

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2004-520025
(P2004-520025A)**

(43) 公表日 **平成16年7月8日(2004.7.8)**

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 Q 1/02
C 0 7 K 16/30
C 1 2 Q 1/68
G O 1 N 33/48
G O 1 N 33/52

F I

C 1 2 Q 1/02
C O 7 K 16/30
C 1 2 Q 1/68
G O 1 N 33/48
G O 1 N 33/52

テーマコード (参考)

A
M
A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-550109 (P2002-550109)
(86) (22) 出願日 平成13年12月11日 (2001.12.11)
(85) 翻訳文提出日 平成15年6月11日 (2003.6.11)
(86) 国際出願番号 PCT/AU2001/001614
(87) 国際公開番号 W02002/048395
(87) 国際公開日 平成14年6月20日 (2002.6.20)
(31) 優先権主張番号 PR 2015
(32) 優先日 平成12年12月11日 (2000.12.11)
(33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 501411178
バイオセプター プロプライエタリー リ
ミテッド
オーストラリア国 2000 ニューサウ
スウェールズ州 シドニー オコンネル
ストリート 26 レベル 10
(74) 代理人 100089705
弁理士 社本 一夫
(74) 代理人 100076691
弁理士 増井 忠式
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前新生物状態および新生物状態を同定するためのP2Yプリン作動性受容体の発現

(57) 【要約】

本発明は、哺乳類における前新生物状態および新生物状態を同定するための方法、特にP2Yプリン作動性受容体の発現の違いに基づいて細胞および組織内の前新生物および新生物を同定する方法に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類由来の細胞および/または組織の P 2 Y プリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態を診断するための方法。

【請求項 2】

哺乳類由来の細胞および/または組織の P 2 Y プリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するための方法。

10

【請求項 3】

哺乳類由来の細胞および/または組織の P 2 Y プリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における発癌の病因を決定するための方法。

【請求項 4】

哺乳類がヒト、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラットまたはマウスである請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

哺乳類がヒトである請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

細胞および/または組織が前立腺、乳腺、皮膚または他の上皮細胞素材由来である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前新生物状態または新生物状態が前立腺の前癌病変または前立腺癌であり、前立腺細胞または前立腺組織の P 2 Y₂ プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の増加を、先の請求項で定義したように、正常な前立腺細胞または前立腺組織の発現プロファイルと比較して前立腺の前癌病変または前立腺癌の存在を診断する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前新生物状態または新生物状態が乳腺の前癌病変または乳癌であり、哺乳類由来の乳腺細胞および/または乳腺組織の P 2 Y₂ プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の低下を、正常な乳腺由来の乳腺細胞および/または乳腺組織の発現プロファイルと比較して乳腺の前癌病変または乳癌の存在を診断する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前新生物状態または新生物状態が皮膚の前癌病変または皮膚癌であり、哺乳類由来の皮膚細胞および/または皮膚組織の P 2 Y₂ プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の低下を、正常な皮膚由来の皮膚細胞および/または組織の発現プロファイルと比較して皮膚の前癌病変または皮膚癌の存在を診断する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 10】

皮膚癌が悪性黒色腫、扁平上皮癌または基底細胞癌である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

P 2 Y 受容体の発現プロファイルが P 2 Y₂、P 2 Y₄ および/または P 2 Y₆ の受容体の発現プロファイルである、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

P 2 Y 受容体の発現プロファイルが P 2 Y₂ 受容体の発現プロファイルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

50

前新生物状態が、P2Y受容体の発現プロファイルが細胞の核内で変化する初期の前新生物状態である、請求項1から12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

前新生物状態が進行した前新生物状態であり、当状態においてP2Y受容体の発現プロファイルが、P2Y受容体が細胞質および/または側方の膜および/または基底膜中に存在するプロファイルを示す、請求項1から12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前新生物状態が、P2Y受容体が上皮細胞膜頂端側に存在するプロファイルを、P2Y受容体の発現プロファイルが示す状態である、請求項1から12のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項16】

P2Y受容体の発現プロファイルを他のマーカーの発現プロファイルと組み合わせる、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

P2Y受容体の発現プロファイルをP2X受容体の発現プロファイルと組み合わせる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

P2Y受容体の発現プロファイルをP2X₁および/またはP2X₂の発現プロファイルと組み合わせる、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

P2Y受容体の発現プロファイルを免疫組織化学的方法、またはウェスタンブロット法もしくはノーザンブロット法により検出する、請求項1から18のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項20】

P2Y受容体の発現プロファイルをELISAまたはRIAにより検出する、請求項1から18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

P2Y受容体の発現プロファイルを比色分析により検出する、請求項1から19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

P2Yプリン作動性受容体特異抗体であって、前新生物または新生物の細胞および/または組織と、正常な細胞および/または組織とを区別することができる当該抗体。

30

【請求項23】

抗体がP2Y₂、P2Y₄および/またはP2Y₆の受容体に特異的である、請求項22に記載の抗体。

【請求項24】

抗体がP2Y₂受容体に特異的である請求項23に記載の抗体。

【請求項25】

抗体がモノクローナル抗体である請求項22から24のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項26】

抗体がポリクローナル抗体である請求項22から24のいずれか1項に記載の抗体。

40

【請求項27】

少なくとも1つの他の抗体と組み合わせる請求項22から24のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項28】

少なくとも1つの他の抗体がP2Y受容体特異抗体またはP2X受容体特異抗体である、請求項27に記載の抗体。

【請求項29】

P2X受容体の抗体がP2X₁またはP2X₂の受容体特異抗体である、請求項27に記載の抗体。

50

【請求項 30】

少なくとも1つの他の抗体がモノクローナル抗体である、請求項 27 から 29 のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 31】

少なくとも1つの他の抗体がポリクローナル抗体である、請求項 27 から 29 のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 32】

請求項 22 から 31 のいずれか1項に記載の抗体を含む一組の P2Y 抗体。

【請求項 33】

請求項 1 から 21 のいずれか1項に記載の方法で使用する際の、請求項 22 から 31 のいずれか1項に記載の抗体または請求項 32 に記載の一組の抗体。 10

【請求項 34】

前新生物または新生物の細胞および/または組織と、正常な細胞および/または組織とを区別するために使用する際の、請求項 22 から 31 のいずれか1項に記載の抗体または請求項 32 に記載の一組の抗体。

【請求項 35】

細胞および/または組織を生検により得る請求項 1 から 21 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 36】

生検材料を細針吸引により、体液から、または前立腺の細胞および/または組織の場合には直腸からの触診による滲出液または精液から採取する、請求項 35 に記載の方法。 20

【請求項 37】

相補的な検査と併用しての請求項 1 から 21 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 38】

相補的な検査が悪性度のための検査である請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

悪性度のための検査が、ヒトのテロメラゼタンパク質 1 (hTP1) に特異的な抗体を使用する抗テロメラゼ抗体検査または抗テネイン検査である請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

請求項 22 から 31 のいずれか1項に記載の P2Y プリン作動性受容体特異抗体または請求項 32 に記載の一組の抗体と結合させた、単離された哺乳類の細胞または組織試料。 30

【請求項 41】

P2Y プリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態を診断するためのキット。

【請求項 42】

P2Y プリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するためのキット。

【請求項 43】

P2Y プリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、哺乳類における発癌の病因を決定するためのキット。 40

【請求項 44】

P2Y プリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段が、請求項 22 から 31 のいずれか1項に記載の抗体または請求項 32 に記載の一組の抗体である、請求項 41 から 43 のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 45】

前記哺乳類由来の細胞および/または組織が前新生物細胞または新生物細胞の近位にあり、前新生物または新生物そのものではない、請求項 1 から 21 のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳類における前新生物状態および新生物状態を同定するための方法、特にP2Yプリン作動性受容体の発現の違いに基づいて細胞および組織内の前新生物および新生物を同定する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

癌を診断する際、生検サンプルの細胞の特徴、例えば癌細胞のサイズおよび形の多様性の程度、活動的に分裂している細胞の比率、および周辺構造への浸潤について考慮される。10
一般に使用される組織学的染色は、細胞内要素を区別して標識するヘマトキシリン（一次染色）およびエオシン（カウンター染色）である。他の診断法としては顕微鏡分析用に視覚化することのできる、細胞または組織の内部（細胞内エピトープにより）または表面上（細胞外エピトープにより）の特定の診断分子、例えば癌胎児性抗原（CEA）の抗体を用いる。いくつかの具体的な例について以下に述べる。

【0003】

前立腺癌

西洋における前立腺癌の発症率は驚くべき速度で増加しており、過去5年間で2倍以上になっている。これはあらゆる新生物の中で最も高い発生率を有し、世界全体の男性の癌死亡の最も一般的な原因として肺癌に次いで第二位であり、オーストラリアの癌死亡の主要な原因である〔非特許文献1〕。良性前立腺過形成（benign prostatic hyperplasia: BPH）は50歳以上の男性に一般的であり、それ自体が前立腺癌の前駆体である前立腺上皮内新生物（prostatic intraepithelial neoplasia: PIN）の前駆体となり得る。検死の研究は70%の男性が80歳に達するまでに前立腺に悪性細胞を有することを示している〔非特許文献2〕。20

【0004】

この症状の重大さにもかかわらず、診断法はわずかしかなかくまた正確ではない。予後を評価する現行の方法、例えば直腸からの触診（digital rectal examination: DRE）、超音波、前立腺性酸性ホスファターゼ濃度、アンドロゲン遮断、前立腺特異抗原（prostate specific antigen: PSA）の比重、PSAの速度、PSAの年齢特異的基準範囲、およびGleasonの組織病理学的分類は、前立腺癌との臨床結果に関する信頼できる予測情報を提供できるとは言えない〔非特許文献3〕。例えば複数の試験によりDRE3では36.9%の偽陰性率を生じることが示された〔非特許文献4〕。PSAは、前立腺の他にも多数の組織に関与する33kDaのセリンプロテアーゼで〔非特許文献5〕、アンドロゲン、グルココルチコイドおよびプロゲステロンによりアップレギュレートされ、成長因子の制御に関与すると考えられている。残念ながら血清PSA濃度では、偽陰性23%および偽陽性36.7%の診断を生じる。新たにスクリーニングで検出される症例の半数以上が、実際には偽陽性であることさえ示唆されている〔非特許文献6〕。付加的な検査、例えばPSAの比重、速度および年齢特異的基準範囲の導入によるスクリーニング法を改善する試みは疑わしい。ある試験は、年齢特異的PSA基準範囲を適用すると、PSA正常上限が4.5ng/mLに上昇し、臨床的に重要なかなりの数の癌が検出できなくなることを示した〔非特許文献7〕。この不確実さゆえに悪性かどうかの確定には前立腺の生検がしばしば行われるが、この検査もまた新生物への変化の部位を直接サンプリングしていないことに起因する、23%の偽陰性の診断というかなり不満足な値を示す〔非特許文献8〕。40

【0005】

治療の選択は、組織切片の顕微鏡分析に基づく臨床的なステージ分類に大きく依存する〔非特許文献9〕。この技術は組織学的外観を臨床結果に関連づける上で、判定とかなりの経験に依存する。残念ながら前立腺癌組織が不均一であることは周知であり、生細胞の診断の特徴が検査する切片で見過ごされやすい可能性がある。状況をさらに複雑にすること50

には、手術および放射線療法の結果を調査する無作為試験およびコントロール試験がまだ行われていない [非特許文献 2]。治療の選択には、根治的前立腺切除、放射線療法、アンドロゲン遮断、および“注意深い待機”が挙げられる。“注意深い待機”が根治的介入かを問う確実な回答は、前立腺癌の介入 - 対 - 観察に関する試験 [非特許文献 10] の結論を待たなければならない。これらの決定が患者に及ぼす結果は重大である。例えば根治的前立腺切除はしばしば失禁、インポテンス、膀胱頸狭窄、疼痛および鬱に至る [非特許文献 11]。

【 0 0 0 6 】

その他の癌、例えば乳癌または皮膚癌の場合、サンプルは幾つかの理由で誤診を招く可能性がある。乳腺の腫瘍の場合、局在する腫瘍の境界をうまく定義することはできず、同様に皮膚癌の場合も (H & E 染色で決定されるような) 組織学的に明らかな癌と正常組織との境界は多様である。正常な組織はいずれにしても多かれ少なかれ、所望する以上にこれら腫瘍周囲を削除されることになる。

10

【 0 0 0 7 】

参考文献

【非特許文献 1】Lian FR, Bhuiyam M, Li YW, Wall N, Kraut M および Sarkar FH, 1988 ジェニステイン誘発性 G (2) - M 停止、P 2 1 (W a f 1) アップレギュレーション、および非小細胞肺癌におけるアポトーシス。Cell Line. Nutr. & Cancer. 31: 184-191。

【非特許文献 2】Hoey J, 1998 前立腺癌：進行および混乱。CMAJ 159: 1-3。

20

【非特許文献 3】Festuccia C, Vincentini C, di Pasquale AB, Aceto G, Zazzeroni F, Miano L, および Bologna M, 1995 良性前立腺過形成および前立腺癌の短期組織培養における、プラスミノゲンアクチベーター活性化。Oncol. Res. 7: 131-138。

【非特許文献 4】Saxena S, Mohanty NK および Jain AK, 1997 前立腺症の男性における前立腺癌のスクリーニング。Ind. J. Pathl. Micro. 40:441-450。

【非特許文献 5】Diamandis EP および Yu H, 1997 前立腺特異抗原の前立腺以外の素材。Urol. Clin. Nth. Am. 24; 275-282。

【非特許文献 6】Weyler J, 1999 前立腺癌：スクリーニングか、注意深い待機か？ Ann. Oncol. 9: 9-11。

【非特許文献 7】Bassler TJ, Orozco R, Bassler IC, Odowd GJ および Stamey TA, 1998 60 歳代男性に関する前立腺特異的抗原の正常上限の上昇により見過ごされるほとんどの前立腺癌は、臨床的に重要である。Urol. 52: 1064-1069。

30

【非特許文献 8】Rabbanì F, Stroumbakis N, Kava BR, Cookson MS および Fair WR, 1998 前立腺生検偽陰性の 1 / 6 の発症率および臨床的重要性。J. Urol. 159: 1247-1250。

【非特許文献 9】Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE および Honn KV, 1997 ヒト前立腺癌の診断マーカーおよび予防マーカー。Prostate 31: 264-281。

【非特許文献 10】Small EJ, 1997 前立腺癌。Curr. Opin. Oncol. 9: 277-286。

【非特許文献 11】Moul JW, Mooneyhan RM, Kao TC, McLeod DG および Cruess DF, 1998 根治的前立腺切除後の失禁、インポテンスおよび狭窄を予測するための術前および術中の因子。

40

Prost. Can. & Prost. Dis. 1: 242-249。

【非特許文献 12】Dasari VR, Sandhu AK, Mills DC, Athwal RS および Kunapuli SP, 1996 P 2 U プリン作動性受容体遺伝子のヒト染色体 1 1 q 1 3 . 5 - 1 4 . 1 へのマッピング。Somat. Cell Mol. Genet. 22, 75-79。

