

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 507027

(P2003 - 507027A)

(43)公表日 平成15年2月25日(2003.2.25)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
38/00			H 4 B 0 6 3
39/395		48/00	4 B 0 6 5
		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全194数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 517168(P2001 - 517168)

(86)(22)出願日 平成12年8月14日(2000.8.14)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月13日(2002.2.13)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/03143

(87)国際公開番号 W001/013117

(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)

(31)優先権主張番号 9919258.5

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(31)優先権主張番号 0007754.5

(32)優先日 平成12年3月30日(2000.3.30)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 オックスフォード グリコサイエンス (ユーケー) リミテッド
イギリス,アピンドン オーエックス14 4
アールワイ,ミルトン パーク 86,ザ フ
ォーラム

(72)発明者 ヘラス, ヘラス, ムジヤンセラゲ, アスラ
, チャンドラシリ
イギリス,オクソン オーエックス14 1ワ
イダブリュー,アピンドン,フォスター ロ
ード 53

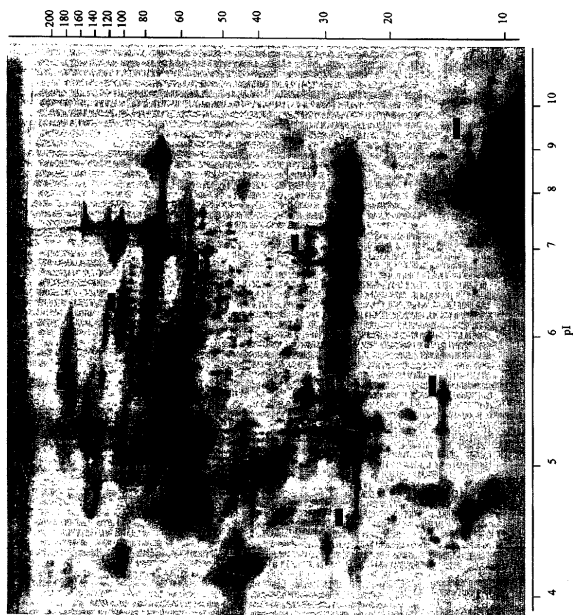
(74)代理人 弁理士 八田 幹雄 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質、遺伝子ならびに乳癌の診断及び処置へのこれらの使用

(57)【要約】

本発明は、乳癌のスクリーニング、診断及び予想を目的とする、乳癌処置の有効性をモニターすることを目的とする、ならびに薬剤の開発を目的とする方法及び組成物を提供するものである。血清の2次元電気泳動によって検出可能な乳癌関連特徴 (B F) が記載される。本発明はさらに、髄液、血清または血漿中で検出可能な乳癌関連タンパク質イソ型 (B P I)、単離された B P I からなる製剤、 B P I に免疫特異的な抗体、および前記からなるキットを提供するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 2次元電気泳動によって被検者からの体液のテストサンプルを分析して、特徴の2次元アレイを形成し、該アレイは、その相対存在比が乳癌の存在、不存在、段階若しくは重篤度と相関するまたは乳癌の発症若しくは経過を予想する少なくとも一の選択された特徴からなり；および

(b) テストサンプルにおける各選択された特徴の存在比を、乳癌に冒されていない一人以上のヒトからの体液における前記選択された特徴の存在比と、または乳癌に冒されていない被検者の前記特徴に関して予め決定された参考範囲と、またはテストサンプルにおける少なくとも一の発現参考特徴(Expression Reference Feature) (ERF) の存在比と比較する

ことからなる、被検者において乳癌をスクリーニングする、診断する若しくは予想する、被検者における乳癌の段階若しくは重篤度を測定する、乳癌が発達する危険のある被検者を同定する、または乳癌を有する被検者に投与される治療の効果をモニターする方法。

【請求項2】 体液は血清または血漿である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該方法は乳癌のスクリーニングまたは診断を目的とするものであり、少なくとも一の選択された特徴の相対存在比は乳癌の存在または不存在と相関する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 該方法は乳癌を有する被検者に投与される治療の効果をモニターすることを目的とするものであり、少なくとも一の選択された特徴の相対存在比は乳癌の重篤度と相関する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】 段階(b)は、サンプルにおける各選択された特徴の存在比を、乳癌に冒されていない一人以上のヒトからの血清における前記選択された特徴の存在比とまたは乳癌に冒されていない被検者における前記特徴に関して予め決定された参考範囲と比較することからなる、請求項2に記載の方法。

