

(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 - 530077

(P2003 - 530077A)

(43)公表日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 3
16/18		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15		1/19	4 H 0 4 5
1/19		1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 20数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 525386(P2001 - 525386)

(86) (22)出願日 平成12年9月21日(2000.9.21)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月22日(2002.3.22)

(86)国際出願番号 PCT/US00/25981

(87)国際公開番号 W001/021828

(87)国際公開日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(31)優先権主張番号 60/155,865

(32)優先日 平成11年9月24日(1999.9.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 フィラデルフィア・ヘルス・アンド・エデュケーション・コーポレーション
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19102フィラデルフィア・ブロードアンドパインストリート

(72)発明者 スターズ, マーク・イー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19085ピラノバ・シヨ-モントドライブ503

(72)発明者 フ, ユ-ジ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406ガルフミルズ・ランターンレーン161

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P C A M - 1 マ-カータンパク質、P C A M - 1 をコードする核酸配列及びP C A M - 1 の検出のための免疫アッセイ

(57)【要約】

本発明は、癌マ-カータンパク質、P C A M - 1、及びこのタンパク質を同定しコードするポリヌクレオチドを提供する。このマ-カーの検出は、患者における癌を診断及び予測することにおいて有用である。また提供されるのは、P C A M - 1 の発現のための発現ベクター及び宿主細胞並びにP C A M - 1 タンパク質に対して作製される抗体である。さらに、組織、細胞もしくは他の生物学的流体の粗抽出物中のタンパク質に選択的に結合する特定の 8 m e r 配列の同定のためのモンテカルロ様スクリーニングアッセイが提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 無作為の8mer二本鎖DNA配列を製造すること及び選択した組織において生産されるタンパク質に結合する8mer配列を同定するためにタンパク質結合アッセイを用いることを含んでなる選択した組織におけるタンパク質の同定のためのモンテカルロ様スクリーニングアッセイ。

【請求項2】 PCAM-1タンパク質に結合する単離され、精製された核酸配列。

【請求項3】 配列CACGGATGを含んでなる請求項2の単離され、精製された核酸配列。

【請求項4】 配列CACAAATGAを含んでなる請求項2の単離され、精製された核酸配列。

【請求項5】 PCAM-1ポリペプチドをコードするかもしくはPCAM-1ポリペプチドをコードする遺伝子とハイブリダイズする単離され、精製された核酸配列。

【請求項6】 配列番号：1を含んでなる請求項5の単離され、精製された核酸配列。

【請求項7】 コードするPCAM-1ポリペプチドが配列番号：2を含んでなる請求項5の単離され、精製された核酸配列。

【請求項8】 単離され、精製されたPCAM-1ポリペプチド。

【請求項9】 配列番号：2を含んでなる請求項8の単離され、精製されたPCAM-1ポリペプチド。

【請求項10】 請求項8のPCAM-1ポリペプチドに対して作製される抗体。

【請求項11】 PCAM-1ポリペプチドをコードするかもしくはPCMA-1ポリペプチドをコードする遺伝子とハイブリダイズする核酸配列を含んでなる発現ベクター。

【請求項12】 請求項11の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項13】 患者から生物学的サンプルを得ること及び生物学的サンプル中のPCAM-1タンパク質レベルを検出するかもしくはモニターすることを

含んでなり、ここで、生物学的サンプル中のPCAM-1タンパク質の存在は、患者における癌の存在もしくは進行を示す、患者における癌を診断及び予測する方法。

【請求項14】 癌が前立腺癌である請求項13の方法。

【請求項15】 (a) PCAM-1基準；及び

(b) 生物学的サンプル中のPCAM-1タンパク質を検出するための手段、を含んでなる患者における癌を診断及び予測するためのキット。

【請求項16】 癌が前立腺癌である請求項15のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、本明細書においてPCAM-1と称する、癌の新規に同定されたマーカータンパク質に特異的に結合する、本明細書においてPCAM-1プローブ1及びPCAM-1プローブ2と称する核酸プローブ(すなわち、DNA共通ドメイン)に関する。本発明はさらに、PCAM-1の核酸配列及びアミノ酸配列に関する。また提供されるのは、PCAM-1を特異的に認識するポリクローナル及びモノクローナル抗体である。本発明はさらに、癌を包含する、無調節の細胞増加及び増殖に関連する疾患の診断、予防及び処置においてPCAM-1タンパク質を検出するように設計された免疫アッセイにおけるこれらの抗体の使用に関する。