【非特許文献 13】Communi D, Piroton S, Parmentier M および Boeynaems JM, 1995 ヒトのウリジンヌクレオチド受容体のクローニングおよび機能的発現。J. Biol. Chem. 270, 30849-30852。

【非特許文献 14】Maier R, Glatz A, Mosbacher J および Bilbe G, 1997 P 2 Y 6 c D N A のクローニングおよび偽遺伝子の同定：骨組織および脳組織における P 2 Y 受容体サブタイプの発現の比較。Biochem. Biophys. Res. Commun. 237, 297-302。

50

【非特許文献15】Hansen MA, Barden JA, Balcar VJ, Keay KA および Bennett MR, 1997 P2X受容体の細胞外ドメインの構造的モチーフおよび特徴づけ。Biochem. Biophys. Res. Comm. 236: 670-675。

【非特許文献16】Barden JA, Cuthbertson RM, Jia-Zhen W, Moseley JM および Kemp BE, 1997 15位のIleがAlaで置換されているタンパク質(残基1-34)(PTHrP[Ala15]-(1-34))に関する副甲状腺ホルモンの溶液構造。J. Biol. Chem. 272: 29572-29578。

【非特許文献17】Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, Morris MA および Buell GN, 1995 膀胱由来のヒトP2X受容体の特徴づけおよび染色体上の位置づけ。Recept. Channels 3, 283-289。

【非特許文献18】Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA および Jarvis MF, 1999 ヒトP2X(2)受容体の分子的特徴づけおよび機能的特徴づけ。Mol. Pharmacol. 56, 1171-1181。

【非特許文献19】Garcia-Guzman M, Stuhmer W および Soto F, 1997 ヒトP2X3プリン受容体の分子のおよび薬理学的特性。Brain Res. Mol. Brain Res. 47, 59-66。

【非特許文献20】Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE および Stuhmer W, 1997 ヒトP2X4受容体の組み換え体の特徴づけにより、ラットの相同体との薬理学的差異を明らかにする。Mol. Pharmacol. 51, 109-118。

【非特許文献21】Le KT, Paquet M, Nouel D, Babinski K および Seguela P, 1997 脳システムおよび免疫システム由来の自然に切断されたヒトP2X ATP受容体サブユニットの1次構造および発現。FEBS Lett. 418, 195-199。

【非特許文献22】Urano T, Nisimori H, Han H, Furuhashi T, Kimura Y, Nakamura Y および Tokino T, 1997 p53により制御される新規ヒトP2X受容体遺伝子であるP2XMのクローニング。Cancer Res. 57, 3281-3287。

【非特許文献23】Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA および Antonarakis SE, 1998 ヒトP2X7受容体の遺伝子構造および染色体の位置づけ。Recept. Channels 5, 347-354。

【非特許文献24】Dutton J, Hansen M, Balcar J, Barden J および Bennett MR, 1999 ラット膀胱における神経の静脈瘤様腫瘍に関する平滑筋細胞のP2X受容体群の発達。J. Neurocytol. 28, 3-15。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、前新生物細胞および/または新生物細胞を同定する方法を提供することであり、これにより先行技術の欠点の少なくとも一部を克服または大幅に改善し、あるいは有用な代替法を提供することとなる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概略

P2Yプリン作動性受容体は、アデノシン三リン酸(ATP)と結合する、Gタンパク質共役型組織受容体で、一部のP2Y受容体サブタイプはウリジン三リン酸(UTP)と結合する。哺乳類においてP2Y受容体の発現パターンを前新生物および新生物の診断に使用できることが、驚くことに発見された。

【0010】

哺乳類における前癌および癌のステージは、成長、細胞外マトリックス、代謝因子および神経支配因子の著明な差、ならびに上皮下のカルシウムイオンおよび微小管の増加を伴う。本発明の新規抗体を用いると、P2Y受容体を免疫細胞化学的方法により十分に視覚化することができ、それらが異なる発現パターンで、例えば細胞表面、尿細管および点状に標識されて存在することが示された。これらの発現パターンを用いて癌の発達の異なるステージを同定することができ、すなわち完全に正常な組織に始まり、一例として前立腺の

P 2 Y 受容体の発現が、個々に冒された腺房内の核に最初に現れる前新生物状態を経て進行するという経過を示す。より進行した前新生物状態であってまだ疾患の形態学的徴候が表れていないものにおいて、受容体は核を離れて腺房内の細胞質および側方の膜および基底膜に拡散し、その後上皮細胞の頂端側細胞膜に沈着するが、この沈着は初期癌に伴う形態学的変化に同調して起こる。これらのステージでは明らかに腫瘍と形態学的に定義される領域以上に、事実上全体に及んでいるため、診断は目下の腫瘍領域を直接サンプリングすることに限定されることなく、ある程度距離を置いて腫瘍の存在を検出することができる。

【 0 0 1 1 】

したがって本発明は、前癌症状（例えば過形成）を診断し、癌をステージ分類し、発癌の基礎的な生理学および病因学を調べるための、新たな手段を提供する。 10

第1の側面により本発明は、哺乳類由来の細胞および/または組織のP 2 Y プリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態を診断するための方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

第2の側面により本発明は、哺乳類由来の細胞および/または組織のP 2 Y プリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するための方法を提供する。 20

【 0 0 1 3 】

第3の側面により本発明は、哺乳類由来の細胞および/または組織のP 2 Y プリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における発癌の病因を決定するための方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

好ましくは哺乳類はヒトであるが、当該方法はウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラットおよびマウスを含むあらゆる適切な哺乳類に適用することができる。

好ましくは細胞および/または組織は、前立腺、乳腺または皮膚由来である。しかし当該方法は他の上皮細胞を含む他の細胞のタイプにもまた有用となり得ることを、当業者は理解するだろう。 30

【 0 0 1 5 】

前新生物状態または新生物状態が前立腺の前癌病変または前立腺癌である場合、前立腺細胞または前立腺組織のP 2 Y₂ プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の増加を、先に定義したように、正常な前立腺細胞または前立腺組織の発現プロファイルと比較して、前立腺の前癌病変または前立腺癌の存在を診断する。

【 0 0 1 6 】

前新生物状態または新生物状態が乳腺の前癌病変または乳癌である場合、哺乳類から採取した乳腺細胞および/または乳腺組織のP 2 Y₂ プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の低下を、正常な乳腺由来の乳腺細胞および/または乳腺組織の発現プロファイルと比較して、乳腺の前癌病変または乳癌の存在を診断する。 40

【 0 0 1 7 】

前新生物状態または新生物状態が皮膚の前癌病変または皮膚癌である場合、哺乳類由来の皮膚細胞および/または皮膚組織のP 2 Y₂ プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の低下を、正常な皮膚由来の皮膚細胞および/または組織の発現プロファイルと比較して、皮膚の前癌病変または皮膚癌の存在を診断する。

【 0 0 1 8 】

好ましくは皮膚癌は、悪性黒色腫、扁平上皮癌または基底細胞癌である。したがって本発明により、例えば上述のように皮膚癌の状態を、角化棘細胞腫およびその他の良性病巣、例えば光線性角化症と区別することができる。 50

【0019】

好ましくはP2Y受容体の発現プロファイルは、P2Y₂、P2Y₄および/またはP2Y₆受容体の発現プロファイルであり、より好ましくはP2Y₂受容体の発現プロファイルである。当業者は過度の実験作業をせずに、行おうとする特定の方法にどのP2Yが最適かを確認することができる。一般に正常な細胞または組織と比較して、前新生物または新生物の細胞または組織との発現プロファイルの強度差に最もコントラストのある、これらP2Y受容体が最も望ましい。

【0020】

1つの態様において前新生物状態は、P2Y受容体の発現プロファイルが細胞の核内で変化した初期の前新生物状態である。あるいはもう1つの態様において前新生物状態は進行した前新生物状態であり、この場合P2Y受容体の発現プロファイルは、P2Y受容体が細胞質および/または側方の膜および/または基底膜中に存在するプロファイルを示す。

10

【0021】

もう1つの態様において前新生物状態は、P2Y受容体が上皮細胞の頂端側膜上に存在するというプロファイルを、P2Y受容体の発現プロファイルが示す状態である。

P2Y受容体の発現プロファイルを他のマーカーの発現プロファイルと組み合わせることができることは、当業者には明らかであろう。特にP2Y受容体の発現プロファイルはP2X受容体の発現プロファイル、そして好ましくはP2X₁および/またはP2X₂の発現プロファイルと組み合わせることができる。

【0022】

好ましくはP2Y受容体の発現プロファイルの検出は、免疫組織化学的方法による。しかし細胞または組織のサンプル源および利用できる試薬により、ELISA、RIAまたは類似の免疫学的技術を含むその他の手段でもP2Y受容体を検出できることは、当業者には明らかであろう。好ましくはP2Y受容体は、比色分析、例えばDAB（ジアミノベンジジン）またはLSAB法（標識ストレプトアビジン - ビオチン法）、第二抗体検出キット（Dako）により検出する。

20

【0023】

標準的なウエスタンブロット法および標準的なノーザンブロット法によるP2Yプリン作動性受容体のmRNAの検出もまた、P2Y受容体の発現プロファイルの決定に有用となり得ることは、当業者には明らかであろう。

30

【0024】

第4の側面により本発明はP2Yプリン作動性受容体特異抗体を提供するが、同抗体は前新生物または新生物の細胞および/または組織と、正常な細胞および/または組織とを区別することができるものとする。

【0025】

好ましくは抗体は、P2Y₂受容体、P2Y₄受容体および/またはP2Y₆受容体に特異的である。最も好ましくは抗体は、P2Y₂受容体に特異的である。

P2Y受容体特異抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよいことは、当業者には明らかであろう。P2Y受容体特異抗体を他の抗体、特に1つまたはそれ以上のP2X受容体特異抗体と組み合わせてもよいこともまた、当業者には明らかであろう。P2X受容体特異抗体もまたモノクローナルでもポリクローナルでもよい。好ましい態様においてP2X受容体の抗体は、P2X₁および/またはP2X₂の受容体特異抗体である。

40

【0026】

第5の側面により本発明は、第4の側面による抗体を含む一組の抗体を提供する。

第6の側面により本発明は、前新生物または新生物の細胞および/または組織と、正常な細胞および/または組織とを区別するために使用する場合、第4の側面によるP2Yプリン作動性受容体特異抗体、または第5の側面による一組の抗体を提供する。

【0027】

第7の側面により本発明は、第4の側面によるP2Yプリン作動性受容体特異抗体、または第5の側面による一組の抗体と複合させた、哺乳類の単離細胞または単離組織のサンブ

50

ルを提供する。

【0028】

本発明に使用する細胞および/または組織は生検（特に乳腺組織では例えば細針吸引、）により得ることができるが、体液または、前立腺細胞および/または組織の場合には直腸からの触診による滲出液または精液を含む、その他のあらゆる手段で得ることもできる。

【0029】

本発明の方法およびP2Y受容体特異抗体は、例えば悪性度の検査を含む他のあらゆる相補的な検査と組み合わせて使用できることは、当該技術分野の業者には明らかであろう。悪性度の検査は、ヒトテロメラーゼタンパク質1（hTP₁）に特異的な抗体を使用する抗テロメラーゼ抗体検査、または他のあらゆる適切なアッセイまたは抗テネイシン検査の

10

【0030】

第7の側面により本発明は、P2Yプリン作動性受容体プロファイルを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態を診断するためのキットを提供する。

【0031】

第8の側面により本発明は、P2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するためのキットを提供する。

【0032】

第9の側面により本発明は、P2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、哺乳類における発癌の病因を決定するためのキットを提供する。好ましくはP2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する同手段は、第4の側面による抗体または第5の側面による一組の抗体である。

20

【0033】

好ましくは同キットは、第1から第3の側面のいずれか1つによる方法において使用する。

本発明の内容において、“新生物細胞”および“新生物組織”という用語は通常の意味で解釈されるものとし、新生物細胞または新生物組織の特徴的な性質、例えば過形成および/または肥大の成長パターンおよび、異常な細胞の形およびサイズおよび核のサイズを際

30

【0034】

本発明の内容において、“前新生物細胞”および“前新生物組織”という用語は通常の意味で解釈されるものとし、過形成または肥大し得る細胞または組織を含むが、これに限定されない。しかしこのような細胞または組織は、新生物細胞または新生物組織の特徴的な性質、例えば異常な細胞の形およびサイズおよび核のサイズを際立たせるH&Eによる特徴的な染色は有していない。

【0035】

本発明の内容において、“正常細胞”および“正常組織”という用語は通常の意味で解釈されるものとし、P2Y発現プロファイルが、前新生物または新生物のいずれもない個体由来の細胞で観察されるプロファイルと実質的に変わらない、細胞または組織を含む。本発明の内容において前立腺の症状に関する場合、“正常細胞”という用語は、例えば良性前立腺過形成の前立腺由来の細胞もまた含む。

40

【0036】

本発明の内容において“一組の抗体”という用語は、同一抗原または異なる抗原に特異的な数種の異なる抗体を含み、各受容体のサブタイプを特異的に識別することのできるポリクローナル抗体を含む。抗体がモノクローナルの場合“一組の抗体”という用語は、各受容体 例えばP2YおよびP2X、または受容体のサブタイプ 例えばP2Y₂およびP2Y₄を特異的に識別することのできる一群の抗体もまた含む。

50

【 0 0 3 7 】

本発明の内容において“発現プロフィール”の検出には、発現のパターンまたは強度の検出を含む。

本発明の内容で他に明確な要求がなければ、本説明および本請求項を通して“含む”“含んでいる”等の言葉は、除外または除外的な意味の対局として、包含的な意味；すなわち“含んでいるが限定されない”という意味で解釈されるものとする。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 8 】

発明の説明

本発明は、前新生物細胞および新生物細胞はP2Yプリン作動性受容体を他と区別して発現するという所見に基づいている。したがってこの区別の目安となる発現を用いて、前新生物細胞または新生物細胞を同定することができる。さらにP2Yプリン作動性受容体は、前新生物および新生物の異なるステージの細胞内では異なって分配されるため、P2Yプリン作動性受容体の発現プロフィールを用いて、前新生物状態および新生物状態のステージを分類することができる。P2Yの異なる発現パターンを用いて、発癌の病因の決定することもできる。さらに本発明は、P2Yプリン作動性受容体の発現プロフィールを検出する手段を含む、前新生物状態および/または新生物状態を診断するためのキット；P2Yプリン作動性受容体の発現プロフィールを検出する手段を含む、前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するためのキット；およびP2Yプリン作動性受容体の発現プロフィールを検出する手段を含む、発癌の病因を決定するためのキットを含む。