【請求項6】 段階(b)は、下記乳癌関連特徴(Breast Cancer-Associated Feature) (BF) : BF - 1、BF - 2、BF - 3、BF - 4、BF - 5、BF - 7、BF - 8、BF - 9、BF - 10、BF - 12、BF - 13、BF - 14、BF - 15、BF - 16、BF - 17、BF - 18、BF - 19、BF - 2

0、BF - 22、BF - 23、BF - 26、BF - 27、BF - 28、BF - 29、BF - 30、BF - 31、BF - 32、BF - 33、BF - 34、BF - 35、BF - 36、BF - 37、BF - 38、BF - 39、BF - 40、BF - 41、BF - 42、BF - 43、BF - 44、BF - 45、BF - 46、BF - 47、BF - 48の一以上を定量的に検出することからなる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項7】 段階(a)は、等電点電気泳動さらにはドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)からなる、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 被検者からの血清または血漿のサンプルにおいて、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms)(BPI): BPI - 1、BPI - 5、BPI - 6、BPI - 9、BPI - 10、BPI - 11、BPI - 12、BPI - 13、BPI - 14、BPI - 19、BPI - 20、BPI - 21、BPI - 23、BPI - 24、BPI - 25、BPI - 27、BPI - 28、BPI - 29、BPI - 31、BPI - 32、BPI - 33、BPI - 34、BPI - 37、BPI - 40、BPI - 41、BPI - 42、BPI - 43、BPI - 44、BPI - 45、BPI - 46、BPI - 47、BPI - 48、BPI - 49、BPI - 50、BPI - 51、BPI - 52、BPI - 53、BPI - 54、BPI - 55、BPI - 56の少なくとも一を定量的に検出することからなる、被検者において乳癌をスクリーニングする、診断する若しくは予想する、被検者における乳癌の段階若しくは重篤度を測定する、乳癌が発達する危険のある被検者を同定する、または乳癌を有する被検者に投与される治療の効果をモニターする方法。

【請求項9】 定量的に検出する段階はサンプルの少なくとも一のアリコートを試験することからなり、該試験する段階は、
(a)アリコートを予め選択されたBPIに対して免疫特異的である抗体と接触させ;および
(b)抗体及びアリコート中の少なくとも一種間で生じる結合を定量的に測定することからなる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 定量的に検出する段階は複数の予め選択されたBPIの定量的な検出用の複数の抗体を用いて複数のアリコートを試験することからなる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 該一の抗体または複数の抗体はモノクローナル抗体である、請求項9または請求項10に記載の方法。

【請求項12】 下記単離された乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI) : BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-41、BPI-42、BPI-43、BPI-44、BPI-45、BPI-46、BPI-47、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56の一からなる製剤。

【請求項13】 請求項12に記載の少なくとも一の製剤からなるキット。

【請求項14】 下記配列：ECQを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項15】 タンパク質は約4.31の等電点(pI)及び約27930の見掛け分子量(MW)を有する、請求項14に記載の製剤。

【請求項16】 pIが4.31の10%以内であり、MWが27930の10%以内である、請求項15に記載の製剤。

【請求項17】 pIが4.31の5%以内であり、MWが27930の5%以内である、請求項15に記載の製剤。

【請求項18】 pIが4.31の1%以内であり、MWが27930の1%以内である、請求項15に記載の製剤。

【請求項19】 下記配列：CQATGFSPRまたはCQATGMSPRを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項20】 タンパク質は約6.44の等電点(pI)及び約4496

0の見掛け分子量(MW)を有する、請求項19に記載の製剤。

【請求項21】 pIが6.44の10%以内であり、MWが44960の10%以内である、請求項20に記載の製剤。

【請求項22】 pIが6.44の5%以内であり、MWが44960の5%以内である、請求項20に記載の製剤。

【請求項23】 pIが6.44の1%以内であり、MWが44960の1%以内である、請求項20に記載の製剤。

【請求項24】 下記配列：DDFまたはDDMを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項25】 下記配列：LEFFPR、IEFFPR、LEMFR、LEFMPR、LEMMPR、IEMFR、IEFMPR、またはIEMMPRを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項26】 単離されたタンパク質は、さらに下記配列：LEFFPR、IEFFPR、LEMFR、LEFMPR、LEMMPR、IEMFR、IEFMPR、またはIEMMPRを有するペプチドからなる請求項25に記載の製剤。