発明の背景

リンパ系組織における染色体異常の存在は確立している。T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)と関連する染色体転座は、いくつかの可能性のある癌遺伝子の同定につながっている(Rabbits, T.H. Cell 1991 67:641-644)。T-ALLと関連する染色体転座の多くは、T細胞受容体(TCR)遺伝子に局在している。免疫グロブリン遺伝子の組換えは、B-リンパ球分化の初期に起こる。部位特異的組換えにより2もしくは3個の生殖系列セグメント(すなわち、可変-V;多様性-D;及び連結-Jセグメント)をV遺伝子エクソンへと連結するV-(D)-J組換えは、V領域の多様性の増幅に寄与する。V、D及びJセグメントの隣接する領域のヌクレオチド配列の比較により、12もしくは23塩基のいずれかのスペーサー配列により隔てられているヘプタマーCACTGTG及びTに富んだノナマーGGTTTTTGTを包含するヌクレオチド配列の2つの共通ブロックが保存されていることが示されている(Early et al. Cell 1980 19:981-992)。T細胞受容体及び免疫グロブリン遺伝子のヘプタマー-スペーサー-ヘプタマー-ノナマー配列間の相同性は、一般に切断点クラスター領域もしくはBPCRsと呼ばれるこれらの要素がV-(D)-J組換えにおいて重要な役割を有す

ることを示唆する。保存された組換えシグナル配列 (RS) を認識するDNA結合タンパク質 (1つもしくは複数) は、シグナルとコーディング領域配列間の連結箇所でDNAを切断しそして切断末端を連結する組換え機構に関与し得ると考えられる。最も初期の報告は、RSタンパク質がリンパ系細胞に位置すると開示した (Aguilera et al. Cell 1987 51:909-917; Halligan, B. D. and Disiderio, S. V. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1987 84:7019-7023; Hamaguchi et al. Nucleic Acid Res. 1989 17:9015-9026; 及び Mak, C. H. Nucleic Acid Res. 1994 22:383-390)。より最近では、異なるRSタンパク質が同定されている。例えば、V(D)J組換えシグナル配列のカッパB結合及び認識成分のDNA結合タンパク質が同定されている。このファミリーの転写因子の活性化は、腫瘍形成チロシンキナーゼが、カッパBにより制御される遺伝子調節要素を有する遺伝子を調節する機構をもたらすと考えられる。

【0002】

T細胞異常に関する研究は、組換え酵素の関与に関して、特に染色体バンド11p13内の切断点に関して特に情報を提供している。たいてい両方の相互転座染色体は、組換え酵素活性の特徴であるN領域ヌクレオチド付加を有するので、組換え酵素は異常な染色体連結を招くようである (Alt, F. W. and Baltimore, D. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1982 79:4118-4223)。これらの転座は、正常な染色体連結過程の突然変異とみなされる。

【0003】

リボソームタンパク質をコードする遺伝子の過剰発現と癌の間の関連性を示す多数の報告がある (Chiao et al. Mol. Carcinog. 1992 5:219-231; Fernandez-Pol et al. J. Biol. Chem. 1993 268:21198-211204; Fernandez-Pol et al. Cell Growth & Differentiation 1994 5:821-825; Fernandez-Po

l, J. A. *Anticancer Res.* 1996 16:2177-2186; Chan et al. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 1996 228:141-147; Chan et al. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 1996 225:952-956; Wool, I. G. *Trends in Biochemical Sciences* 1996 21:164-165; Wool et al. *Biochemistry and Cell Biology* 1995 73:933-947; 及び Vaarala et al. *Int. J. Cancer* 1998 78:27-32)。例えば、Chiao et al. (*Mol. Carcinog.* 1992 5:219-231) は、S2-リボソームタンパク質が頭部及び頸部の癌では高められているが、正常な組織ではほとんど検出できないことを見出した。これらの研究に基づき、リボソームタンパク質は、癌においてタンパク質合成を高めることにおいて役割を有すると一般に考えられる。

