

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 540798

(P2002 - 540798A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(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	A 6 1 K 31/59	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/59		31/7105	4 B 0 2 4
31/7105		31/711	4 B 0 6 3
31/711		45/00	4 C 0 8 4
38/00		48/00	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 93数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 609598(P2000 - 609598)

(86)(22)出願日 平成12年3月6日(2000.3.6)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月2日(2001.10.2)

(86)国際出願番号 PCT/US00/05972

(87)国際公開番号 W000/60109

(87)国際公開日 平成12年10月12日(2000.10.12)

(31)優先権主張番号 09/285,292

(32)優先日 平成11年4月2日(1999.4.2)

(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 ザ リ-ジェンツ オブ ザ ユニバーシ  
ティ オブ カリフォルニア  
アメリカ合衆国 94607 - 5200 カリフォル  
ニア州 オークランド トウエルフス フ  
ロア フランクリン ストリート 1111

(72)発明者 アルバートソン、 ドナ、 ジー .  
アメリカ合衆国 94549 カリフォルニア州  
ラファイエット ヴィア ロブル 1098

(72)発明者 ピンケル、 ダニエル  
アメリカ合衆国 94595 カリフォルニア州  
ウォールナット クリーク マンザニー  
タ コート 31

(74)代理人 弁理士 中島 淳 ( 外 2 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C Y P 2 4 の複製およびその使用

(57)【要約】

本発明は、C Y P 2 4 遺伝子の増幅またはC Y P 2 4 活性の増加が、癌 ( 例えば、乳癌 ) の存在、その進行またはそれにかかりやすい素質のマ-ーカーであるという発見に関する。本発明は、この情報を用いて、動物における癌にかかりやすい素質を検出する方法を提供する。本方法は、( i ) 動物 ( 例えば、ヒト患者 ) 由来の生物学的サンプルを提供すること ; ( i i ) この生物学的サンプル中におけるC Y P 2 4 のレベルを検出すること ; および ( i i i ) 正常な無担癌組織から採取した対照サンプル中におけるC Y P 2 4 レベルとこのC Y P 2 4 レベルを比較することを包含し、対照サンプル中のC Y P 2 4 レベルと比較して増加した前記生物学的サンプル中のC Y P 2 4 レベルが前記動物における前記癌の存在を示す。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 動物における癌の素質を検出する方法であって、前記方法は

- 、
- (i) 前記動物からの生物学的サンプルを提供し；
  - (ii) 前記生物学的サンプル内のCYP24レベルを検出し；そして
  - (iii) 前記のCYP24レベルを、正常で癌を含まない組織から採取した対照サンプルのCYP24レベルと比較することを包含し、ここで、前記対照サンプルのCYP24レベルと比較して、増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、前記動物の癌の素質を示す、方法。

【請求項2】 前記のCYP24レベルは、前記生物学的サンプルの細胞中のCYP24遺伝子のコピー数を測定することにより検出される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記コピー数は、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)を使用して測定する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記コピー数は、核酸プローブのアレーへのハイブリダイゼーションにより決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記比較ゲノムハイブリダイゼーションはアレー上で実施する、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 前記のCYP24レベルは、前記生物学的サンプルのCYP24 mRNAレベルを測定することにより検出され、ここで、前記対照サンプルのCYP24 RNAと比較して、増加した前記サンプルのCYP24 RNAレベルは、癌の素質を示す、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記のCYP24 mRNAレベルは、前記生物学的サンプルおよび前記対照サンプルにおいて同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、CYP24 mRNAレベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記のCYP24 mRNAレベルは、アレー上の1つ以上のプローブへのハイブリダイゼーションにより測定する、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記のCYP24レベルは、前記生物学的サンプルのCYP

24タンパク質レベルを測定することにより検出され、ここで、前記対照サンプルのCYP24タンパク質と比較して、増加した前記サンプルのCYP24タンパク質レベルは、癌の素質を示す、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 CYP24タンパク質レベルは、生物学的サンプルおよび対照サンプルにおいて同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、タンパク質レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 前記CYP24レベルは、前記生物学的サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルを測定することにより検出され、ここで、前記対照サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性と比較して、増加した前記サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルは、癌の素質を示す、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記の25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ活性レベルは、前記生物学的サンプルおよび前記対照サンプルにおいて同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、活性レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記動物は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、ブタ、およびウサギ目の動物からなる群から選択された哺乳動物である、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記生物学的サンプルは、切除組織、全血、血清、血漿、頬側擦過物、唾液、脳脊髄液、および尿からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルと、前記対照サンプルのCYP24レベルの間の差異は、統計学的有意差である、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、前記対照サンプルの前記CYP24レベルより少なくとも約2倍高い、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、前記対照サンプルの前記CYP24レベルより少なくとも約4倍高い、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 癌を有する動物の余命を推定する方法であって、

(i) 前記動物からの生物学的サンプルを提供し；

(ii) 前記生物学的サンプル内のCYP24レベルを検出し；そして

(iii) 前記のCYP24レベルを、正常で癌を含まない組織から採取した対照サンプルのCYP24レベルと比較することを包含し；ここで、前記対照サンプルのCYP24レベルと比較して、増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、正常レベルのCYP24を有する癌を有する動物と比較して、減少した前記動物の余命を示す、方法。

【請求項19】 前記のCYP24レベルは、前記動物の細胞中のCYP24遺伝子のコピー数を測定することにより検出する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記コピー数は、核酸プローブのアレーへのハイブリダイゼーションにより決定する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記コピー数は、比較ゲノムハイブリダイゼーションを使用して測定する、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 前記比較ゲノムハイブリダイゼーションは、アレー上で実施する、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記のCYP24レベルは、前記生物学的サンプルのCYP24 mRNAレベルを測定することにより検出され、ここで、前記対照サンプルのCYP24 RNAと比較して、増加したCYP24 RNAレベルは、減少した余命を示す、請求項18に記載の方法。

【請求項24】 前記のCYP24 mRNAレベルは、前記生物学的サンプルおよび前記対照サンプルにおいて同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、活性レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記のCYP24レベルは、前記生物学的サンプルのCYP24タンパク質レベルを測定することにより検出され、ここで、一定レベルの

ビタミンD受容体活性で、前記対照サンプルのCYP24タンパク質と比較して、増加した前記サンプルのCYP24タンパク質レベルは、減少した余命を示す、請求項18に記載の方法。

【請求項26】 前記のCYP24レベルは、前記生物学的サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルを測定することにより検出され、ここで、前記対照サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性と比較して、増加した前記サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルは、減少した余命を示す、請求項18に記載の方法。

【請求項27】 前記の25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ活性レベルは、前記生物学的サンプルおよび前記対照サンプルにおいて同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、活性レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性のレベルに基準化する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記動物は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、ブタ、およびウサギ目の動物からなる群から選択された哺乳動物である、請求項18に記載の方法。

【請求項29】 前記生物学的サンプルは、切除組織、全血、血清、血漿、頬側擦過物、唾液、脳脊髄液、および尿からなる群から選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項30】 増加した生物学的サンプルのCYP24レベルと、前記対照サンプルのCYP24レベルの間の差異は、統計学的有意差である、請求項18に記載の方法。

【請求項31】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、前記対照サンプルのCYP24レベルより少なくとも約2倍高い、請求項18に記載の方法。

【請求項32】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、前記対照サンプルのCYP24レベルより少なくとも約4倍高い、請求項18に記載の方法。

【請求項33】 動物の癌を処置する方法であって、

- ( i ) 前記動物からの生物学的サンプルを提供し；
- ( i i ) 前記生物学的サンプル内のCYP24レベルを検出し；
- ( i i i ) 前記のCYP24レベルを、正常で癌を含まない組織からの対照サンプルのCYP24レベルと比較し；そして
- ( i v ) 前記対照サンプルのCYP24レベルと比較して、増加したCYP24レベルを有する動物において癌療法を選択および実施することを包含する、方法。

【請求項34】 前記癌療法は、化学療法、放射線療法、手術、抗ホルモン療法、および免疫療法からなる群から選択する、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 前記癌療法は、補助癌療法である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 前記のCYP24レベルは、前記動物の細胞のCYP24遺伝子のコピー数を測定することにより検出する、請求項33に記載の方法。

【請求項37】 前記CYP24遺伝子のコピー数は、核酸プローブのアレーへのハイブリダイゼーションにより決定する、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 前記のCYP24遺伝子のコピー数は、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)を使用して測定する、請求項36に記載の方法。

【請求項39】 前記比較ゲノムハイブリダイゼーションは、アレー上で実施する、請求項26に記載の方法。

【請求項40】 前記のCYPレベルは、前記生物学的サンプルのCYP24 mRNAのレベルを測定することにより検出され、ここで、前記対照サンプルのCYP24 RNAと比較して増加した前記サンプルのCYP24 RNAレベルは、補助癌療法の必要性を示す、請求項33に記載の方法。

【請求項41】 前記CYP24 RNAレベルは、前記生物学的サンプルおよび前記対照サンプルにおいて、同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、活性レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 前記のCYP24レベルは、前記生物学的サンプルのCYP24タンパク質レベルを測定することにより検出され、ここで、前記対照サン

ブルのCYP24タンパク質と比較して増加した前記サンプルのCYP24タンパク質レベルは、補助癌療法の必要性を示す、請求項33に記載の方法。

【請求項43】 前記CYP24タンパク質活性レベルは、前記生物学的サンプルおよび前記対照サンプルにおいて同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、活性レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 前記CYP24レベルは、前記生物学的サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルを測定することにより検出され、ここで、一定レベルのビタミンD受容体活性で、前記対照サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性と比較して、増加した前記サンプルの25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルは、補助癌療法の必要性を示す、請求項33に記載の方法。

【請求項45】 前記25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルは、前記生物学的サンプルおよび前記対照サンプルにおいて同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、活性レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 前記動物は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、ブタ、およびウサギ目の動物からなる群から選択された哺乳動物である、請求項33に記載の方法。

【請求項47】 前記生物学的サンプルは、切除組織、全血、血清、血漿、脳脊髄液、頬側擦過物、唾液、および尿からなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項48】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルと、前記対照サンプルのCYP24レベルの間の差異は、統計学的有意差である、請求項33に記載の方法。

【請求項49】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、前記対照サンプルのCYP24レベルより少なくとも約2倍高い、請求項33に記載の方法。

【請求項50】 前記の増加した前記生物学的サンプルのCYP24レベルは、前記対照サンプルのCYP24レベルより少なくとも約4倍高い、請求項33に記載の方法。

【請求項51】 CYP24発現細胞の増殖を阻害する能力について供試物質をスクリーニングする方法であって、

(i) 前記のCYP24発現細胞を前記供試物質と接触させ；そして

(ii) CYP24活性レベルを検出することを包含し；

ここで、前記物質と接触していない細胞のCYP24活性レベルと比較して減少したCYP24活性レベルは、前記物質が、前記細胞の増殖を阻害することを示す、方法。

【請求項52】 前記細胞は、ビタミンDと接触させる、請求項51に記載の方法。

【請求項53】 前記検出は、CYP24 mRNAのレベルを検出することを包含し、ここで、一定レベルのビタミンD受容体活性で、前記物質サンプルと接触していない細胞のCYP24 mRNAレベルと比較して、減少した前記CYP24発現細胞のCYP24 mRNAレベルは、前記物質が前記細胞の増殖を阻害することを示す、請求項51に記載の方法。

【請求項54】 前記検出は、前記細胞由来の核酸を、核酸プローブのアレーにハイブリダイズさせることを包含する、請求項51に記載の方法。

【請求項55】 前記検出は、CYP24タンパク質レベルを検出することを包含し、ここで、前記物質サンプルと接触していない細胞のCYP24タンパク質レベルと比較して、減少した前記CYP24発現細胞のCYP24タンパク質レベルは、前記物質が前記細胞の増殖を阻害することを示す、請求項51に記載の方法。

【請求項56】 前記接触細胞および前記物質と接触していない細胞の前記CYP24タンパク質レベルは、同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、CYP24タンパク質レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 前記検出は、前記細胞の25-ヒドロキシビタミンD3

24 - ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルを検出することを包含し、ここで、一定レベルのビタミンD受容体活性で、前記物質サンプルと接触していない細胞の25 - ヒドロキシビタミンD3 24 - ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルと比較して、減少した前記CYP24発現細胞の25 - ヒドロキシビタミンD3 24 - ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルは、前記物質が前記細胞の増殖を阻害することを示す、請求項51に記載の方法。

【請求項58】 前記接触細胞および前記物質と接触していない細胞の前記25 - ヒドロキシビタミンD3 24 - ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルは、同じビタミンD受容体活性で測定するか、または、活性タンパク質レベルは、サンプルおよび対照のビタミンD受容体活性レベルに基準化する、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 前記CYP24発現細胞は、腫瘍細胞である、請求項51に記載の方法。

【請求項60】 前記CYP24発現細胞は、過増殖細胞である、請求項51に記載の方法。

【請求項61】 前記の減少したCYP24活性レベルと、前記物質と接触していない細胞におけるCYP24活性レベルの間の差異は、統計学的有意差である、請求項51に記載の方法。

【請求項62】 前記の減少したCYP24活性レベルは、前記物質と接触していない細胞のCYP24活性レベルより少なくとも約2倍低い、請求項51に記載の方法。

【請求項63】 前記の減少したCYP24活性レベルは、前記物質と接触していない細胞のCYP24活性レベルより少なくとも約4倍低い、請求項51に記載の方法。

【請求項64】 上昇したCYP24レベルを有する細胞の増殖を減少させる方法であって、CYP24阻害剤を使用して、前記細胞のCYP24活性レベルを減少させることを包含する、方法。

【請求項65】 前記方法は、細胞をビタミンDと接触させることをさらに包含する、請求項64に記載の方法。

【請求項66】 前記細胞は腫瘍細胞である、請求項64に記載の方法。

【請求項67】 前記腫瘍細胞は、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸直腸癌細胞、白血病細胞、リンパ腫、肺癌細胞、脳癌細胞、膵癌細胞、および卵巣癌細胞からなる群から選択される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記細胞は、過増殖細胞である、請求項64に記載の方法。

【請求項69】 前記細胞は転移細胞である、請求項64に記載の方法。

【請求項70】 前記阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、CYP24遺伝子発現リプレッサー、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ活性の競合的阻害剤、および25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ活性の非競合的阻害剤からなる群から選択する、請求項64に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

関連出願に対するクロス・リファレンス

(該当せず)

**【0002】**

連邦援助研究開発のもとになされた発明に対する権利に関する声明

本発明は、米国国立衛生研究所(NIH)付与グラント番号CA58207の政府支援により行われた。米国政府は、本発明にある権利を有することができる。

**【0003】**

発明の分野

本発明は、癌遺伝学および細胞遺伝学の分野に関する。特に、本発明は、CYP24遺伝子の増幅と癌との間の関連の同定に関する。

**【0004】**

発明の背景

染色体異常は、遺伝的障害類、変性疾患類および癌にしばしば関連している。全染色体類のコピー類の欠失または増殖および染色体セグメント類または特定領域の欠失または増幅は、癌ではよく起こる(Smith(1991)Breast Cancer Res.Treat.18:Suppl.1:5-14;van de Vijer(1991)Biochim.Biophys.Acta.1072:33-50)。実際、DNA配列類の増幅および欠失は、癌の原因であることができる。たとえば、プロトオンコジーン類および癌抑制遺伝子類はそれぞれ、腫瘍化の特徴であることが多い(Dutrillaux(1990)Cancer Genet.Cytogenet.49:203-217)。癌に関連する特定ゲノム領域類の同定とクローニングは、腫瘍化の研究および診断および予後のよりよい手段の開発の両者において極めて重要である。

**【0005】**

比較ゲノムハイブリット形成(CGH)を用いる研究では、ヒト乳癌のおよそ20個の増幅ゲノム領域を明らかにした(Muleris(1994)Gene

s Chromosomes Cancer 10:160-170; Kallioniemi (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2156-2160; Isola (1995) Am. J. Pathol. 147:905-911)。これらの領域は、腫瘍の進行および治療に対する応答においてある役割を果たすかもしれない非常に作用性の高い遺伝子類をコードすると予測されている。これらの増幅領域類のうち3個は、確立されたオンコジーン類; 17q12のERBB2、8q24のMYCおよび11q13のCCND1およびEMS1と関連していた。乳癌においては、ERBB2およびCCND1/EMS1増幅および過剰発現が、平均余命短縮と関連していた (Gaudray (1992) Mutat. Res. 276:317-328; Borg (1991) Oncogene 6:137-143)。MYC増幅は、リンパ節関与、進行期癌および再燃率増加と関連していた (Borg (1992) Intern. J. Cancer 51:687-691; Berms (1995) Gene 159:11-18)。乳癌または他の腫瘍細胞と関連している追加的な増幅ゲノム領域類の同定は、腫瘍化の研究および癌診断学の開発において極めて重大であることは明白である。

#### 【0006】

前記のCGH研究で見出された増幅領域類のひとつは、染色体20、特に20q13上にあった。その後、20q13の増幅が種々の腫瘍タイプに出現することおよび攻撃的腫瘍挙動に関連していることが見出された。20q13コピー数増加は、乳癌細胞株の40%および原発性乳癌類の18%において見出された (Kallioniemi (1994) 同上)。20q13におけるコピー数増加は、また、卵巣 (Iwabuchi (1995) Cancer Res. 55:6172-6180)、結腸 (Schlegel (1995) Cancer Res. 55:6002-6005)、頭頸部 (Bockmuhl (1996) Laryngor. 75:408-414)、脳 (Mohapatra (1995) Genes Chromosomes Cancer 13:86-93)、および膵臓 (Solinas-Toldo (1996) Genes Chromosomes Cancer 20:399-407)の癌類の25%を超え

るもので報告されてきた。

【0007】

この20q13領域は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)を用いて、乳癌類および細胞株類において高分解能で分析された。20q13内部の1.5メガベース(Mb)幅の増幅領域が同定された(Stokke(1995)Genomics 26:134-137);Tanner(1994)Cancer Res. 54:4257-4260)。乳癌のそれぞれ29%および7%において、低レベル(>1.5X)および高レベル(>3X)20q13配列増幅がインタフェースFISHによって明らかになった(Tanner(1995)Clin.Cancer Res. 1:1455-1461)。高レベル増幅は、攻撃的腫瘍表現型に関連していた(Tanner(1995)同上;Courjal(1996)Br.J.Cancer 74:1984)。FISHを用いて未培養乳癌腫類146個の染色体20qの座14個を分析したもうひとつの研究では、20q13.2のRMC20C001領域(症例の9.6%において高度増幅)、PTPN1領域3Mb近位(6.2%)および20q11のAIB3領域(6.2%)を含む3個の独立して増幅される領域類を識別した(Tanner(1996)Cancer Res. 56:3441-3445)。20q13内部の増幅領域類を明確に特性解析することは、これらの癌類の診断および予後において重要な段階であろうということは明らかである。

【0008】

培養細胞中において染色体20qのコピー数増加は、また、不死化およびゲノム不安定性を含む進行腫瘍類に特徴的な表現型に関連していた。たとえば、20q11-qterにおけるコピー数増加は、それぞれ、ヒトパピローマウイルス(HPV)16E7またはHPV16による形質転換後のヒト尿路上皮細胞(ウロエピセリアルセル)(HUC(Reznikoff(1994)Genes Dev. 8:2227-2240)およびケラチン細胞類(Solinas-Toldo(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:3854-3859)中でしばしば観察されている。さらに、20q13.2におけるコピー数増加は、一部のHPV16E7形質転換HUC株類中におけるp5

3非依存性ゲノム不安定性に関連していた ( S a v e l i e v a ( 1 9 9 7 ) O n c o g e n e 1 4 : 5 5 1 - 5 6 0 ) 。これらの研究は、20q上および特に20q13.2における1個以上の遺伝子類の発現増加が乳癌および他の固形腫瘍類の出現に寄与していることを示唆している。いくつかの候補オンコジーン類は、AIB1 ( A n z i c k ( 1 9 9 7 ) S c i e n c e 2 7 7 : 9 6 5 - 9 6 8 ) 、 B T A K ( S e n ( 1 9 9 7 ) O n c o g e n e 1 4 : 2 1 9 5 - 2 0 0 ) 、 C A S ( B r i n k m a n n ( 1 9 9 6 ) G e n o m e R e s . 6 : 1 8 7 - 1 9 4 ) および T F A P 2 C ( W i l l i a m s o n ( 1 9 9 6 ) G e n o m i c s 3 5 : 2 6 2 - 2 6 4 ) を含めて、20q上において増幅されるとして同定されている。腫瘍表現型に関連している20q13中の核酸配列類を明確に同定することは、これらの癌類の診断と予後に重要な段階であろう。本発明はこれらおよび他の必要性を満たすものである。

#### 【0009】

##### 発明の概要

本発明は、CYP24遺伝子の増幅またはCYP24活性の増加が、癌（例乳癌）の存在、その進行またはそれにかかりやすい素質のマーカであるという発見に関する。本発明は、この情報を用いて、動物における癌にかかりやすい素質、その進行またはその予後を検出/評価する方法類を提供する。したがって、ひとつの態様では、本発明は、動物における癌にかかりやすい素質を検出する方法類を提供する。この方法類では、前記動物由来の生物試料を提供すること、この生物試料内部におけるCYP24のレベルを検出すること；および正常な無担癌組織から採取した対照試料中におけるCYP24レベルとこのCYP24レベルを比較することを含み、対照試料中のCYP24レベルと比較した前記生物試料中のCYP24増加レベルが前記動物中における癌の存在を示唆する。同様に、前記試料中のCYP24レベル増加は、癌を有することが判明している動物/患者の予後不良、および/または生存余命短縮、および/または癌が現実に存在することを示唆する。