【請求項27】 タンパク質は約5.34の等電点(pI)及び約16620の見掛け分子量(MW)を有する、請求項24、25または26に記載の製剤。

【請求項28】 pIが5.34の10%以内であり、MWが16620の10%以内である、請求項27に記載の製剤。

【請求項29】 pIが5.34の5%以内であり、MWが16620の5%以内である、請求項27に記載の製剤。

【請求項30】 pIが5.34の1%以内であり、MWが16620の1%以内である、請求項27に記載の製剤。

【請求項31】 下記配列：ANまたはAGGを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項32】 タンパク質は約6.08の等電点(pI)及び約59520の見掛け分子量(MW)を有する、請求項31に記載の製剤。

【請求項33】 pIが6.08の10%以内であり、MWが59520の10%以内である、請求項32に記載の製剤。

【請求項34】 pIが6.08の5%以内であり、MWが59520の5%以内である、請求項32に記載の製剤。

【請求項35】 pIが6.08の1%以内であり、MWが59520の1%以内である、請求項32に記載の製剤。

【請求項36】 下記配列：VYQ、LLEN、LIEN、ILEN、IIEEN、LLEGG、LIEGG、ILEGG、IEGG、またはPAを有する一以上のペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項37】 タンパク質は約6.02の等電点(pI)及び約59410の見掛け分子量(MW)を有する、請求項36に記載の製剤。

【請求項38】 pIが6.02の10%以内であり、MWが59410の10%以内である、請求項37に記載の製剤。

【請求項39】 pIが6.02の5%以内であり、MWが59410の5%以内である、請求項37に記載の製剤。

【請求項40】 pIが6.02の1%以内であり、MWが59410の1%以内である、請求項37に記載の製剤。

【請求項41】 下記配列：CYCQKを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項42】 タンパク質は約7.27の等電点(pI)及び約30450の見掛け分子量(MW)を有する、請求項41に記載の製剤。

【請求項43】 pIが7.27の10%以内であり、MWが30450の10%以内である、請求項42に記載の製剤。

【請求項44】 pIが7.27の5%以内であり、MWが30450の5%以内である、請求項42に記載の製剤。

【請求項45】 pIが7.27の1%以内であり、MWが30450の1%以内である、請求項42に記載の製剤。

【請求項46】 下記配列：LDDYLN、LDDYIN、IDDYLN、IDDYIN、LDDYLGG、LDDYIGG、IDDYLGG、IDDYI

GG、HAQ、ELまたはEIを有する一以上のペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項47】 タンパク質は約5.97の等電点(pI)及び約91410の見掛け分子量(MW)を有する、請求項46に記載の製剤。

【請求項48】 pIが5.97の10%以内であり、MWが91410の10%以内である、請求項47に記載の製剤。

【請求項49】 pIが5.97の5%以内であり、MWが91410の5%以内である、請求項47に記載の製剤。

【請求項50】 pIが5.97の1%以内であり、MWが91410の1%以内である、請求項47に記載の製剤。

【請求項51】 下記配列：FGPVP RまたはMGPVP Rを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項52】 タンパク質は約4.79の等電点(pI)及び約47130の見掛け分子量(MW)を有する、請求項51に記載の製剤。

【請求項53】 pIが4.79の10%以内であり、MWが47130の10%以内である、請求項52に記載の製剤。

【請求項54】 pIが4.79の5%以内であり、MWが47130の5%以内である、請求項52に記載の製剤。

【請求項55】 pIが4.79の1%以内であり、MWが47130の1%以内である、請求項52に記載の製剤。

【請求項56】 下記配列：YCTまたはVVEEを有する一以上のペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項57】 タンパク質は約6.15の等電点(pI)及び約191760の見掛け分子量(MW)を有する、請求項56に記載の製剤。

【請求項58】 pIが6.15の10%以内であり、MWが191760の10%以内である、請求項57に記載の製剤。

【請求項59】 pIが6.15の5%以内であり、MWが191760の5%以内である、請求項57に記載の製剤。

【請求項60】 pIが6.15の1%以内であり、MWが191760の

1%以内である、請求項57に記載の製剤。

【請求項61】 下記配列：WLGD、DALGD、ADLGD、EGLGD、GELGD、VSLGD、SVLGD、WIGD、DAIGD、ADIGD、EGIGD、GEIGD、VSIIGD、SVIIGD、QCVVDFFR、QCVVDFMR、またはQCVVDMMRを有する一以上のペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項62】 タンパク質は約6.07の等電点(pI)及び約33400の見掛け分子量(MW)を有する、請求項61に記載の製剤。