【0004】

あるいはまた、特定のロイシンジッパー配列モチーフもしくは多数のリボソームタンパク質に特有の他のモチーフが突然変異している可能性があること及び突然変異体が次に核酸に結合することができ (Fernandez-Pol et al. *Anticancer Res.* 1996 16:2177-2186; Wool, I. G. *Trends in Biochemical Sciences* 1996 21:164-165; Wool, I. G. (1997) *The ribosomal RNA and Group I introns* (R. Green and R. Schroeder, Eds.) R. G. Landes Co., Austin TX USA pp. 153-178)、そして癌細胞においてヌクレアーゼの機能を果たすか、連結を制御するか、または遺伝子転写もしくは翻訳を調節するいずれかをできることが提示されている。例えば、ラットリボソームタンパク質S3aは、ラットv-fosトランスフォーメーションエフェクター遺伝子の産物と同一である (Chan et al. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 1996 22

8 : 1 4 1 - 1 4 7)。S 3 aはタンパク質合成の開始に関与し、そしてまた増殖の調節及び細胞周期に関与するタンパク質にも関連している (Chan et al . Biochem . and Biophys . Res . Comm . 1 9 9 6 2 2 8 : 1 4 1 - 1 4 7)。同様に、ラットリボソームタンパク質L 1 0は、推定のウィルムス腫瘍サプレッサー遺伝子に対するDNA結合タンパク質に相同である (Chan et al . Biochem . and Biophys . Res . Comm . 1 9 9 6 2 2 5 : 9 5 2 - 9 5 6)。これらの研究は、突然変異体リボソーム様タンパク質が癌の予測もしくは診断に役立つ可能性があり、そして癌細胞の性質を調節することにおいて重要な役割を果たすことを示唆する。

【 0 0 0 5 】

要するに、再編成する遺伝子と関連する染色体異常を引き起こす機構 (1 つもしくは複数) 及び正常な抗原受容体遺伝子に関与する酵素 (すなわち、組換え酵素) (Croce , C . M . Cell 4 9 : 1 9 8 7 1 5 5 - 1 6 9) の役割は、十分に研究されてはいるが、それでもなおあまり理解されていない。従って、新規なB P C R s 及び新規な組換え酵素の同定は、特に非リンパ系タイプ疾患及び固形癌発生を理解するために必要とされる。

発明の要約

本発明の一つの目的は、無作為の8 m e r DNA配列の製造及び選択した組織により生産される一つのタンパク質もしくは複数のタンパク質に結合する8 m e r配列を同定するタンパク質結合アッセイにおけるそれらの使用を含んでなる新規な転写因子の同定のためのモンテカルロ様スクリーニングアッセイを提供することである。

【 0 0 0 6 】

本発明の別の目的は、P C A M - 1 タンパク質に結合するモンテカルロ様スクリーニングアッセイにより同定される8 m e r 共通配列を提供することである。これらの精製された核酸配列は、本明細書においてP C A M - 1 プローブ1及びP C A M - 2 プローブ2と称する。

【 0 0 0 7 】

本発明の別の目的は、PCAM-1ポリペプチドをコードするかもしくはPCAM-1ポリペプチドをコードする遺伝子とハイブリダイズする単離され、精製された核酸配列を提供することである。

【0008】

本発明の別の目的は、PCAM-1ポリペプチドのアミノ酸配列を提供することである。

【0009】

本発明の別の目的は、細胞及び組織における組換え及び天然のPCAM-1タンパク質を特異的に認識するPCAM-1ポリペプチドに対して作製されるポリクローナル及びモノクローナル抗体を提供することである。

【0010】

本発明の別の目的は、PCAM-1ポリペプチドをコードするかもしくはPCMA-1ポリペプチドをコードする遺伝子とハイブリダイズするいずれかの核酸配列を含有する発現ベクター及び発現ベクターを含んでなる宿主細胞を提供することである。

【0011】

本発明のさらに別の目的は、患者から得られる生物学的サンプル中のPCAM-1タンパク質レベルの検出及び/もしくはモニタリングにより患者における癌を診断及び/もしくは予測するための方法及びキットを提供することである。好ましい態様として、PCAM-1は、PCAM-1タンパク質に対して作製される抗体を用いて免疫アッセイにより尿サンプルにおいて検出される。