#### 【0010】

ひとつの態様では、CYP24レベルは、前記生物試料の細胞中におけるCYP

P 2 4 遺伝子類のコピー数を定量することによって、検出する。特に好適な態様では、前記コピー数は、コンパラティブゲノムハイブリダイゼーション ( C G H ) を用いて測定する。別の好適な態様では、前記コピー数は、核酸プローブ列に対するハイブリダイゼーションによって測定し、さらに特に好適な態様では、コンパラティブゲノムハイブリダイゼーションを列に対して行う。

【 0 0 1 1 】

もうひとつの態様では、C Y P 2 4 レベルは、前記生物試料中におけるC Y P 2 4 mRNAレベルを ( 例 列になっている1個以上のプローブに対するハイブリット形成によって ) 測定することによって検出し、この場合、前記対照試料中におけるC Y P 2 4 RNAと比較した前記試料中におけるC Y P 2 4 RNAレベル増加は、癌にかかりやすい素質を示唆する。好適な態様では、C Y P 2 4 レベルは、前記生物試料中および同一ビタミンDレセプター活性にある対照試料中において測定するか、または前記C Y P 2 4 レベル類を前記試料中および対照においてビタミンDレセプター活性レベルに対して基準化する。

【 0 0 1 2 】

さらに別の態様では、C Y P 2 4 レベルは、前記生物試料中におけるC Y P 2 4 タンパク質レベルを測定することによって検出し、この場合、前記対照試料中におけるC Y P 2 4 タンパク質と比較した試料中におけるC Y P 2 4 タンパク質レベル増加は、癌にかかりやすい素質を示唆する。好適な態様では、C Y P 2 4 タンパク質のレベルは、生物試料中および同一ビタミンD活性にある対照試料中で測定するか、または、前記タンパク質レベル類を前記試料中および対照においてビタミンDレセプター活性レベルに対して基準化する。

またさらに別の態様において、C Y P 2 4 レベルは、生物試料中における25 - ヒドロキシビタミンD3 24ヒドロキシラーゼ酵素活性レベルを測定することによって検出し、その場合、対照試料中における25 - ヒドロキシビタミンD3 24ヒドロキシラーゼ酵素活性と比較した生物試料中における25 - ヒドロキシビタミンD3 24ヒドロキシラーゼ酵素活性レベル増加は、癌にかかりやすい素質を示唆する。好適な方法類において、生物試料中および対照試料中において25 - ヒドロキシビタミンD3 24ヒドロキシラーゼ活性レベルは、生物試

料中および同一ビタミンD活性にある対照試料中で測定するか、または、前記活性レベル類を前記試料中および対照においてビタミンDレセプター活性レベルに対して基準化する。

#### 【0013】

本文に記載の方法類において、前記動物（類）とは、哺乳類、さらに好適にはヒト、非ヒト霊長類、イヌ類、ネコ類、マウス類、ウシ類、ウマ類、ブタ類およびウサギ類からなる群から選択された哺乳類である。

好適な生物試料類は、摘出（例 組織生検）組織類、全血、血清、血漿、口内さっ過物、唾液、脳脊髄液、および尿からなる群から選択される。

好適な態様において、生物試料中におけるCYP24の増加レベルと対照試料中におけるCYP24のレベルの差は、統計的に有意差となっている（例 生物試料中におけるCYP24の増加レベルは、対照試料中におけるCYP24レベルに対して少なくとも約2倍大きく、さらに好適には少なくとも4倍大きい）。

#### 【0014】

本発明は、また、動物における癌を治療する方法類を提供する。前記方法類は、本文に記載のようなアッセイ類を実施すること（例 前記動物由来の生物試料を提供すること；この生物試料内部におけるCYP24のレベルを検出すること；および正常な無担癌組織から採取した対照試料中におけるCYP24レベルとこのCYP24レベルを比較すること）および前記対照試料中のCYP24レベルと比較してCYP24レベル増加を有する動物において癌治療を選択して実施することを含む。好適な態様において、前記癌療法は、化学療法、放射線療法、外科手術、抗ホルモン療法、および免疫療法からなる群から選択される。一部の好適な態様において、前記癌療法は、アジュバント癌治療である。

#### 【0015】

本発明は、また、CYP24 - 発現細胞の増殖を阻害する能力を試験する物質をスクリーニングする方法類を提供する。本方法類では、前記試験物質にCYP24 - 発現細胞を接触させること、およびCYP24活性レベルを検出することを含むが、前記物質に接触させなかった細胞中におけるCYP24活性レベルと比較してのCYP24活性レベル低下は、前記物質が前記細胞の増殖を阻害する

ことを示唆している。好適な態様において、前記細胞はビタミンDに接触させる。CYP24レベルの検出は、本文で記載のようにして実施できる。一部の態様において、前記CYP24 - 発現細胞は、癌細胞である。一部の態様において、前記CYP24 - 発現細胞は、過増殖性細胞である。特に好適な態様において、前記CYP24活性低下レベルと前記物質に接触させなかった細胞中におけるCYP24アッセイレベルの差は、統計的に有意差となっている(例 前記試験物質に接触させた細胞中において、少なくとも約2倍低く、さらに好適には少なくとも4倍低い)。

#### 【0016】

本発明は、さらに、CYP24レベル増加細胞の増殖を低下させる方法類を提供する。前記方法類は、CYP24阻害剤を用いて前記細胞中におけるCYP24活性レベルを低下させることを含む。前記方法類は、さらに、前記細胞をビタミンDに接触させることを含むことができる。前記細胞は癌細胞(例 乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸直腸癌細胞、白血病細胞、リンパ腫、肺癌細胞、脳癌細胞、膵臓癌細胞、結腸癌細胞、および卵巣癌細胞)であることができる。前記細胞は、過増殖性細胞であることができる。前記細胞は、また、転移細胞であることができる。好適な阻害剤類として、アンチセンスオリゴヌクレオチド類、リボザイム類、CYP24遺伝子発現レプレッサー類、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ活性の競合的阻害剤類、および25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ活性の非競合的阻害剤類が挙げられる。

#### 【0017】

##### 定義

本発明をよりよく理解できるように、いくつかの用語を下記で定義した。

“CYP24遺伝子”とは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ酵素(たとえば、GenBank寄託番号U60669 S78775およびX59506を参照)をコードするDNA配列である。用語遺伝子は、遺伝子の変異コピーまたは遺伝子断片を意味することができる。

#### 【0018】

用語“VDR”は、ビタミンDレセプターを意味する。

## 【0019】

用語“対して特にハイブリッドを形成する”および“特異的ハイブリダイゼーション”および“対して選択的にハイブリダイズする”とは、本文では、緊縮条件下で特定のヌクレオチド配列に対して優先的にある核酸分子が結合、二重鎖形成、またはハイブリダイゼーションすることを意味する。用語“緊縮条件”とは、あるプローブが優先的にその標的配列に対してハイブリダイズすること、それよりは低度で他の配列類に対してハイブリダイズするかまたは全くハイブリダイズしないであろう条件を意味する。核酸ハイブリダイゼーション（例 列状になっている場合、サザンまたはノーザンハイブリダイゼーション）の範疇における“緊縮ハイブリダイゼーション”および“緊縮ハイブリダイゼーション洗浄条件”は、配列依存性であり、異なる環境パラメータ下では異なってくる。核酸類のハイブリダイゼーションに関する詳しい参考については、たとえば、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization and Strategy of Nucleic Acid Probe Assays*、第1部、第2章、“overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays (ハイブリダイゼーションの原則と核酸プローブアッセイ手法の概説)”、Elsevier、N.Y. (“Tijssen”) でわかる。一般的に、高緊縮ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、規定のイオン強度およびpHにおける特定配列の熱融解点 ( $T_m$ ) より低い約5 °C であるように選択される。この  $T_m$  は、標的配列の50%が完全にマッチしたプローブにハイブリダイズする温度（規定のイオン強度およびpHにおいて）である。非常に緊縮な条件は、特定プローブについての  $T_m$  と等しくなるように選択される。列上またはサザンまたはノーザンプロットにおけるフィルター上で100個を超える相補性残基を有する相補性核酸類のハイブリダイゼーションのための極めて緊縮なハイブリダイゼーション条件の例としては、標準的ハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイゼーションを一晩実施する時、42 °C である（例 Sambrook (1

989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)、第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、および下記の詳細な記載を参照)。高緊縮洗浄条件の1例としては、65度で15分について0.2×SSC洗浄である(SSC緩衝液の説明については、例 同上のSambrook参照)。列ハイブリダイゼーションの典型的な緊縮洗浄は、50%ホルムアミド、2×SSCで50 または50 までである。しばしば、高緊縮洗浄の前に、低緊縮洗浄を行ってバックグラウンドプローブシグナルを除去する。たとえば100個を超えるヌクレオチド類の二重鎖についての中等度緊縮洗浄の例は、45 で15分で1×SSCである。たとえば100個を超えるヌクレオチド類の二重鎖についての低緊縮洗浄の例は、40 で15分で4×乃至6×SSCである。

#### 【0020】

用語“検出可能な組成物による標識”とは、本文では、検出可能な組成物、すなわちラベルに結合した核酸を意味するものとして使用する。前記検出は、たとえば、分光学的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、物理または化学的手段によって実施できる。たとえば、有用なラベル類としては、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、蛍光色素類(例 FITC、ローダミン、ランタニド燐光類、レキサスレッド)、電子稠密試薬類(例 金)、たとえばELISAなどで一般的に使用されているような酵素類(例 西洋わさびパーオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、発色性ラベル類(例 金コロイド)、磁気ラベル類(例 Dynabeads<sup>TM</sup>)、ビオチン、ジオキシゲニン、または抗血清またはモノクローナル抗体類が利用可能なハプテン類およびタンパク質類などが含まれる。前記ラベルは、検出すべき核酸、ペプチドまたは他の標的化合物に直接取り込ませることができ、または、それは、前記標的にハイブリダイズするかまたは結合するプローブまたは抗体に結合させることができる。ペプチドは、二次的レポーター(例 ロイシンジッパーペア配列類、二次抗体類のための結合部位類、転写活性化剤ポリペプチド、金属結合ドメイン類、エピトープタグ類)によって認識される既定のポリペ

プチドエピトープを取り込むことによって検出可能とすることができる。ラベルは、種々の長さのスペーサーアームによって結合させ、潜在的立体妨害を低下させるかまたは他の有用なあるいは所望の性質に対する影響を低下させることができる(たとえば、Mansfield(1995) Mol Cell Prob es 9:145-156参照)。ラベルの組み合わせも同様に使用できることがわかるであろう。したがって、ある態様では、たとえば、異なる核酸類を識別可能な(たとえば、違うように着色される)ラベルによって標識することもできる。

用語“核酸”とは、本文では、一重鎖または二重鎖形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを意味するものとして使用する。この用語は、核酸類、すなわち、天然ヌクレオチド類の公知のアナログ類で所望の目的のために参考核酸と同等のまたは改良された結合特性を有するアナログ類を含むオリゴヌクレオチド類を含む。前記用語は、また、天然のヌクレオチド類に類似または所望の目的のためにそれを凌ぐように改善された速度で代謝される核酸類を含む。前記用語は、また、合成骨格を有する核酸様構造類を含む。本発明によって提供されるDNA骨格アナログ類は、ホスホジエステル、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-チオアセタール、メチレン(メチルイミノ)、3'-N-カルバメート、モルホリノカルバメート、およびペプチド核酸類(PNAs)が含まれる; Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, F. Echstein編著、IRL Press, Oxford University Press(1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Science、第600巻、BasergaおよびDenhardt編著(NYAS1992); Milligan(1993) J. Med. Chem. 36:1923-1937; Antisense Research and Applications(1993, CRC Press)を参照。PNAsは、N-(2-アミノエチル)グリシン単位のような非イオン性の骨格類を含んでいる。ホスホロ

チオアート結合については、WO 97/03211 ; WO 97/39154 ; Mata (1997) Toxicol . Appl . Pharmacol . 144 : 189 - 197 に記載されている。本用語によって包含される他の合成骨格には、メチルホスホネート結合類またはメチルホスホネートとホスホジエステルが交互に結合しているもの (Strauss - Soukup (1997) Biochemistry 36 : 8692 - 8698)、およびベンチルホスホネート結合類 (Samstag (1996) Antisense Nucleic Acids Drug Dev 6 : 153 - 156) が挙げられる。用語核酸は、遺伝子、cDNA、mRNA、オイゴヌクレオチドプライマー、プローブまたは増幅産物と相互に交換可能なものとして使用している。

#### 【0021】

用語“核酸アレー (nucleic acid array)”とは、本文中、各標的要素が1個以上の固体表面に固定化された1個以上の核酸分子類 (プローブ類) を含む複数の標的要素類であるとして使用されており、試料核酸類は、これに対してハイブリット形成できる。標的要素の核酸類は、例えばCYP24由来である特定遺伝子類またはクローン類由来の配列 (類) を含有できる。他の標的要素類は、たとえば、参考配列類を含有するであろう。種々の大きさの標的要素類を、本発明のアレーで使用することができる。一般的に、小さい標的要素類が好まれる。典型的には、標的要素は、直径が約2 cm未満であろう。通常、要素の大きさは、1マイクロメートルから約3 mmであり、好適には、約5マイクロメートルと約1 mmの間である。前記アレーの標的要素類は、異なる密度で前記固体表面に配置できる。前記標的要素密度は、ラベルの性質、固体支持体等のようないくつかの要因に依存するであろう。当業者は、各標的要素は、異なる長さの配列を有する核酸類混合物を含むことができることを理解するであろう。したがって、標的要素は、クローン化されたDNA片の1個を超えるコピーを含有でき、各コピーは、異なる長さの断片類に分けることができる。標的要素に固定された核酸の長さおよび複雑さは、本発明にとって重要ではない。当業者は、これらの要因を調節して、あるハイブリダイゼーション操作のために最適なハイブリダイゼーションおよびシグナル産生を得ることができ、さらに、異なる遺伝子類

またはゲノム位置間において必要な分解を得ることができる。さまざまな態様において、標的要素配列は、約1 kbから約1 Mbの間、約10 kbから約500 kbの間、約200から約500 kbの間、および約50 kbから約150 kbの間の複雑性を有するであろう。

#### 【0022】

用語“プローブ”または“核酸プローブ”とは、本文で、試料へのそのハイブリダイゼーションが検出可能である1個以上の核酸断片類の集まりを意味するものとして使用している。前記プローブは標識しないこともできるし、または、標的または試料へのその結合が検出できるように下記で説明するように標識することもできる。特に列の場合には、プローブまたは標的核酸類のいずれかを列に対して固定することができる。前記列が“プローブ”または“標的”核酸類を含むかどうかは、その内容から明白であろう。同様に、この内容に応じて、前記プローブ、標的またはその両者のいずれかを標識できる。前記プローブは、たとえば、1個以上のクローン類、単離された全染色体または染色体断片、またはポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)増幅産物類の集合体のようなゲノムの1個以上の特定(事前に選択された)部分類由来の核酸源から産生される。本発明のプローブ類は、本文に記載の領域中に見出された核酸類から産生される。前記プローブまたはゲノム核酸試料は、たとえば、反復性核酸類のブロックまたは除去または独特の核酸類を多くすることによって、ある方法で処理することができる。前記用語“試料”とは、本文では、検出された核酸類ばかりでなく、ブロック核酸類等との標識に適用される形状となっている検出可能な核酸類を意味するものとして使用できる。ブロック核酸は、また、別個の言い方もできる。“プローブ”が特に意味するところは、用語を使用した内容から明らかである。前記プローブは、また、固体表面(例 ニトロセルロース、ガラス、石英、熔融シリカスライド)上に列状に固定化された核酸類である。いくつかの態様では、前記プローブは、たとえば、WO96/17958中で述べられているように核酸類の列の一員であることもできる。高密度列を作製可能な技術は、また、この目的のためにも使用することができる(たとえば、Fodor(1991)Science 767-773; Johnston(1998)Curr. Biol. 8

: R171 - R174 ; Scummer ( 1997 ) Biotechniques 23 : 1087 - 1092 ; Kem ( 1997 ) Biotechniques 23 : 120 - 124 ; 米国特許第5、143、854参照)。当業者は、本文に記載した特定プローブ類の正確な配列をある程度改変して、開示されたプローブ類と“実質的に同一で”あるがそれでもなおそれらが由来したプローブと同一標的類または試料類に対して特異的に結合（すなわち、対して特異的にハイブリダイズ）できる能力を保持しているプローブ類を産生できることがわかるであろう（上記の検討を参照）。このような改変は、本文に記載のこのプローブについての引用によって具体的に記載網羅されている。

### 【0023】

本文では、用語“ヒト核酸試料”は、ハイブリダイゼーションまたは増幅による検出に適した形状のヒトDNAまたはRNAを含む試料を意味するものとして使用する。この核酸は、単離、クローニング、または増幅できる；それは、たとえば、ゲノムDNA、mRNA、または特定染色体由来のcDNA、または本文に開示した特定のアンプリコン類または欠失物類内部の選択された配列類（例特定プロモータ類、遺伝子類、増幅または制限断片類、cDNA等）であることができる。前記核酸試料は、特定の細胞類または組織類から抽出することができる。核酸試料を調製した細胞または組織試料は、通常、アンプリコン増幅または欠失または転座に関連して検出された癌を有している疑いがある患者から採取される。細胞および組織試料類の方法類は当業者に周知であり、吸引、組織切片類、針生検等が挙げられるがこれらに限定されない。前記試料は、しばしば、患者由来の試料である“臨床試料”であり、組織学的目的のために採取した凍結切片類またはパラフィン切片類のような組織切片類を含む。前記試料は、また、細胞培養物由来の（細胞の）上清または細胞それ自体、および染色体異常を検出するかまたはアンプリコンコピー数を求めることが望ましい組織培養および他の媒体由来の細胞であることができる。ある場合では、前記核酸類を、ハイブリダイゼーション前にPCRのような標準的手法を用いて増幅させることもできる。前記試料は、固体に固定化された単離核酸類であることもできる。1態様では、前記試料は、それぞれの核酸類が実質的に未改変のまま保持されかつ典型的には標準的

手法に従って調製されたインタフェース核を含むように、調製することができる。

#### 【0024】

用語“癌検出”とは、動物中における癌の存在または不在を確認することを意味している。“癌検出”とは、また、動物中における癌性細胞の存在の可能性に関してまたは癌発症の可能性またはそれに対してのかかりやすさに関して間接的証拠を得ることを意味することもできる。癌検出は、本発明の方法類を単独でまたは他の方法類と組み合わせて、または動物健康状態に関する他の情報と照らし合わせて、達成することができる。

#### 【0025】

動物における“癌”とは、コントロール不可の増殖、不死化、転移能、急激成長および増殖速度およびある形態学的特長のような癌の原因となる細胞類に特異的な特徴性質を有する細胞類の存在を意味している。癌細胞は、腫瘍の形状であることも頻繁であろうが、上記細胞は、動物内部において単独で存在することもでき、または白血病細胞のように非腫瘍化癌細胞であることもできる。癌には、乳癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳または中枢神経系癌、末梢神経系癌、食道癌、子宮頸部癌、メラノーマ、子宮または子宮内膜癌、口腔腔または咽頭癌、肝癌、腎臓癌、精巣癌、胆管癌、小腸または盲腸癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨髄腫および軟骨肉腫などが挙げられる。

#### 【0026】

「動物」とは、多細胞、神経系の所有、自発的運動、内部消化、などで特徴づけられる動物界のものを表わす。「動物」はヒトまたはその他の哺乳動物であることができる。好ましい動物は、ヒト、非ヒト霊長類、およびその他の哺乳動物である。すなわち、本発明の方法は、ヒトに対する医療的応用と同じく獣医学的応用をも意図していることが認識されるであろう。

#### 【0027】

「生物学的サンプルの提供」とは、本発明に記載された方法における使用のための生物学的サンプルを得ることを意味する。これは最も多くは動物から細胞のサンプルを除去することで行なわれるであろうが、また既に単離した細胞（たと

えば他の人によって単離された)ものを用いたり或いは本発明の方法をインビボで行なうことによっても達成することができる。

【0028】

「生物学的サンプル」とは、細胞もしくは細胞集団、または動物からの大量の組織もしくは体液を意味する。最もしばしば、サンプルは動物から取出されてきたが、しかし「生物学的サンプル」という用語はインビボ、すなわち動物から取出さずに分析された細胞や組織をも意味する。「生物学的サンプル」とはしばしば動物からの細胞を含むであろうが、しかしこの用語はまた、CYP24レベルを測定するために使用できる血液、唾液または尿の非細胞画分のような非細胞的な生物学的材料をも意味する。好ましい生物学的サンプルは、組織バイオプシー、切屑(たとえば頬面切屑または頬側擦過物)、全血、プラズマ、血清、尿、唾液、細胞培養物、または脳脊髄体液を含む。