【請求項63】 pIが6.07の10%以内であり、MWが33400の10%以内である、請求項62に記載の製剤。

【請求項64】 pIが6.07の5%以内であり、MWが33400の5%以内である、請求項62に記載の製剤。

【請求項65】 pIが6.07の1%以内であり、MWが33400の1%以内である、請求項62に記載の製剤。

【請求項66】 下記配列：WLQV、DALQV、ADLQV、EGLQV、GELQV、VSLQV、SVLQV、WIQV、DAIQV、ADIQV、EGIQV、GEIQV、VSIQV、SVIQV、YFV、YMV、WLQG、DALQG、ADLQG、EGLQG、GELQG、VSLQG、SVLQG、WIQG、DAIQG、ADIQG、EGIQG、GEIQG、VSIQG、またはSVIQGを有する一以上のペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項67】 タンパク質は約5.38の等電点(pI)及び約67290の見掛け分子量(MW)を有する、請求項66に記載の製剤。

【請求項68】 pIが5.38の10%以内であり、MWが67290の10%以内である、請求項67に記載の製剤。

【請求項69】 pIが5.38の5%以内であり、MWが67290の5%以内である、請求項67に記載の製剤。

【請求項70】 pIが5.38の1%以内であり、MWが67290の1%以内である、請求項67に記載の製剤。

【請求項71】 下記配列：DESLQVAERまたはDESIQVAERを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項72】 タンパク質は約4.98の等電点(pI)及び約35440の見掛け分子量(MW)を有する、請求項71に記載の製剤。

【請求項73】 pIが4.98の10%以内であり、MWが35440の10%以内である、請求項72に記載の製剤。

【請求項74】 pIが4.98の5%以内であり、MWが35440の5%以内である、請求項72に記載の製剤。

【請求項75】 pIが4.98の1%以内であり、MWが35440の1%以内である、請求項72に記載の製剤。

【請求項76】 下記配列：VHNまたはVHGGを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項77】 タンパク質は約5.13の等電点(pI)及び約20730の見掛け分子量(MW)を有する、請求項76に記載の製剤。

【請求項78】 pIが5.13の10%以内であり、MWが20730の10%以内である、請求項77に記載の製剤。

【請求項79】 pIが5.13の5%以内であり、MWが20730の5%以内である、請求項77に記載の製剤。

【請求項80】 pIが5.13の1%以内であり、MWが20730の1%以内である、請求項77に記載の製剤。

【請求項81】 下記配列：PFPまたはPMPを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項82】 タンパク質は約6.37の等電点(pI)及び約41260の見掛け分子量(MW)を有する、請求項81に記載の製剤。

【請求項83】 pIが6.37の10%以内であり、MWが41260の10%以内である、請求項82に記載の製剤。

【請求項84】 pIが6.37の5%以内であり、MWが41260の5%以内である、請求項82に記載の製剤。

【請求項85】 pIが6.37の1%以内であり、MWが41260の1

%以内である、請求項82に記載の製剤。

【請求項86】 下記配列：VPNまたはVPGGを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項87】 タンパク質は約6.20の等電点(pI)及び約67280の見掛け分子量(MW)を有する、請求項86に記載の製剤。

【請求項88】 pIが6.20の10%以内であり、MWが67280の10%以内である、請求項87に記載の製剤。

【請求項89】 pIが6.20の5%以内であり、MWが67280の5%以内である、請求項87に記載の製剤。

【請求項90】 pIが6.20の1%以内であり、MWが67280の1%以内である、請求項87に記載の製剤。

【請求項91】 下記配列：FF、FM、MF、MM、ENまたはEGGを有する一以上のペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項92】 タンパク質は約6.72の等電点(pI)及び約47550の見掛け分子量(MW)を有する、請求項91に記載の製剤。

【請求項93】 pIが6.72の10%以内であり、MWが47550の10%以内である、請求項92に記載の製剤。

【請求項94】 pIが6.72の5%以内であり、MWが47550の5%以内である、請求項92に記載の製剤。

【請求項95】 pIが6.72の1%以内であり、MWが47550の1%以内である、請求項92に記載の製剤。

【請求項96】 下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms)(BPI)：BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-41、BPI-42、BPI-43、BPI-44、BPI-45、BPI-46、BPI-47、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BP