【 0 0 3 9 】

本発明の好ましい態様をあくまで一例としてここに記述することにする。

【実施例1】

【 0 0 4 0 】

実施例1 - 抗体の作成

クローニングされたヒトP2Y₂ [非特許文献12]、ヒトP2Y₄ [非特許文献13]、およびヒトP2Y₆ [非特許文献14]受容体のコンセンサス配列について、Hansenら [非特許文献15]の行ったアプローチに従って適切なエピトープを検討した。P2Y₂のセグメントLeu226-Lys242に相応する非相同性のエピトープを、P2Y₄(Arg226-Arg242) およびP2Y₆(Cys220-Lys236)のこれに当たる配列と共に使用した。P2Y₂およびP2Y₄のエピトープにはN末端にCysを付加して、マレイミドカプロイル-N-ヒドロキシスクシンイミドの架橋物質を介して、各々にジフテリアトキソイドを結合させた。すべての合成はABI合成機にて標準的なt-BOC法を用いて行った [非特許文献16]。ペプチド-抗原結合体を水に5mg/mLで懸濁させ、分注して完全フロインドアジュバントと共に混合することにより乳化させた。2mgペプチドを含む1mL量のエマルジョンを筋注し、その後2週間隔で不完全フロインドアジュバントを用いて、2回、3回、4回および5回の免疫感作を続けて行った。各エピトープに対して使用したウサギまたはヒツジに適当な抗体価が得られたことが確立された後、静脈穿刺による最終採血を10-12週に行った。血液を37℃で30分間インキュベーションして4℃で15時間保存し、その後遠心して血清を分離し、少量ずつ分注して-20℃に保存した。各ペプチドに特異的な抗体についてELISA法により血清の検査を行った。ELISA法で吸光度がバックグラウンドより1.0高くなる血清希釈倍数の逆数と定義された抗体価は、免疫前サンプルの225±25に比して75, 000±4, 000の範囲であった。各抗体は特定のサブタイプに対して特異的であることが認められた。

【 0 0 4 1 】

この抗体に特異的なエピトープに対して各抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、同じ標識傾向を示しているにもかかわらずバックグラウンドを低下することができた。マウスの同じP2Y₂エピトープに対して作成されたモノクローナル抗体でも、同じ結果が得られた。

【実施例 2】

【0042】

実施例 2 - 免疫組織化学的方法

8 μ m 厚の切片を、固定していない凍結組織から Reichert Jung 2800 Frigocut クリオトームにて作成するか、あるいはまたパラフィン包埋した組織から切片を作成した。切片は室温で 1 時間空気乾燥し、アセトン中で -20 で 12 時間固定し、抗体標識前に 1 時間室温で空気乾燥した。これを次に抗 P2Y₂ のモノクローナルのマウス、ウサギまたはヒツジのいずれかの第一抗体と共に室温にてインキュベーションした。洗浄後、次に切片を第二抗体中で 30 分間インキュベーションした：第二抗体はマウスの第一抗体に対しては HRP 標識ヤギ抗マウス第二抗体 (Dako)、ウサギの 1 次抗体に対しては HRP 標識抗ウサギ第二抗体、または HRP 標識ヤギ抗ヒツジ第二抗体の 1 : 30 希釈液とした。スライドガラスを再度洗浄し、次に 15% ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド (DAB-Sigma) に 10 分間浸した。切片を洗浄し、空気乾燥して DPX (Merk) にのせて標本とした。コントロールのスライドガラスは、最初のインキュベーション時に希釈液中でインキュベーションした後、実験のスライドガラスと同じ方法で処理した。ネガティブコントロールスライドガラスは、第一抗体を非免疫血清に置き換えた以外は、実験のスライドガラスと同じ方法で処理した。

10

【0043】

すべての抗体に対して個々の特異性を示された。

【実施例 3】

【0044】

実施例 3 - ヒト癌組織 (前立腺) における P2Y 受容体

正常 40 例およびヒト前立腺癌の 40 症例の研究において、P2Y₂ サブタイプはヒト前立腺癌組織中で著明に増加していた。正常組織/良性前立腺過形成では標識は観察されなかった。癌組織の P2Y₂ の標識パターンは特に有益で、前立腺疾患の各ステージに伴って標識された腺房上皮細胞の比率が増加し、新生物の変化と P2Y₂ の腺房の標識領域との直接の相関を示した。標識は核内に始まり (ステージ 1 ; 図 1)、核外または細胞質に点在する標識へと進行し (ステージ 2 ; 図 2)、そしてステージ 3 ではまた形態学的な変化も伴うさらに進んだ症例では上皮細胞頂端側および側方への沈着へと進行する (ステージ 3 ; 図 3)。

20

30

【0045】

P2Y および P2X の受容体の抗体の組み合わせ

P2X はイオン、特にカルシウムイオンに対して細胞を開口する、すばやく作用するリガンド (ATP) 開閉イオンチャンネルである。P2Y 受容体は、ATP または UTP または ADP さえにもよる活性化後、G タンパク質共役型の活性化カスケードを引き起こすことで細胞内カルシウム貯留に作用する、ずっと緩やかに作用する代謝型受容体であり、したがってその機能は P2X 受容体とは全く異なる。

【0046】

P2X 受容体の抗体を P2Y 受容体の抗体と組み合わせて使用したところ、P2Y 受容体の抗体単独で使用した場合と類似のパターンが得られた。特に P2Y₂ 受容体サブタイプの抗体を、P2X₁ および P2X₂ 受容体サブタイプのいずれか一方または双方の抗体と共に使用しての前立腺細胞/組織の標識は、P2Y₂ 受容体の抗体を単独に使用して得られた結果を増幅した。

40

【0047】

P2X 抗体は以下のように作成した：

ヒト P2X₁ [非特許文献 17]、ヒト P2X₂ [非特許文献 18]、ヒト P2X₃ [非特許文献 19]、ヒト P2X₄ [非特許文献 20]、ヒト P2X₅ [非特許文献 21]、ヒト P2X₆ [非特許文献 22] およびヒト P2X₇ [非特許文献 23] のコンセンサス配列について、ラット抗体 [非特許文献 15, 24] に用いたアプローチに従って適切なエピトープを検討した。N 末端に Cys を付加した P2X₁ ではセグメント Lys68-Val184 に相応す

50

る非相同性エピトープを使用した。P 2 X₂からはHis209-Cys226を選択した。P 2 X₃からはAsn185-Cys203を選択した。P 2 X₄からはCys270--Glu285を選択した。P 2 X₅からはCys272-Ser288を選択した。P 2 X₆からはAsn200-Cys218を選択した。P 2 X₇からはC末端にCysを付加したVal165-Lys81を選択した。ジフテリアトキシンに架橋するためマレイミドカプロイル - N - ヒドロキシスクシンイミドを介して、すべてのエピトープをジフテリアトキシンに結合させた。抗体はウサギおよびヒツジで作製し、P 2 Y抗体について上述のように精製した。

【0048】

図4は、P 2 Y₂抗体、P 2 X₁抗体およびP 2 X₂抗体を組み合わせて使用した、ステージ3の症例（明らかな癌）の前立腺組織の標識を示す。

10

その他のP 2 Xサブタイプ、例えばP 2 X₃およびP 2 X₇を使用しても、前立腺サンプルでは同様の結果が得られた。

【実施例4】

【0049】

実施例4 - ヒト癌組織（乳癌および皮膚癌）におけるP 2 Y受容体

その他の癌、例えば乳癌（単一病巣および複数病巣）および悪性黒色腫を含む皮膚癌では、標識パターンが逆転した。これらの組織において、P 2 Y₂抗体による正常細胞の標識は濃く表れる（正常組織におけるP 2 Y₂の発現が比較的高いことを意味する）が、癌組織ではP 2 Y₂抗体の標識は観察されなかった。P 2 X受容体の抗体、特にP 2 X₁およびP 2 X₂サブタイプの抗体をP 2 Y₂受容体の抗体と組み合わせて使用することにより結果は増幅された（図5から10）。

20

【実施例5】

【0050】

実施例5 - P 2 Y受容体の抗体による診断と他の検査との併用

上述のP 2 Y（およびP 2 X）受容体の抗体による診断を相補的な検査と併用することができることは明らかである。このような検査は癌の性質に関するさらなる情報を提供することができ、例えば悪性に関する検査、例えば抗テロメラゼ抗体検査、および/または抗テネイシン検査は治療方針を考える上で有用となり得る。

【0051】

本発明を具体的な実施例を参照して述べたが、本発明を多くの他の形で提示できることは当該技術分野の技術者により理解されるだろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】前新生物の第1のステージである、P 2 Y₂抗体にて標識された顕著な（prominent）上皮細胞核を示す。

【図2】今度は標識が点状のパターン（矢印）を形成し核内は染色されていないが、一方癌の形態学的エビデンスはまだ表れていない、前新生物の典型的なステージ2の染色を示す。

【図3】染色は、進行癌に伴う形態学的変化のエビデンスを示す組織において、上皮細胞の頂端側（矢印）にP 2 Y₂が集まっていることを示す。

40

【図4】ステージ3の症例（明らかな癌）由来の前立腺組織の、P 2 Y₂抗体、P 2 X₁抗体およびP 2 X₂抗体を組み合わせた標識を示す。

【図5】P 2 Y₂、P 2 X₁およびP 2 X₂抗体を組み合わせて標識した、非癌性乳腺組織（線維腺腫）を示す。標識を組み合わせることにより、標識強度のわずかな改善が観察される。

【図6】極めて類似する染色を示すP 2 Y₂の標識による非癌性線維腺腫の類似の一連の切片を示す。

【図7】P 2 Y₂、P 2 X₁およびP 2 X₂抗体を組み合わせて標識した乳癌組織を示す。癌組織は標識されていない。

【図8】陽性染色と極めて類似する欠如部分を示す、P 2 Y₂で標識された乳癌組織を示す

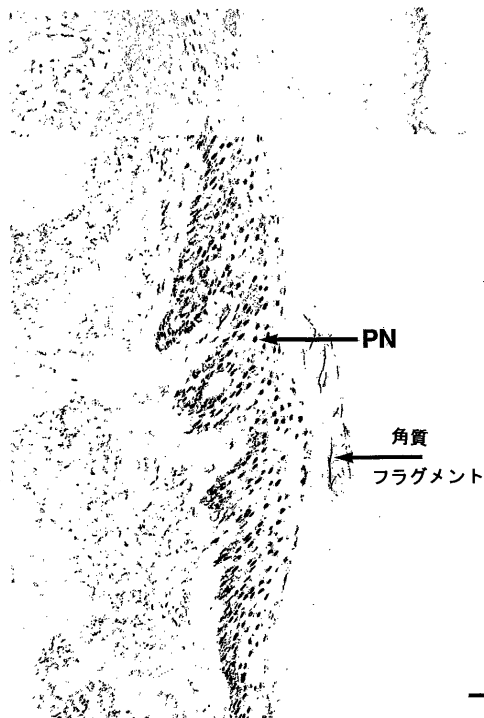
50

す。

【図 9】 顕著な核 (prominent nuclei: P N) の標識を伴う、P 2 Y₂ 抗体で標識された正常な皮膚の良性病巣生検例を示す。

【図 10】 P 2 Y₂ 抗体で標識された悪性黒色腫の生検切片を示し、正常なサンプルで視覚化されていたすべての標識が黒色腫では欠如している。正常な標識は黒色腫から 2 m m 以内に認められる。上で使用した抗体の組み合わせでも等しい結果が得られる。

【図 9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/48395 A1

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/574 (74) Agent: BALDWIN SHELSTON WATERS; 60 Margaret Street, Sydney, NSW 2000 (AU).
- (21) International Application Number: PCT/AU01/01614 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 11 December 2001 (11.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: FR 2015 11 December 2000 (11.12.2000) AU (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOSCEPTRE PTY LTD [AU/AU]; Level 10, 26 O'Connell Street, Sydney, NSW 2000 (AU).

Published:

— with international search report

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BARDEN, Julian [AU/AU]; 48 Mawarra Crescent, Marsfield, NSW 2122 (AU), SLATER, Michael [AU/AU]; Flat 3/511 Burwood Road, Belmore, NSW 2192 (AU).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/48395 A1

(54) Title: P2Y PURINERGIC RECEPTOR EXPRESSION FOR IDENTIFYING PRENEOPLASTIC AND NEOPLASTIC STATES

(57) Abstract: The present invention relates to methods for identifying pre-neoplastic and neoplastic states in mammals and in particular to a method for identifying pre-neoplasia and neoplasia in cells and tissues based on differential expression of P2Y purinergic receptors.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 1 -

P2Y purinergic receptor expression for identifying preneoplastic and neoplastic states**TECHNICAL FIELD**

The present invention relates to methods for identifying pre-neoplastic and
5 neoplastic states in mammals and in particular to a method for identifying pre-neoplasia
and neoplasia in cells and tissues based on differential expression of P2Y purinergic
receptors.

BACKGROUND

When diagnosing cancer, cellular features in biopsy samples are taken into account
10 such as the degree of variability of cancer cell size and shape, the proportion of actively
dividing cells and invasion into neighbouring structures. Commonly used histological
stains are haematoxylin (primary stain) and eosin (counterstain) which differentially
label subcellular elements. Other diagnostic methods employ antibodies to particular
15 diagnostic molecules within (via intracellular epitopes) or on the surface of cells or
tissues (via extracellular epitopes) which can be made visible for microscopic analysis
eg, carcino-embryonic antigen (CEA). Some specific examples are discussed below.

Prostate Cancer

The incidence of prostate cancer in the Western world is increasing at an alarming
rate, having more than doubled in the past five years. It has the highest incidence of any
20 neoplasm, is second only to lung cancer as the most common cause of cancer death in
men worldwide, and is the leading cause of cancer death in Australia [1]. Benign
prostatic hyperplasia (BPH) is common in men over 50 and is a possible precursor of
prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), itself a precursor to prostate cancer.
Postmortem studies indicate that 70% of men have malignant cells in their prostate by
25 the time they reach 80 [2].

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 2 -

Despite the gravity of this condition, diagnostic methods are few and imprecise. Current methods for assessing prognosis, such as digital rectal examination (DRE), ultrasound, prostatic acid phosphatase levels, androgen ablation, prostate specific antigen (PSA) density, PSA velocity, PSA age-specific reference ranges and Gleason

5 histopathological grading, can fail to provide reliable predictive information regarding the clinical outcome of prostate cancer [3]. For instance, studies have shown that DRE results in a 36.9% false negative rate [4]. PSA is a 33-kDa serine protease that is associated with a number of tissues besides prostate [5], is up-regulated by androgens, glucocorticoids and progestins and is thought to be involved in the regulation of growth

10 factors. Unfortunately, serum PSA levels have an incidence of 23% false negative and 36.7% false positive diagnoses [5]. It has even been suggested that more than half of new screen-detected cases are in fact false positives [6]. Attempts to improve screening methods by the introduction of additional tests such as PSA density, velocity, and age-specific reference ranges has been equivocal. One study has shown that applying an age-

15 specific PSA reference range that increases the upper limit of normal PSA to 4.5 ng/mL results in the failure to detect a substantial number of clinically significant cancers [7]. Given this uncertainty, prostate biopsy is often performed to confirm malignancy but this test also has a highly unsatisfactory 23% incidence of false-negative diagnosis [8], caused by the failure to directly sample the site of neoplastic change.