【0029】

「CYP24のレベルの検出」とは、CYP24遺伝子の数、または25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ酵素をコードする遺伝子の発現レベルの測定を意味する。遺伝子のコピー数は、当業者に公知の種々の方法、たとえばこれらに限定されるものではないが、比較ゲノムハイブリッド化(CGH)や定量的DNA増幅(たとえば定量的PCR)によって測定することができる。遺伝子発現は、それらの何れもが標準的技術を用いて測定可能であるところのmRNAレベル、タンパクレベルまたはタンパク活性の検出を含めた種々の方法でモニターすることができる。検出はCYP24(たとえばゲノムDNA、cDNA、mRNA、タンパクもしくは酵素活性)のレベルの定量を含むことができ、または特に対照レベルと比較してのCYP24のレベルの定性的評価であってもよい。検出されるレベルのタイプは明細書から明瞭であろう。CYP24はVDR活性としっかりリンクしているので、遺伝子発現の測定は好ましくは、VDR活性の測定と組み合わせて行なわれる。

【0030】

CYP24のレベルの「比較」とは、2つのサンプルにおけるCYP24レベルを検出し、そしてそのレベルが同等であるかまたは一方が他方よりも大きいか

どうかを決定することを意味する。この比較は、2つの値の間の統計的比較を可能とするような定量的レベル間において、またはたとえばヒトによる目視での評価のような定性的検出方法のように定量性の欠如のもとに行なうことができる。

#### 【0031】

「対照サンプル」とは、健康でありガンに罹患していない動物及び/又は細胞や組織で代表される生物学的材料のサンプルを意味する。対照サンプルにおけるCYP24のレベルは、特定の組織における、または特定の時点(たとえ治療方式の前、途中、もしくは後)における正常で無ガンの動物の一般的集団もしくは特定の個体において望ましくは典型的なものである。このサンプルは、特に本発明に記載の方法で用いられる動物から取出すことができるし、また体内のどこかにガンのある動物から取り出した無ガンの生物学的材料を含むところの正常で無ガンの動物で代表される如何なる生物学的材料であってもよい、対照サンプルもまた、正常で無ガンの動物からの測定に基いてこれまでに確定されたところの無ガン集団で代表される確定されたCYP24レベルをも意味することができる。

#### 【0032】

「増大したレベルのCYP24」とは、CYP24の対照レベルと比較して明らかに高いレベルのCYP24を意味する。比較のための方法は、CYP24の定量値を用いて統計的に行なうことができ、またはたとえばヒトによる目視評価のような非統計的手段を使って比較することもできる。

#### 【0033】

「CYP24遺伝子のコピー数」とは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ酵素をコードする細胞中のDNA配列の数を意味する。遺伝子に関して、一般に動物は各々の遺伝子の2つのコピーをもっている。しかしながらコピーの数は、遺伝子増幅や複製によって増大させたりまたは欠失によって減少させたりすることができる。

#### 【0034】

mRNA、タンパク、酵素活性またはコピー数のレベルが「測定」されたとき、それは定性的または定量的方法を用いて評価される。そのレベルは好ましくは、生物学的サンプルから得た値と対照の値の統計的な比較が可能な定量的手段を

用いて決定される。このレベルはまた、たとえば可視分析や蛍光顕微鏡その他の光学的検出器（たとえば画像分析計など）を用いて検出した蛍光的にラベルしたサンプルのような複数の可視ラベル化サンプルのヒトによる比較、といったような定性的方法を用いて決定することもできる。CYP24 mRNA、タンパクまたは酵素活性のレベルが測定するとき、好ましくはその測定は、VDR活性の測定及び/又は正常な組織または細胞（たとえば同一動物からか、もしくは異なった「対照」動物からの）におけるCYP24活性の測定を含む。

#### 【0035】

「25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性」とは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、1-25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>またはその他の類縁の基質の24-ヒドロキシル化の触媒を意味する（たとえば次を参照。Stryer (1988) Biochemistry, 3rd Edition, W. H. Freeman and Co.; Jehan et al., (1998) Biochim. Biophys. Acta, 1395: 259-265; Seo and Norman (1997) J. Bone Miner. Res. 12: 598-606）。

#### 【0036】

「組織バイオプシー」とは、診断的分析のための生物学的サンプルの除去を意味する。ガンに罹患している患者においては、腫瘍の中の細胞を分析するために腫瘍から組織を除去してもよい。

#### 【0037】

CYP24の定量されたレベルがCYP24の正常レベルの信頼区間の外側にあるときは、その2つのレベル間の差は「統計的に有意である」といわれる。もし検査値がCYP24の正常レベルの信頼区間の外側にあるときは、その検査値は正に異常であり平均値からの正常な偏移を表わすものではない、という確率を予測することができる。本発明の方法において、テストサンプルが異常である確率が0.15、0.1、0.05および0.01を含めた多くの値の何れかでアレー (array) ば、テストサンプルと対照の間の差は「統計的に有意である」と定義することができる。たとえばFreude, J. E.: (1988) M

odern Elementary Statistics, Prentice-Hallのような多くの資料が、統計的有為差の評価方法を教示している。

【0038】

動物の「延命予測（余命）」とは、疾患または病状の結果の予後予想を意味する。「延命予測」は、疾患、病状、またはそれらの症状の重篤度、持続または進行に関する予測を意味することができる。「延命予測」はまた、動物の延命が期待される時間の長さ、または一定時間までの動物の延命の確率をも意味することができる。

【0039】

「ガンの治療方法」とは、動物におけるガン細胞数を減少または消滅するように考えられた手段や処置方法を意味するか、またはガンの症状を治癒させることを意味する。「ガンの治療方法」は、ガン細胞が現実には消滅したり、細胞数が現実には減少したり、またはガンの症状が現実には治癒したりすることを必須的に意味するものではない。ガンの治療方法は、成功の可能性が低くてもしばしば行なわれるが、もし動物の病歴や予想延命予測（余命）がわかっておれば、それは全体として有益な処置方法とみなされる。

【0040】

「CYP24活性のレベルの減少」とは、細胞における25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>24-ヒドロキシラーゼ酵素活性の阻害、またはCYP24遺伝子のコピー数の減少、または細胞でのCYP24 mRNAもしくはタンパクの減少（たとえば与えられたVDR活性レベルにおける）を意味する。好ましくは、CYP24活性のレベルは正常で無ガンの細胞に典型的なレベルにまで減少されるが、そのレベルは、正常細胞に典型的なものより以下のレベルを含め細胞の増殖を減少させるに十分な如何なるレベルにまでも減少させることができるであろう。

【0041】

細胞をビタミンDと「接触」させることは、細胞がビタミンDの存在下にあることを確かにするものである。通常はビタミンDと接触しない細胞の場合には、ビタミンDはインビボまたはインビトロで細胞に添加される。「ビタミンD」とは、ビタミンD<sub>1</sub>、ビタミンD<sub>2</sub>およびビタミンD<sub>3</sub>を含み但しそれらには限定

されないビタミンD分子の一群の如何なるものをも意味する。それはまた、たとえばビタミンDの代謝産物と同じくCYP24酵素の基質である分子の構造的および機能的同族体をも意味する。

【0042】

「腫瘍細胞」とは、腫瘍から単離された腫瘍の一部分であるか、または腫瘍形成可能なガン細胞である。腫瘍細胞はインビボまたはインビトロで存在することができる。

【0043】

「過増殖細胞」とは、異常に高い増殖速度をもつ細胞、または異常に大きな程度すなわち時間につれて数が増大する細胞集団となるまで増殖する細胞である。

「過増殖細胞」はインビボまたはインビトロで存在することができる。

【0044】

「CYP24活性の阻害剤」とは、上で定義したようなCYP24活性を減少させるように作用する分子である。そのような阻害剤は、アンチセンス分子もしくはリボザイム、CYP24遺伝子転写のリプレッサー、または25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ酵素の競合的もしくは非競合的分子阻害剤を包含することができる。

【0045】

「CYP24転写のリプレッサー」というフレーズは、CYP24遺伝子からのCYP24 mRNAの生産を阻害することができる分子を意味する。好ましくはこの部分は、CYP24遺伝子の調節要素と直接または間接に結合し、それによりCYP24遺伝子の転写を防ぐものである。

【0046】

「25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼの競合的阻害剤」とは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ酵素とまたはその基質と直接または間接に結合することができ、それによって該酵素の基質への結合を防ぎそしてインビトロまたはインビボで基質の24-ヒドロキシル化を防ぐような分子を意味する。

【0047】

「25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24 - ヒドロキシラーゼの非競合的阻害剤」とは、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24 - ヒドロキシラーゼ酵素基質の24 - ヒドロキシル化は阻害するが、酵素と基質との結合は阻害しない分子を意味する。

【0048】

細胞増殖のまたはCYP24活性の阻害剤の「スクリーニング」とは、細胞増殖またはCYP24活性を阻害するための分子集団の活性を系統的に試験することを意味する。スクリーニングは、インビトロまたはインビボで行なうことができる。スクリーニングされる分子の阻害活性は、たとえば標準的な試験方法を用いてのCYP24酵素活性を調べるように直接的に評価するか、またはたとえば細胞増殖のようなCYP24酵素活性の細胞的結果をモニターすることによって間接的に評価することができる。

【0049】

「CYP24 - 発現細胞」とは、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24 - ヒドロキシラーゼタンパクをいくらかでも生産する細胞である。一般的に、その細胞で生産される酵素の量は、標準的な技術を用いて検出可能であろう。

【0050】

「供試物質」とはスクリーニングでテストされる如何なる分子または非分子体をも意味する。該分子はスクリーニングに含まれるように無作為に選択されるか、または該分子がスクリーニングで陽性の結果を与えるであろうとの経験的な予測によって含まれることができる。この分子は、スクリーニングの目的のために生化学的アッセイまたは細胞の中へ直接導入してもよく、あるいはスクリーニングで望ましくテストされるRNAまたはポリペプチドをコードする核酸から成っていてもよい。アッセイ系の中へ直接導入された分子は、ペプチド、核酸、含水炭素、脂質、またはそれ以外如何なる有機もしくは無機の分子をも含む如何なる公知の化学的または生化学的分子を包含することができる。「供試物質」はまた、たとえば電磁氣的放射や加熱のような非分子体をも意味する。

【0051】

細胞の「増殖」とは、細胞もしくは細胞集団が生長し分裂する速度、または細

胞もしくは細胞集団が生長し、分裂しまたは数が増加する程度を意味する。細胞の「増殖」はまた、細胞の生長および分裂速度ならびに細胞死の速度を含めた複数の因子を反映することができる。

【0052】

「細胞の増殖の減少」というフレーズは、細胞または細胞集団の生長または分裂の速度または程度の減少を意味する。そのような方法は細胞分裂もしくは細胞生長の防止を含むことができ、細胞死をも含んでもよく、そしてインビボまたはインビトロで実施することができる。

【0053】

「CYP-24阻害活性」とは、細胞における25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性の産生及び/又は蓄積を減少または阻害する分子の能力である。該分子は、たとえば転写の阻害、mRNAレベルの減少、翻訳の阻害、または酵素自体の阻害のようなCYP24遺伝子から酵素活性までの経路の如何なる工程における蓄積をも防ぐことができる。この減少や阻害は好ましくは、VDR活性の同一のレベルでの制御への参照によって確認される。

【0054】

CYP24酵素またはCYP24ポリペプチドは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ活性をもつタンパクであり、最も好ましくはCYP24遺伝子によってコードされる。

【0055】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク」という用語はここでは、アミノ酸残基の重合体を表わすものとして相互交換可能的に用いられている。これらの用語は、天然に存在するアミノ酸重合体と同様に、1つまたはそれより多いアミノ酸残基が対応する天然存在アミノ酸の人工的な化学的類似体であるようなアミノ酸重合体に適用される。

【0056】

ここでたとえば「アルギニン」とか「アルギニン残基」というような名称で特定されるアミノ酸は、天然の、人工的の、または改変されたアミノ酸を意味する。すなわち、たとえばアルギニンとは、ポリペプチド中に取り込まれる能力によ

り天然のアルギニンと同一もしくは類似の機能を有し、そのポリペプチド中に取り込まれる能力により天然のアルギニンと同一もしくは類似の機能を有し、そのポリペプチドのフォールディングを行ない、そしてそのポリペプチドとその他のポリペプチドとの相互作用を行なうようなアルギニン類似体をも包含するものである。

#### 詳細な説明

本発明は、ビタミンD24ヒドロキシラーゼ(CYP24)遺伝子(GenBank受入番号U60669 S78775およびX59506)の増幅が各種の癌(たとえば乳癌)で発生するという発見に関する。ビタミンD24ヒドロキシラーゼは、ビタミンD3の活性形の分解を開始することによって、細胞内のビタミンD系の活性を制御する。特定の理論に縛られずに、腫瘍発生時のCYP24の増幅によって、ビタミンDが仲介する増殖制御を中断させる手段を提供することが考えられている。

#### 【0057】

ヒト乳癌の染色体バンド20q13.2の増幅は、予後不良と腫瘍の攻撃的挙動に関連しており(Tanner et al., (1995) Clin. Cancer Res 1:1455-1461; Courjal et al., (1996) Br. J. Cancer, 74:1984-1989)、この領域への遺伝子マッピングの過剰発現は、乳癌の発達が原因であることが示唆される。比較ゲノムハイブリダイゼーションの新しい高分解能形である、配列CGH(Pinkel et al., (1998) Nature Genetics, 20:207-211)を用いて、我々はDNA複製数プロファイルを、20q13.2における再帰性増幅の領域にマップした。

#### 【0058】

この分析は、遺伝子CYP24に注目している。なぜならCYPは、最も情報を与える腫瘍において、最も高度に増幅される狭いゲノム間隔にマップされ、CYP24の機能について知識があるためである。CYP24は、ビタミンD3の活性形、1,25-ジヒドロキシビタミンD3の分解を触媒する酵素である、ビタミンD24ヒドロキシラーゼをコード化する(総説については、Walt

ers (1992) *Endocrine Reviews* 13:719-764; Jones et al., (1998) *Amer. Physical Soc.* 78:1193-1231)。ビタミンDは、カルシウムと骨の代謝の調節に主要な役割を果たすセコステロイドホルモンである。しかし、ビタミンD受容体(VDR)も、乳房を含む(Berger et al., (1987) *Cancer Res.* 47:6793-6799; Buras et al., (1994) *Breast Cancer Res. and Treatment* 31:191-202)、無機質代謝に関与しない他の多くのいわゆる「古典的でない」組織で発見されており、これらの組織におけるビタミンDの役割も示されている。

#### 【0059】

1,25-ジヒドロキシD3およびリガンド結合受容体のレベルは、フィードバック機構によって細胞内で非常に厳しく制御されているように思われる。ホルモンをVDRに結合させると、CYP24転写の活性化が生じて、1,25-ジヒドロキシD3の分解と、1,25-ジヒドロキシD3の合成に必要な酵素であるCYP11の阻害が開始される。実際に、CYP24の転写はVDRレベルおよび活性に非常に密接に関連しているため、CYP24プロモーターリポータ作成物からの転写の活性化は、VDR活性のアッセイとして使用される(Arbour et al., (1998) *Anal. Biochem.* 255:148-154)。したがって、この理論に束縛されずに、我々は、細胞内のCYP24の役割がビタミンD系の生物活性を制限することであると考えている。

#### 【0060】

乳房などの「古典的でない」組織において、ビタミンDは、細胞を分化と増殖休止の方向へ向かわせることによって、増殖阻害を促進する。乳癌細胞は、生体内と生体外の両方で、ビタミンDの抗増殖効果に応答する(Eisman et al., (1989) *Cancer Res.* 47:21-25)。乳癌細胞系は一般に、ビタミンDに応答して、細胞サイクルのG0/G1ステージで捉えられ、MCF-7乳癌細胞系は、アポトーシスを行うよう誘導させることができる(Elstner et al., (1995) *Cancer Res.* 5

5:2822-2830; Love-Schimenti et al., (1996) Cancer Res 56:2789-2794; Sirnoli-Campbell et al., (1977) Breast Cancer Res. and Treatment, 42:31-41)。げっ歯類へのビタミンDの投与は、腫瘍キセノグラフの進行を低下させる (Eisman et al., (1989) Cancer Res. 47:21-25; Colston et al., (1989) Cancer, 188-191)。

【0061】

ビタミンDのこのような成長調節特性は、ビタミンD系の崩壊が異常増殖の原因になりやすいという、現行の意見を支持する。この示唆は、受容体陰性腫瘍の患者が予後不良であるという観察と、日光を浴びることと乳癌と結腸癌の危険が、反比例して相互に関連していること確立した疫学的研究によって、さらに支持されている (Gorham et al., (1989) Can. J. Public Health 80:96-100; Gorham et al., (1990) Int. J. Epidemiol 19:820-824; Garland et al., (1990) Preventive Medicine 19:614-622)。

【0062】

それゆえ、CYP24のこの仮説的な発癌遺伝子の役割は、1,25-ジヒドロキシビタミンD3のレベルを低下させ、リガンド結合VDRの生物効果を調節するその機能に由来している。この仮説は、生体外でのビタミンDの抗増殖活性が、ヒドロキシラーゼ阻害剤の存在下で向上するという観察によって支持されている (Reinhardt and Horst (1989) Arch. Biochem. Biophys. 272:459-465; Zhao et al., (1996) J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 57:197-202)。したがって、理論に束縛されずに、本発明は、リガンド結合VDRが結合し、増加した数のCYP24遺伝子複製による転写を開始するため、CYP24の増幅が細胞内のビタミンD分解のアップレギュレーションによって、ビタミンD仲介成長制御を取り消すという認識に、一部基づいている。

## 【0063】

これらの発見を考慮すると、CYP24は癌および/または癌発生の可能性（予測）のための良好なマーカーとなる。したがって、ある実施例において、本発明は、動物における癌の存在、または偏好の検出方法を提供する。方法には（i）動物（たとえばヒト患者）による生物サンプルを与えること；（ii）生物サンプル内のCYP24レベルを検出すること；（iii）CYP24レベルを、通常の癌のない動物から採取した対照サンプルのCYP24レベルと比較することが含まれる。ここで対照サンプルのCYP24レベルに比較した生物サンプル内のCYP24の上昇したレベルによって、前記動物における前記癌の存在が示される。CYP24転写物、翻訳ポリペプチドまたは酵素活性をアッセイする場合、方法はVDR活性の測定を含むことが好ましく、サンプルと対照の比較は、同じVDRレベルで行うか、VDRレベルの違いを反映させて補正を行う。

## 【0064】

同様にCYP24レベルの検出は、癌に罹患した動物の生存予測値を予測するのにも使用できる。CYP24レベルは生存予測値（たとえば疾病の進行または再発の可能性）のアッセイに使用可能なため、CYP24レベルのアッセイによって、癌治療の有用な構成要素が与えられる。したがって、癌治療の1つの好ましい方法において、CYP24レベルがアッセイされ、適切な対照または個体群標準と比較して高い場合には、1個以上のアジュバント療法（たとえば放射線療法、再手術、化学療法など）が癌治療措置として選択される。

## 【0065】

上昇したCYP24レベルが癌または癌の素因の表示として確認されると、CYP24レベルは、潜在的な予防法および/または治療法を評価する有用な標的/マーカーとなる。したがってたとえば、（VDR活性の所与のレベルにおける）CYP24活性のレベルは、1つ以上の推定上の潜在的治療/予防法がある場合でもない場合でも、治療/予防化合物の潜在的活性の尺度となる、すなわち化合物の存在時にCYP24活性が低いと、化合物の潜在的活性がより高いことが示される。

## 【0066】

別の実施例において、本発明は細胞の増殖を低下させる方法を提供する（たとえば癌細胞）。本方法は、CYP24の阻害剤を用いて、前記細胞におけるCYP24活性のレベルを低下させることを含む。

#### 1. CYP24レベルのアッセイ

上で示したように、（たとえば特定のビタミンD受容体活性において）CYP24の複製数または活性レベルのアッセイは、癌の存在または可能性（素因）の尺度となる。CYP24の配列は既知であるため、複製数は、以下で述べるように多数の各種方法によって直接測定できる。

#### 【0067】

CYP24「活性」レベルに基づくアッセイに関して（たとえば、転写産物のレベル、翻訳タンパク質のレベル、タンパク質のレベル、酵素活性）、CYP24の転写をビタミンD受容体（VDR）のレベルおよび活性に密接に結びつけることは、CYP24レベルの評価を複雑にする。手短かに言えば、CYP24発現レベルは、VDR活性はもちろんのこと、複製数から生じる転写の規模の上昇にも依存する。したがって、CYP24「活性」のアッセイに基づく実施例では特に、CYP24レベルの評価が、正常細胞に対する腫瘍細胞中のCYP24レベルの測定だけでなく、腫瘍および正常細胞におけるVDRレベルと活性の測定も含むことが好ましい。そのようはアッセイを以下で説明する。

#### A) 複製数の検出

1つの実施例において、癌の存在または偏好は単にCYP24複製数の決定によって評価される。特定の遺伝子の複製数の評価方法は、当業熟練者には周知である。

#### 1) ハイブリダイゼーションに基づくアッセイ

サンプル中のCYP24コード化核酸の複製数を評価する方法の1つには、サザントランスファーがある。サザンプロットにおいて、ゲノムDNA（通常、フラグメント化され、電気泳動ゲルで分離された）は、標的領域に特異性のプローブに対してハイブリダイゼーションされる。標的領域のプローブからのハイブリダイゼーション信号の強度を、正常ゲノムDNA（たとえば、同一または関連細胞、組織、器官などの非増幅部分）の分析による対照プローブ信号と比較すると