I - 51、BPI - 52、BPI - 53、BPI - 54、BPI - 55、BPI - 56の一に免疫特異的に結合できる抗体。

【請求項97】 モノクローナル抗体である、請求項96に記載の抗体。

【請求項98】 BPIの他のイソ型よりも大きな親和性でBPIに結合する、請求項96または97に記載の抗体。

【請求項99】 BPIのいずれかの他のイソ型よりも大きな親和性でBPIに結合する、請求項96に記載の抗体。

【請求項100】 請求項96または97に記載の一以上の抗体からなるキット。

【請求項101】 治療上有効な量の請求項96または97に記載の抗体及び製薬上許容できる担体からなる薬剤組成物。

【請求項102】 治療上有効な量の請求項96または97に記載の抗体の断片または誘導体、この際、該断片または誘導体は抗体の結合ドメインを含む；
および
製薬上許容できる担体
からなる薬剤組成物。

【請求項103】 乳癌を処置または予防する必要のある被検者に、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI) : BPI - 1、BPI - 5、BPI - 6、BPI - 9、BPI - 10、BPI - 11、BPI - 12、BPI - 13、BPI - 14、BPI - 19、BPI - 20、BPI - 21、BPI - 23、BPI - 24、BPI - 25、BPI - 27、BPI - 28、BPI - 29、BPI - 31、BPI - 32、BPI - 33、BPI - 34、BPI - 37、BPI - 40、BPI - 41、BPI - 42、BPI - 43、BPI - 44、BPI - 45、BPI - 46、BPI - 47、BPI - 48、BPI - 49、BPI - 50、BPI - 51、BPI - 52、BPI - 53、BPI - 54、BPI - 55、BPI - 56の一をコード化する核酸を治療上有効な量投与することからなる乳癌を処置または予防する方法。

【請求項104】 乳癌を処置または予防する必要のある被検者に、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI

I) : B P I - 1、 B P I - 5、 B P I - 6、 B P I - 9、 B P I - 10、 B P I - 11、 B P I - 12、 B P I - 13、 B P I - 14、 B P I - 19、 B P I - 20、 B P I - 21、 B P I - 23、 B P I - 24、 B P I - 25、 B P I - 27、 B P I - 28、 B P I - 29、 B P I - 31、 B P I - 32、 B P I - 33、 B P I - 34、 B P I - 37、 B P I - 40、 B P I - 41、 B P I - 42、 B P I - 43、 B P I - 44、 B P I - 45、 B P I - 46、 B P I - 47、 B P I - 48、 B P I - 49、 B P I - 50、 B P I - 51、 B P I - 52、 B P I - 53、 B P I - 54、 B P I - 55、 B P I - 56の一以上の機能を阻害する核酸を治療上有効な量投与することからなる乳癌を処置または予防する方法。

【請求項105】 乳癌の処置または予防に使用される薬剤の製造における下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (B P I) : B P I - 1、 B P I - 5、 B P I - 6、 B P I - 9、 B P I - 10、 B P I - 11、 B P I - 12、 B P I - 13、 B P I - 14、 B P I - 19、 B P I - 20、 B P I - 21、 B P I - 23、 B P I - 24、 B P I - 25、 B P I - 27、 B P I - 28、 B P I - 29、 B P I - 31、 B P I - 32、 B P I - 33、 B P I - 34、 B P I - 37、 B P I - 40、 B P I - 41、 B P I - 42、 B P I - 43、 B P I - 44、 B P I - 45、 B P I - 46、 B P I - 47、 B P I - 48、 B P I - 49、 B P I - 50、 B P I - 51、 B P I - 52、 B P I - 53、 B P I - 54、 B P I - 55、 B P I - 56の一をコード化する治療上有効な量の核酸の使用。

【請求項106】 乳癌の処置または世像に使用される薬剤の製造における下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (B P I) : B P I - 1、 B P I - 5、 B P I - 6、 B P I - 9、 B P I - 10、 B P I - 11、 B P I - 12、 B P I - 13、 B P I - 14、 B P I - 19、 B P I - 20、 B P I - 21、 B P I - 23、 B P I - 24、 B P I - 25、 B P I - 27、 B P I - 28、 B P I - 29、 B P I - 31、 B P I - 32、 B P I - 33、 B P I - 34、 B P I - 37、 B P I - 40、 B P I - 41、 B P I - 42、 B P I - 43、 B P I - 44、 B P I - 45、 B P I - 46、 B P I -

47、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56の一以上の機能を阻害する治療上有効な量の核酸の使用。