発明の詳細な記述

前立腺癌のような癌の早期検出のためのマーカーの開発は、癌の改善された処置にとって必須である。前立腺癌に関して、一般に、血清前立腺特異的抗原(PSA)レベルは、前立腺癌にかかっている患者の同定のために高感度ではなくまた特異的でもないと考えられる(Garnick, M. B. and Fair, W. R. Prostate Cancer. Scientific American, December 1998 75-83)。前立腺癌にかかっている男性の25%程度は正常なPSAレベルを有すると概算されている。従って、前

立腺癌を包含する癌のより高感度で且つより特異的なアッセイの開発が明らかに必要とされる。集団地域検査プログラムによるかもしくは日常的な臨床検査における実施を可能にする、非侵襲性で且つ安価な尿に基づくスクリーニングアッセイは、特に有用である。

【0012】

本発明は、ヒト組織から得られる核抽出物中の新規なDNA結合タンパク質を同定するためにスクリーニングアッセイにおいて用いることができる二本鎖核酸配列に関する。本発明はまた、無作為の8mer DNA配列を製造し、そして選択した組織、すなわち、腫瘍組織において生産されるタンパク質に結合する8mer配列を同定するためにタンパク質結合アッセイを用いる、本明細書において「モンテカルロ」タイプスクリーニングアッセイと称する、新規なスクリーニングアッセイにも関する。モンテカルロタイプスクリーニングアッセイを、腫瘍組織の核タンパク質抽出物において過剰に発現される新規な転写因子を同定するために用いた。このアッセイのために、8merの二本鎖DNAプローブ(n=4096の組み合わせ)を設計した。次にDNAプローブは、同じ患者(n=11)からの匹敵する標本における癌、良性、高い悪性度分類の前立腺上皮内腫瘍及び精嚢組織からの匹敵するタンパク質抽出物間でタンパク質-DNA結合親和性の違いについてスクリーニングするために用いた。タンパク質の結合は、ニトロセルロースフィルターによりそして電気泳動移動度ゲルシフトアッセイ(EMSA)において決定した。シンチレーション計数及びホスホイメーキング(phosphoimaging)により、進行したヒト前立腺癌組織の核抽出物から単離されたタンパク質は、PCAM-1プローブ1(CACGGATG)及びPCAM-1プローブ2(CACAATGA)を含んでなる2つの異なる二本鎖核酸配列に特異的に結合することが示された。調べた他の組織から抽出したタンパク質は、これら2つの核酸配列に結合せず、これらが腫瘍特異的タンパク質に結合したことを示す。これらの配列の一つ、「PCAM-1プローブ2」は、T細胞白血病細胞において以前に同定されている、いわゆる、「切断点クラスター領域」もしくはBPCR(Rabbits, T.H. and Boehm, T. Advances in Immunology 1991 50:119-

146)と同一であった。BPCR配列は、以前に、T細胞及びB細胞における染色体切断と関連付けられており、そしてこれらのBPCRsと関連する機構もしくはタンパク質の機能不全は、白血病並びに前立腺癌における癌性細胞の発生をある程度説明することができる。「PCAM-1プローブ1」及び「PCAM-1プローブ2」の配列を以下に示す：

「PCAM-1プローブ1」：

5' - CACGGATG - 3'

3' - GTGCCTAC - 5'

「PCAM-1プローブ2」：

5' - CACAATGA - 3'

3' - GTGTTACT - 5'

同定された特定のDNA配列(すなわち、二本鎖の)CACGGATG及びCACAATGAを、PC-3ML前立腺細胞(Wang et al. *Oncology Research* 1998 10:219-233)から開発されたcDNAライブラリーをスクリーニングするために用いた。このスクリーニングは、PCAM-1リボソームタンパク質を発現するファージミドクロンの同定をもたらした。「PCAM-1」は、本明細書において用いる場合、精製された組換えもしくは天然のPCAM-1タンパク質のアミノ酸配列をさす。PCAM-1遺伝子のサブクローニング及び遺伝子バンクの検索により、この遺伝子がヒトリボソームタンパク質S2及びマウス染色体タンパク質LLRep3と約90~95%の相同性を示すことが示された。このPCAM-1リボソームタンパク質を発現する核酸配列は配列番号：1を含んでなり、そしてこのポリペプチドの推定アミノ酸配列は配列番号：2を含んでなる。