、標的核酸の相対複製数の概算値が得られる。

【0068】

CYP24の複製数を決定する別の方法は、*in situ* (原位置)ハイブリダイゼーションである。*in situ*ハイブリダイゼーションは既知である (たとえばAngerer (1987) Meth. Enzymol 152:649)。一般に*in situ*ハイブリダイゼーションは、以下の主要なステップより成る：(1) 分析される組織または生物構造の固定；(2) 標的DNAのアクセシビリティを高め、非特異性結合を減少させるため、生物構造の事前ハイブリダイゼーション処理；

(3) 核酸混合物の、生物構造または組織内の核酸へのハイブリダイゼーション；(4) ハイブリダイゼーションで結合されなかった核酸フラグメントを除去するため、ハイブリダイゼーション後の洗浄；(5) ハイブリダイゼーションした核酸フラグメントの検出。これらの各ステップで用いた試薬と使用した条件は、特定の用途によって変わる。

【0069】

好ましいハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、これに限定されるわけではないが、サザンロットまたは*in situ*ハイブリダイゼーション (たとえばFISH) などの従来の「直接プローブ」法と、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) などの「比較プローブ」法がある。方法は、これに限定されるわけではないが、基質 (たとえば膜またはガラス) 結合法、または以下で述べる配列ベース手法を含む、広範な形式で用いることができる。

【0070】

代表的な*in situ*ハイブリダイゼーションにおいて、細胞は、一般にガラススライドである固体担体に固定される。もし核酸がプローブされれば、細胞は、一般に熱やアルカリにより変性する。細胞を次に、適切な温度のハイブリダイゼーション溶液に接触させて、タンパク質をコード化する核酸配列に特異性である標識プローブをアニーリングさせる。標的 (たとえば細胞) を次に、通常は規定の厳密性で、あるいは厳密性を増して、雑音温度比に対して適切な信号が得られるまで洗浄する。

## 【0071】

プローブは通常、たとえば放射線同位体または蛍光レポータによって標識する。好ましいプローブは、厳密な条件下で標的核酸と特異的にハイブリダイゼーションできるように、十分な長さである。好ましいサイズ範囲は約200～約1000bpである。

## 【0072】

一部の用途において、反復配列のハイブリダイゼーション能力を阻害する必要がある。したがって一部の実施例では、tRNA、ヒトゲノムDNA、またはCot-I DNAを用いて、非特異性ハイブリダイゼーションを阻害する。

## 【0073】

比較ゲノムハイブリダイゼーション法において、(たとえば考えられる腫瘍からの)核酸の第1の収集(サンプル)には第1の標識を付け、(たとえば健康な細胞/組織からの)核酸の第2の収集(対照)には第2の標識を付ける。核酸のハイブリダイゼーション比は、配列において各繊維に結合した2つ(第1および第2)の標識の比によって決定される。染色体欠損または増殖がある場合、2つの標識からの信号の比の差が検出され、比はCYP24複製数の尺度となる。

## 【0074】

本発明の方法によって使用するのに適したハイブリダイゼーション手順は、たとえばAlbertson(1984)EMBO J. 3:1227-1234; Pinkel(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142, EPO Pub. No. 430,402, Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Choo編, Humana Press, Totowa, NJ(1984)などで述べられている。

## 【0075】

特に好適実施例では、Pinkel et al., (1998) Nature Genetics 20:2071-211またはKallioniemi(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:532

1 - 5 3 2 5 ( 1 9 9 2 ) の方法を使用する。

## 2) 増幅に基づくアッセイ

また別の実施例において、増幅に基づくアッセイを用いて複製数を測定する。このような増幅に基づくアッセイでは、CYP24 核酸配列は、増幅反応（たとえばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）においてテンプレートとして作用する。定量的増幅において、増幅生成物の量は、元のサンプル中のテンプレートの量に比例する。適切な（たとえば健康な組織）対照との比較は、CYP24の複製数の尺度となる。

### 【0076】

「定量的」増幅の方法は、当業熟練者には周知である。たとえば、定量的PCRには、同じプライマーを用いて、既知量の対照配列を同時に共増幅することが含まれる。これは、PCR反応を校正する場合に用いられる内部標準となる。定量的PCRの詳細な手順は、Innis et al., (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. NY) で与えられている。CYP24の既知の核酸配列（GenBank受入番号U60669 S78775 X59506を参照）によって、当業熟練者は遺伝子の任意の部分を増幅するためのプライマーをルーチンの十分に選択することができる。

### 【0077】

他の適切な増幅方法は、これに限定されるわけではないが、リガーゼ連鎖反応（LCR）（Wu and Wallace (1989) Genomics 4 : 560, Landegren et al., (1988) Science 241 : 1077、Barringer et al., (1990) Gene 89 : 117を参照）、転写増幅（Kwoh et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1173）、自己維持配列複製（Guatelli et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 1874）、ドットPCR、リンカアダプタPCRなどが挙げられる。

B) 遺伝子発現の検出

上で示したように、CYP24レベルも、癌への偏好のマーカーとしてアッセイできる。しかし、CYP24の転写を、CYP24「活性」のビタミンD受容体(VDR)レベル測定に密接に結びつけることは、本発明のアッセイで使用されるVDR活性の測定と好ましく結びつけられる。したがって、同じレベルのVDR活性における対照と比較して、CYP24活性が上昇していることは、癌の存在および/または偏好の表示となる。

#### 【0078】

好適実施例において、CYP24活性はCYP24遺伝子転写産物(たとえばmRNA)の測定によって、翻訳タンパク質の量の測定によって、またはCYP24酵素活性(25-ヒドロキシビタミンD3 24-ヒドロキシラーゼ酵素活性)の測定によって特徴付けられる。

##### 1) 遺伝子転写の検出

##### a) 直接ハイブリダイゼーションに基づく定量

核酸ハイブリダイゼーション技法を用いたCYP24遺伝子の写し(由来のCYP24 mRNAないしはcDNA)の検出および、または定量化の方法は、専門分野の熟練者にはよく知られている(Sambrook et al. supra参照)。例えば、CYP24 cDNAの存在、欠如または量を測定する方法の1つは、上記記載のサザントランスファーに含まれる。簡潔に言えば、CYP24 mRNAを分離して(例、酸グアニジニウム-フェノール-クロロフォルム抽出法、Sambrook et al. supra)、逆転写し、cDNAを生成する。その後、cDNAを随意、蒸解してバッファ中のゲル上を移動させ、膜に移す。その後、標的CYP24 cDNAに特化した核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションを実行する。

#### 【0079】

プローブには、CYP24蛋白質を符号化した核酸配列の全長、または、それより短いものが利用できる。短いプローブは、実験により特異性を試験される。核酸プローブは、20塩基以上の長さを持つことが好ましい。(核酸ハイブリダイゼーションに使用する核酸プローブ配列の選択法については、Sambrook et al. supraを参照。)ハイブリダイゼーション蛋白質の測定に

よって、CYP24 cDNAの存在または欠如の定性的測定が可能になる。

#### 【0080】

同様に、ノーザンブロットは、CYP24 mRNAの直接検出に使用できる。簡潔に言えば、例えば、酸グアニジニウム - フェノール - クロロフォルム抽出法を用いて、任意の細胞試料からmRNAを分離する。その後、mRNAを電気泳動にかけて、mRNA種に分離し、ゲル中からニトロセルロース膜に移動させる。サザンブロットを用いた場合のように、標識を持つプローブが、CYP24 mRNAの同定および、または定量化に利用される。

#### b) 増幅ベースの定量

別の好ましい実施例では、CYP24 DNAのコピー数を直接推定するために、CYP24の写し(例、CYP24 mRNA)が、上記記載の増幅(例、PCR)ベース法で測定できる。好ましい実施例において、CYP24の写しのレベルは、PCR(RT-PCR)の逆転写によって推定される。上に述べたように、CYP24活性は、遺伝子の写しのレベルが測定されているビタミンD受容体(VDR)活性と直接連結しているため、VDR活性(例、写しのレベル)も測定されることが好ましい。その時、VDR活性の任意のレベルに応じたCYP24活性の増加は、悪性腫瘍、または、悪性腫瘍素質の増加を示す。このように、好ましい増幅ベース定量(例、RT-PCR)では、VDRの写しのレベルも定量される。

#### 【0081】

上に示すように、PCR定量法は、専門分野の熟練者にはよく知られている。同様に、RT-PCR法もよく知られている。さらに、当該RT-PCR定量のためのプローブは、以下の表1で規定され、定量法は例1に図解される(例、図3参照)。

#### 2) 発現蛋白質の検出

CYP24の「活性」も、発現したCYP24ポリペプチドを検出または定量化することによって、検出および、または定量化できる。同ポリペプチドは、専門分野の熟練者にはよく知られた幾種かの方法を用いて検出および定量化できる。これらの方法には、電気泳動、毛細電気泳動、高性能液体クロマトグラフィ

ー ( H P L C )、薄膜クロマトグラフィー ( T L C )、超拡散クロマトグラフィーなどの分析的な生化学的方法、ないしは、流動またはゲル沈降素反応、免疫拡散 ( 一回または二回 )、免疫電気泳動、放射免疫測定 ( R I A )、酵素連結免疫吸着検定 ( E L I S A s )、免疫蛍光測定、ウエスタンブロットなどの様々な免疫学的方法が含まれる。

#### 【0082】

好ましい実施例の1つにおいて、CYP24ポリペプチドは、電気泳動蛋白質分離 ( 例、1ないし2次元電気泳動 ) を通じて検出・定量化される。電気泳動技法を用いた蛋白質の検出法は、専門分野の熟練者にはよく知られている ( R . S c o p e s ( 1 9 8 2 ) 『蛋白質精製』Springer-Verlag, N . Y . ; D e u t s c h e r , ( 1 9 9 0 ) 「酵素学の方法」182巻『蛋白質精製の手引き』Academic Press, Inc., N . Y . を広く参照のこと)。

#### 【0083】

もう1つの好ましい実施例において、試料中のCYP24ポリペプチドの存在の検出および定量化に、ウエスタンブロット ( 免疫ブロット ) 分析が用いられる。この技法は、一般に、分子量を基礎としたゲル電気泳動によって試料蛋白質を分離し、分離蛋白質を適切な固形支持物 ( ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルターないしは誘導ナイロンフィルターなど ) に移動させ、CYP24ポリペプチドに特定的に結合する抗体を加えて試料をインキュベートすることから成る。抗CYP24ポリペプチド抗体は、固形支持物上でCYP24と特定的に結合する。これらの抗体は、直接標識できるか、または、もう1つのやり方として、抗CYP24と特定的に結合する標識を持つ抗体 ( 例、標識ヒツジ抗マウス抗体 ) を用いて後から検出することができる。

#### 【0084】

より好ましい実施例では、CYP24ポリペプチドは免疫測定を用いて検出される。本件で用いられているように、免疫測定は、検体 ( C Y P 2 4 ポリペプチド ) と特定的に結合する抗体を利用する定量法である。このように、免疫測定は、抗CYP24抗体に対するCYP24ポリペプチドの特定的な結合の検出を特

徴とし、検体を単離、標的化および定量化する他の物理的ないしは化学的な特性とは対照をなす。

【0085】

CYP24ポリペプチドは、幾種かの広く認められた免疫学的な結合測定（例、米国特許4,366,241、4,376,110、4,517,288および4,837,168参照）を用いて検出および、または定量化される。一般的な免疫測定の再検討のためには、Asai(1993)「細胞生物学の方法」37巻『細胞生物学における抗体』Academic Press, Inc. New York、Stites & Terr(1991)「基礎臨床免疫測定」第7版も参照のこと。

【0086】

免疫学的な結合測定（すなわち、免疫測定）は、多くの場合、検体（この場合には、CYP24ポリペプチドないしは部分列）と特定の結合し、しばしば固定する手段として「捕捉剤」を利用する。同捕捉剤は、検体に特異的に結合する一部分である。好ましい実施例では、捕捉剤は、CYP24ポリペプチドに特定の結合する抗体である。抗体（抗CYP24）は、専門分野の熟練者にはよく知られた幾種かの方法によって生成できる。

【0087】

免疫測定も、捕捉剤と検体によって形成された結合錯体に特定の結合して標識を付ける手段として、しばしば標識付け剤を利用する。標識付け剤自体には、抗体・検体錯体から成る一部分が利用できる。このように、標識付け剤には、標識を持つCYP24ポリペプチド、または、標識を持つ抗CYP24抗体が利用できる。もう1つのやり方として、標識付け剤には、抗体・CYP24ポリペプチド錯体を特定の結合する第3部分、例えば、他の抗体などが利用できる。

【0088】

好ましい実施例の1つでは、標識付け剤には、標識を持つ、人由来の第2CYP24抗体が利用される。もう1つのやり方として、第2CYP24抗体には標識を付けず、標識を持つ第3抗体によって、次々に、第2抗体の誘導源である種の抗体に特定の結合することもできる。第2抗体は、標識を持つ第3の分子、

例えば、酵素標識を持つステレプタビジンなどが特定の結合することのできる、検出可能部分のある形態、例えばビオチンに修正可能である。

【0089】

プロテインAまたはプロテインGといった免疫グロブリン定常部に特異的にあ結合することが可能な他のタンパク質も、標識物として使用されてよい。これらのタンパク質は、連鎖球菌の仲間の細菌の細胞壁の正常な成分である。それらは様々な種からの免疫グロブリン定常部との非免疫原性の反応性を示す（全般的には、Kronvalら、(1973) J. Immunol., 111:1401-1406、およびAkerstrom(1985) J. Immunol., 135:2589-2542参照のこと）。

【0090】

前文に示したように、CYP24ポリペプチドの検出および/または定量的ためのイムノアッセイは、当業者に周知の非常に多様なフォーマットをとることが可能である。

【0091】

CYP24ポリペプチドを検出するための好ましいイムノアッセイは、競合または非競合性でよい。非競合イムノアッセイは、捕捉された分析物の量が直接的に測定されるアッセイである。一つの好ましい「サンドイッチ」アッセイにおいては、たとえば、捕捉剤（抗CYP24抗体）は、固形の素地に直接結合されることが可能であって、それらはそこに固定される。固定された抗体は次いで、検査試料中のCYP24ポリペプチドを捕捉する。このようにして固定されたCYP24は、標識をつけている第2のヒトCYP24抗体などの標識物によって結合される。

【0092】

競合アッセイにおいては、試料中に存在する分析物の量は、捕捉された物質（抗CYP24抗体）から、試料中に存在する分析物によってとって代わられた（または押退けられた）添加された（外来性の）分析物（CYP24ポリペプチド）の量を測定することにより、間接的に測定される。一つの新競合アッセイにおいては、既知の量の、この場合にはCYP24ポリペプチドが、試料に添加され

、次に当該試料は捕捉物質と接触される。抗体に結合したCYP24ポリペプチドの量は、試料中に存在するCYP24ポリペプチドの濃度に反比例する。

【0093】

一つの特に好ましい態様においては、抗体は固体支持体上に固定される。抗体に結合したCYP24ポリペプチドの量は、CYP24ポリペプチド/抗体複合体中に存在するCYP24ポリペプチドの量を測定することによるか、または別法として、残っている未結合のCYP24ポリペプチドの量を測定することにより決定される。CYP24ポリペプチドの量用は、標識されたCYP24ポリペプチドを供給することにより測定されてもよい。

【0094】

本発明のアッセイは、当業者に周知の標準的な方法により得点づけされる（正か負、またはCYP24ポリペプチドの量として）。得点づけの詳細な方法は、アッセイのフォーマットおよび標識の選択に依存するであろう。たとえば、ウェスタンブロットアッセイは酵素標識により産生される色のついた産物を可視化することによって得点づけされることが可能である。正しい分子量にある明らかに見える色のついたバンドまたはスポットは正の結果として得点づけされ、一方明らかに見えるスポットまたはバンドがないことは負として得点づけされる。バンドまたはスポットの強度は、CYP24の定量的な測定を提供することが可能である。

【0095】

本文に述べられた種々のイムノアッセイにおける使用のための抗体は、以下に述べられるように製造されることが可能である。

【0096】

3) 酵素活性の測定

もう一つの態様においては、CYP24レベル（活性）はCYP24ポリペプチドの酵素活性（25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24ヒドロキラーゼ）を測定することによってアッセイされる。この酵素の活性のアッセイ法は、当業者には周知である。したがって、たとえば細胞懸濁物中のCYP24活性は、<sup>3</sup>H-標識された25OHD<sub>3</sub>（アマシャム）の代謝を測定することによりアッセイされ

るであろう。酸化産物はHPLCにより分離され、活性はC-24酸化産物の合計として計算される(Tomonら、1990 *Endocrinol.*, 126: 2868-2875)。別法としてCYP24活性は、25-OH-[26, 27-<sup>3</sup>H]D<sub>3</sub>(NEN#NET349)とのインキュベーションと、過ヨウ素酸分解の後に[<sup>3</sup>H]アセトンとして放出された放射能の測定の後に測定されることができる(BeckmanおよびDeLuca(1997) *Meth. Enzymol.*, 282: 200-213)。

### C) VDR活性を制御している間のCYP24レベルの比較

前文に説明したように、CYP24の活性レベルはビタミンD受容体(VDR)の活性レベルにしっかりと関連している。したがって、CYP24活性(たとえば転写、翻訳、翻訳されたタンパク質の活性、その他)をアッセイする場合には、活性レベルは好ましくはVDR活性のレベルについて測定される。試料組織(たとえば組織生検)が対照試料(たとえば健康な組織)(好ましくは同レベルのVDR活性にある)よりも高いレベルのCYP24活性を示す場合には、それゆえ高められたCYP24活性は、癌の存在、予後、または発症の素質を示す。

#### 【0097】

VDR転写物(たとえばmRNA)レベルが、または翻訳されたタンパク質のレベルは、CYP24活性について前文に述べられたアッセイを用いて測定されることが可能である; 唯一の差は、当該アッセイがCYP24よりもむしろVDR核酸またはポリペプチドに対して特異的に調整されていることである。

#### 【0098】

VDRに特異的な抗体は市販されている(アフィニティ・バイオリジェンツ(Affinity Bioreagents)#PA1-711、MA1-710、サンタクルーズ・バイオテクノロジー(Santa Cruz Biotechnology)#sc-1008、sc-1009)。mRNA FISH用のリボプローブを生成するために使用されることが可能なCYP24およびVDR mRNAのための遺伝子特異プローブは、実施例1において提供される。さらに、CYP24およびVDRの転写レベルのためのアッセイは、実施例1において説明されている。

D) ハイブリダイゼーション・フォーマットおよびハイブリダイゼーション条件の最適化

1) アレーに基づくハイブリダイゼーション

本発明の方法は、アレーに基づくハイブリダイゼーションフォーマットに特に好都合である。一つの好ましいアレーに基づくハイブリダイゼーション系についての記述として、Pinkerら(1998)、Nature Genetics, 20:207-211を参照のこと。

【0099】

アレーは、一つまたはそれより多い表面(たとえば固体、膜、またはゲル)に付着された多数の異なる「プローブ」または「ターゲット」核酸(または他の化合物)である。好ましい態様においては、多数の核酸(または他の成分)は、一つの連続した表面か、または互いに並置された複数の表面に付着される。

【0100】

一つのアレーフォーマットにおいては、多数の異なるハイブリダイゼーション反応が、基本的には「平行して」進行されることが可能である。これは、迅速な、基本的に同時の、数多くのハイブリダイゼーションの査定を、1回の「実験」において提供する。アレーに基づくフォーマットにおいてハイブリダイゼーション反応を行なう方法は、当業者に周知である(たとえば、Pastinen(1997) Genome Res. 7:606-614; Jackson(1996) Nature Biotechnology 14:1685; Chee(1995) Science 274:610; WO96/17958、Pinkelら(1998) Nature Genetics 20:207-211参照のこと)。

【0101】

アレー、特に核酸アレーは、当業者に周知の広く多様な方法により製造されることが可能である。たとえば、一つの単純な態様においては、固形支持体(たとえばガラス表面、膜、その他)の上の異なる位置に異なる核酸をスポットティング(ピペットを用いて手で)することにより、「低密度」アレーが簡単に製造されることが可能である。

## 【0102】

この単純なスポットティングアプローチは自動化され、高密度にスポットされたアレーが製造されている（米国特許第5,807,522号参照のこと）。この特許は、マイクロキャピラリーを表面に対してたたいて少量の生体試料を置くべく自動化されたシステムの使用について述べている。このプロセスは高密度のアレーを生じるべく繰返される。

## 【0103】

アレーはまたオリゴヌクレオチド合成技術を用いても産生される。このように、たとえば、米国特許第5,143,854号およびPCT特許公報WO90/15070および92/10092は、高密度のオリゴヌクレオチドアレーの光に指示される組合せによる合成の使用を教示している。

## 【0104】

手短にいえば、ガラス表面上の光に指示される結合によるオリゴヌクレオチドアレーの合成は、自動化されたホスホロアミダイト化学とチップマスキング法とを用いて進行する。一つの特別な実施においては、ガラス表面はたとえば、感光性の保護基によってブロックされたヒドロキシルまたはアミン基などの官能基を含んでいるシラン試薬を用いて被覆される。フォトリトグラフィック（*photolithographic*）マスクを通した光分解が、選択的に官能基を暴露するべく用いられ、次いでそれらは次に入って来る5'を光防護されたホスホロアミダイトと反応するべく用意される。ホスホロアミダイトは、照明された（したがって感光性の防護基の除去により暴露された）部位とのみ反応する。したがって、ホスホロアミダイトは先行する工程から選択的に暴露された領域に選択的に付加される。これらの工程は、固体表面上に所望の配列のアレーが合成されるまで反復される。アレー上の異なる位置における異なるオリゴヌクレオチド類似体の組合せによる合成は、合成を通じた照明パターンと、カップリング剤の添加の順序とによって決定される。

