10 FA18 GA13  
GA18 GA27 HA03 HA04 HA13  
HA14 HA19  
4B063 QA01 QA19 QQ43 QQ53 QR08  
QR32 QR35 QR40 QR42 QR56  
QR62 QR84 QS34 QX02  
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19  
CA20 CC01 CC24 CE12 DA01  
DA14  
4B065 AA26X AA58X AA72X AA90X  
AA93X AA93Y AB01 AC14  
AC15 BA02 BA05 BA25 BD14  
CA24 CA44 CA46  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 CA40 DA22 DA75 EA20  
EA51 FA34 FA44 FA71 FA74  
GA26

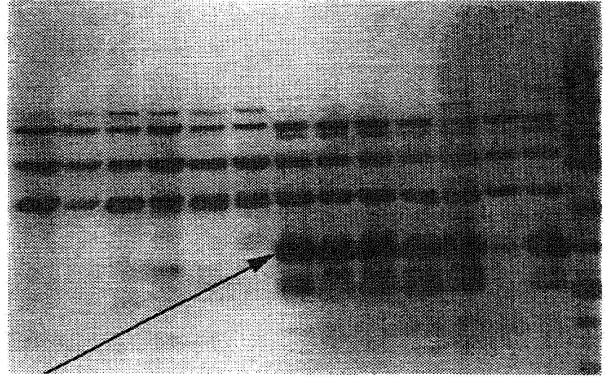
专利名称(译)	用于检测前列腺疾病的试剂和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003524398A</a>	公开(公告)日	2003-08-19
申请号	JP2000606256	申请日	2000-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ビリングメデルパトリシアエイ コーエンモーリス コルピツツトレイシーエル ゴードンジユリアン グラナドスエドワートエヌ ラツセルジヨンシー ストロープステイーブンディー		
发明人	ビリング-メデル,パトリシア・エイ コーエン,モーリス コルピツツ,トレイシー・エル ゴードン,ジユリアン グラナドス,エドワート・エヌ ラツセル,ジヨン・シー ストロープ,ステイーブン・ディー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 C07K14/47 C07K14/495 C07K16/24 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57434 A61K38/00 C07K14/4748 C07K16/3069 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/136		
FI分类号	C07K14/495 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.N C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/FA18 4B024/GA13 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA04 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA19 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA25 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA22 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA34 4H045/FA44 4H045/FA71 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	09/276600 1999-03-25 US		
其他公开文献	JP4917207B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

描述为PCIGF，描述了从前列腺组织转录的一系列连续和部分重叠的cDNA序列以及由此编码的多肽。这些序列可用于检测，诊断，分期，分期，监测，预后，体内成像，预防或治疗前列腺疾病和病症，例如前列腺癌，或易患疾病。。还提供了与编码PCIGF的多肽或蛋白质特异性结合的抗体和防止激动剂或组织特异性PCIGF多肽的作用的抑制剂，所述分子可用于治疗前列腺疾病，肿瘤或转移。这很有用。

11]

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



レーン 組織  
1 乳癌

レーン 組織  
8 BPH