【0013】

組換えPCAM-1タンパク質は、EMSAにおいて「PCAM-1プローブ1」及び「PCAM-1プローブ2」に特異的に結合する(そして無作為に作製した8mer配列にはそうしない)ことが示された。また、生物学的サンプル中のPCAM-1を同定するためにDNAタンパク質結合アッセイも開発した。EMSAを用いて、PCAM-1は、前立腺癌組織からの組織抽出物において

そしてヒト患者からの尿及び血清において検出された。これらのアッセイにおいて、PCAM-1は、良性もしくは正常な前立腺組織または精嚢組織では検出されなかった。PCAM-1はまた、前立腺癌の臨床証拠のない正常な個体の尿もしくは血清においても検出されなかった。

【0014】

PCAM-1タンパク質を特異的に認識する抗体の開発後に、酵素結合免疫サンドイッチアッセイもしくはELISA研究をヒト組織及び流体からのタンパク質抽出物に対して実施した。ELISAsにより、PCAM-1は、組織からの粗タンパク質抽出物の研究における前立腺癌の非常に高感度のマーカーであることが示された(表1)。これらの実験において、前立腺の顕微解剖領域(調べたn=40の根治的前立腺切除)からの核タンパク質抽出物は、匹敵する精嚢(SV)、前立腺肥大症(BPH)もしくは高い悪性度分類の前立腺上皮内腫瘍(HGPIN)病巣において検出される非常に低いレベルと比較して有意に高いレベルのPCAM-1を発現した。PCAM-1の量($\mu\text{g}/\text{mg DNA}$)は、グリーソンスコア(GS)の関数として増加するようであり、このタンパク質が癌の病期特異的マーカーであり得ることを示す。

【0015】

【表1】

表1: 顕微解剖組織中のPCAM-1

病理学	組織 PCAM-1
SV (n=30)	0
SM (n=5)	0
BPH (n=24)	0
HGPIN (n=6)	0.1 \pm 0.03
GS 4 (n=8)	1.8 \pm 0.31
GS 6 (n=13)	10.5 \pm 1.15
GS 7 (n=10)	20.3 \pm 2.06
GS 8-10 (n=9)	25.2 \pm 3.31

*PCAM-1 ($\mu\text{g}/\text{mg DNA}$).

【0016】

癌性組織を含有する前立腺を除くための根治的前立腺切除（合計n = 40）後に、異なる腺病巣及び組織を前立腺の矢状切片から切断した。全てのBPH及びHGPIIN標本は、癌を示す同じ前立腺から得た。サンプルは少なくとも3回アッセイし、そしてデータは、調べたコホートにおける全ての患者について平均した。

【0017】

診断試験は、患者における尿PCAM-1レベルを比較するために行った。これらの試験からのデータを表2に示す。

【0018】

【表2】

表2: PCAM-1尿アッセイ(n= 225)

診断	PCAM - 1 陽性	PCAM - 1 陰性
前立腺癌 (生検陽性 GS4-8)	24/33	9/33
根治的前立腺切除後	2/12	12/14
BPH	15/96	81/96
他の前立腺疾患	1/14	13/14
勃起性機能不全	2/13	11/13
志願者男性 (22 - 53 歳)	0/40	40/40
女性	1/5(神経因性膀胱 障害)	4/5
腎癌	1/1	0/1
直腸癌	0/2	2/2
泌尿器感染症/炎症	5/9	4/9

【0019】

検出限界カットオフは: PCAM - 1 陽性 (> 5 ng / ml) ; PCAM - 1 陰性 (< 4 ng / ml) であった。PCAM - 1 レベルは、PCAM - 1 陽性患者において 5 - 93 ng / l、そして PCAM - 1 陰性患者において 0 . 1 - 4 .