20 Treatment selection is largely dependent on clinical staging based on microscopic analysis of tissue sections [9]. This technique depends on judgment and considerable experience in relating histological appearance to clinical outcome. Unfortunately, prostate cancer tissue is notoriously heterogeneous and a vital diagnostic feature may easily be missed in the section being examined. To further complicate the situation,

25 there have been no randomised and controlled trials to examine the outcomes of surgery

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 3 -

and radiotherapy [2]. Treatment choices include radical prostatectomy, radiation therapy, androgen deprivation and "watchful waiting". A definitive answer to the question of "watchful waiting" versus radical intervention awaits the conclusion of the prostate cancer intervention-versus-observation trial [10]. The consequences to the patient of these decisions are serious. Radical prostatectomy for instance, often results in incontinence, impotence, bladder neck stricture, pain and depression [11].

In the case of other cancers such as breast or skin, samples can be misdiagnosed for several reasons. In the case of breast tumours, the borders of a localised tumour may not be well defined and similarly in the case of skin cancers, the borders between histologically obvious cancer (as determined with H&E stain) and normal tissue are variable. Either more or less normal tissue is excised around these tumours than is desirable.

It is an object of the present invention to provide a method of identifying pre-neoplastic and/or neoplastic cells which will overcome or substantially ameliorate at least some of the deficiencies of the prior art or will provide a useful alternative.

SUMMARY OF THE INVENTION

P2Y purinergic receptors are G-protein coupled tissue receptors which bind adenosine triphosphate (ATP) and, in the case of some P2Y receptor subtypes, uridine triphosphate (UTP). It has surprisingly been found that the expression pattern of P2Y receptors can be used to diagnose pre-neoplasia and neoplasia in mammals.

Pre-cancer and cancer stages in mammals are accompanied by marked differences in growth, extracellular matrix, metabolic and innervation factors as well as increases in subepithelial ionic calcium and microtubules. Using the novel antibodies of the present invention, the P2Y receptors can be readily visualised with immunocytochemical methods and it has been shown that they present in a variety of expression patterns such

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 4 -

as cell surface, tubular and punctate labelling. These expression patterns can be used to identify the different stages in cancer development, commencing with entirely normal tissue and progressing through preneoplasia where P2Y receptor expression in the prostate as an example first appears in the nuclei within individual affected acini. In
5 more advanced preneoplasia, but where there are still no morphological signs of disease, the receptors leave the nuclei and spread into the cytoplasm and lateral and basal membranes within the acini prior to deposition on the apical membrane of the epithelial cells, an event occurring in synchrony with the morphological changes accompanying early cancer. Since these stages are more global in nature than the morphologically
10 defined areas of obvious tumour, the diagnostic is not confined to direct sampling of the area of immediate tumour but can detect the tumour presence at some distance.

The invention therefore provides a new tool with which to diagnose pre-cancerous conditions (such as hyperplasia), to stage cancer and to investigate the basic physiology and aetiology of carcinogenesis.

15 According to a first aspect, the invention provides a method for diagnosing a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal, comprising detection of the P2Y purinergic receptor expression profile of a cell and/or tissue from said mammal and comparison of the profile with a predetermined expression profile of a normal cell and/or tissue.

20 According to a second aspect, the invention provides a method for staging a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal, comprising detection of the P2Y purinergic receptor expression profile of a cell and/or tissue from said mammal and comparison of the profile with a predetermined expression profile of a normal cell and/or tissue.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 5 -

According to a third aspect, the invention provides a method of determining the aetiology of carcinogenesis in a mammal, comprising detection of the P2Y purinergic receptor expression profile of a cell and/or tissue from the mammal and comparison of the profile with a predetermined expression profile of a normal cell and/or tissue.

5 Preferably, the mammal is a human but the method may be applied to any suitable mammal including a horse, a bovine animal, a sheep, a dog, a cat, a rat and a mouse.

Preferably, the cell and/or tissue is from a prostate, breast or skin. However, the skilled addressee will recognise that the method may also be useful for other cells types including other epithelial cells.

10 When the pre-neoplastic or neoplastic state is prostate pre-cancer or prostate cancer, an increase in the intensity of the P2Y₂ purinergic receptor expression profile in a prostate cell or prostate tissue, compared to the expression profile of a normal prostate cell or tissue, as herein defined, is diagnostic of the presence of prostate pre-cancer or prostate cancer.

15 When the pre-neoplastic or neoplastic state is breast pre-cancer or breast cancer, a decrease in the intensity of the P2Y₂ purinergic receptor expression profile in a breast cell and/or breast tissue obtained from the mammal compared to the expression profile of a breast cell and/or breast tissue from a normal breast, is diagnostic of the presence of breast pre-cancer or breast cancer.

20 When the pre-neoplastic or neoplastic state is skin pre-cancer or skin cancer, a decrease in the intensity of the P2Y₂ purinergic receptor expression profile in a skin cell and/or tissue from the mammal compared to the expression profile of a skin cell and/or tissue from normal skin, is diagnostic of the presence of skin pre-cancer or skin cancer.

Preferably, the skin cancer is malignant melanoma, squamous cell carcinoma or
25 basal cell carcinoma. Thus, in accordance with the present invention, it is possible to

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 6 -

differentiate skin cancer states, such as those mentioned, from keratoacanthoma and other benign lesions such as actinic keratoses.

Preferably, the P2Y receptor expression profile is the P2Y₂, P2Y₄ and/or P2Y₆ receptor expression profile and more preferably, it is the P2Y₃ receptor expression profile. The skilled addressee, without undue experimentation, can ascertain which P2Y receptors are most suitable for the particular method being practiced. Generally, those P2Y receptors which give the best contrast in terms of the difference in the intensity of expression profile between pre-neoplastic or neoplastic cells or tissues compared to normal cells or tissues are the most desirable.

10 In one embodiment, the pre-neoplastic state is an early pre-neoplastic state in which the P2Y receptor expression profile is altered in the nucleus of the cell. Alternatively, in another embodiment, the pre-neoplastic state is an advanced pre-neoplastic state in which the P2Y receptor expression profile is a profile in which the P2Y receptors are in the cytoplasm and/or lateral membranes and/or basal membranes.

15 In another embodiment, the neoplastic state is a state in which the P2Y receptor expression profile is a profile wherein the P2Y receptors are on the apical membrane of an epithelial cell.

It will be clear to the skilled addressee that the P2Y receptor expression profile can be combined with the expression profile of other markers. In particular, the P2Y receptor expression profile can be combined with a P2X receptor expression profile and preferably, with the expression profile of P2X₁ and/or P2X₂.

Preferably, detection of the P2Y receptor expression profile is by immunohistochemical means. However, it will be clear to the skilled addressee that the P2Y receptors may be detected by other means including ELISA, RIA or similar immunological techniques, depending on the source of the cell or tissue sample and the

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 7 -

reagents available. Preferably, the P2Y receptors are detected by a colorimetric assay such as DAB (diaminobenzidine) or the LSAB (labelled streptavidin biotin technique) secondary antibody detection kit (Dako).

It will be clear to those skilled in the art that standard Western blotting techniques and standard Northern detection of P2Y purinergic receptor mRNA may also be useful in determining the P2Y receptor expression profile.

According to a fourth aspect, the invention provides a P2Y purinergic receptor-specific antibody, wherein the antibody is capable of differentiating between pre-neoplastic or neoplastic cells and/or tissue and normal cells and/or tissue.

Preferably, the antibody is specific for P2Y₂, P2Y₄ and/or P2Y₆ receptors. Most preferably, the antibody is specific for P2Y₂ receptors.

It will be clear to those skilled in the art the P2Y receptor-specific antibodies may be polyclonal or monoclonal. It will also be clear to those skilled in the art that the P2Y receptor-specific antibody may be combined with other antibodies and, in particular, with one or more P2X receptor-specific antibodies. The P2X receptor-specific antibody may also be monoclonal or polyclonal. In a preferred embodiment, the P2X receptor antibody is a P2X₁ and/or P2X₂ receptor-specific antibody.

According to a fifth aspect, the present invention provides a suite of antibodies comprising antibodies according to the fourth aspect.

According to a sixth aspect, the invention provides a P2Y purinergic receptor-specific antibody according to the fourth aspect or a suite of antibodies according to the fifth aspect when used to differentiate between pre-neoplastic or neoplastic cells and/or tissue and normal cells and/or tissue.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 8 -

According to a seventh aspect, the invention provides an isolated mammalian cell or tissue sample complexed with a P2Y purinergic receptor-specific antibody according to the fourth aspect or a suite of antibodies according to the fifth aspect.

5 The cells and/or tissue for use in the invention may be obtained by biopsy (for example, by fine needle aspirate, especially from breast tissue) but may also be obtained by any other means including from a body fluid or, in the case of prostate cells and/or tissue, from digital rectal examination exudate or from semen.

10 It will be clear to the person skilled in the art that the methods and P2Y receptor-specific antibodies of the present invention may be used in combination with any other complementary test including, for example, a test for malignancy. The test for malignancy may be an anti-telomerase antibody test using a specific antibody against human telomerase protein 1 (hTP₁) or any other suitable assay or test such as an anti-tenascin test.

15 According to a seventh aspect, the invention provides a kit for diagnosing a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile.

According to an eighth aspect, the present invention provides a kit for staging a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile.

20 According to a ninth aspect, the present invention provides a kit for determining the aetiology of carcinogenesis in a mammal comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile.

25 Preferably, the means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile is an antibody according to the fourth aspect or a suite of antibodies according to the fifth aspect.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 9 -

Preferably, the kit is used in a method according to any one of the first to third aspects.

In the context of the present invention, the term "neoplastic cell" and "neoplastic tissue" are to be construed in their ordinary sense and include, but are not limited to, a
5 cell or tissue which has the characteristic feature of a neoplastic cell or tissue such as, for example, hyperplasia and/or a hypertrophic growth pattern and the characteristic staining with haematoxylin and eosin stain (ie. H&E) that highlights abnormal cell shape and size and nucleus size

In the context of the present invention, the terms "pre-neoplastic cell" and "pre-neoplastic tissue" are to be construed in their ordinary sense and include, but are not
10 limited to, a cell or tissue that may be hyperplastic or hypertrophic. Such a cell or tissue, however, does not have the characteristic features of a neoplastic cell or tissue such as, for example, the characteristic staining with H&E that highlights abnormal cell shape and size and nucleus size.

In the context of the present invention, the terms "normal cell" and "normal tissue" are to be construed in their ordinary sense and include a cell or tissue in which the P2Y expression profile is not substantially altered from the profile that would be observed in
15 the cells from an individual having neither pre-neoplasia nor neoplasia. In the context of the present invention as it relates to conditions of the prostate, the term "normal cell" also includes, for example, a cell from a prostate having benign prostate hyperplasia.

In the context of the present invention the term "suite of antibodies" comprises polyclonal antibodies which contain several different antibodies specific for the same or different antigens and which are able to specifically differentiate between each of the
20 receptor subtypes. When the antibodies are monoclonal, the term "suite of antibodies"

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 10 -

also comprises a panel of antibodies able to specifically differentiate between each of the receptors e.g. P2Y and P2X or the receptor subtypes e.g. P2Y₂ and P2Y₄.

In the context of the present invention, detection of an "expression profile" comprises detection of a pattern or intensity of expression.

- 5 Unless the context clearly requires otherwise, throughout the description and the claims, the words 'comprise', 'comprising', and the like are to be construed in an inclusive sense as opposed to an exclusive or exhaustive sense; that is to say, in the sense of "including, but not limited to".

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

- 10 Fig 1 shows prominent epithelial nuclei labelled with P2Y₂ antibody, the first stage of preneoplasia.
- Fig 2 shows typical stage 2 staining of preneoplasia where the label now forms a punctate pattern (arrow) with no stain in the nuclei but equally with no morphological
- 15 evidence yet of cancer.
- Fig 3 staining shows that P2Y₂ collects on the apical epithelium (arrow) in tissue showing evidence of morphological change associated with advanced cancer.
- Fig. 4 shows a combination of P2Y₂, P2X₁ and P2X₂ antibody labelling of prostate tissue from a stage 3 case (obvious cancer).
- 20 Fig 5 shows non-cancerous breast tissue (fibroadenoma) labelled with a combination of P2Y₂, P2X₁ and P2X₂ antibodies. A small improvement in label intensity is observed with the mixture of labels.
- Fig 6 shows a similar serial section of non-cancerous fibroadenoma labelled with P2Y₂ showing closely similar staining.
- 25 Fig 7 shows cancerous breast tissue labelled with a combination of P2Y₂, P2X₁ and P2X₂ antibodies. The cancer tissue is devoid of label.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 11 -

Fig 8 shows breast cancer tissue labelled with P2Y₂ showing closely similar loss of positive staining.

Fig 9 shows an example of a biopsy of a benign lesion in normal skin labelled with P2Y₂ antibody with prominent nuclei (PN) labelled.

- 5 Fig 10 shows a biopsy section of malignant melanoma labelled with P2Y₂ antibody in which all the label that had been visible in the normal samples is lost in the melanoma. Normal label is regained within 2 mm of the melanoma. Combinations of antibodies used above yield identical results.

10 **DESCRIPTION OF THE INVENTION**

- The present invention is based on the finding that pre-neoplastic and-neoplastic cells differentially express P2Y purinergic receptors. This differential expression can therefore be used to identify pre-neoplastic or neoplastic cells. Further, because the P2Y purinergic receptors are distributed differently in cells at different stages of pre-neoplasia and neoplasia, the expression profile of the P2Y purinergic receptors can be used to stage pre-neoplastic and neoplastic states. The differential expression patterns of P2Y can also be used to determine the aetiology of carcinogenesis. Further, the invention includes a kit for diagnosing a pre-neoplastic and/or neoplastic state comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile; a kit for staging a pre-neoplastic and/or neoplastic state comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile; and a kit for determining the aetiology of carcinogenesis comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile.
- 15
20
25

Preferred embodiments of the invention will now be described by way of example only.

Example 1 - Antibody Production

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 12 -

The consensus sequences of the human P2Y₂ [12], human P2Y₄ [13], and human P2Y₆ [14] cloned receptors were examined for suitable epitopes following the approach adopted in Hansen et al. [15]. The non-homologous epitope corresponding to the segment Leu226-Lys242 in P2Y₂ was used, with the comparable sequences in P2Y₄ (Arg226-Arg242) and P2Y₆ (Cys220-Lys236). Each was attached to diphtheria toxoid via maleimidocaproyl-N-hydroxysuccinimide crosslinker through adding an N-terminal Cys to P2Y₂ and P2Y₄ epitopes. All syntheses were carried out using standard t-BOC chemistry on an ABI synthesiser [16]. The peptide-antigen conjugates were suspended in water at 5 mg/mL and aliquots emulsified by mixing with Complete Freund's Adjuvant. Emulsion volumes of 1 mL containing 2 mg of peptide were injected intramuscularly with second, third, fourth and fifth immunisations followed at 2 week intervals using Incomplete Freund's Adjuvant. Final bleeds via venepuncture were obtained at 10-12 weeks, after it was established that adequate antibody titres had been obtained in the rabbits or sheep used for each epitope. The blood was incubated at 37°C for 30 min, and stored at 4°C for 15 h after which the serum was collected following centrifugation and stored at -20°C in small aliquots. Sera were tested with an ELISA assay for antibodies specific for each peptide. The antibody titre, defined as the reciprocal of the serum dilution resulting in an absorbance of 1.0 above background in the ELISA assay, was in the range 75,000 ± 4,000 compared with 225 ± 25 for the pre-immune samples. Each antibody was found to be specific against the particular subtype.