## 【0105】

好ましい態様においては、本発明に使用されるアレーはプローブまたはターゲット核酸であることが可能である。これらのプローブまたはターゲット核酸は、

それらの「標的」核酸と各々ハイブリダイズされる。CYP24 遺伝子配列は既知であるため、オリゴヌクレオチドアレーは、CYP24 に特異的な一つまたは多数のプロープを含んで合成されることが可能である。

#### 【0106】

もう一つの態様においては、アレー、特にスポットされたアレーは、ゲノムDNA、たとえばCYP24 を含んでいるアンプリコンか、またはCYP24 それ自身についての高分解能スキャンを提供する重複クローンを含むことが可能である。アンプリコン核酸は、たとえばHAC、MAC、YAC、BAC、PAC、P1、コスミド、プラスミド、ゲノムクローンのインター・アル(inter-Alu)PCR産物、ゲノムクローンの制限消化物、cDNAクローン、増幅(たとえばPCR)産物、その他から取得可能である。

#### 【0107】

種々の態様において、アレー核酸は本発明のアンプリコン配列にかかっていい、または含んでいる先にマップされたクローンのライブラリ、ならびに以下に述べたような、他のゲノム領域からのクローンから由来する。アレーは試料核酸の内の一つの集団とハイブリダイズされることができ、または二つの別個に標識されたコレクションとともに(検査試料と参考試料を用いてというように)使用されることもできる。

#### 【0108】

当該技術においては、種々の固体表面の上に核酸を固定するための多くの方法が知られている。広く多様な有機および無機ポリマー、ならびに天然および合成による他の物質が、固体表面用の物質として使用されることができ、代表的な固体表面は、たとえばニトロセルロース、ナイロン、ガラス、石英、ジアゾ化膜(紙またはナイロン)、シリコーン、ポリホルムアルデヒド、セルロース、および酢酸セルロースを含む。さらに、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、その他といったプラスチックが使用されることができ、紙、セラミックス、金属、メタロイド、半導体物質、セラミド、などを含む他の物質も使用されてよい。さらに、ゲルを形成する物質が使用される。かかる物質は、たとえばタンパク質(たとえばゼラチン)、リポ多糖、ケイ酸塩、アガロース、およびポリア

クリルアミドを含む。当該固体表面が多孔性である場合には、系の性質に依存して種々の孔サイズが用いられてよい。

#### 【0109】

表面の調製においては、複数の異なる物質、特にラミネートが、種々の特性を取得するべく用いられてよい。たとえば、タンパク質（たとえばウシ血清アルブミン）か、または高分子混合物（たとえばデンハーツ（Denhardt）の溶液）が、非特異的な結合を避けるべく、共有結合をわかりやすくするべく、シグナル検出を高めるべく用いられることが可能である。もし化合物と表面との間に共有結合が望ましい場合には、表面は通常多官能性であるか、または多官能性化されることが可能である。表面上に存在し、かつ結合に使用されてもよい官能基は、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアン基、エチレン性基、ヒドロキシル基、メルカプト基、その他を含むことが可能である。広く多様な化合物を種々の表面に結合するための方法は周知であり、文献に平易に説明されている。

#### 【0110】

たとえば、種々の官能基を分子に導入することによる核酸の固定法は周知である（たとえば、Bischoff (1987) Anal. Biochem., 164: 336-344; Kremsky (1987) Nucl. Acids Res. 15: 2891-2910 参照のこと）。修飾されたヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチドを含んでいるPCRプライマーを用いて、あるいは修飾されたヌクレオチドを用いた酵素による末端標識により、標的の上に置かれることができる。本発明の核酸アレー用のためのガラスまたは膜の支持体（たとえばニトロセルロース、ナイロン、ポリプロピレン）の使用は、比較的高いエレメント濃度において標的にアレーするための手動およびロボットによる方法を用いている充分に開発された技術であるため、好都合である。かかる膜は市販されており、プロトコールおよび膜へのハイブリダイゼーションのための装置は周知である。

#### 【0111】

直径1 mmから1  $\mu$ mまでの、種々のサイズの標的エレメントが使用されることが可能である。各々の標的エレメントに結合するために得られる試料の総量が

限られているため、少量の濃縮され、固定されたプローブDNAを含んでいる小さい標的エレメントが、高度にコンプレキシティの比較ハイブリダイゼーション (high complexity comparative hybridization) 用に用いられた。したがって、少量の濃縮されたプローブDNAを含んでいる小さいアレー標的エレメントをもち、得られるシグナルが高度に局在化されかつ鮮明になるようにすることは利点がある。かかる小さいアレー標的エレメントは、典型的には  $10^4 / \text{cm}^2$  よりも大きい密度のアレーにおいて使用される。  $1 \text{ cm}^2$  の面積の定量的な蛍光イメージングの可能な比較的単純な装置が、一つの画像における多数の標的エレメントからのデータの獲得を可能にすることが記述されている (Witttrup (1994) Cytometry 16 : 201 - 213、Pinkelら、(1998) Nature Genetics 20 : 207 - 211 参照)。

#### 【0112】

ガラス、石英、小さいビーズなどの、膜よりはるかに低い蛍光を持つ固体表面基板の上のアレイは、はるかに良好な感度を達成できる。ガラスまたは溶融石英などの基板は、それらが極低蛍光性の基板となり、著しく効率のよいハイブリダイゼーション環境を提供する点で有利である。ガラスまたは合成溶融石英への標的核酸の共有結合は多くの既知技術 (上述) に従って達成できる。核酸は市販の試薬を用いてガラスに便利にカップリングすることができる。例えば、多くの官能基を持つシラン処理ガラスを製造するための材料は市販されているか、標準的技術を使って製造できる (例えば Gait (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press、ワシントンD.C.) を参照されたい)。ガラスと比べて10分の1以下の自己蛍光を持つ石英製カバースリップもシラン処理できる。

#### 【0113】

もう一つの選択肢として、市販の被覆ビーズまたは他の表面にプローブを固定化することもできる。例えば、ビオチン末端標識核酸を市販のアビジン被覆ビーズに結合させることができる。ストレプトアビジンまたは抗ジゴキシゲニン抗体を、標準的プロトコールに従い、例えばプロテインAを用いて、タンパク質を介

したカップリングによって、シラン処理ガラススライドに取り付けることもできる(例えばSmith(1992) Science 258:1122-1126を参照されたい)。ビオチンまたはジゴキシゲニン末端標識核酸は標準的技術に従って製造できる。ビーズに取り付けた核酸へのハイブリダイゼーションは、それらをハイブリダイゼーション混合物に懸濁し、次にそれらをガラス基板に沈着させ、洗浄後に分析を行なうことによって達成される。もう一つの選択肢として、酸化第二鉄粒子などの常磁性粒子を使用することもできる。

#### 【0114】

特に好ましい一態様として、ある表面(例えばガラスまたは石英表面)にプローブ核酸をスポットする。水、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびニトロセルロースの混合物に核酸を溶解し、アミノシラン被覆ガラススライドにスポットする。プローブ混合物を「スポットする」作業には小さい毛細管を使用できる。

#### 【0115】

##### 2) 他のハイブリダイゼーションフォーマット

当業者には様々な核酸ハイブリダイゼーションフォーマットが知られている。例えば一般的なフォーマットとしてサンドイッチアッセイと、競合または置換アッセイが挙げられる。ハイブリダイゼーション技術は、HamesおよびHiggins(1985)「Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach」(IRL Press)、GallおよびPardue(1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:378-384、ならびにJohnら(1969) Nature 223:582-587に概説されている。

#### 【0116】

サンドイッチアッセイは核酸配列を検出または単離するための商業上有益なハイブリダイゼーションアッセイである。このようなアッセイでは、共有結合によって固形支持体に固定化された「捕捉」核酸と、溶解状態の標識された「シグナル」核酸とを利用する。サンプルで標的核酸を供給する。「捕捉」核酸と「シグナル」核酸プローブは標的核酸とハイブリダイズして「サンドイッチ」ハイブリ

ダイゼーション複合体を形成する。最も有効であるためにはシグナル核酸が捕捉核酸とハイブリダイズしてはならない。

#### 【0117】

通例、ハイブリダイゼーションの検出には標識されたシグナル核酸が使用される。相補的核酸またはシグナル核酸は、ハイブリダイズしたポリヌクレオチドの存在を検出するために典型的に使用されるいくつかの方法のいずれを使って標識してもよい。最も一般的な検出方法は<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>Cまたは<sup>32</sup>

P - 標識プローブなどを用いるオートラジオグラフィーの使用である。他の標識には、標識された抗体に結合するリガンド、蛍光体、化学発光剤、酵素、標識されたリガンドにとって特異的な結合対要素として働くことのできる抗体などがある。

#### 【0118】

ハイブリダイゼーション複合体の検出には、標的ポリヌクレオチドまたは標的核酸およびプローブポリヌクレオチドまたはプローブ核酸の二重鎖へのシグナル生成複合体の結合が必要な場合がある。通例、そのような結合は、リガンドに結合したプローブと、シグナルに結合した抗リガンドとの間に起こるような、リガンドと抗リガンドの相互作用によって起こる。

#### 【0119】

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出すべき標的核酸を増幅する核酸増幅系の使用によって向上させることができる。そのような系の例にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)系、リガーゼ連鎖反応(LCR)系などがある。当技術分野で最近になって記述された他の方法にはNASBAO(nucleic acid sequence based amplification; Cangen社(オンタリオ州ミシソーガ))システムとQ Beta Replicaseシステムがある。

#### 【0120】

### 3) ハイブリダイゼーション条件の最適化

核酸ハイブリダイゼーションには単に、プローブとその相補的標的が相補的塩基対により安定したハイブリッド二本鎖分子を形成することができる条件下で、

変性プローブと標的核酸を提供するステップが含まれるだけである。ハイブリッド二本鎖分子を形成しないこの核酸はその後、典型的には、検出可能な付着標識の検出により検出される、ハイブリダイズされた核酸を残して洗い流される。一般的には、核酸は温度を上昇させる、あるいはその核酸を含有する緩衝液の塩濃度を減少させることにより、あるいは化学的薬剤を添加するとき、あるいはpHの値を上げるとき、変性されると考えられている。低緊縮条件下（例えば、低い温度および/または高い塩濃度および/または高い標的濃度）で、ハイブリッド二本鎖分子（例えば、DNA：DNA、RNA：RNAあるいはRNA：DNA）は、アニーリングされる配列が完全には相補的ではない場合であっても形成される。したがって、ハイブリダイゼーションの特異性は低い緊縮性では減少される。反対に、高い緊縮性（例えば、高い温度あるいは低い塩濃度）では、ハイブリダイゼーションを成功裡に行うにはミス対合がより少ないことが求められる。

#### 【0121】

当業者であれば、いかなる程度の緊縮性であっても提供されるよう、ハイブリダイゼーション条件を選択することが可能であることは理解されるであろう。1つの好適な実施態様では、ハイブリダイゼーションを確実なものとする低い緊縮性で実施され、またその後は引き続いて洗浄がミス対合ハイブリッド二本鎖分子を取り除くために高い緊縮性で実施される。成功裡に行われる洗浄は、ハイブリダイゼーションの所望されるレベルが得られるまで、次第に高くなる緊縮性で実施される（例えば、37 ~ 70 にて0.25 x SSPEに低く下げる）。緊縮性はまた、ホルムアミドなどの薬剤の添加により上昇させることができる。ハイブリダイゼーション特異性は、提供することができるさまざまな対照に対するハイブリダイゼーションと、そのテストプローブに対するハイブリダイゼーションとを比較することにより評価することが可能である。

#### 【0122】

一般的には、ハイブリダイゼーション特異性（緊縮性）とシグナル強度との間で折り合いをつける。1つの好適な実施態様では、洗浄が、一致した結果を生みまた、バックグラウンド強度のおよそ10%よりも大きなシグナル強度を提供す

るもっとも高度な緊縮性で実施される。このように、1つの好適な実施態様では、ハイブリダイズされたアレイは、さらに高い緊縮性を備えた溶液で連続的に洗浄され、また各洗浄間で読み出されるのが良い。このように産み出されたデータの分析により、ハイブリダイゼーションパターンが測定できるように改変されることがない、より上の洗浄緊縮性、および関心の対象となっている特定プローブに対して十分なシグナルを供給する洗浄緊縮性が明らかにされる。

#### 【0123】

1つの好適な実施態様では、バックグラウンドシグナルは、非特異的結合を減少させるためにハイブリダイゼーション時に洗浄剤（例えば、C-TAB）、あるいは遮断剤（例えば、tRNA、精子DNA、cot-1 DNA、その他）を使用することにより減少される。特に好適な1つの実施態様では、ハイブリダイゼーションは約10 µg / 1 µL tRNAの存在下で実施される。ハイブリダイゼーション時の遮断剤の使用は、当業者には周知のものである（例えば、P. Tijssen、同上掲載書中の第8章を参照のこと）。

#### 【0124】

ハイブリダイゼーション条件を最適化する諸方法は、当業者には周知のものである（例えば、Tijssen『生化学と分子生物学における実験室技術（Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology）』、第24巻「核酸プローブによるハイブリダイゼーション（Hybridization With Nucleic Acid Probes）」、1993年、Elsevier社刊、ニューヨークを参照のこと）。

#### 【0125】

最適条件はまた、基板タイプ、蛍光色素、励起および放出バンド、スポットサイズなどの異なる組み合わせの標識（例えば、蛍光）を検出する際の感受性の1つの関数でもある。低い蛍光バックグラウンドシグナル表面を使用することができる（例えば、Chu（1992）Electrophoresis 13:105-114を参照のこと）。候補表面上のさまざまな直径のスポット（「標的要素」）の検出に関する感受性は、例えば、蛍光的に末端標識化されたDNA断

片の一連の希釈液をスポットすることにより、容易に測定することができる。これらのスポットは、通常の蛍光顕微鏡を使用してその後画像化される。感受性、直線性、および蛍光色素と固体表面（例えば、ガラス、融解石英、その他）のさまざまな組み合わせから到達可能な動的範囲をこのように測定することができる。また公知の相対的な命題における一对の蛍光色素率の連続希釈も分析することができる。これにより、検出器とプローブが固定された基板の蛍光により、蛍光率測定がその許容動的範囲にわたっている実際の蛍光色素率を反映するその正確度が測定される。

#### 【0126】

#### 4) 核酸の標識化と検出

1つの好適な実施態様では、ハイブリダイズされた核酸は、サンプル核酸に付着させた1つあるいはそれ以上の標識を検出することにより検出される。標識は、当業者には周知のものである数々の手段のいずれかにより、組み込むことが可能である。核酸に標識を付着させる手段には、例えば、ニック翻訳、あるいは核酸のキナーゼ化による末端標識化およびその後のサンプル核酸を標識（例えば、蛍光体）に結合させるリンカーの付着（結合）が含まれる。核酸に標識を付着させるための広い範囲のさまざまなリンカーもまた公知のものである。さらに、インターカレート染色剤と蛍光ヌクレオチドもまた使用することができる。

#### 【0127】

本発明で使用するのに適当な検出可能な標識には、分光、光化学、生物化学、免疫化学、電気、光学あるいは化学的手段により検出可能な、いずれかの組成が含まれる。本発明で有用な標識には、標識化されたストレプトアビジン共役による染色用のビオチン、磁気ビーズ（例えば、Dyna beads<sup>TM</sup>）、蛍光染色剤（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、グリーン蛍光タンパク質など、例えば、Molecular Probes社、米国オレゴン州ユーージーン市を参照）、放射能標識（例えば、<sup>2</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>Cあるいは<sup>32</sup>P）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびその他のELISAで通常使用されているもの）、および金コロイドなどの比色標識（例えば、高い効率を有する、40~80 nm直径寸法

範囲にある、散乱グリーン光の金粒子)あるいは色ガラスあるいはプラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、その他)ビーズが含まれる。こうした標識の使用を教示している特許には、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号および第4,366,241号が含まれる。

#### 【0128】

蛍光標識は、バックグラウンドシグナルが低くてしかも非常に強いシグナルを供給するためには、好ましいものである。また、これは迅速スキャニング法により高度な解像度と感受性で光学的に検出可能である。核酸サンプルは単一標識、例えば、単一蛍光標識によりすべて標識化することができる。代替的には、もう1つの実施態様では、異なる核酸サンプルは、各核酸サンプルが異なる標識を有する場合に同時にハイブリダイズすることができる。例えば、1つの標識がグリーン蛍光標識を有することができ、また第2標的がレッド蛍光標識を有することができた場合である。スキャニングステップは、グリーン蛍光標識の結合部位と、レッド標識の結合部位とを識別することになる。各核酸サンプル(標的核酸)は、もう1つのものとは別に分析することができる。

#### 【0129】

用いることができる適当な色原体には、色を観察することができるように波長の区別できる範囲にある光を吸収するそうした分子および化合物、例えば、蛍光剤、あるいは代替的には、特定の波長あるいは波長範囲の照射により照射されるときに光を放射するそうした分子および化合物、例えば、蛍光剤が含まれる。

#### 【0130】

望ましくは、蛍光剤は、吸収される光の波長よりも約10 nm高い値のものよりもさらに大きな波長で通常放射される、約300 nmより上の光を吸収するべきであり、好適には約350 nm、そしてさらに好適には約400 nmの光を吸収するべきである。結合染色剤の吸光および放出特性は、非結合染色剤とは区別すべきである。したがって、さまざまな波長範囲と染色剤の特性と照らし合わるとき、用いられる染色剤を示し、また、共役されておらずまた任意の溶

媒で特徴付けられる染色剤は示さないように意図される。

【0131】

蛍光剤を照射することにより、複数の放射を得ることができるので、蛍光剤は一般的には好適である。したがって、単一標識を、複数の測定可能な出来事に対して供給することができる。

【0132】

検出可能な信号も、化学発光および生物発光源から供給できる。化学発光源は、化学反応によって電子的に励起される、次に光を発光可能な化合物を含む。この光は検出可能な信号として作用するか、蛍光受容体にエネルギーを供給する。あるいは、ルシフェリンをルシフェラーゼまたはルシジェニンとともに用いて、生物発光を与えることもできる。

【0133】

スピン標識は、電子スピン共鳴 ( E S R ) 分光法によって検出可能な不対電子スピンを持つレポータ分子によって供給される。スピン標識の例としては、誘起フリーラジカル、遷移金属錯体、特にバナジウム、銅、鉄、マンガンなどが挙げられる。スピン標識の例としては窒素酸化物フリーラジカルが挙げられる。

【0134】

標識は、ハイブリダイゼーションの前か後に、標的 ( サンプル ) 核酸に添加できる。いわゆる「直接標識」は、ハイブリダイゼーション前に標的 ( サンプル ) 核酸に直接添加または包含される、検出可能な標識である。これにたいしていわゆる「間接標識」は、ハイブリダイゼーション後にハイブリッド二重鎖に結合される。間接標識は、ハイブリダイゼーション前に標的核酸に結合された結合部分に添加されることが多い。したがってたとえば、標的核酸は、ハイブリダイゼーション前にビオチン化してもよい。ハイブリダイゼーション後に、アビジン結合蛍光団は、検出されやすい標識を与えるビオチン保持ハイブリッド二重鎖を結合する。核酸の標識とハイブリダイゼーションされた標識核酸の検出の方法に関する詳細な総説は、Loboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 24: Hybridization With Nucleic Acid

Probes, P. Tijssen編、Elsevier, NY, (1993)を参照。

【0135】

蛍光標識は、生体外転写反応中に簡単に添加される。したがってたとえば、フルオレセイン標識UTPおよびCTPは、生体外転写で生成されたRNAに包含させることができる。

【0136】

標識は直接、またはリンカ部分によって添加できる。一般に標識またはリンカ標識添加部位は、特定の位置に限定されていない。たとえば、標識は、ヌクレオシド、ヌクレオチド、またはその類似体の、所望の検出またはハイブリダイゼーションが阻害されない任意の位置に添加できる。たとえば、あるClontech(パロアルト、カリフォルニア州)による標識ON試薬は、オリゴヌクレオチドのリン酸主鎖全体に点在した標識と、3'および5'末端における末端標識を与える。本明細書の実施例で示すように、標識はリボース環の位置に添加可能であり、リボースは希望通りに変更、そして削除することさえ可能である。有用な標識試薬の塩基部分は、加えられた目的を阻害しない方法で、天然型または改良型の塩基部分を含むことができる。改良された塩基は、これに限定されるわけではないが、7-deaza AおよびG、7-deaza-8-aza AおよびG、その他のヘテロ環部分を含む。

【0137】

蛍光標識は単一種の有機分子に限定されないが、無機分子、有機および/または無機分子の多分子混合物、水晶、ヘテロポリマーなどを含むことが認識される。したがってたとえば、シリカシェル内に包囲されたCdSe-CdSコアシェルナノクリスタルは、生体分子に結合させるために容易に誘導体化できる(Bruchezら, (1988) Science, 281:2013-2016)。同様に、蛍光度の高い量子ドット(硫化亜鉛キャップセレン化カドミウム)は、超高感度生物検出で使用するために、生物分子に共有結合されている(Warren and Nie(1998) Science, 281:2016-2018)。