0 ng/ml の範囲であった。

【0020】

表2に示すように、尿PCAM-1アッセイの感度は73%（すなわち、24/33）であった。3～4年前（すなわち、GS8-10、T3期癌）に前立腺を取り除いた2人の患者では、おそらく、再発する癌のために、尿PCAM-1レベルは高かった。これらの患者は、再発する癌があるかどうかを決定するために現在観察中である。逆に、これらの患者のうち12人（すなわち、GS5-6、T2期癌）は、尿PCAM-1について陰性であった。BPHにかかっている（そして癌の指標がない）と診断される患者では、約16%（n=15/96）が高いPCAM-1尿レベルを示した。患者のこのコホートにおいて、BPH患者の84%（n=81/96）は、PCAM-1について陰性であった。40人の志願者男性のうち、全てがPCAM-1について陰性であった。直腸癌にかかっている一人の患者及び感染症もしくは炎症にかかっている5人の患者（n=5/9）は、PCAM-1について陽性であり、従って、感染症もしくは炎症から偽陽性が生じる可能性があることを示す。

【0021】

従って、これらの結果は、PCAM-1尿アッセイの感度が前立腺癌について73%であることを示す。総合的な特異性（すなわち、疾患にかかっていない患者の総数で割った陰性患者の総数）は約92%（167/180）であった。従って、PCAM-1タンパク質は、癌、特に前立腺癌の有用な独立した診断マーカーであると考えられる。

【0022】

本発明の一つの態様として、PCAM-1タンパク質をコードする核酸配列及びこれらの核酸配列によりコードされるPCAM-1タンパク質の推定アミノ酸配列が提供される。PCAM-1タンパク質をコードする代表的核酸配列及び代表的推定アミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1及び配列番号：2に示す。「核酸配列」は、本明細書において用いる場合、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド及びそのフラグメントもしくは一部、並びに一本もしくは二本鎖であることができそしてセンスもしくはアンチセンス鎖を表すことがで

きるゲノムもしくは合成起源のDNAもしくはRNAをさす。「アミノ酸配列」、「ポリペプチド」もしくは「タンパク質」という用語は、本明細書において用いる場合、単離及び精製されておりそしてPCAM-1タンパク質と関連する天然に存在するタンパク質分子のアミノ酸配列をさす。

【0023】

本発明はまた、これらの核酸配列を含んでなる発現ベクター及び発現ベクターを含有する宿主細胞にも関する。発現ベクター及び発現ベクターでトランスフェクションすることができる宿主細胞は、当該技術分野において周知である。本発明のもののような選択した核酸配列をベクターにそして最終的に宿主細胞に導入する方法もまた周知である。

【0024】

本発明の核酸及びアミノ酸配列は、生物学的サンプル中のPCAM-1タンパク質の検出のためのスクリーニングアッセイを開発することにおいて有用である。本明細書において示すように、一つの態様として、抗体をPCAM-1タンパク質に対して作製し、そして組織、痰、尿もしくは血清のような生物学的サンプル中のPCAM-1タンパク質を検出するためにELISAのような免疫アッセイにおいて用いることができる。周知の方法に従ってモノクローナルもしくはポリクローナル抗体をこのタンパク質に対して作製することができる。あるいはまた、標識した核酸プローブを本発明の核酸配列から製造し、そして組織生検サンプルの核抽出物中のPCAM-1を検出するためにEMSAにおいて用いることができる。

【0025】

従って、本発明の別の態様は、生物学的サンプル中のPCAM-1の検出のための方法及びキットに関する。本明細書において示すように、患者の生物学的サンプル中のPCAM-1レベルの検出は、患者における癌、特に前立腺癌を診断及び予測することにおいて有用である。本発明の方法では、生物学的サンプルを患者から得、そして次に生物学的サンプル中のPCAM-1を検出するための手段と接触させる。一つの態様として、この手段は、組織、痰、血清及び尿のような生物学的サンプル中のPCAM-1タンパク質を検出することができる、PC

AM - 1タンパク質に対して作製される抗体を含んでなることができる。別の態様として、この手段は、組織生検のような生物学的サンプル中のPCAM - 1タンパク質を検出することができるCACGGATGのような標識した核酸プローブを含んでなることができる。従って、本発明のキットでは、サンプル中のPCAM - 1タンパク質及びPCAM - 1タンパク質基準を検出するための手段が提供される。PCAM - 1タンパク質を検出するための手段は、PCAM - 1タンパク質に対して作製される抗体もしくは該タンパク質に結合することができる標識した核酸プローブを含んでなることができる。生物学的サンプル中のPCAM - 1の存在は、患者が癌、特に前立腺癌にかかっていることを示す。本発明の方法及びキットはまた、前立腺癌にかかっている患者において患者におけるPCAM - 1のレベルの変化を継続的にモニターすることにより彼らの予後を評価しそして処置を評価するために用いることもできる。継続的なPCAM - 1のレベルの増加は、癌が進行していることを示し、一方、継続的なPCAM - 1のレベルの減少は、癌の退行を示す。