Affinity purification of each of the antibodies against the specific epitope for that antibody resulted in reduced background but identical labelling trends. A monoclonal antibody raised against the same P2Y₂ epitope in mice yielded the same results.

25 **Example 2 - Immunohistochemical Procedure**

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 13 -

Sections with a thickness of 8 μm were cut from unfixed, frozen tissue using a Reichert Jung 2800 Frigocut cryotome or else were sectioned from paraffin-embedded tissue. Sections were air dried at room temperature for 1 hour, fixed for 12 hours in acetone at -20°C and air dried at room temperature for 1 hour prior to antibody labelling.

- 5 They were then incubated at room temperature with either a monoclonal mouse, rabbit or sheep anti-P2Y₂ primary antibody. After washing, sections were then incubated for 30 min in the secondary antibody: a 1:30 dilution of HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Dako) for mouse primary, HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody for rabbit primary, or HRP-conjugated goat anti-sheep secondary antibody.
- 10 Slides were again rinsed and then immersed in 15% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB - Sigma) for 10 minutes. Sections were rinsed, air dried and mounted in DPX (Merck). Control slides were incubated in diluent buffer during the first incubation and then treated in the same manner as the experimental slides. Negative control slides were treated in the same manner as the experimental slides except that the
- 15 primary antibody was replaced with non-immune serum.

Individual specificity of all antibodies was demonstrated.

Example 3 – P2Y receptors in human cancer tissue (prostate)

- In a study of 40 normal and 40 human prostate cancer cases, P2Y₂ subtypes were markedly increased in human prostate cancer tissue. There was no observable labelling
- 20 of normal tissue/benign prostatic hyperplasia. The labelling pattern for P2Y₂ in the cancerous tissue was particularly informative in that there was a greater proportion of labelled acinar epithelial cells with each stage of prostate disease, showing a direct correlation between neoplastic transformation and the extent of P2Y₂ acinar labelling commencing with the nuclei (stage 1; Figure 1), progressing to extra-nuclear or
- 25 cytoplasmic punctate labelling (stage 2; Figure 2) and progressing to deposition on the

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 14 -

apical epithelium and lateral epithelium (stage 3; Figure 3) in advanced cases where stage 3 is also accompanied by changes in morphology.

Combination of P2Y and P2X receptor antibodies

5 P2X are fast acting ligand (ATP)-gated ion channels that open the cell to ions, particularly calcium. P2Y receptors are much slower acting metabotropic receptors that act on internal cellular calcium stores following activation by ATP or UTP or even ADP by triggering a G-protein coupled cascade of activity and so function entirely differently to P2X receptors.

10 When P2X receptor antibodies were used in combination with P2Y receptor antibodies, a similar pattern to that described using P2Y receptor antibodies alone was obtained. In particular, labelling of prostate cells/tissues using antibodies against P2Y₂ and either or both P2X₁ and P2X₂ receptor subtypes enhanced results obtained using antibodies against the P2Y₂ receptor alone.

15 P2X antibodies were produced as follows:

The consensus sequences of the human P2X₁ [17], human P2X₂ [18], human P2X₃ [19], human P2X₄ [20], human P2X₅ [21], human P2X₆ [22] and human P2X₇ [23] were examined for suitable epitopes following the approach used for the rat antibodies [15, 24]. The non-homologous epitopes corresponding to the segment Lys68-Val84 used in P2X₁ with an added N-terminal Cys. His209-Cys226 was selected from P2X₂. Asn185-Cys203 was selected in P2X₃. Cys270-Glu285 was selected from P2X₄. Cys272-Ser288 was selected from P2X₅. Asn200-Cys218 was selected from P2X₆. Val65-Lys81 to which was added a C-terminal Cys was selected from P2X₇. All epitopes were conjugated to diphtheria toxin via maleimidocaproyl-N-hydroxysuccinimide for

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 15 -

crosslinking to diphtheria toxin. Antibodies were raised in rabbits and sheep and purified as described above for the P2Y antibodies.

Figure 4 shows the use of a combination of P2Y₂, P2X₁ and P2X₂ antibody labelling of prostate tissue from a stage 3 case (obvious cancer).

5 The use of other P2X subtypes such as P2X₃ and P2X₇ yielded similar results in prostate samples.

Example 4 – P2Y receptors in human cancer tissue (breast and skin)

The labelling patterns were reversed in other cancers such as breast cancers (single
10 and multi-foci) and skin cancers including malignant melanoma. In these tissues, P2Y₂ antibody labelling of normal tissue was intense (implying that the expression of P2Y₂ in normal tissue was relatively high) but P2Y₂ antibody labelling was not observed in cancer tissue. Results were enhanced by the use of antibodies against P2X receptors in combination with antibodies against P2Y₂ receptor, in particular antibodies against P2X₁,
15 and P2X₂ subtypes (Figures 5 to 10).

Example 5 - Combining P2Y receptor antibody diagnosis with other tests

It is clear that the P2Y (and P2X) receptor antibody diagnosis described above can be combined with complementary tests. Such tests may provide further information as
20 to the nature of the cancer eg. a test for malignancy such as the anti-telomerase antibody test, and/or anti-tenascin may be useful in devising treatment regimes.

Although the invention has been described with reference to specific examples, it will be appreciated by those skilled in the art that the invention may be embodied in many other forms.

25

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 16 -

References

1. Lian FR, Bhuiyan M, Li YW, Wall N, Kraut M, and Sarkar FH, 1998 Genistein-Induced G(2)-M Arrest, P21(Waf1) Upregulation, and Apoptosis in a Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line. *Nutr. & Cancer*. 31:184-191.
2. Hoey J, 1998 Prostate cancer: progress and perplexity. *CMAJ* 159:1-3.
3. Festuccia C, Vincentini C, di Pasquale AB, Aceto G, Zazzeroni F, Miano L, and Bologna M, 1995 Plasminogen activator activities in short-term tissue cultures of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Oncol. Res.* 7:131-138.
4. Saxena S, Mohanty NK, and Jain AK, 1997 Screening of prostate cancer in males with prostatism. *Ind. J. Pathol. Micro.* 40:441-450.
5. Diamandis EP and Yu H, 1997 Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol. Clin. Nth. Am.* 24:275-282.
6. Weyler J, 1999 Prostate cancer: screening or watchful waiting? *Ann. Oncol.* 9:9-11.
7. Bassler TJ, Orozco R, Bassler JC, Odowd GJ, and Stamey TA, 1998 Most Prostate Cancers Missed By Raising the Upper Limit of Normal Prostate-Specific Antigen For Men in Their Sixties Are Clinically Significant. *Urol.* 52:1064-1069.
8. Rabbani F, Stroubakis N, Kava BR, Cookson MS, and Fair WR, 1998 Incidence and clinical significance of false-negative sextant prostate biopsies. *J. Urol.* 159:1247-1250.
9. Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE, and Honn KV, 1997 Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate* 31:264-281.
10. Small EJ, 1997 Prostate cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 9:277-286.
11. Moul JW, Mooneyhan RM, Kao TC, McLeod DG, and Cruess DF, 1998 Preoperative and Operative Factors to Predict Incontinence, Impotence and Stricture After Radical Prostatectomy. *Prost. Can. & Prost. Dis.* 1:242-249.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 17 -

12. Dasari VR, Sandhu AK, Mills DC, Athwal RS and Kunapuli SP, 1996 Mapping of the P2U purinergic receptor gene to human chromosome 11q 13.5-14.1. *Somat. Cell Mol. Genet.* 22, 75-79.
13. Communi D, Piroton S, Parmentier M and Boeynaems JM, 1995 Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 30849-30852.
14. Maier R, Glatz A, Mosbacher J and Bilbe G, 1997 Cloning of P2Y6 cDNAs and identification of a pseudogene: comparison of P2Y receptor subtype expression in bone and brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 297-302.
15. Hansen MA, Barden JA, Balcar VJ, Keay KA, and Bennett MR, 1997 Structural motif and characteristics of the extracellular domain of P2X receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:670-675.
16. Barden JA, Cuthbertson RM, Jia-Zhen W, Moseley JM, and Kemp BE, 1997 Solution structure of parathyroid hormone related protein (residues 1-34) containing an Ala substituted for an Ile in position 15 (PTHrP[Ala15]-(1-34)). *J. Biol. Chem.* 272:29572-29578.
17. Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, Morris MA and Buell GN, 1995 Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Recept. Channels* 3, 283-289.
18. Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA and Jarvis MF, 1999 Molecular and Functional Characterization of Human P2X(2) Receptors. *Mol. Pharmacol.* 56, 1171-1181.
19. Garcia-Guzman M, Stuhmer W and Soto F, 1997 Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 47, 59-66.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 18 -

20. Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE and Stuhmer W, 1997
Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological
differences to the rat homologue. *Mol. Pharmacol.* 51, 109-118.
21. Le KT, Paquet M, Nouel D, Babinski K and Seguela P, 1997 Primary structure and
5 expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and
immune system. *FEBS Lett.* 418, 195-199.
22. Urano T, Nishimori H, Han H, Furuhata T, Kimura Y, Nakamura Y and Tokino T,
1997 Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53 *Cancer Res.*
57, 3281-3287.
- 10 23. Buell GN, Talbot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA and Antonarakis SE, 1998
Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor *Recept.*
Channels 5, 347-354.
24. Dutton J, Hansen M, Balcar V, Barden J, and Bennett MR, 1999 Development of
P2X receptor clusters on smooth muscle cells in relation to nerve varicosities in the rat
15 urinary bladder. *J. Neurocytol.* 28, 3-15.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 19 -

THE CLAIMS DEFINING THE INVENTION ARE AS FOLLOWS:-

1. A method for diagnosing a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal,
comprising detection of the P2Y purinergic receptor expression profile of a cell and/or
tissue from said mammal and comparison of the profile with a predetermined expression
5 profile of a normal cell and/or tissue.
2. A method for staging a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal,
comprising detection of the P2Y purinergic receptor expression profile of a cell and/or
tissue from said mammal and comparison of the profile with a predetermined expression
profile of a normal cell and/or tissue.
- 10 3. A method of determining the aetiology of carcinogenesis in a mammal, comprising
detection of the P2Y purinergic receptor expression profile of a cell and/or tissue from
the mammal and comparison of the profile with a predetermined expression profile of a
normal cell and/or tissue.
4. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the mammal is a human, a
15 horse, a bovine animal, a sheep, a dog, a cat, a rat or a mouse.
5. A method according to claim 4 wherein the mammal is a human.
6. A method according to any one of claims 1 to 5 wherein the cell and/or tissue is from
a prostate, breast, skin or other epithelial source.
7. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the pre-neoplastic or
20 neoplastic state is prostate pre-cancer or prostate cancer and an increase in the intensity
of the P2Y₂ purinergic receptor expression profile in a prostate cell or prostate tissue,
compared to the expression profile of a normal prostate cell or tissue, as herein defined,
is diagnostic of the presence of prostate pre-cancer or prostate cancer.
8. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the pre-neoplastic or
25 neoplastic state is breast pre-cancer or breast cancer and a decrease in the intensity of the

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 20 -

P2Y₂ purinergic receptor expression profile in a breast cell and/or breast tissue obtained from the mammal compared to the expression profile of a breast cell and/or breast tissue from a normal breast, is diagnostic of the presence of breast pre-cancer or breast cancer.

9. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the pre-neoplastic or
5 neoplastic state is skin pre-cancer or skin cancer and a decrease in the intensity of the P2Y₂ purinergic receptor expression profile in a skin cell and/or tissue from the mammal compared to the expression profile of a skin cell and/or tissue from normal skin, is diagnostic of the presence of skin pre-cancer or skin cancer.
10. A method according to claim 9 wherein the skin cancer is malignant melanoma,
10 squamous cell carcinoma or basal cell carcinoma.
11. A method according to any one of claims 1 to 10 wherein the P2Y receptor expression profile is the P2Y₂, P2Y₄, and/or P2Y₆ receptor expression profile.
12. A method according to claim 11 wherein the P2Y receptor expression profile is the P2Y₂ receptor expression profile.
- 15 13. A method according to any one of claims 1 to 12 wherein the pre-neoplastic state is an early pre-neoplastic state in which the P2Y receptor expression profile is altered in the nucleus of the cell.
14. A method according to any one of claims 1 to 12 wherein the pre-neoplastic state is an advanced pre-neoplastic state in which the P2Y receptor expression profile is a profile
20 in which the P2Y receptors are in the cytoplasm and/or lateral membranes and/or basal membranes.
15. A method according to any one of claims 1 to 12 wherein the neoplastic state is a state in which the P2Y receptor expression profile is a profile wherein the P2Y receptors are on the apical membrane of an epithelial cell.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 21 -

16. A method according to any one of claims 1 to 15 wherein the P2Y receptor expression profile is combined with the expression profile of other markers.
17. A method according to claim 16 wherein the P2Y receptor expression profile is combined with a P2X receptor expression profile.
- 5 18. A method according to claim 17 wherein the P2Y receptor expression profile is combined with an expression profile of P2X₁ and/or P2X₂.
19. A method according to any one of claims 1 to 18 wherein the P2Y receptor expression profile is detected by immunohistochemical means, or Western or Northern blotting techniques.
- 10 20. A method according to any one of claims 1 to 18 wherein the P2Y receptor expression profile is detected by ELISA or RIA.
21. A method according to any one of claims 1 to 19 wherein the P2Y receptor expression profile is detected by a colorimetric assay.
22. A P2Y purinergic receptor-specific antibody, wherein the antibody is capable of
- 15 differentiating between a pre-neoplastic or neoplastic cell and/or tissue and a normal cell and/or tissue.
23. An antibody according to claim 22 wherein the antibody is specific for P2Y₂, P2Y₄ and/or P2Y₆ receptors.
24. An antibody according to claim 23 wherein the antibody is specific for P2Y₂
- 20 receptors.
25. An antibody according to any one of claims 22 to 24 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
26. An antibody according to any one of claims 22 to 24 wherein the antibody is a polyclonal antibody.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 22 -

27. An antibody according to any one of claims 22 to 24 combined with at least one other antibody.
28. An antibody according to claim 27 wherein the at least one other antibody is a P2Y receptor-specific antibody or a P2X receptor-specific antibody.
- 5 29. An antibody according to claim 27 wherein the P2X receptor antibody is a P2X₁ or P2X₂ receptor-specific antibody.
30. An antibody according to any one of claims 27 to 29 wherein the at least one other antibody is a monoclonal antibody.
31. An antibody according to claim 27 to 29 wherein the at least one other antibody is a
10 polyclonal antibody.
32. A suite of P2Y antibodies comprising antibodies according to any one of claims 22 to 31.
33. An antibody according to any one of claims 22 to 31 or a suite of antibodies according to claim 32 when used in a method according to any one of claims 1 to 21.
- 15 34. An antibody according to any one of claims 22 to 31 or a suite of antibodies according to claim 32 when used to differentiate between pre-neoplastic or neoplastic cells and/or tissue and normal cells and/or tissue.
35. A method according to any one of claims 1 to 21 wherein the cell and/or tissue is obtained by biopsy.
- 20 36. A method according to claim 35 wherein the biopsy is taken by fine needle aspirate, from a body fluid or, in the case of a prostate cell and/or tissue, from digital rectal examination exudate or from semen.
37. A method according to any one of claims 1 to 21 combined with a complementary test.