## 【0138】

## E) CYP24に対する抗体

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のどちらも、本明細書で述べる発明の免疫学的検定および治療方法に使用できる。ポリクローナル抗体は、実質的に純粋なCYP24ポリペプチドまたは抗原CYP24ポリペプチドを、適切なヒト以外の哺乳動物に複数回注射（たとえば皮下または筋肉注射）することによって上昇させることが好ましい。CYP24ペプチドの抗原性は、ペプチドを用いて免疫化された動物の抗体反応の大きさを決定する従来の方法によって決定できる。一般に、CYP24抗体の上昇に使用されるCYP24ペプチドは、CYP24に比較的高い親和性を持つ抗体の高い力価を生成させる、CYP24ペプチドであることが望ましい。

## 【0139】

所望ならば、免疫化ペプチドを、当業界で周知の方法を用いて、接合によって担体タンパク質に結合させてもよい。このような、一般に使用される担体は、キーホールリンペットヘマシアニン(KLH)、サイログロブリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、破傷風トキソイドなどが含まれ、ペプチドに化学的に結合される。結合ペプチドは次に、動物（たとえばマウスまたはウサギ）の免疫化に用いる。CYP24は哺乳類種で保存されるため、CYP24タンパク質の免疫原性を高めるために担体タンパク質を使用することが好ましい。次に哺乳動物から採取した血液サンプルより、抗体を得る。ポリクローナル抗体の作成に使用する技法は、当業界で既知である（たとえば、Methods of Enzymology, Production of Antisera With Small Dose of Immunogen: Multiple Intradermal Injection, Langoneら編(Acad. Press, 1981)を参照)。動物より生成されるポリクローナル抗体は、たとえば抗体が上昇されたペプチドが結合するマトリックスへの結合と溶離によって、さらに精製できる。

## 【0140】

当業熟練者にとっては、モノクローナル抗体と同様に、ポリクローナル抗体の

精製および/または濃縮の免疫学的技術において一般的な各種技術は既知である。たとえば、Coligan,ら,(1991), Current Protocol in Immunology, Wiley Interscienceを参照。

【0141】

しかし、生成されるCYP24抗体は、モノクローナル抗体(「mAb」)であることが好ましい。モノクローナル抗体を調製する場合、8匹のマウスまたはラットを免疫化することが好ましい。「抗体」という語は、本明細書で使用されるように、エピトープ決定基を結合可能な、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>などの無傷の細胞はもちろんのこと、そのフラグメントを含む。またこの文脈において、「本発明のmAb」という語は、CYP24に特異性を持つモノクローナル抗体を指す。

【0142】

ハイブリドーマスクリーニングmAbの生成に用いる一般的な方法は周知である(Kohler and Milstein(1975)Nature, 256:495)。簡単には、KohlerとMilsteinが述べているように、方法は、メラノーマ、奇形癌、または子宮癌、神経膠腫、肺癌に罹患した5名の個別の癌患者の、流入領域リンパ節からリンパ球を単離することと(サンプルは外科試料より得た)、細胞をプールすることと、SHFP-1によって細胞を融合させることより成る。ハイブリドーマは、癌細胞系に結合する抗体の生成についてスクリーニングした。

【0143】

mAb間のCYP24特異性の確認は、興味のあるmAbの初期反応パターンを判定するために、比較的ルーチン的なスクリーニング技法(酵素結合免疫吸着剤アッセイ、すなわち「ELISA」)を用いて行える。

【0144】

試験するmAbによって本発明のmAbの、上で述べたように単離されたCYP24への結合が阻害されるかどうか判定することによる不要な実験を行わずに、mAbが本発明のmAbと同じ特異性を持っているかどうか判定するためにm

A bを評価することも可能である。本発明のm A bによる結合の低下で示されるように、試験されるm A bが本発明のm A bに競合する場合、2つのモノクローナル抗体は、同じまたは密接に関連するエピトープに結合しやすい。m A bが本発明のm A bの特異性を持つかどうか判定する、また別の方法は、本発明のm A bを、通常反応性である抗原を用いて事前にインキュベートし、試験されるm A bが抗原に結合する能力を阻害されるかどうかを判定することである。そして、試験されるm A bが阻害されれば、そのm A bはおそらく、本発明のm A bと同じ、または密接に関連するエピトープ特異性を持っている。

#### 【0145】

抗体フラグメント、たとえば単鎖抗体 ( s c F v またはその他 ) も、ファージ表示技術を用いて生成 / 選択できる。細菌に感染するウィルス ( バクテリオファージまたはファージ ) の表面に抗体フラグメントを発現する能力によって、10<sup>10</sup>を超える非結合クローンのライブラリから単結合抗体フラグメントを単離することができる。ファージ表面に抗体フラグメントを発現するために ( ファージ表示 )、抗体フラグメント遺伝子を、ファージ表面タンパク質 ( p I I I ) をコード化する遺伝子に挿入すると、抗体フラグメント - p I I I 融合タンパク質がファージ表面に表示される ( M c C a f f e r t y ら ( 1 9 9 0 ) N a t u r e , 3 4 8 : 5 5 2 - 5 5 4 ; H o o g e n b o o m ら , ( 1 9 9 1 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 1 9 : 4 1 3 3 - 4 1 3 7 ) 。

#### 【0146】

ファージ表面の抗体フラグメントは機能性であるため、抗体フラグメントを結合するファージ保持抗原は、抗原親和性クロマトグラフィーによって非結合ファージから分離できる ( M c C a f f e r t y ら ( 1 9 9 0 ) N a t u r e , 3 4 8 ) 。抗原フラグメントの親和背によって、1回の親和性選択について、20 ~ 1000000倍の濃縮因子が得られる。しかし、溶出ファージによって細菌に感染させると、さらにファージが成長し、もう1回選択を行うことができる。このようにして、1回で1000倍の濃縮が、2回の選択で1000000倍になり得る ( M c C a f f e r t y ら ( 1 9 9 0 ) N a t u r e , 3 4 8 : 5 5 2 - 5 5 4 ) 。したがって濃縮が低い場合でも ( M a r k s ら , ( 1 9 9 1 ) J

. Mol Biol. 222:581-597)、複数回の親和性選択によって、まれなファージを単離することができる。抗原に対するファージ抗体ライブラリの選択によって濃縮されるため、クローンの大半は、3, 4回という少ない選択の後に抗原に結合する。したがって、抗原への結合を分析するのに必要なのは、比較的少数のクローン(数百)である。

#### 【0147】

ヒト抗体は、ファージに対する非常に巨大で多様なV遺伝子レパートリを表示することによって、事前に免疫化を行わずに生成できる(Marksら, (1991) J. Mol Biol. 222:581-597)。ある実施態様において、ヒト末梢血リンパ球に存在する天然VHおよびVLレパートリは、免疫化されていないドナーからPCRによって単離された。V遺伝子レパートリはPCRを用いて無作為にスプライスされ、scFv遺伝子レパートリが作成され、これをファージベクター内でクローニングして、3000万のファージ抗体のライブラリ(Id.)が作成された。この1つの「ナイーブ」なファージ抗体ライブラリから、結合抗体フラグメントがハプテン、多糖類、タンパク質を含む17を超える異なる抗原に対して単離された(Marksら, (1991) J. Mol Biol. 222:581-597; Marksら, (1993) Bio/Technology 10:779-783; Griffithら, (1993) EMBOJ 12:725-734; Clacksonら, (1991) Nature 352:624-628)。抗体は、ヒトサイログロブリン、免疫グロブリン、腫瘍壊死因子およびCEAを含む自己タンパク質に対して生成されていた(Griffithら, (1993) EMBOJ 12:725-734)。無傷の細胞で直接選択することによって、細胞表面抗原に対する抗体を単離することも可能である。抗体フラグメントは、選択に用いる抗原に対して高度に特異性であり、1~100 $\mu$ Mの範囲の親和性を持つ(Marksら, (1991) J. Mol Biol. 222:581-597; Griffithら, (1993) EMBOJ 12:725-734)。ファージ抗体ライブラリが大きくなると、さらに多くの抗原に高い結合親和性を持つ、さらに多くの抗体を単離することができるようになる。

## 【0148】

CYP24抗体は、多数の市販サービスを用いても調製できることも認識されるであろう(たとえばBerkeley抗体研究所、Bethyl研究所、Anawa、Eurogeneticなど)。

## 【0149】

## II. 重要であると予想されるレベルを最適化 - 測定する分析

この発明の分析は、癌の可能性検出/予知することに、癌から生存を予測することに、CYP24活性を調整する薬品のスクリーニングに、そして細胞の増殖を抑制する薬品のスクリーニングにすぐに役立つ。特に、例えば、CYP24(ゲノムDNA)の増幅の識別は癌の存在および/または癌の進行に対する素因を示している。

## 【0150】

予言的な/診断検定を最適化する方法は、当業者には十分に知られている。一般的には、この測定には、正常組織のレベルおよび病理学(例えば、癌組織)のCYP14活性レベルにおける「基準レベル」(例えば、CYP24の)を測定することが含まれる。特に好ましい実施の形態では、そのようなレベルを、共存するVDR活性、サンプルの種類、年齢、性、進行状態、全体的な生理学的な状態(例えば、妊娠している女性に比べて妊娠していない女性)、全足的な健康、腫瘍のタイプ等について、適切なコントロールを使って測定する。好ましい実施の形態では、「基準線」(例えば、コントロール)レベルは、(同じ個人からのまたは同じ住民の人達からの正常な(健康な)組織から測定される。代わりに、「基準線」と「異常である」レベルは、「上述で確認され多さまざまな共同因子(年齢、健康、性など、)の影響を統計的に評価できる十分なサンプルの大きさと多様性を提供する「住民」研究から決定される。「基準線」CYP24レベルを、例えば、実施例3-5で記述したように、モデル系を参考にして評価することもできる。

## 【0151】

好ましい実施の形態では、その測定したCYP24レベルが、コントロールサンプルの測定したまたは既知のレベルよりも大きいとき(例えば、同じ種の正常

で健康な哺乳動物についての既知のまたは測定されたレベル、或いは同じ個人についての異なる組織および/または異なる時間で測定された「基準線/参照レベルのいずれか」、CYP24レベルの定量的検定は陽性の結果、例えば、上昇したCYP24レベルを示すように思われる。特に好ましい実施の形態では、サンプルと「コントロール」の間の差が統計的に重要である(例えば、85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、そして最も好ましくは98%以上の信頼できるレベル)である場合、検定は陽性の結果を示すように思われる(例えば、予知できる重要なレベル)。

#### 【0152】

### III. 癌を処理する方法 - CYP24レベルに基づいた補助治療の選択

癌の存在、または進展の素因を評価する能力のために、本発明の検定は癌治療養生法の有用な構成要素になる。従って、一つの実施の形態では、CYP24の活性を病気の進行の手段として使うことができるけれど、一方別の実施の形態では、CYP24活性は補助治療の必要性を評価するのに使用されている。「補助の癌治療」は、癌処理のもう一つの方法と組み合わせて、またはその後が続いて施される化学療法、放射線治療、外科学、再手術、反ホルモン治療、および、免疫療法のように癌を処理することの方法を当てはまる。「補助の癌治療」は、対照レベルと比較すると高められている、CYP24の生存が下がっているという期待あるいは検出されたレベルを考慮して選ばれる癌処理の積極的な形態を表すことが多い。補助治療法は当業者にはよく知られていて、そして、化学療法、放射線治療、一次手術または再手術、反ホルモン治療、免疫療法などを含むけれど、それに限定されない。この状況で用いられる「化学療法」は、動物の中の癌細胞の数を殺すことまたは減らすことを目的にした、癌を持つ動物への化学物質の投与に当てはまる。一般に、化学療法剤は、癌細胞のような分裂しているすなわち増殖している細胞の成長を抑えたり、またはそういう細胞を殺す。癌に対して使用される化学療法剤は、当業者にはよく知られており、ドキシルビシン、ビンブラスチン、ゲニステインなどが含まれるが、それらに限定されない。

#### 【0153】

この状況での「放射線治療」は、癌を持つ動物へ放射線の投与に当てはまる。

放射線は、癌細胞のような、分裂する細胞の増殖を殺すか、抑制する。外の発生源（例えば、 $\gamma$ 線発生源、プロトン発生源、分子線発生源など）によって、または移植可能放射性物質によって投与することができる。放射線治療には、腫瘍容積を減少させるかまたは除去することを目的とする「伝統的な」放射線処理、またはより積極的な放射線外科技術がある。

【0154】

外科手術の方法は、動物から、細胞、例えば、癌細胞の直接的な除去、または切断に当てはまる。その癌細胞は、ほとんど、腫瘍の形（例えば、乳房の腫瘍）であり、動物から取り除かれる。外科手術方法には、異常の組織だけでなく健康な組織の除去も伴う可能性がある。「再手術」は、同じ病理学の処理のための手術を以前に受けた動物に行なわれる手術に当たる。

【0155】

「抗ホルモン治療」は、細胞に対してミトゲン効果を有するエストロゲンまたはアンドロゲンのようなホルモンに対向するまたは抑制する化合物の投与に当たる。しばしば、これらのホルモンは、生体内で癌細胞の癌性特性を増大させるように作用する。

【0156】

免疫療法は、動物の中で癌細胞を破壊するために動物の免疫系の能力を高める方法に当たる。この方法には、免疫系エフェクターの細胞障害抗体を腫瘍目標に向けるのに役立つ腫瘍に特有のマーカ（例えば、IL-13レセプターおよびLewis Y (Lev) マーカなど）を結合するポリクローン抗体、またはモノクローナル抗体による処理を含むことができる。免疫療法の方法は、当業者にはよく知られている（例えば、Pastanら(1992) Ann. Rev. Biochem., 61:331-354、BrinkmanおよびPastan(1994) Biochimica Biophysica Acta, 1198: 27-45などを参照）。

【0157】

IV. 治療法のスクリーニング

CYP24活性（ビタミンDレセプター活性の所定のレベルで）の低く規制す

ることが癌の進行を防ぐために予防として作用する、および/または癌を減らすまたは除去するように治療として作用すると期待されるということも、本発明の発見であった。従って、1つの実施の形態では、本発明は、CYP24の活性を調整し、そして好ましくは低く規制する薬品をスクリーニングする方法を提供する。この状況で用いられる低く規制するということは、CYP24転写の減少、および/またはCYP24翻訳の減少および/またはCYP24ポリペプチド活性の減少である。

#### 【0158】

この発明の好ましい「スクリーニング」の方法は、試験薬品エージェントを持つCYP24を表している細胞（例えば、CYP24を表すことが可能な細胞）を試験薬品と接触指せること、そして(i i) CYP24活性のレベルを検出すること（例えば、上述のように）を含んでおり、その場合、その薬品と接触していない細胞中のCYP24活性のレベルと比較して、低いレベルのCYP24活性は、その薬品がCYP24活性を抑制しているまたは低く規制しているということ、および/またはその細胞の増殖を抑制していることを示している。実質的に、そのような検定で、どんな薬品もを検査をすることができる。

そのような薬品には、自然のまたは合成された核酸、自然のまたは合成されたポリペプチド、自然のまたは合成されたリピド、自然のまたは合成された小さい有機分子などが含まれるが、それに限定されない。一つの好ましい形には、試験薬品は組み合わせライブラリーとして提供される。

#### 【0159】

A) 組み合わせライブラリー（例えば、小さい有機分子）。

慣例的には、有益な性状を持つ新しい化学物体は、望ましい性質または活性を持つ化学物質（「鉛化合物」と呼ばれる）を確認し、鉛化合物の変異体を作り出し、そしてこれらの異なる化合物の性状と活性を評価することによって、生成される。しかしながら、現在は、薬剤発見の全ての態様について時間を短くする傾向にある。多くの試験を速くしかも効率的に試験する能力のために、高処理能力のスクリーニング（HTS）方法が伝統的な鉛化合物識別方法に取って代わっている。

。

## 【0160】

一つの好ましい実施の形態で、高処理能力スクリーニング方法には、多数の潜在的治療化合物（候補化合物）を含むライブラリーを提供することが含まれる。次に、そのような「組み合わせの化学ライブラリー」を、望ましい特性の活性を示すこれらの構成物（特に、化学種又は副分類）を確認するために下記に記述するような、一つまたはそれ以上の分析でスクリーニングする。こうして確認された化合物は、伝統的な「鉛化合物」として役立つことができ、またはそれだけで潜在的なまたは実際の治療法として使うことができる。

組み合わせ化学ライブラリーは、試薬のような多数の化学的「構成ブロック」を組み合わせることによる化学的合成または生物学的合成のいずれかによって生成された多様な化学物質の集積である。例えば、ポリペプチド（例えば、突然変異蛋白質）ライブラリーのような線状の組み合わせ化学ライブラリーは、アミノ酸と呼ばれる1組の化学構成ブロックを、所定の化合物の長さ（すなわち、ポリペプチド化合物のアミノ酸の数）にあらゆる可能な方法で組み合わせることによって生成される。そのような化学構成ブロックの組み合わせ混合物を通して、無数の化学化合物を合成することができる。例えば、1人の注釈者は、100の交換可能な化学構成ブロックの系統的な組み合わせ混合物で、理論的に1億の四量体化合物、または100億の五量体化合物を合成するという結果になるということを観察した（Gallopら、（1994）37（9）：1233-1250）。

組み合わせの化学ライブラリーの調製とスクリーニングは当業者にはよく知られている。

## 【0161】

そのような組み合わせの化学ライブラリーには、ペプチドライブラリーが含まれるが、それに限定されない（米国特許第5,010,175、Furka（1991）Int. J. Pept. Prot. Res., 37：487-493、Houghtonら（1991）Nature, 354：84-88を参照）。ペプチド合成は、決して、本発明で使用するために考えられ、意図される唯一の手法ではない。化学的多様性ライブラリーを生

成するための他の化学的性質を使うこともできる。そのような化学的性質には、ペプチド(PCT Publication No WO 91/19735, 26 Dec. 1991)、コード化したペプチド(PCT Publication WO 93/20242, 14 Oct. 1993)、任意のバイオオリゴマー(PCT Publication WO 92/00091, 9 Jan. 1992)、ベンゾジアゼピン(米国特許第5,288,514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチドのようなダイバースマー(Hobbsら、(1993年)(Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913)、vinylogousポリペプチド(Hagiharaら(1992)J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568)、ベータ-D-グルコースを持つnonpeptidall peptidomimetics(Hirschmannら、(1992)J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218)、小さい合成ライブラリーの相似の有機合成(Chenら、(1994)J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661)、オリゴカルバメイト(Chora、(1993)Science 261: 1303)、および/またはリン酸ペプチдил(Campbellら、(1994)J. Org. Chem. 59: 658.)。一般に、Gordonら、(1994)J. Med. Chem. 37: 1385を参照、核酸ライブラリー(例えば、Strategene、Corp.を参照)、ペプチド核酸ライブラリー(例えば、米国特許第5,539,083号参照)、抗体ライブラリー(例えば、Vaughnら、(1996)Nature Biotechnology, 14(3): 309-314、およびPCT/US96/10287を参照)、炭水化物ライブラリー(例えば、Liangら、(1996)Science, 274: 1520-1522、および米国特許第5,593,853を参照)および小さい有機分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピンはBaum(1993)C&EN, Jan 18, 33頁、イソプレノイドは米国特許第5,569,588号、チアゾリジノンおよびメタチアゾノンは米国特許第5,549,974号、ピロリジンは米国特許第5,525,735号および5,5

19, 134号、モノホリノ化合物は米国特許第5,506,337号、ベンゾジアゼピンは第5,288,514号など)。

【0162】

組み合わせライブラリーの調製装置は、市販されている(例えば、357MPS、390MPS、Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Wobum. MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MAを参照)。

【0163】

多数のよく知られたロボット体系も、溶液相の化学的性質のために開発された。これらの装置には、ロボットアームを利用する武田薬品工業(日本の大阪)により開発された自動合成装置のような自動ワークステーション、および化学者によって行なわれた手動の合成操作を真似るロボットアームを利用する多くのロボット装置(Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.)がある。

【0164】

前述の装置のどれでも、本発明で使用するのに適している。本明細書で論じたように操作することができるようにこれらの装置の修正について特性と実行は、関連業者には明らかである。その上に、多数の組み合わせライブラリーそのものが市販されている(例えば、ComGenex, Princeton, N. J., Asinex, Moscow, RU, tripos, INC., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow, Ru, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MDなどを参照)。

【0165】

B) 高速選別分析

本願明細書において記載されているCYP24の水準を調整している化合物に対するどんな分析法でも高速選別分析が可能である。したがって、好ましい分析法であれば、CYP24遺伝子転写の増進または阻害、CYP24ポリペチド形質発現の増進または阻害、およびCYP24ポリペチド活動の阻害または増進を検出する。(与えられたVDR活動水準において)。

特定の核酸またはタンパク産物の存在、非共存または定量化のための高速選別法は、当業者にとって周知である。同様に、結合分析およびリポータ・ジーン・アッセイも周知である。たとえば、米国特許第5,559,410号には、タンパク質用高速選別法が開示されている。また、米国特許第5,585,639号には結合(すなわち配列において)核酸に対する高速選別法が開示されている。一方、米国特許第5,576,220号および第5,541,061号にはリガンド/抗体結合用高速選別法が開示されている。