【0026】

さらに、PCAM - 1タンパク質レベルを検出するためのこれらの方法及びキットはまた、他のタイプの癌、炎症症状、感染症及び遺伝的突然変異を診断及び予測することにおいても有用であり得ると考えられる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Stearns, Mark F.
 Hu, Youji
 Philadelphia, Health and Education Corporation

<120> A PCAM-1 MARKER PROTEIN, NUCLEIC ACID SEQUENCES
 ENCODING PCAM-1 AND IMMUNOASSAYS FOR DETECTION OF
 PCAM-1

<130> MCP-0030

<140>
 <141>

<150> 60/155,865
 <151> 1999-09-24

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 911
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 gcacgagggg tgacgccggg gcagcggggg ggcccggggg ccctgggtggc cctgggatgg 60
 ggaaccgagg tggcttccgc ggaggtttcg gcagtggcat ccggggccgg ggtcgcggcc 120
 gtggacgggg ccggggccga ggccgaggag ctcgcgagg caaggccgag gataaggagt 180
 ggatgcccggt caccaagttg ggccgcttgg tcaaggacat gaagatcaag tccctggagg 240
 agatcactct cttctccctg cccattaagg aatcagagat cattgatttc ttcctggggg 300
 cctctctcaa ggatgagggt ttgaagatta tgccagtgca gaagcagacc cgtgccggcc 360
 agcgcaccag gttcaaggca tttgttgcta tcggggacta ccacccgtgg ggccatcatc 420
 ctggccaagc tctccatcgt ccccgctgcg agaggctact gggggaacaa catcgccaag 480
 gccacactg tccgttgcaa ggtgacaggc cgctgcggct ctgtgctggt acgcctcatc 540
 cctgcaccca ggggcaactg catcgtctcc gcacctgtgc ctaagaagct gctcatgatg 600
 gctggtatcg caatggccac gtcggtctgg gtgttaagtg ctccaaggag gtggccaccg 660
 atgactgcta cacctcagcc cggggctgca ctgccaccct ggcaacttcg ccaaggccac 720
 ctttgatgcc atttctaaga cctacagtca cctgaccccc gacctctgga aggagactgt 780
 attcaccag tctccctatc aggagttcac tgaccacctc gtcaagacc acaccagagt 840
 ctcctgagc cggactcagg ctccagctgt ggctacaaca tagggttttt atacaagaaa 900
 agaaaaataa a 911

<210> 2
 <211> 276
 <212> PRT

Glu Thr Val Phe Thr Lys Ser Pro Tyr Gln Glu Phe Thr Asp His Leu
 245 250 255

Val Lys Thr His Thr Arg Val Ser Val Gln Arg Thr Gln Ala Pro Ala
 260 265 270

Val Ala Thr Thr
 275

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Arg Gly Gly Phe Arg Gly Gly Phe Gly Ser Gly Ile Arg
 1 5 10 15
 Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Ala
 20 25 30
 Gly Arg Gly Gly Lys Ala Glu Asp Lys Glu Trp Met Pro Val Thr Lys
 35 40 45
 Leu Gly Arg Leu Val Lys Asp Met Lys Ile Lys Ser Leu Glu Glu Ile
 50 55 60
 Thr Leu Phe Ser Leu Pro Ile Lys Glu Ser Glu Ile Ile Asp Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Gly Ala Ser Leu Lys Asp Glu Val Leu Lys Ile Met Pro Val Gln
 85 90 95
 Lys Gln Thr Arg Ala Gly Gln Arg Thr Arg Phe Lys Ala Phe Val Ala
 100 105 110
 Ile Gly Asp Tyr Val Gly Leu Gly Val Lys Cys Ser Lys Glu Val Ala
 115 120 125
 Thr Ala Ile Arg Gly Ala Ile Ile Leu Ala Lys Leu Ser Ile Val Pro
 130 135 140
 Val Arg Arg Gly Tyr Trp Gly Asn Asn Ile Gly Lys Ala His Thr Val
 145 150 155 160
 Arg Cys Lys Val Thr Gly Arg Cys Gly Ser Val Leu Val Arg Leu Ile
 165 170 175
 Pro Ala Pro Arg Gly Thr Gly Gly Ile Val Ser Ala Pro Lys Lys Leu
 180 185 190
 Leu Met Met Ala Asn Gly His Ala Gly Ile Asp Asp Cys Tyr Thr Ser
 195 200 205
 Ala Arg Gly Cys Thr Ala Thr Leu Gly Asn Phe Ala Lys Ala Thr Phe
 210 215 220
 Asp Ala Ile Ser Lys Thr Tyr Ser Tyr Leu Thr Pro Asp Leu Trp Lys
 225 230 235 240