WO 02/48395

PCT/AU01/01614

- 23 -

38. A method according to claim 37 wherein the complementary test is a test for malignancy.
39. A method according to claim 38 wherein the test for malignancy is an anti-telomerase antibody test using a specific antibody against human telomerase protein 1 (hTP₁) or an anti-tenascin test.
40. An isolated mammalian cell or tissue sample complexed with a P2Y purinergic receptor-specific antibody according to any one of claims 22 to 31 or a suite of antibodies according to claim 32.
41. A kit for diagnosing a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile.
42. A kit for staging a pre-neoplastic and/or neoplastic state in a mammal comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile.
43. A kit for determining the aetiology of carcinogenesis in a mammal comprising means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile.
44. A kit according to any one of claims 41 to 43 wherein the means for detecting a P2Y purinergic receptor expression profile is an antibody according to any one of claims 22 to 31 or a suite of antibodies according to claim 32.
45. A method according to any one of claims 1 to 21 wherein the cell and/or tissue from said mammal is proximal to a pre-neoplastic or neoplastic cell and is not itself pre-neoplastic or neoplastic.

Figure 1



Figure 2

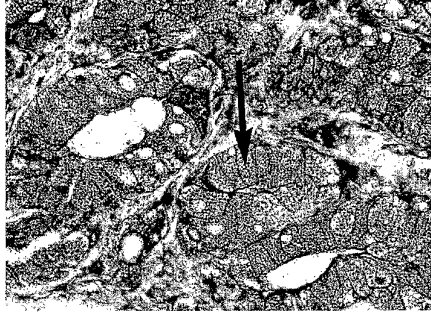
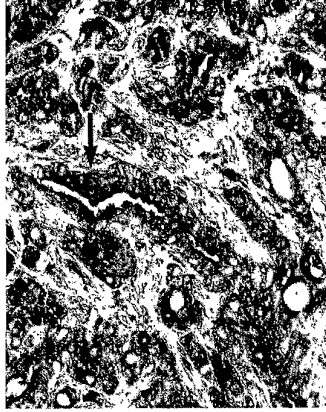


Figure 3



WO 02/48395

4/10

PCT/AU01/01614

Figure 4



Figure 5

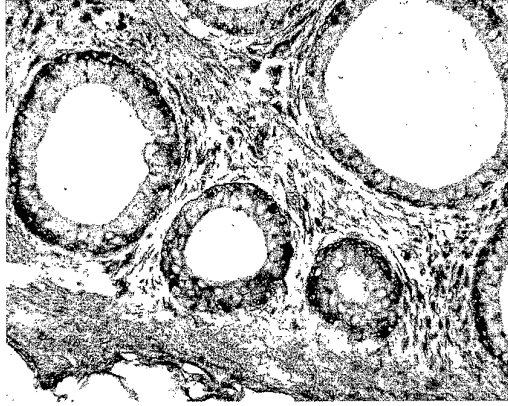


Figure 6

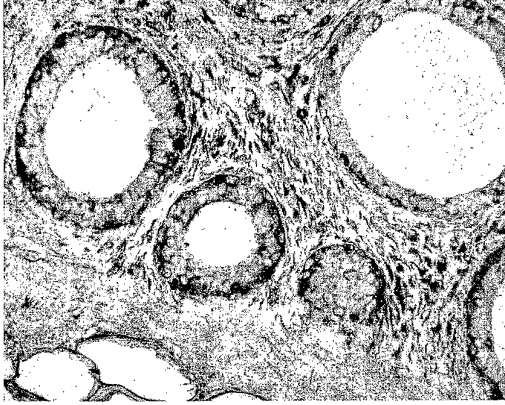


Figure 7

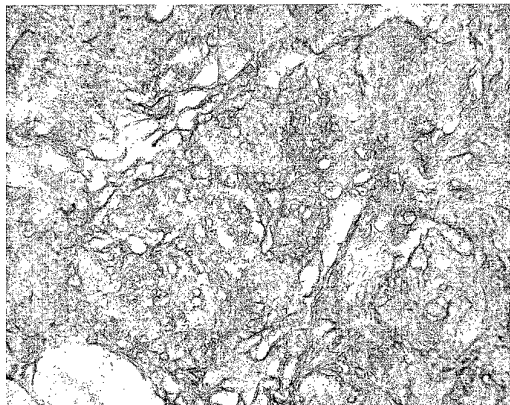
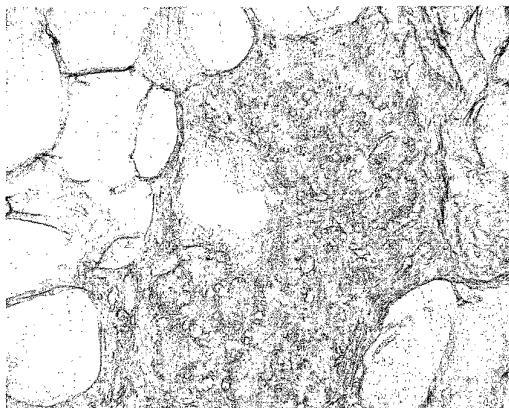


Figure 8

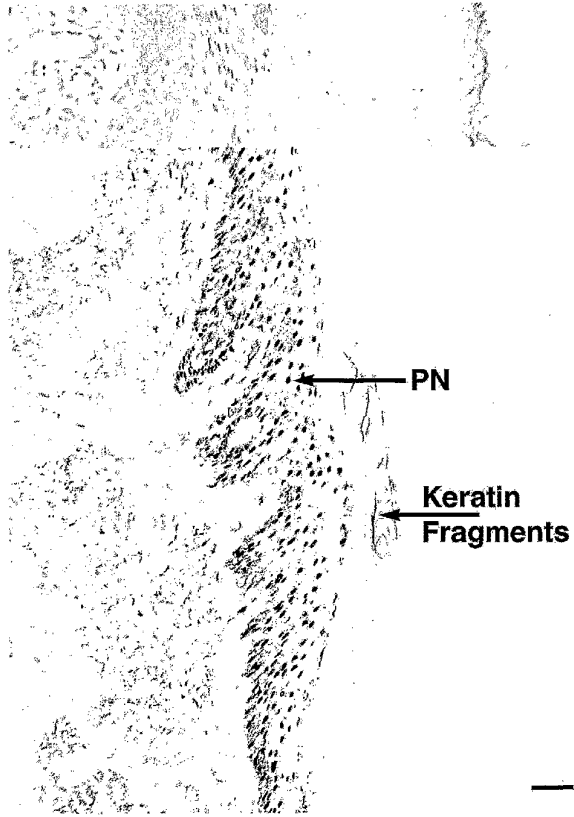


WO 02/48395

9/10

PCT/AU01/01614

Figure 9



WO 02/48395

10/10

PCT/AU01/01614

Figure 10



【手続補正書】

【提出日】平成15年7月18日(2003.7.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項22

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項22】

前新生物または新生物の細胞および/または組織と、正常な細胞および/または組織とを区別するために使用する際の、P2Yプリン作動性受容体特異抗体。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項40

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項40】

請求項1から21のいずれか1項に記載の方法で使用する際の、単離された哺乳類の細胞または組織試料。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項41

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項41】

P2Yプリン作動性受容体プロフィールを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態を診断するために使用する際のキット。

【手続補正4】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項42

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項42】

P2Yプリン作動性受容体発現プロフィールを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するために使用する際のキット。

【手続補正5】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項43

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項43】

P2Yプリン作動性受容体発現プロフィールを検出する手段を含む、哺乳類における発癌の病因を決定するために使用する際のキット。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳類における前新生物状態および新生物状態を同定するための方法、特に P 2 Y プリン作動性受容体の発現の違いに基づいて細胞および組織内の前新生物および新生物を同定する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

癌を診断する際、生検サンプルの細胞の特徴、例えば癌細胞のサイズおよび形の多様性の程度、活動的に分裂している細胞の比率、および周辺構造への浸潤について考慮される。一般に使用される組織学的染色は、細胞内要素を区別して標識するヘマトキシリン（一次染色）およびエオシン（カウンター染色）である。他の診断法としては顕微鏡分析用に視覚化することのできる、細胞または組織の内部（細胞内エピトープにより）または表面上（細胞外エピトープにより）の特定の診断分子、例えば癌胎児性抗原（CEA）の抗体を用いる。いくつかの具体的な例について以下に述べる。

【0003】

前立腺癌

西洋における前立腺癌の発症率は驚くべき速度で増加しており、過去5年間で2倍以上になっている。これはあらゆる新生物の中で最も高い発生率を有し、世界全体の男性の癌死亡の最も一般的な原因として肺癌に次いで第二位であり、オーストラリアの癌死亡の主要な原因である〔非特許文献1〕。良性前立腺過形成（benign prostatic hyperplasia: BPH）は50歳以上の男性に一般的であり、それ自体が前立腺癌の前駆体である前立腺上皮内新生物（prostatic intraepithelial neoplasia: PIN）の前駆体となり得る。検死の研究は70%の男性が80歳に達するまでに前立腺に悪性細胞を有することを示している〔非特許文献2〕。

【0004】

この症状の重大さにもかかわらず、診断法はわずかしかなくまた正確ではない。予後を評価する現行の方法、例えば直腸からの触診（digital rectal examination: DRE）、超音波、前立腺性酸性ホスファターゼ濃度、アンドロゲン遮断、前立腺特異抗原（prostate specific antigen: PSA）の比重、PSAの速度、PSAの年齢特異的基準範囲、およびGleasonの組織病理学的分類は、前立腺癌との臨床結果に関する信頼できる予測情報を提供できるとは言えない〔非特許文献3〕。例えば複数の試験によりDRE3では36.9%の偽陰性率を生じることが示された〔非特許文献4〕。PSAは、前立腺の他にも多数の組織に關与する33kDaのセリンプロテアーゼで〔非特許文献5〕、アンドロゲン、グルココルチコイドおよびプロゲスチンによりアップレギュレートされ、成長因子の制御に關与すると考えられている。残念ながら血清PSA濃度では、偽陰性23%および偽陽性36.7%の診断を生じる。新たにスクリーニングで検出される症例の半数以上が、実際には偽陽性であることさえ示唆されている〔非特許文献6〕。付加的な検査、例えばPSAの比重、速度および年齢特異的基準範囲の導入によるスクリーニング法を改善する試みは疑わしい。ある試験は、年齢特異的PSA基準範囲を適用すると、PSA正常上限が4.5ng/mLに上昇し、臨床的に重要なかなりの数の癌が検出できなくなること示した〔非特許文献7〕。この不確実さゆえに悪性かどうかの確定には前立腺の生検がしばしば行われるが、この検査もまた新生物への変化の部位を直接サンプリングしていないことに起因する、23%の偽陰性の診断というかなり不満足な値を示す〔非特許文献8〕。

【0005】

治療の選択は、組織切片の顕微鏡分析に基づく臨床的なステージ分類に大きく依存する〔非特許文献9〕。この技術は組織学的外観を臨床結果に關連づける上で、判定とかなりの経験に依存する。残念ながら前立腺癌組織が不均一であることは周知であり、生細胞の診断の特徴が検査する切片で見過ごされやすい可能性がある。状況をさらに複雑にすることには、手術および放射線療法の結果を調査する無作為試験およびコントロール試験がまだ行われていない〔非特許文献2〕。治療の選択には、根治的前立腺切除、放射線療法、ア

ンドロゲン遮断、および“注意深い待機”が挙げられる。“注意深い待機”が根治的介入かを問う確実な回答は、前立腺癌の介入 - 対 - 観察に関する試験 [非特許文献 1 0] の結論を待たなければならない。これらの決定が患者に及ぼす結果は重大である。例えば根治的前立腺切除はしばしば失禁、インポテンス、膀胱頸狭窄、疼痛および鬱に至る [非特許文献 1 1] 。

【 0 0 0 6 】

その他の癌、例えば乳癌または皮膚癌の場合、サンプルは幾つかの理由で誤診を招く可能性がある。乳腺の腫瘍の場合、局在する腫瘍の境界をうまく定義することはできず、同様に皮膚癌の場合も (H & E 染色で決定されるような) 組織学的に明らかな癌と正常組織との境界は多様である。正常な組織はいずれにしても多かれ少なかれ、所望する以上にこれら腫瘍周囲を削除されることになる。

【 0 0 0 7 】

参考文献

【非特許文献 1】Lian FR, Bhuiyam M, Li YW, Wall N, Kraut M および Sarkar FH, 1988 ジェニステイン誘発性 G (2) - M 停止、P 2 1 (W a f l) アップレギュレーション、および非小細胞肺癌におけるアポトーシス。Cell Line. Nutr. & Cancer. 31: 184-191。

【非特許文献 2】Hoey J, 1998 前立腺癌：進行および混乱。CMAJ 159: 1-3。

【非特許文献 3】Festuccia C, Vincentini C, di Pasquale AB, Aceto G, Zazzeroni F, Miano L, および Bologna M, 1995 良性前立腺過形成および前立腺癌の短期組織培養における、プラスミノゲンアクチベーター活性化。Oncol. Res. 7: 131-138。

【非特許文献 4】Saxena S, Mohanty NK および Jain AK, 1997 前立腺症の男性における前立腺癌のスクリーニング。Ind. J. Pathl. Micro. 40:441-450。

【非特許文献 5】Diamandis EP および Yu H, 1997 前立腺特異抗原の前立腺以外の素材。Urol. Clin. Nth. Am. 24; 275-282。

【非特許文献 6】Weyler J, 1999 前立腺癌：スクリーニングか、注意深い待機か？ Ann. Oncol. 9: 9-11。

【非特許文献 7】Bassler TJ, Orozco R, Bassler IC, Odowd GJ および Stamey TA, 1998 6 0 歳代男性に関する前立腺特異的抗原の正常上限の上昇により見過ごされるほとんどの前立腺癌は、臨床的に重要である。Urol. 52: 1064-1069。

【非特許文献 8】Rabbani F, Stroumbakis N, Kava BR, Cookson MS および Fair WR, 1998 前立腺生検偽陰性の 1 / 6 の発症率および臨床的重要性。J. Urol. 159: 1247-1250。

【非特許文献 9】Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE および Honn KV, 1997 ヒト前立腺癌の診断マーカーおよび予防マーカー。Prostate 31: 264-281。

【非特許文献 1 0】Small EJ, 1997 前立腺癌。Curr. Opin. Oncol. 9: 277-286。

【非特許文献 1 1】Moul JW, Mooneyhan RM, Kao TC, McLeod DG および Cruess DF, 1998 根治的前立腺切除後の失禁、インポテンスおよび狭窄を予測するための術前および術中の因子。

Prost. Can. & Prost. Dis. 1: 242-249。

【非特許文献 1 2】Dasari VR, Sandhu AK, Mills DC, Athwal RS および Kunapuli SP, 1996 P 2 U プリン作動性受容体遺伝子のヒト染色体 1 1 q 1 3 . 5 - 1 4 . 1 へのマッピング。Somat. Cell Mol. Genet. 22, 75-79。

【非特許文献 1 3】Communi D, Pirotton S, Parmentier M および Boeynaems JM, 1995 ヒトのウリジンヌクレオチド受容体のクローニングおよび機能的発現。J. Biol. Chem. 270, 30849-30852。

【非特許文献 1 4】Maier R, Glatz A, Mosbacher J および Bilbe G, 1997 P 2 Y 6 c D N A のクローニングおよび偽遺伝子の同定：骨組織および脳組織における P 2 Y 受容体サブタイプの発現の比較。Biochem. Biophys. Res. Commun. 237, 297-302。

【非特許文献 1 5】Hansen MA, Barden JA, Balcar VJ, Keay KA および Bennett MR, 1997 P 2 X 受容体の細胞外ドメインの構造的モチーフおよび特徴づけ。Biochem. Biophys

. Res. Comm. 236: 670-675.