#### 【0166】

加えて、高速選別セットは市販されている(例えば Zymark Corp., Hopkinton, MA や Air Technical Industries, Mentor, OH や Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA や Precision Systems, Inc., Natick, MA,などを参照のこと)。

#### 【0167】

これらの装置は、概して全てのサンプルおよび試薬のピペット操作、液体調剤、時限式インキュベーションおよび分析に適した検知器中マイクロプレートの最終的な読み込みを含む全ての手順を自動化している。

これらの設定可能装置は、高度な柔軟性および使用者用の設定および高速分析と急速立ち上げが可能である。かかる装置の製造業者は、各種の高速分析装置用に詳しいプロトコルを提供している。たとえば、Zymark社は、遺伝子転写、リガンド結合、などの転形を検出するための選別装置を記載している技術文書を提供している。

#### 【0168】

V. 細胞中活動水準の低減

もう一つの実施例においては、本発明は細胞のCYP24活動水準を低減する方法を提供している。この文脈では、CYP24活動の低減とは、「未処置」条件の同じ細胞と比較したCYP24活動の低減である。より好ましくは、VDR活動の同じ水準での同じ細胞と比較して、あるいはVDR活動のために標準化してである。

#### 【0169】

特定の遺伝子または遺伝子産物の活動水準を低減する方法は、当業者にとって周知である。かかる方法は、例えばアンチセンス分子またはリボザイムの使用、ターゲティング転写因子（例えば抗体またはDNA結合タンパクで）、およびポリペチド産物（例えば不活性な結合剤（例えば突然変異蛋白質）との競合によって）を目標とすること、直接型ブロッキング（例えばそばに抗体または他リガンドを有するバインディング、その他）によるターゲティング転写または翻訳を含むが、これに限定されるものではない。

#### 【0170】

##### A) アンチセンス分子

CYP24活動は、刺激に対する反応を抑制されることができるとかまたは、アンチセンス分子の使用によって、完全に抑制されることができるとか。「アンチセンス配列またはアンチセンス核酸」は核酸である。そして、符号化CYP24メッセンジャーRNAに対する補足性は核酸一次構造またはその結果である。CYP24メッセンジャーRNAにアンチセンス分子を結合すると、CYP24ポリペチドの正常翻訳を妨げる。

#### 【0171】

かように、本発明の好適な実施例に従えば、好ましいアンチセンス分子は、CYP24メッセンジャーRNAとハイブリッド可能な核酸（例えばオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド類似体）を含む。この関係は一般に「アンチセンス」と命名される。アンチセンスの核酸類似体は、RNAの機能、すなわちタンパク質への翻訳、細胞質へのトランスロケーション、またはその全体的な生物学的機能に必要な他のいかなる活動をも禁ずることができるとか。メッセンジャーRNAがその機能の全部または一部を遂行するのに失敗するとCYP24ポリペプチ

ドの発現が減少するかまたは完全に抑制される。

【0172】

本発明の文脈において、「オリゴヌクレオチド」という用語は、自然に生成する塩基および/またはホスホジエステル結合でつながれるシクロフラノシル群から形成されるポリヌクレオチドを指す。この用語は、自然に発生しているサブユニットまたはそれらに近い相同物から形成される自然発生種または合成種に効果的に関連する。用語「オリゴヌクレオチド」は、また、オリゴヌクレオチドに類似して機能するが自然には発生しない部分を有する部分を指すこともある。したがって、オリゴヌクレオチドは糖の一部または糖内の結合をかえるかもしれない。これらの中で典型的なのはホスホロチオネート及びそのたの当業者には公知である硫黄を含有している種である。若干の好適な実施例に従えば、オリゴヌクレオチドのホスホジエステル結合の少なくとも1つは、活性が調整されることになっているRNAが位置する細胞領域に入り込む組成物の能力を高めるように機能する構造で置換されている。この種の置換がホスホロチオネート結合、メチルホスホネート結合または短いチェーン・アルキルまたはシクロアルキル組織を含むことは好ましい。他の好適な実施例に従えば、ホスホジエステル結合は実質的に非イオン性でキラルでない構造またはキラルで光学異性体的に特殊な構造によって置換されている。当業者が、本発明を実施するに当たり他の結合を選択することは可能である。

【0173】

オリゴヌクレオチド類は、又少なくともある種の修飾された塩基型を含む種類を含んでもよい。このようにして、自然界に通常見出される以外のプリンとピリミジンとを用いることが可能である。同様に、ヌクレオチドのサブユニットのフラノシル部分で、この発明の本質的な主義が守られる限り、修飾があっても良い。そのような修飾の例は、2'-アルキル-及び2'-ハロゲン-置換ヌクレオチドである。本発明において、有用な糖部分の2'位置での修飾のいくつかの特定の例としては、OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCH<sub>3</sub>, OCN, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、又は、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>3</sub>であり、そこでnは、1-約10であり、そして、他の置換基は同様な性質を持つ。

## 【0174】

そのようなオリゴヌクレオチドは、天然のオリゴヌクレオチド或いは、天然のラインに沿ってはいるが、天然の構造とは、1つ或いは、それ以上の相違のある合成のオリゴヌクレオチドと、機能的に相互変換が可能なものとして、描くのが最善である。全てのそのような類縁体は、CYP24のメッセンジャーRNAと効果的にハイブリダイズして、そのRNAの機能を阻害するために機能する限り、この発明によって包含される。

## 【0175】

この発明と一致したオリゴヌクレオチドは、好ましくは、約3 - 約100のサブユニットからなる。より好ましくは、その様なオリゴヌクレオチドと類縁体は、約8 - 約25のサブユニットからなり、更に好ましくは、約12 - 約20のサブユニットを持つ。認められるように(評価されるように)、1つのサブユニットは、1つのホスホジエステル或いは、他の結合を介して、隣接したサブユニットに適切に結合した、塩基と糖の組み合わせである。この発明に合致して用いられるオリゴヌクレオチド類は、既知の個相合成の技術によって、簡便に通例的に作られる。その様な合成用の装置は、Applied Biosystemsを含めたいくつかの業者で販売されている。そのような合成のいかなる他の手段も又用いられることが可能である。しかしながら、オリゴヌクレオチド類の実際の合成は、日常的に実施している人の能力の十分、範囲内である。ホスホロチオエート及び、アルキル化された誘導体のようなほかのオリゴヌクレオチド類の調製もまた当業者に良く知られている。

## 【0176】

## B) リボザイム

アンチセンス分子に加えて、リボザイムは、CYP24の転写をターゲットとし、阻害するために用いることが可能である。リボザイムは、他のRNA分子を触媒的に切断するRNA分子である。異なった種類のリボザイムはが記述されてきている。これらは、グループ1リボザイム、槌型リボザイム、ヘアピンリボザイム、RNase P、及び、斧型リボザイムを含む。(種々のリボザイムの性質に関する概説は、Castanotto その他(1994) Adv. in

Pharmacology 25: 289-317を参照のこと)。

【0177】

ヘアピンリボザイムの一般的な特徴については、例えば、Hampelその他(1990) Nucl. Acids Res. 18:299-304; Hampel その他(1990)ヨーロッパ特許公報No. 0 360 2 57; アメリカ合衆国特許No, 5, 254, 678に記載されている。調製の方法は、当業者に良く知られている。(例えば、Wong - Staal その他, WO94/26877; Ojwang その他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6340-6344; Yamada その他(1994) Human Gene Therapy 1:39-45; Leavittte その他(1995) Proc, Natl. Acad. Sci. USA 92:699-703; Leavittt その他(1994) Human Gene Therapy 5:1151-120; 及び、Yamada その他(1994) Virology 205:121-126を参照のこと)

【0178】

C) CYP24ポリペプチド活性の拮抗的阻害

例えば、与えられたVDR活性レベルでのCYP24活性は、CYP24ポリペプチドの拮抗的阻害剤を与えることにより、減少されうる。これは、もっとも簡単に25-ヒドロキシビタミンD3 24-水酸化酵素活性に欠けるCYP24ポリペプチドを与えることにより達成される。

【0179】

不活性なポリペプチド変更体(突然変異たんぱく質)を作る方法は、当業者にはよく知られている。(例えば、アメリカ合衆国特許5, 486, 463 5, 422, 260, 5, 116, 943, 4, 752, 585, 4, 518, 504を参照のこと)。そのようなポリペプチドのスクリーニング(例えば、上記のアッセイにおける)は、単に通常の実験操作で達成することが可能である。ここに、上述したように、ハイスループット方法を用いて、事実上数千の作用物質を僅か1日か2日でスクリーニングすることが可能である。

## 【0180】

## D) 内在性CYP24発現を調節するプロモーターの修飾

更に他の実施例では、CYP24の発現は、内在性プロモーターを改変することによって変化させることが可能である。内在性遺伝子の発現を変化させる方法は、当業者に良く知られている。一般的にその様な方法は調節される特定の遺伝子の発現を制御する調節配列の全体あるいは、一部を改変或いは、置換することを含む。好的实施例では、CYP24の上流にある調節配列（例えば、本来のプロモーター）を改変する。

## 【0181】

これは、相同組換えを利用して、本来の調節配列に異種の核酸を導入することにより、一般に達成される。CYP24遺伝子産物の発現をダウンレギュレートするためには、読み取り枠を改変するかプロモーターを破壊するかのいずれかである単純な突然変異が適切である。

## 【0182】

特に好適実施例では、問題とする構造遺伝子あるいは、上流配列を形成する核酸配列が非相同組換え構造体をターゲットとするために用いられる。内在性遺伝子の発現を改変するための相同組換えの利用は、アメリカ合衆国特許5,272,071, WO 91/09955, WO 93/09222, WO 96/29411, WO 95/31560 及びWO 91/12650に詳しく記載されている。

## 【0183】

## E) 他の分子の利用

CYP24活性をダウンレギュレートするために、他の数多くの手段をとることが可能である。上述したように、特にハイスループットスクリーニング方法を用いて、事実上数千の化合物をCYP24活性の改変（例えば、ダウンレギュレート）能力について、試験することが可能である。上述で同定された化合物又は、そのようなスクリーニング系で同定された化合物の1つ或いはそれ以上のものは、どれでもCYP24活性を調節するのに用いることが可能である。

## 【0184】

## F) CYP24調節物質の投与

CYP24活性を調節(例えば、ダウンレギュレート)する化合物は種々の方法で投与されうる。これらは予防的及び / 或いは治療的処置のために非経口、局所、経口、或いはエアロゾルや経皮のような局部投与を含むが、これらに限定されるものではない。医薬組成物は投与方法に応じて種々の単位剤型で投与されうる。例えば経口投与に適した単位剤型は粉末剤、錠剤、ピル剤、カプセル剤、トローチ剤を含む。CYP24調節剤(例えば、抗体、アンチセンス構成体、リボザイム、有機低分子等)は経口投与される際、消化から防御されなくてはならない。このことは典型的にはその分子(類)を酸性加水分解や酵素的加水分解に抵抗性を付与する組成物で複合体化するか、或いはその分子(類)をリポソームのような適切な抵抗性担体に包含させることによって成就されうる。消化保護剤の手段は当業者に良く知られている。

## 【0185】

投与組成物は通常、薬学的に許容されうる担体、好ましくは水溶性担体に溶解したCYP24調節剤からなる。種々の水溶性担体、例えば緩衝化された食塩水等を使うことができる。これらの溶液は無菌で、一般に不要物を含まない。これらの組成物は通常の、良く知られた無菌操作によって無菌化される。その組成物にはpH調製剤や緩衝剤、毒性調整剤等のような生理条件に近似させるのに必要な薬学的に許容される補助剤、たとえば酢酸ナトリウム、食塩、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等、を含んでも良い。これらの製剤における活性物質の濃度は広範囲にわたり、選ばれる特定の投与形態と患者の必要に応じて、主として溶液容積、粘度、体重等に基づいて選択される。

## 【0186】

このようにして、静脈投与用の典型的な薬剤組成は1患者1日あたり約0.1から10 mgとなる。特に薬物が体腔や臓器の内腔のような隔離された場所で、血流ではないところに投与される場合には、1患者1日あたり0.1から約100 mgの投与量を使っても良い。局所投与では本質的に、より高用量が可能である。非経口的に投与可能な組成物を調製する実際的な方法は

当業者にとって良く知られ、かつ明白であり、詳しくはRemington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)のような刊行物に記載されている。

【0187】

CYP24の調節剤を含有する組成物は治療的、或いは予防的処置の目的で投与されうる。治療的応用においては、組成物は病気及びその合併症を治療するか、或いは少なくとも部分的に進行を阻止するに十分な量で病気(例えば上皮癌)に苦しんでいる患者に投与される。このことを達成するのに適した量は“治療有効投与量”と定義される。この使用に有効な量は病気の重篤度と患者の健康の一般状態に依存している。その組成物の単回、あるいは多回投与は患者により必要されかつ耐えられる投与量と頻度に依存して投与される。

いずれにせよ、その組成物は患者を効果的に治療するために本発明の薬剤の充分量を提供すべきである。

【0188】

VI. 診断及び / 或いは予後への応用に使用するキット

診断、研究、及び上記に示した治療的応用に使うために、この発明によりキットが提供される。診断と研究応用ではこのようなキットは次のような物をいくつか、或いはすべてを含んでも良い: アッセイ試薬、緩衝剤、CYP24特異的及び / 或いはVDR特異的核酸類、或いは抗体(例えばフルサイズモノクローナル或いはポリクローナル抗体、単鎖抗体(例えばscFv)、或いは他のCYP24やVDR結合分子類)、及び他のハイブリダイゼーションプローブ類及び / 或いはプライマー類、及び / 或いは25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 24-ヒドロキシラーゼ。治療製品は無菌食塩或いは別に薬学的に許容される乳化及び懸濁用塩基を含んでも良い。

【0189】

加えて、そのキットは本発明の方法を実施するための指針(例えばプロトコル)を含む使用説明物を包含していても良い。使用説明物は典型的には記載物や印刷物から成るがそのようなものに限定されない。そのような使用説明を保

存することが可能でエンドユーザーに伝達することが可能なすべての媒体が本発明により意図されている。そのような媒体には電子貯蔵媒体（例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（CDROM）等を含むがこれらに限定されるものではない。そのような媒体にはそのような使用説明物を提供するインターネットサイトのアドレスを含んでも良い。

#### 【0190】

##### 実施例

以下の実施例は、特許請求された発明を制限するためではなく、例証するために提供される。

#### 【0191】

##### 実施例1

20q13.2.での増幅のためのドライバー発ガン遺伝子としてのCYP24の識別。

この実験は、CYP24の選択的な増幅を示す胸部腫瘍の遺伝子分析を記述する。腫瘍発展の間のこの遺伝子のより高いコピー数のための選択は、胸部における腫瘍の発現におけるビタミンD経路の重要性の更なる所見を提供する。

我々は、染色体帯域20q13.2での再発する増幅の領域を渡ったDNAコピー番号の高解像度定量的地図を得るために、比較ゲノム雑種形成の新しい高解像度種類、配列CGHを使用した。我々の研究所で開発した配列CGHは、その分析がゲノム領域（図1）にわたって目標クローンを区切ることによって決定されるように、雑種形成目標としてDNAクローンの微小配列を使用する。このように、隣接するクローンが配列を構成するとき、非常に高い解像度コピー数プロフィールが得られうる。

#### 【0192】

配列CGHの前例のない高いダイナミックレンジと量的精度CGHが、最初増幅された領域にわたって、コピー数プロフィールを非常に正確に描く能力を提供する。若干の腫瘍においては、コピー数プロフィールは、増幅の狭いピーク（図3において~300kb）を示す。この知見は、遺伝子マッピングの注意をその領域に集中させ、それらが候補ドライバー発ガン遺伝子としての評価に対して最

も高い優先権を与えられなければならないことを示す。

【0193】

乳癌の染色体帯域20q13.2における領域Aにわたる高解像度配列CGHの適用は、はっきりした増幅挙動を持つ、2個のサブ領域、A1およびA2の存在を明らかにした。最近、サブ領域A1に位置付けられ、A1の増幅のためのドライバー遺伝子でありそうな、候補発ガン遺伝子、ZNF217(コリンズら(1998))が同定された。それがこれらの腫瘍において最も高く増幅された狭いゲノム間隔に位置づけられるので、我々の注意は、今や領域A2のためのドライバー発ガン遺伝子としての遺伝子CYP24に集中する。

以前は、それが乳癌細胞系BT474において転写されることが分からなかったため、CYP24は候補発ガン遺伝子として無視された(コリンズら(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻:8703頁~8708頁)。しかし、コピー数プロファイルのピークの位置の故に、およびその機能についての既存の知識の故に、細胞系と腫瘍におけるCYP24の表現の再評価が正当化された。

【0194】

したがって、我々はCYP24とビタミンDレセプター(VDR)の表現レベルを調べた。それは、表Iにリストしたプライマーを使用して、RT-PCRによるCYP24発現を制御している。

【0195】

この再評価は、これらの遺伝子が乳癌細胞系と腫瘍において発現されることを示す(図3)。CYP24とVDRの発現は、MCF7細胞に認められ、細胞が1,25-dihydroxyvitamin-D3(図3A)で処理されたとき、CYP24の発現のより高いレベルが誘起された。さらに、CYP24とVDRの発現は、2種の胸部腫瘍S21とS59で確認された(図3B)。しかしBT474では、CYP24発現は、培養培地への1,25-dihydroxyvitamin-D3の追加なしでは確認されなかった(図3C)。VDRの低レベル発現だけがこの細胞系において見つかった。これは、おそらく、たぶん1,25-dihydroxyvitamin-D3の追加なしで、BT

474におけるCYP24の発現を見つけないことを示している。  
BT474についてのこれらの所見は、CYP24機能の分析の複雑さを例証し、腫瘍形成におけるCYP24の役割を評価するとき、VDR活性を測定することの重要性を強調している。

【表1】

CYP24及びVDRの遺伝子発現評価に用いられたプライマー

プライマー名	配列	配列 ID 番号
CYP24 前進	5'-(AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) CAA ACC GTG GAA GGC CTA TC -3'*	1
CYP24 逆進	5'-(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA G)T CTT CCC TTC CAG GAT CA-3'***	2
VDR. 前進	5'-CTTCAGGCGAAGCATGAAGC-3'+	3
VDR 逆進	5'-CCTTCATCATGCCGATGTCC-3'	4
ZNF217 前進	5'-(AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) AGA GGG GTG AGT GAC AAG-3'*	5
ZNF217 逆進	5'-(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) AGC TCG GAA TGG AAC AAC-3' <sup>a</sup>	6

\* 増幅された製品がmRNA FISHのためのリボプローブを生成するために試験管内転写のためのテンプレートとして使うことができるように、括弧で示されたT3プロモータは、5'末端に含まれる。

\*\* 増幅された製品がmRNA FISHのためのリボプローブを生成するために試験管内転写のためのテンプレートとして使うことができるように、括弧で示されたT7プロモータは、5'末端に含まれる。逆進プライマーは第二のexon-exonジャンクションに架かり、ゲノムDNAの増幅を防止する。A111bp断片は、増幅される。

+ 第3のexon-exonジャンクションに架かる。

++ A134bp PCR断片は、増幅される。

<sup>a</sup> A265bp PCR断片は、増幅される。

【0196】

実施例2

組織切片でのマルチ・カラー蛍光性 *in situ* ハイブリッド形成 (mRNA FISH) を使用する発現分析。

通常の組織と比較して腫瘍において過剰発現される遺伝子を識別するために、我々は、ホルマリン固定パラフィン埋込み臨床標本を使用するために、*C. elegans* に転写パターンを視覚化するために、我々の FISH プロトコルを適応した (Albertson ら (1995) *C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*, 第48巻 339~364ページ、H. F. Epstein および D. C. Shakes 編集 Academic Press, Inc.; Birchall ら (1995) *Nature Genet.* 11巻 314~320ページ)。我々のアプローチには、試験管内の転写によって合成される蛍光体をラベルしたリボプローブの使用が含まれる。転写反応のための DNA テンプレートは、T3 または T7 バクテリオファージプロモータが、5' 末端に導入された特殊なプライマーを遺伝子を使用する増幅によって生成する。このように、プローブを作成するために遺伝子断片のサブクローニングは、避けることができる。

#### 【0197】

ハイブリッド形成信号は、狭い波長の励起光と焦点蛍光の排除のために組織の自己蛍光発光からの妨害を減らす共焦点顕微鏡で映し出された。放射性プローブよりむしろ、蛍光性プローブの使用は、高解像度、時間節約、同時の免疫組織化学との両立性 (Chuang ら (1996) *Cell*, 79巻 1~20頁)、および、単一の組織切片で同時に数多くの遺伝子の発現の相対的レベルを測定する可能性 (Albertson ら (1995)) を含めて、数多くの利点を持っている。

#### 【0198】

##### 実施例3

正常乳房細胞における CYP24 および VDR の発現

ヒトにおいては、ビタミンDレセプターは、免疫組織化学によって正常乳房の内腔および胞状上皮細胞に、そして、胸部腫瘍細胞中に突き止められた (Berg

er ら(1987年) *Cancer Res.* 47巻: 6793~6799頁; Colston Rら(1989年) *Lancet*, 188~191頁)。この実験では、ネズミの乳腺の発達および退縮の間のCYP24およびVDR遺伝子の発現プロフィールは、細胞タイプとこれらの遺伝子生成物が機能する発達段階を識別するために決定される。これらの研究は、これらの遺伝子の正常な発現の説明を提供し、それは、つぎに下記のように開発される、ネズミ胸部腫瘍モデルおよびCYP24トランスジェニックのマウスにおける発現と比較される。発現分析は、転写体と蛋白質レベルの両方で実行される。