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/25981										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. 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) U.S. : 435/4, 8, 7.1, 7.2, 7.21; 530/300; 580/350, 388.1, 388.15; 598/1, 1.11, 18.7, 22.1, 23.1, 23.5												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	HU et al. Macroarray screening assays identified an oncogenic transcription factor as a marker for human prostate cancer.	1-3, 5-9										
—	Proceedings of the American Association for Cancer Research. March 1999, Vol. 40, page 74, Abstract No. 492.	10-16										
Y	CAMPBELL, A. M. General properties and applications of monoclonal antibodies. Monoclonal antibody technology. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1984, pages 1-32.	10										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier document published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"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	"B" earlier document published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"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											
"B" earlier document published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 11 DECEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 09 JAN 2001										
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-8250		Authorized officer ALANA M. HARRIS, PH.D. Telephone No. (703) 305-0196										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/25981

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (7):

C12Q 1/00, 1/68; G01N 33/53, 33/567; A61K 35/00; C07K 14/00, 16/00, 17/00, 2/00, 4/00, 5/00, 7/00; C12P 21/08; C08B 27/00; C07H 1/00, 5/04, 5/08, 19/00, 21/00, 21/02, 21/04

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

485/4, 6, 7.1, 7.2, 7.21; 520/300; 520/350, 388.1, 386.15; 526/1, 1.11, 18.7, 22.1, 23.1, 23.5

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 Q	1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 Q	1/68		33/574	B
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/574		5/00	A

(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) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G
 , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,
 R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T ,
 A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C
 A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M
 , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H ,
 G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K
 E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S
 , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N ,
 M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R
 U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M
 , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N ,
 Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA01 CA04 CA12 GA11
 HA12
 4B063 QA19 QQ03 QQ79 QQ96 QR32
 QR48 QR55 QS32 QS33 QX01
 4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02
 CA24 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
 DA76 EA51 FA74

专利名称(译)	PCAM-1标记蛋白，编码PCAM-1的核酸序列和用于检测PCAM-1的免疫测定		
公开(公告)号	JP2003530077A	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001525386	申请日	2000-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	费城健康及教育公司，D/B/A,德雷克塞尔大学医学院		
申请(专利权)人(译)	Fuiraderufuia健康和Edeyukeshiyon的企业庸率		
[标]发明人	スターンズマークイー フユージ		
发明人	スターンズ,マークイー フ,ユージ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/4705 A61K38/00 C12Q1/6886 G01N33/57434		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/574.B C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QX01 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/155865 1999-09-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了癌症标志物蛋白，PCAM-1以及鉴定和编码该蛋白的多核苷酸。检测该标志物可用于诊断和预测患者的癌症。还提供用于表达PCAM-1的表达载体和宿主细胞以及针对PCAM-1蛋白的抗体。进一步提供了一种类似于蒙特卡洛的筛选测定法，用于鉴定与组织，细胞或其他生物流体的粗提取物中的蛋白质选择性结合的特定8mer序列。

病理学	組織 PCAM-1
SV (n=30)	0
SM (n=5)	0
BPH (n=24)	0
HGPIN (n=6)	0.1 ± 0.03
GS 4 (n=8)	1.8 ± 0.31
GS 6 (n=13)	10.5 ± 1.15
GS 7 (n=10)	20.3 ± 2.06
GS 8-10 (n=9)	25.2 ± 3.31