【非特許文献 16】Barden JA, Cuthbertson RM, Jia-Zhen W, Moseley JM および Kemp BE, 1997 15位の Ile が Ala で置換されているタンパク質 (残基 1 - 34) (PTHRP [Ala 15] - (1 - 34)) に関する副甲状腺ホルモンの溶液構造。J. Biol. Chem. 272: 29572-29578.

【非特許文献 17】Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, Morris MA および Buell GN, 1995 膀胱由来のヒト P2X 受容体の特徴づけおよび染色体上の位置づけ。Recept. Channels 3, 283-289.

【非特許文献 18】Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA および Jarvis MF, 1999 ヒト P2X (2) 受容体の分子的特徴づけおよび機能的特徴づけ。Mol. Pharmacol. 56, 1171-1181.

【非特許文献 19】Garcia-Guzman M, Stuhmer W および Soto F, 1997 ヒト P2X3 プリン受容体の分子のおよび薬理学的特性。Brain Res. Mol. Brain Res. 47, 59-66.

【非特許文献 20】Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE および Stuhmer W, 1997 ヒト P2X4 受容体の組み換え体の特徴づけにより、ラットの相同体との薬理学的差異を明らかにする。Mol. Pharmacol. 51, 109-118.

【非特許文献 21】Le KT, Paquet M, Nouel D, Babinski K および Seguela P, 1997 脳システムおよび免疫システム由来の自然に切断されたヒト P2X ATP 受容体サブユニットの 1 次構造および発現。FEBS Lett. 418, 195-199.

【非特許文献 22】Urano T, Nisimori H, Han H, Furuhashi T, Kimura Y, Nakamura Y および Tokino T, 1997 p53 により制御される新規ヒト P2X 受容体遺伝子である P2XM のクローニング。Cancer Res. 57, 3281-3287.

【非特許文献 23】Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA および Antonarakis SE, 1998 ヒト P2X7 受容体の遺伝子構造および染色体の位置づけ。Recept. Channels 5, 347-354.

【非特許文献 24】Dutton J, Hansen M, Balcar J, Barden J および Bennett MR, 1999 ラット膀胱における神経の静脈瘤様腫瘍に関する平滑筋細胞の P2X 受容体群の発達。J. Neurocytol. 28, 3-15.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、前新生物細胞および/または新生物細胞を同定する方法を提供することであり、これにより先行技術の欠点の少なくとも一部を克服または大幅に改善し、あるいは有用な代替法を提供することとなる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概略

P2Y プリン作動性受容体は、アデノシン三リン酸 (ATP) と結合する、G タンパク質共役型組織受容体で、一部の P2Y 受容体サブタイプはウリジン三リン酸 (UTP) と結合する。哺乳類において P2Y 受容体の発現パターンを前新生物および新生物の診断に使用できることが、驚くことに発見された。

【0010】

哺乳類における前癌および癌のステージは、成長、細胞外マトリックス、代謝因子および神経支配因子の著明な差、ならびに上皮下のカルシウムイオンおよび微小管の増加を伴う。本発明の新規抗体を用いると、P2Y 受容体を免疫細胞化学的方法により十分に視覚化することができ、それらが異なる発現パターンで、例えば細胞表面、尿細管および点状に標識されて存在することが示された。これらの発現パターンを用いて癌の発達の異なるステージを同定することができ、すなわち完全に正常な組織に始まり、一例として前立腺の P2Y 受容体の発現が、個々に冒された腺房内の核に最初に現れる前新生物状態を経て進行するという経過を示す。より進行した前新生物状態であってまだ疾患の形態学的徴候が

表れていないものにおいて、受容体は核を離れて腺房内の細胞質および側方の膜および基底膜に拡散し、その後上皮細胞の頂端側細胞膜に沈着するが、この沈着は初期癌に伴う形態学的変化に同調して起こる。これらのステージでは明らかに腫瘍と形態学的に定義される領域以上に、事実上全体に及んでいるため、診断は目下の腫瘍領域を直接サンプリングすることに限定されることなく、ある程度距離を置いて腫瘍の存在を検出することができる。

【0011】

したがって本発明は、前癌症状（例えば過形成）を診断し、癌をステージ分類し、発癌の基礎的な生理学および病因学を調べるための、新たな手段を提供する。

第1の側面により本発明は、哺乳類由来の細胞および/または組織のP2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態を診断するための方法を提供する。

【0012】

第2の側面により本発明は、哺乳類由来の細胞および/または組織のP2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するための方法を提供する。

【0013】

第3の側面により本発明は、哺乳類由来の細胞および/または組織のP2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルの検出、および予め決定しておいた正常な細胞および/または組織の発現プロファイルと前記プロファイルとの比較を含む、前記哺乳類における発癌の病因を決定するための方法を提供する。

【0014】

好ましくは哺乳類はヒトであるが、当該方法はウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラットおよびマウスを含むあらゆる適切な哺乳類に適用することができる。

好ましくは細胞および/または組織は、前立腺、乳腺または皮膚由来である。しかし当該方法は他の上皮細胞を含む他の細胞のタイプにもまた有用となり得ることを、当業者は理解するだろう。

【0015】

前新生物状態または新生物状態が前立腺の前癌病変または前立腺癌である場合、前立腺細胞または前立腺組織のP2Y₂プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の増加を、先に定義したように、正常な前立腺細胞または前立腺組織の発現プロファイルと比較して、前立腺の前癌病変または前立腺癌の存在を診断する。

【0016】

前新生物状態または新生物状態が乳腺の前癌病変または乳癌である場合、哺乳類から採取した乳腺細胞および/または乳腺組織のP2Y₂プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の低下を、正常な乳腺由来の乳腺細胞および/または乳腺組織の発現プロファイルと比較して、乳腺の前癌病変または乳癌の存在を診断する。

【0017】

前新生物状態または新生物状態が皮膚の前癌病変または皮膚癌である場合、哺乳類由来の皮膚細胞および/または皮膚組織のP2Y₂プリン作動性受容体の発現プロファイルの強度の低下を、正常な皮膚由来の皮膚細胞および/または組織の発現プロファイルと比較して、皮膚の前癌病変または皮膚癌の存在を診断する。

【0018】

好ましくは皮膚癌は、悪性黒色腫、扁平上皮癌または基底細胞癌である。したがって本発明により、例えば上述のように皮膚癌の状態を、角化棘細胞腫およびその他の良性病巣、例えば光線性角化症と区別することができる。

【0019】

好ましくはP2Y受容体の発現プロファイルは、P2Y₂、P2Y₄および/またはP2Y₆

受容体の発現プロフィールであり、より好ましくは P 2 Y₂ 受容体の発現プロフィールである。当業者は過度の実験作業をせずに、行おうとする特定の方法にどの P 2 Y が最適かを確認することができる。一般に正常な細胞または組織と比較して、前新生物または新生物の細胞または組織との発現プロフィールの強度差に最もコントラストのある、これら P 2 Y 受容体が最も望ましい。

【 0 0 2 0 】

1つの態様において前新生物状態は、P 2 Y 受容体の発現プロフィールが細胞の核内で変化した初期の前新生物状態である。あるいはもう1つの態様において前新生物状態は進行した前新生物状態であり、この場合 P 2 Y 受容体の発現プロフィールは、P 2 Y 受容体が細胞質および/または側方の膜および/または基底膜中に存在するプロフィールを示す。

【 0 0 2 1 】

もう1つの態様において前新生物状態は、P 2 Y 受容体が上皮細胞の頂端側膜上に存在するというプロフィールを、P 2 Y 受容体の発現プロフィールが示す状態である。

P 2 Y 受容体の発現プロフィールを他のマーカーの発現プロフィールと組み合わせることができることは、当業者には明らかであろう。特に P 2 Y 受容体の発現プロフィールは P 2 X 受容体の発現プロフィール、そして好ましくは P 2 X₁ および/または P 2 X₂ の発現プロフィールと組み合わせることができる。

【 0 0 2 2 】

好ましくは P 2 Y 受容体の発現プロフィールの検出は、免疫組織化学的方法による。しかし細胞または組織のサンプル源および利用できる試薬により、E L I S A、R I A または類似の免疫学的技術を含むその他の手段でも P 2 Y 受容体を検出できることは、当業者には明らかであろう。好ましくは P 2 Y 受容体は、比色分析、例えば D A B (ジアミノベンジジン) または L S A B 法 (標識ストレプトアビジン - ビオチン法)、第二抗体検出キット (D a k o) により検出する。

【 0 0 2 3 】

標準的なウエスタンブロット法および標準的なノーザンブロット法による P 2 Y プリン作動性受容体の m R N A の検出もまた、P 2 Y 受容体の発現プロフィールの決定に有用となり得ることは、当業者には明らかであろう。

【 0 0 2 4 】

第 4 の側面により本発明は、前新生物または新生物の細胞および/または組織と、正常な細胞および/または組織とを区別するために使用する際の、P 2 Y プリン作動性受容体特異抗体を提供する。

【 0 0 2 5 】

好ましくは抗体は、P 2 Y₂ 受容体、P 2 Y₄ 受容体および/または P 2 Y₆ 受容体に特異的である。最も好ましくは抗体は、P 2 Y₂ 受容体に特異的である。

P 2 Y 受容体特異抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよいことは、当業者には明らかであろう。P 2 Y 受容体特異抗体を他の抗体、特に 1 つまたはそれ以上の P 2 X 受容体特異抗体と組み合わせてもよいこともまた、当業者には明らかであろう。P 2 X 受容体特異抗体もまたモノクローナルでもポリクローナルでもよい。好ましい態様において P 2 X 受容体の抗体は、P 2 X₁ および/または P 2 X₂ の受容体特異抗体である。

【 0 0 2 6 】

第 5 の側面により本発明は、第 4 の側面による抗体を含む一組の抗体を提供する。

第 6 の側面により本発明は、第 1 の側面による方法で使用する際の、単離された哺乳類の細胞または組織試料を提供する。

【 0 0 2 7 】

本発明に使用する細胞および/または組織は生検 (特に乳腺組織では例えば細針吸引、) により得ることができるが、体液または、前立腺細胞および/または組織の場合には直腸からの触診による滲出液または精液を含む、その他のあらゆる手段で得ることもできる。

【 0 0 2 8 】

本発明の方法および P 2 Y 受容体特異抗体は、例えば悪性度の検査を含む他のあらゆる相

補的な検査と組み合わせて使用できることは、当該技術分野の業者には明らかであろう。悪性度の検査は、ヒトテロメラーゼタンパク質1 (hTP₁) に特異的な抗体を使用する抗テロメラーゼ抗体検査、または他のあらゆる適切なアッセイまたは抗テネイシン検査のような検査とすることができる。

【0029】

第7の側面により本発明は、P2Yプリン作動性受容体プロフィールを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態を診断するために使用する際のキットを提供する。

【0030】

第8の側面により本発明は、P2Yプリン作動性受容体の発現プロフィールを検出する手段を含む、哺乳類における前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するために使用する際のキットを提供する。

【0031】

第9の側面により本発明は、P2Yプリン作動性受容体の発現プロフィールを検出する手段を含む、哺乳類における発癌の病因を決定するために使用する際のキットを提供する。

【0032】

好ましくはP2Yプリン作動性受容体の発現プロフィールを検出する同手段は、第4の側面による抗体または第5の側面による一組の抗体である。

好ましくは同キットは、第1から第3の側面のいずれか1つによる方法において使用する。

【0033】

本発明の内容において、“新生物細胞”および“新生物組織”という用語は通常の意味で解釈されるものとし、新生物細胞または新生物組織の特徴的な性質、例えば過形成および/または肥大の成長パターンおよび、異常な細胞の形およびサイズおよび核のサイズを際立たせるヘマトキシリンおよびエオシン染色(すなわちH&E)による特徴的な染色を有する細胞または組織を含むが、これに限定されない。

【0034】

本発明の内容において、“前新生物細胞”および“前新生物組織”という用語は通常の意味で解釈されるものとし、過形成または肥大し得る細胞または組織を含むが、これに限定されない。しかしこのような細胞または組織は、新生物細胞または新生物組織の特徴的な性質、例えば異常な細胞の形およびサイズおよび核のサイズを際立たせるH&Eによる特徴的な染色は有していない。

【0035】

本発明の内容において、“正常細胞”および“正常組織”という用語は通常の意味で解釈されるものとし、P2Y発現プロフィールが、前新生物または新生物のいずれもない個体由来の細胞で観察されるプロフィールと実質的に変わらない、細胞または組織を含む。本発明の内容において前立腺の症状に関する場合、“正常細胞”という用語は、例えば良性前立腺過形成の前立腺由来の細胞もまた含む。

【0036】

本発明の内容において“一組の抗体”という用語は、同一抗原または異なる抗原に特異的な数種の異なる抗体を含み、各受容体のサブタイプを特異的に識別することのできるポリクローナル抗体を含む。抗体がモノクローナルの場合“一組の抗体”という用語は、各受容体 例えばP2YおよびP2X、または受容体のサブタイプ 例えばP2Y₂およびP2Y₄を特異的に識別することのできる一群の抗体もまた含む。