上述のように、CYP24とVDR mRNAのための遺伝子特異的プローブは、mRNA FISHのためのリボプローブを生成するのに用いることができる。VDRに固有な抗体は、市販されている(Affinity BioReagents #PAI-711、MAI-710; Santa Cruz Biotechnology #sc-1008、sc-1009)。

免疫組織化学および/またはmRNA FISHの免疫組織化学との組合せは、胸部におけるさまざまな細胞タイプに固有な特定の遺伝子とマーカートンパク質の発現のサイトを突き止めるのに用いられる。可能ならば、CYP24 および/または VDRならびに細胞タイプに特異的なマーカの位置決めは、遺伝子とマーカートンパク質のために、プローブの上に多数の区別できる蛍光色素を使用して、同一組織切片で、同時に実行される。

齧歯目の胸部の発達が記述された(例えば、Medina(1996年) *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 1巻5~19頁参照)、そして、週齢の4-8週に乳房の脂肪パッド全体の管状組織の樹脂状化から始まる。侵入する管の先端に位置する末端の芽状突起には増殖している細胞が含まれる。妊娠時に、管状組織の更なる樹枝状化が、既存の管状ツリーの側からの第三の末端芽状突起の精密化によって起こる。乳タンパク質、ラクトグロブリンと乳漿酸性の蛋白が合成されるとき、腺の末端分化が乳汁分泌の間に起こる。乳を出す乳腺の退縮には、大規模なアポトーシスが含まれ、離乳後の4~6週間に起こる。

【0199】

実験設計

CYP24とVDRの発現は、mRNA FISHまたは遺伝子特異的抗体を使用して組織切片の*in situ*染色によって決定される。マウスの生体内灌流および固定続いて、組織ブロックが調製される。乳腺は、次の時点でマウスから採取する：(a)胸部管状組織の樹枝状化の始めと終り(それぞれ、3-4週齢と8週齢に)(b)妊娠の初期、中期および後期(性交後4、8、13および18日に)(c)乳汁分泌の間、ならびに(d)胸部の退縮の初期と終期の間。屠殺の前に、全てのマウスに、単クローナルBrdU抗体を使用するのSフェース細胞の免疫組織化学的検出のために5-bromo-deoxyuridine (BrdU)を注射する(Arbeitら、1994年)。ケラチン中間フィラメント・タンパク質の免疫組織化学的染色は、乳管の基底(keratin-14)および内腔細胞(keratin-6)を区別するのに用いられる(Antibodies, BabCo # prb-155p)-169p)。退縮の初期および後期は、アポトーシスのためのTUNELアッセイを用いて識別される(Naikら(1996年)Genes Dev. 10巻:2106~2166頁)。

#### 【0200】

##### 方法

##### 標本調製。

マウスは、屠殺の2時間前に、BrdU 100mg/kgを腹腔内注射する。マウスは、秤量し、0.25%アベルチン溶液37.5mg/kgで麻酔し、新に用意したパラホルムアルデヒドの3.75%溶液で灌流する。組織を除去し、ポスト4の<Cでの3.75%のパラホルムアルデヒドで、一晚、後固定して、それからパラフィンに埋め込む。切片(~6μmの厚み)はキシレン中で脱蠟し、エタノールの段階的なシリーズ中を通し、それから、用途に従い、15分間37で、プロテイナーゼK 5~15μg/ml添加してインキュベーションする。プロテアーゼ処理の後で、室温で20分間1%パラホルムアルデヒド中でポスト固定し、すすぎ、つぎに脱水する。

#### 【0201】

##### mRNA FISH。

標本は、37℃で2時間、ハイブリッド化緩衝液(50-70%ホルムアミド、5X SSC、0.1% SDS、0.1%のトウイン20、100 µg/ml tRNA、10%デキストラン硫酸塩)中でプリハイブリッド化する。プリハイブリッド化溶液を除去し、蛍光体をラベルしたリボプローブ(Albertsonら(1995年)、C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism, 42巻, H. F. Epstein and D. C. Shakes, eds. Academic Press, Inc. の339~364頁)をハイブリッド化緩衝液中の標本に適用する。ハイブリッド化は、プローブの長さでGC内容にしたがって、37-50℃で一晩行う。

#### 【0202】

##### 免疫組織化学

切片の処理は、抗体に従わずかに異なるが、間接的検出のための標準の方法を使用する(例えば、Albertson(1984) Develop. Biol. 101:61~72)。

#### 【0203】

##### Sフェース分析。

BrdU陽性細胞のための免疫組織化学的染色の後に、BrdUラベル指数を、連続した20倍率の場で1000個の核を計数することによって決定する。

#### 【0204】

##### アポトーシス

TUNELアッセイは、製造業者の指示書(Oricor # S7110、Gaiterburg, MD)にしたがって、末端トランスフェラーゼ活性の蛍光検出を使用して、行う。

#### 【0205】

##### データ収集および分析。

乳房組織中のCYP24とVDRの発現プロフィールには、特殊な細胞タイプ、発達段階に特有の発現パターンおよび発現の相対的レベルの列挙が含まれる。細胞に特異的なマーカータンパク質の発現は、特定の細胞および発達段階における

CYP24とVDR発現の指定を確かめるのに用いられる。乳管の基底および内腔細胞は、特定のケラチンの発現によって識別され、退縮する細胞は、TUNEL陽性細胞として同定される。

異なる成長段階におけるCYP24およびVDR mRNAの発現の相対的レベルは、同一組織切片にハイブリド化したリボソームプローブに関して測定される。

#### 【0206】

##### 実施例4

確立されたネズミ乳がんモデル、MMTV-ERBB2トランスジェニックマウスにおけるCYP24の発現

#### 【0207】

われわれは、ヒト胸部腫瘍標本(図3)におけるCYP24およびVDR mRNAを文書に記録し、ヒト胸部腫瘍標本からの正常および腫瘍組織におけるこれらの遺伝子の発現を研究しつづける。ここで、われわれは、ERBB2がん遺伝子がマウスの乳がんウイルスプロモーター(JAX Mice、MMTVneu Erbb2、#002376)の制御の下で、乳房組織で発現される、確立された胸部腫瘍のトランスジェニックマウスモデルにおける胸部がん発生の間のCYP24およびVDRの発現を調べる。これらのマウスは、最初、約4月齢で過形成性で形成異常の乳腺に巣状の腫瘍を発生させる(Guyら、1992年)。胸部腫瘍発生のトランスジェニックマウスモデルの研究は、患者の材料の分析では研究することのできない腫瘍発生の特定の相におけるこれらの遺伝子の潜在的役割を研究する機会を提供する。特に、マウスモデルは、ヒトの標本からは得ることのできない妊娠前段階へのアクセスを提供する。さらに、マウスの腫瘍モデルは、腫瘍発生における特別の遺伝子の役割が、はっきりした遺伝的背景において誘起される腫瘍(たとえば、ERBB2の過剰発現、cyclin D1またはp53の欠如によって誘起される腫瘍)で評価することを可能にする。

#### 【0208】

##### 実験計画

初期および後期腫瘍発達の時点を網羅するために、2、4、6および10~12月齢のトランスジェニックマウスを研究する。屠殺の2時間前に、BrdUを

腹腔内に注射し、Sフェースキネティックを測定する。組織を採取し、mRNA FISH用に処理し、ケラチン-14および-6、ならびにHER2-neu 導入遺伝子の発現を、実施例3におけるように抗体を用いて測定する。

#### 【0209】

ここに記載した実施例および具体例は、例証の目的のためだけであって、それらの光の中での種々の修正および変更は、当該業者には示唆されるであろうし、付された請求範囲の応用と範囲の精神および権限の中に含まれることは理解される。ここに挙げられたすべての出版物、特許、および特許の応用は、これによって全ての目的のために、全体として参照されて入れられている。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)を示す。左のパネルでは、ゲノムDNA全体が、「供試および「参照」細胞個体群から単離され、各種の蛍光色素によって標識され、正常な分裂中期染色体へハイブリダイズされる。Cot-1 DNAを用いて、反復配列のハイブリダイゼーションを抑制する。染色体のある位置において生じた2種類の蛍光色素の蛍光強度の比は、供試および参照ゲノムにおける対応するDNAの複製数の比にほぼ比例している。右のパネルは、マップされたクローンの配列に対する、同様のハイブリダイゼーションを示す。これにより、クローンのサイズおよび/またはその間のマップ空間によって決定された分解能を用いて、複製数の測定が可能になる。

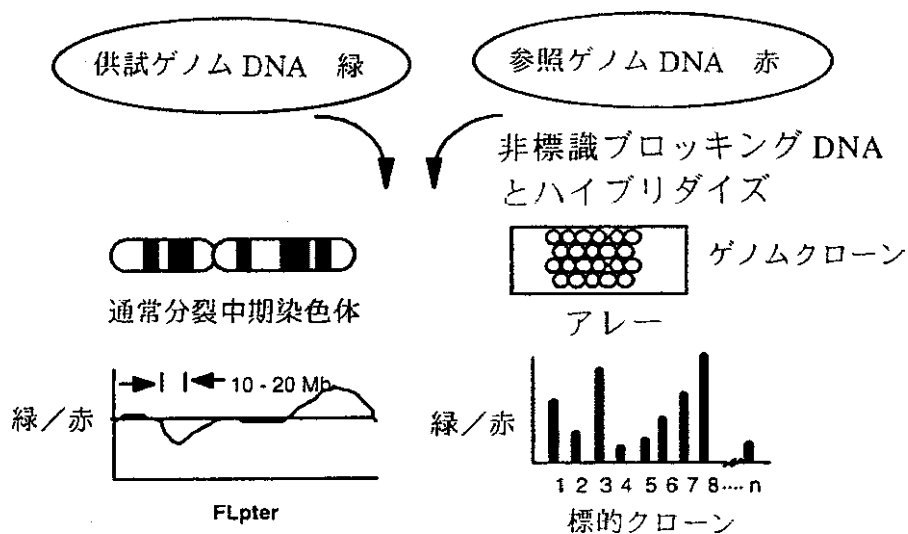
##### 【図2】

乳癌腫瘍S21の高分解能配列CGH測定を示す。20q13.2における領域Aによる近接標的クローンの試験：参照比を、棒として示した各標的クローンの比とともにプロットし、STS含有量マッピングによって決定されるクローンの重複を示す。クローン名は最後の4桁に短縮してある。この分析は、重複クローンのRMC20B4121、RMC20B4087、RMC20B4195が複製数プロファイルのピークの遺伝子座であることと、重複クローンRMC20B4087、RMC20B4195に遠位の領域内の複製数が急勾配で減少することを示している。

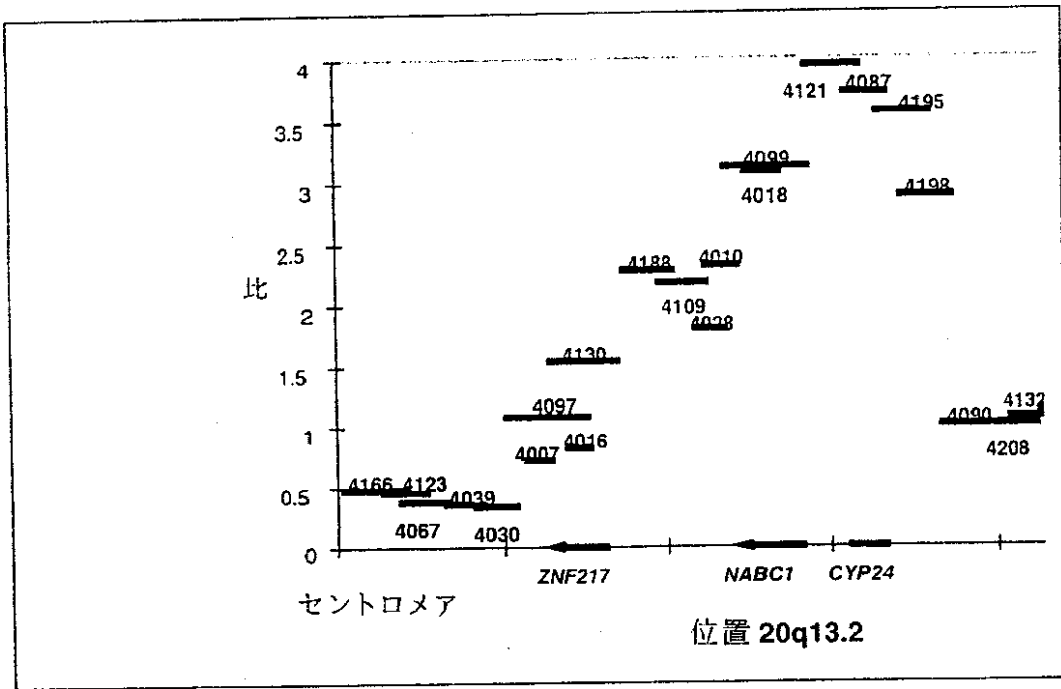
## 【図3】

RT-PCRによって評価した、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>で誘発を行った場合と行わない場合のヒト乳癌細胞系および腫瘍におけるCYP24、VDRおよびZNF217遺伝子の発現を示す。(a) 10<sup>-8</sup>Mの1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>およびビヒクル対照(エタノール、EtOH)を用いてインキュベートしたMCF7乳癌細胞における、CYP24遺伝子発現の誘発の時間経過。(b) 2種類の乳癌腫瘍S21およびS59における遺伝子発現。(c) BT474細胞系における遺伝子発現。細胞は(a)で述べたように、10<sup>-8</sup>Mの1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を用いてインキュベートした。

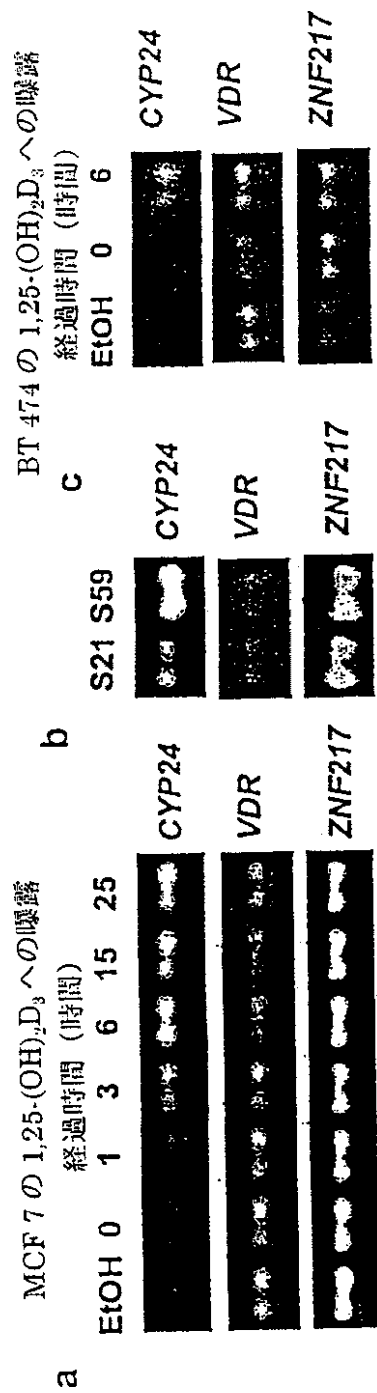
## 【図1】



【図2】



【図3】



## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/05972
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> 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>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/1, 7.21, 7.4, 7.8, 7.91, 7.92, 7.93, 183, 350, 3-51, 352, 354, 363, 364, 366, 372; 424/1.11 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y --- A	COLLINS et al. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: Genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. July 1998, Vol.95, pages 8703-8708, see entire document.	1-17 ----- 18-70
Y --- A	ARMBRECHT et al. Insulin markedly potentiates the capacity of parathyroid hormone to increase expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase in rat osteoblastic cells in the presence of 1, 25-dihydroxyvitamin D3. FEBS. 1996, Vol.393, pages 77-80, see entire document.	1-32 ----- 33-70
<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	*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	
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	
*E* earlier document published on or after the international filing date	*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	
*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)	*A* document member of the same patent family	
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 01 JUNE 2000	Date of mailing of the international search report 24 JUL 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>Jerry J. Hays for</i> ALANA M. HARRIS, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/05972

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:**  
IPC (7):

C12Q 1/00, 1/02, 1/24, 1/25; C12N 9/00, 5/00, 5/06, 5/08; G01N 1/00, 1/10, 31/00, 33/48, 33/483, 33/487, 33/49, 33/493, 31/10

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:**  
US CL :

435/1, 7.21, 7.4, 7.8, 7.91, 7.92, 7.93, 183, 350, 351, 352, 354, 363, 364, 366, 372; 424/1.11

**B. FIELDS SEARCHED**

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, LIPESCI, BIOTECHDS, BIOBUSINESS, PROMT, PHIN, PHIC, WPIDS, JICST-EPLUS, DIALOG, CANCERLIT, BIOL. AND AGRIC. INDEX, CUR. BIOTECH AB., CLAIMS/US PAT. AB., CHINESE PAT. AB., EUROPEAN PAT., DERWENT, EMSWORLD PAT., WIPO/PCT PATENTS.

## 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)
A 6 1 K	45/00	A 6 1 P 35/00	
	48/00	35/04	
A 6 1 P	35/00	C 1 2 Q 1/02	
	35/04	1/26	
C 1 2 Q	1/02	1/68	A
	1/26	G 0 1 N 33/15	Z
	1/68	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	33/53	M
	33/50	33/566	
	33/53	33/573	A
	33/566	33/574	A
	33/573	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/574	A 6 1 K 37/02	
(72)発明者	ピンケル、 ダニエル アメリカ合衆国 94595 カリフォルニア 州 ウォールナット クリーク マンザニ ータ コート 31		
(72)発明者	コリンズ、 コリン アメリカ合衆国 94901 カリフォルニア 州 サン ラファエル シャノン レーン 36		
(72)発明者	グレイ、 ジョー、 ダブリュー . アメリカ合衆国 94127 カリフォルニア 州 サン フランシスコ サンタ ポーラ アヴェニュー 50		
(72)発明者	イストラ、 ボーク アメリカ合衆国 94114 カリフォルニア 州 サン フランシスコ マーズ ストリ ート 56		
F タ-ム(参考)	2G045 AA26 AA28 AA40 CA25 CA26 CB01 CB03 CB07 DA12 DA13 DA14 DA20 DA78 FB01 FB02 4B024 AA12 CA09 CA12 HA12 4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ03 QQ20 QQ22 QQ44 QQ53 QQ79 QQ91 QR32 QR41 QR56 QR62 QR77 QR82 QS25 QS34 QX02 4C084 AA13 AA17 BA03 DC50 ZB21 ZB26 4C086 AA01 AA02 DA14 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26		

专利名称(译)	CYP 24的复制及其使用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002540798A</a>	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000609598	申请日	2000-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	アルバートソンドナジー ピンケルダニエル コリンズコリン グレイジョーダブリュー イストラボーク		
发明人	アルバートソン、ドナ、ジー、 ピンケル、ダニエル コリンズ、コリン グレイ、ジョー、ダブリュー、 イストラ、ボーク		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/00 A61K31/59 A61K31/7105 A61K31/711 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04 C12N5/00 C12N5/06 C12N5/08 C12N9/00 C12N15/09 C12Q1/00 C12Q1/02 C12Q1/24 C12Q1/25 C12Q1/26 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N1/00 G01N1/10 G01N31/00 G01N31/10 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/487 G01N33/49 G01N33/493 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/573 G01N33/574 G01N33/82		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/04 C12Q1/48 G01N33/57415 G01N33/82 G01N33/5011 Y10T436/25		
FI分类号	A61K31/59 A61K31/7105 A61K31/711 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/573.A G01N33/574.A C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA28 2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045 /CB07 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA78 2G045/FB01 2G045/FB02 4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063 /QQ03 4B063/QQ20 4B063/QQ22 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063 /QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA03 4C084/DC50 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA14 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086 /ZB26		
优先权	09/285292 1999-04-02 US		
其他公开文献	JP4790127B2 JP2002540798A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及以下发现：CYP24基因的扩增或增加的CYP24活性是癌症（例如乳腺癌）的存在，其发展或易感性的标志。本发明使用该信息来提供用于检测动物中癌症易感性的方法。该方法包括（i）从动物（例如人类患者）提供生物样品；（ii）检测生物样品中CYP24的水平；和（iii）正常 包括比较该CYP24水平与取自荷瘤组织的对照样品中的CYP24水平，其中与对照样品中的CYP24水平相比，生物样品中CPY24水平升高是 表示存在癌症。

プライマー名	配列	配列 ID 番号
CYP24 前進	5'-(AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) CAA ACC GTG GAA GGC CTA TC -3'	1
CYP24 逆進	5'-(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA G)T CTT CCC TTC CAG GAT CA -3'	2
VDR 前進	5'-CTTCAGGCGAAGCATGAAGC-3'	3
VDR 逆進	5'-CCTTCATCATGCCGATGTCC-3'	4
ZNF217 前進	5'-(AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) AGA GGG GTG AGT GAC AAG-3'	5
ZNF217 逆進	5'-(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) AGC TCG GAA TGG AAC AAC-3'	6