【0037】

本発明の内容において“発現プロフィール”の検出には、発現のパターンまたは強度の検出を含む。

本発明の内容で他に明確な要求がなければ、本説明および本請求項を通して“含む”“含んでいる”等の言葉は、除外または除外的な意味の対局として、包含的な意味;すなわち“含んでいるが限定されない”という意味で解釈されるものとする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

発明の説明

本発明は、前新生物細胞および新生物細胞はP2Yプリン作動性受容体を他と区別して発現するという所見に基づいている。したがってこの区別の目安となる発現を用いて、前新生物細胞または新生物細胞を同定することができる。さらにP2Yプリン作動性受容体は、前新生物および新生物の異なるステージの細胞内では異なって分配されるため、P2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルを用いて、前新生物状態および新生物状態のステージを分類することができる。P2Yの異なる発現パターンを用いて、発癌の病因の決定することもできる。さらに本発明は、P2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、前新生物状態および/または新生物状態を診断するためのキット；P2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、前新生物状態および/または新生物状態のステージを分類するためのキット；およびP2Yプリン作動性受容体の発現プロファイルを検出する手段を含む、発癌の病因を決定するためのキットを含む。

【0039】

本発明の好ましい態様をあくまで一例としてここに記述することにする。

【実施例1】

【0040】

実施例1 - 抗体の作成

クローニングされたヒトP2Y₂ [非特許文献12]、ヒトP2Y₄ [非特許文献13]、およびヒトP2Y₆ [非特許文献14] 受容体のコンセンサス配列について、Hansenら [非特許文献15] の行ったアプローチに従って適切なエピトープを検討した。P2Y₂のセグメントLeu226-Lys242に相応する非相同性のエピトープを、P2Y₄(Arg226-Arg242)およびP2Y₆(Cys220-Lys236)のこれに当たる配列と共に使用した。P2Y₂およびP2Y₄のエピトープにはN末端にCysを付加して、マレイミドカプロイル-N-ヒドロキシスクシンイミドの架橋物質を介して、各々にジフテリアトキシソイドを結合させた。すべての合成はABI合成機にて標準的なt-BOC法を用いて行った [非特許文献16]。ペプチド-抗原結合体を水に5mg/mLで懸濁させ、分注して完全フロインドアジュバントと共に混合することにより乳化させた。2mgペプチドを含む1mL量のエマルジョンを筋注し、その後2週間隔で不完全フロインドアジュバントを用いて、2回、3回、4回および5回の免疫感作を続けて行った。各エピトープに対して使用したウサギまたはヒツジに適当な抗体価が得られたことが確立された後、静脈穿刺による最終採血を10-12週に行った。血液を37℃で30分間インキュベーションして4℃で15時間保存し、その後遠心して血清を分離し、少量ずつ分注して-20℃に保存した。各ペプチドに特異的な抗体についてELISA法により血清の検査を行った。ELISA法で吸光度がバックグラウンドより1.0高くなる血清希釈倍数の逆数と定義された抗体価は、免疫前サンプルの225±25に比して75, 000±4, 000の範囲であった。各抗体は特定のサブタイプに対して特異的であることが認められた。

【0041】

この抗体に特異的なエピトープに対して各抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、同じ標識傾向を示しているにもかかわらずバックグラウンドを低下することができた。マウスの同じP2Y₂エピトープに対して作成されたモノクローナル抗体でも、同じ結果が得られた。

【実施例2】

【0042】

実施例2 - 免疫組織化学的方法

8μm厚の切片を、固定していない凍結組織からReichert Jung 2800 Frigocutクリオームにて作成するか、あるいはまたパラフィン包埋した組織から切片を作成した。切片は室温で1時間空気乾燥し、アセトン中で-20℃で12時間固定し、抗体標識前に1時間

室温で空気乾燥した。これを次に抗 P 2 Y₂ のモノクローナルのマウス、ウサギまたはヒツジのいずれかの第一抗体と共に室温にてインキュベーションした。洗浄後、次に切片を第二抗体中で 30 分間インキュベーションした：第二抗体はマウスの第一抗体に対しては HRP 標識ヤギ抗マウス第二抗体 (Dako)、ウサギの 1 次抗体に対しては HRP 標識抗ウサギ第二抗体、または HRP 標識ヤギ抗ヒツジ第二抗体の 1 : 30 希釈液とした。スライドガラスを再度洗浄し、次に 15% ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド (DAB-Sigma) に 10 分間浸した。切片を洗浄し、空気乾燥して DPX (Merk) にのせて標本とした。コントロールのスライドガラスは、最初のインキュベーション時に希釈液中でインキュベーションした後、実験のスライドガラスと同じ方法で処理した。ネガティブコントロールスライドガラスは、第一抗体を非免疫血清に置き換えた以外は、実験のスライドガラスと同じ方法で処理した。

【0043】

すべての抗体に対して個々の特異性を示された。

【実施例 3】

【0044】

実施例 3 - ヒト癌組織 (前立腺) における P 2 Y 受容体

正常 40 例およびヒト前立腺癌の 40 症例の研究において、P 2 Y₂ サブタイプはヒト前立腺癌組織中で著明に増加していた。正常組織/良性前立腺過形成では標識は観察されなかった。癌組織の P 2 Y₂ の標識パターンは特に有益で、前立腺疾患の各ステージに伴って標識された腺房上皮細胞の比率が増加し、新生物の変化と P 2 Y₂ の腺房の標識領域との直接の相関を示した。標識は核内に始まり (ステージ 1 ; 図 1)、核外または細胞質に点在する標識へと進行し (ステージ 2 ; 図 2)、そしてステージ 3 ではまた形態学的な変化も伴うさらに進んだ症例では上皮細胞頂端側および側方への沈着へと進行する (ステージ 3 ; 図 3)。

【0045】

P 2 Y および P 2 X の受容体の抗体の組み合わせ

P 2 X はイオン、特にカルシウムイオンに対して細胞を開口する、すばやく作用するリガンド (ATP) 開閉イオンチャンネルである。P 2 Y 受容体は、ATP または UTP または ADP さえにもよる活性化後、G タンパク質共役型の活性化カスケードを引き起こすことで細胞内カルシウム貯留に作用する、ずっと緩やかに作用する代謝型受容体であり、したがってその機能は P 2 X 受容体とは全く異なる。

【0046】

P 2 X 受容体の抗体を P 2 Y 受容体の抗体と組み合わせて使用したところ、P 2 Y 受容体の抗体単独で使用した場合と類似のパターンが得られた。特に P 2 Y₂ 受容体サブタイプの抗体を、P 2 X₁ および P 2 X₂ 受容体サブタイプのいずれか一方または双方の抗体と共に使用しての前立腺細胞/組織の標識は、P 2 Y₂ 受容体の抗体を単独に使用して得られた結果を増幅した。

【0047】

P 2 X 抗体は以下のように作成した：

ヒト P 2 X₁ [非特許文献 17]、ヒト P 2 X₂ [非特許文献 18]、ヒト P 2 X₃ [非特許文献 19]、ヒト P 2 X₄ [非特許文献 20]、ヒト P 2 X₅ [非特許文献 21]、ヒト P 2 X₆ [非特許文献 22] およびヒト P 2 X₇ [非特許文献 23] のコンセンサス配列について、ラット抗体 [非特許文献 15, 24] に用いたアプローチに従って適切なエピトープを検討した。N 末端に Cys を付加した P 2 X₁ ではセグメント Lys68-Val184 に対応する非相同性エピトープを使用した。P 2 X₂ からは His209-Cys226 を選択した。P 2 X₃ からは Asn185-Cys203 を選択した。P 2 X₄ からは Cys270--Glu285 を選択した。P 2 X₅ からは Cys272-Ser288 を選択した。P 2 X₆ からは Asn200-Cys218 を選択した。P 2 X₇ からは C 末端に Cys を付加した Val165-Lys81 を選択した。ジフテリアトキシンに架橋するためマレイミドカプロイル-N-ヒドロキシスクシンイミドを介して、すべてのエピトープをジフテリアトキシンに結合させた。抗体はウサギおよびヒツジで作製し、P 2 Y 抗体について

上述のように精製した。

【0048】

図4は、P2Y₂抗体、P2X₁抗体およびP2X₂抗体を組み合わせで使用した、ステージ3の症例（明らかな癌）の前立腺組織の標識を示す。

その他のP2Xサブタイプ、例えばP2X₃およびP2X₇を使用しても、前立腺サンプルでは同様の結果が得られた。

【実施例4】

【0049】

実施例4 - ヒト癌組織（乳癌および皮膚癌）におけるP2Y受容体

その他の癌、例えば乳癌（単一病巣および複数病巣）および悪性黒色腫を含む皮膚癌では、標識パターンが逆転した。これらの組織において、P2Y₂抗体による正常細胞の標識は濃く表れる（正常組織におけるP2Y₂の発現が比較的高いことを意味する）が、癌組織ではP2Y₂抗体の標識は観察されなかった。P2X受容体の抗体、特にP2X₁およびP2X₂サブタイプの抗体をP2Y₂受容体の抗体と組み合わせで使用することにより結果は増幅された（図5から10）。

【実施例5】

【0050】

実施例5 - P2Y受容体の抗体による診断と他の検査との併用

上述のP2Y（およびP2X）受容体の抗体による診断を相補的な検査と併用することができることは明らかである。このような検査は癌の性質に関するさらなる情報を提供することができ、例えば悪性に関する検査、例えば抗テロメラーゼ抗体検査、および/または抗テネイシン検査は治療方針を考える上で有用となり得る。

【0051】

本発明を具体的な実施例を参照して述べたが、本発明を多くの他の形で提示できることは当該技術分野の技術者により理解されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】前新生物の第1のステージである、P2Y₂抗体にて標識された顕著な（prominent）上皮細胞核を示す。

【図2】今度は標識が点状のパターン（矢印）を形成し核内は染色されていないが、一方癌の形態学的エビデンスはまだ表れていない、前新生物の典型的なステージ2の染色を示す。

【図3】染色は、進行癌に伴う形態学的変化のエビデンスを示す組織において、上皮細胞の頂端側（矢印）にP2Y₂が集まっていることを示す。

【図4】ステージ3の症例（明らかな癌）由来の前立腺組織の、P2Y₂抗体、P2X₁抗体およびP2X₂抗体を組み合わせでの標識を示す。

【図5】P2Y₂、P2X₁およびP2X₂抗体を組み合わせで標識した、非癌性乳腺組織（線維腺腫）を示す。標識を組み合わせることにより、標識強度のわずかな改善が観察される。

【図6】極めて類似する染色を示すP2Y₂の標識による非癌性線維腺腫の類似の一連の切片を示す。

【図7】P2Y₂、P2X₁およびP2X₂抗体を組み合わせで標識した乳癌組織を示す。癌組織は標識されていない。

【図8】陽性染色と極めて類似する欠如部分を示す、P2Y₂で標識された乳癌組織を示す。

【図9】顕著な核（prominent nuclei: PN）の標識を伴う、P2Y₂抗体で標識された正常な皮膚の良性病巣生検例を示す。

【図10】P2Y₂抗体で標識された悪性黒色腫の生検切片を示し、正常なサンプルで視覚化されていたすべての標識が黒色腫では欠如している。正常な標識は黒色腫から2mm以内に認められる。上で使用した抗体の組み合わせでも等しい結果が得られる。請求項2

2、請求項40～43、明細書8～9頁（明細書段落番号「0024」乃至「0032」を補正した。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/01614
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12Q 1/68; G01N 33/53, 33/574		
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) SEE ELECTRONIC DATASBASES BELOW		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SEE ELECTRONIC DATASBASES BELOW		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, CA, Medline. Prinerigic receptor , p2y, cancer/tumour/tumor/carcinoma/neoplasm, gene expression.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P X	WO 01/06259 A1 (THE UNIVERSITY OF SYDNEY) EPD 21 April 1999, OPI 25 January 2001	All
P X	WO 01/30964 A1 (LIFESPAN BIOSCIENCES INC) EPD 22 October 1999, OPI 3 May 2001 Particularly p 84, no 1242 and p 87, no3159	All
P X	Janssens R; Boeynaems J M. Effects of extracellular nucleotides and nucleosides on prostate carcinoma cells. Br J Pharmacol. Jan 2001. 132(2): 536-46.	aLL
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" 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 17 January 2002	Date of mailing of the international search report - 5 FEB 2002	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6283 3929	Authorized officer Gillian Allen Telephone No : (02) 6283 2266	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/01614
(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Wagstaff S C; Bowler W B; Gallagher J A; Hipskind R A. Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c-fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells. <i>Carcinogenesis</i> . Dec 2000. 21(12): 2175-81.	
A	Schultze-Mosgau A; Katzur A C; Arora K K; Stojilkovic S S; Diedrich K; Ortmann O. Characterization of calcium-mobilizing, purinergic P2Y(2) receptors in human ovarian cancer cells. <i>Mol Human Reproduct</i> . May 2000. 6(5): 435-42.	
A	Katzur AC, Koshimizu T, Tornic M, Schultze-Mosgau A, Ortmann O, Stojilkovic SS. Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> . Nov 1999. 84(11): 4085-91.	
A	Hopfner M; Lemmer K; Jansen A; Hanski C; Riecken E O; Gavish M; Mann B; Buhr H; Glassmeier G; Scherubl H. Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells. <i>Biochem Biophys Res Comm</i> . 1998. 251(3): 811-817.	
A	Sauer H; Diederhagen H; Hescheler J; Wartenberg M. Calcium-dependence of hydrogen peroxide-induced c-fos expression and growth stimulation of multicellular prostate tumor spheroids. <i>FEBS LETTERS</i> . 1997. 419(2-3): 201-5.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/AU01/01614

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 01/06259 A1	AU 39494/00 A1
WO 01/30964 A1	AU 13397/01 A1

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 P 21/08	

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

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72) 発明者 バーデン, ジュリアン

オーストラリア国ニュー・サウス・ウェールズ 2 1 2 2, マースフィールド, マワラ・クレセント 4 8

(72) 発明者 スレイター, マイケル

オーストラリア国ニュー・サウス・ウェールズ 2 1 9 2, ベルモア, バーウッド・ロード, フラット 3 / 5 1 1

专利名称(译)	P2Y嘌呤能受体的表达以鉴定癌前和肿瘤病症		
公开(公告)号	JP2004520025A	公开(公告)日	2004-07-08
申请号	JP2002550109	申请日	2001-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	生物权威控股有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物权杖专有有限公司		
[标]发明人	バーデンジュリアン スレイターマイケル		
发明人	バーデン,ジュリアン スレイター,マイケル		
IPC分类号	G01N33/48 C07K16/28 C07K16/30 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 C07K16/28 G01N33/574 G01N2333/705		
FI分类号	C12Q1/02 C07K16/30 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/52.A G01N33/53.D G01N33/53.Y C12N15/00.A C12P21/08		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	2000PR2015 2000-12-11 AU		
其他公开文献	JP4334223B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在哺乳动物中鉴定癌前和癌前状态的方法，尤其涉及基于P2Y嘌呤受体差异表达在细胞和组织中鉴定癌前和癌形成的方法。

【 図 9 】