【請求項107】 核酸はBPIアンチセンス核酸またはリボザイムである、請求項104または106に記載の方法。

【請求項108】 (a) BPI、BPIの生物学的に活性のある部分、またはBPI関連ポリペプチドを候補物質と接触させ；および

(b) 候補物質がBPI、BPIの断片、またはBPI関連ポリペプチドと相互作用するか否かを決定する

ことからなる、BPI、BPIの断片、またはBPI関連ポリペプチドと相互作用する物質のスクリーニング方法。

【請求項109】 BPI、BPIの断片、またはBPI関連ポリペプチドは細胞によって発現される、請求項106に記載の方法。

【請求項110】 細胞は組換えBPI、組換えBPIの断片、または組換えBPI関連ポリペプチドを発現する、請求項107に記載の方法。

【請求項111】 (a) BPIまたはBPI関連ポリペプチドを発現する細胞の第1集団を候補物質と接触させ；

(b) 該BPIまたは該BPI関連ポリペプチドを発現する細胞の第2集団をコントロール物質と接触させ；および

(c) 細胞の第1及び第2集団における該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドまたは該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNAのレベルを比較する、または細胞の第1及び第2集団における細胞の2次メッセンジャーの誘導のレベルを比較する

ことからなる、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの発現または活性を調節する物質のスクリーニング方法。

【請求項112】 該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチド、該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNA、または該細胞の2次メッセンジャーのレベルは、細胞の第2集団におけるより細胞の第1集団における方が大きい、請求項109に記載の方法。

【請求項113】 該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチド、該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNA、または該細胞の2次メッセンジャーのレベルは、細胞の第2集団におけるより細胞の第1集団における方が小さい、請求項109に記載の方法。

【請求項114】 (a) 候補物質を第1の哺乳動物または哺乳動物群に投与し；

(b) コントロール物質を第2の哺乳動物または哺乳動物群に投与し；および

(c) 第1及び第2の群におけるBPI若しくはBPI関連ポリペプチドのまたはBPI若しくはBPI関連ポリペプチドをコード化するmRNAの発現のレベルを比較する

ことからなる、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの発現または活性を調節する物質のスクリーニングまたは同定方法。

【請求項115】 哺乳動物は乳癌の動物モデルである、請求項112に記載の方法。

【請求項116】 該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチド、該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNA、または該細胞の2次メッセンジャーの発現のレベルは、第2の群におけるより第1の群における方が大きい、請求項112または113に記載の方法。

【請求項117】 該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチド、該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNA、または該細胞の2次メッセンジャーの発現のレベルは、第2の群におけるより第1の群における方が小さい、請求項112または113に記載の方法。

【請求項118】 第1及び第2の群における該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチド、該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNA、または該細胞の2次メッセンジャーのレベルを、さらに正常なコントロール哺乳動物における該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドまたは該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNAのレベルに比較する、請求項112に記載の方法。

【請求項119】 該候補物質の投与は、第1の群における該BPI若しく

は該BPI関連ポリペプチド、または該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNA、または該細胞の2次メッセンジャーのレベルを、第2の群における該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドまたは該mRNAまたは該細胞の2次メッセンジャーのレベルになるように調節する、請求項112に記載の方法。

【請求項120】 該哺乳動物は乳癌を有するヒト被検者である、請求項112～117のいずれか1項に記載の方法。

【請求項121】 (a) 候補物質をBPIまたはBPI関連ポリペプチドと接触させ；および

(b) 存在する際には、前記物質及びBPIまたはBPI関連ポリペプチド間の結合を定量的に検出する

ことからなる、BPIまたはBPI関連ポリペプチドと相互作用する物質のスクリーニングまたは同定方法。

【請求項120】 (a) 第1のアリコートにおいて、候補物質をBPIまたはBPI関連ポリペプチドと接触させ、および

(b) 候補物質の添加後の第1のアリコートにおけるBPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性を、コントロールのアリコートにおけるBPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性と、または予め決定された参考範囲と比較する

ことからなる、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性を調節する物質のスクリーニングまたは同定方法。

【請求項121】 BPIまたはBPI関連ポリペプチドは組換タンパク質である、請求項119または120に記載の方法。

【請求項122】 BPIまたはBPI関連ポリペプチドは固相に固定化される、請求項119～121のいずれか1項に記載の方法。

【請求項123】 BPI-41、BPI-42、BPI-43、BPI-44、BPI-45、BPI-46、BPI-47、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56またはこれらの補体をコード化するヌクレオチド配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項124】 B P I - 4 1、B P I - 4 2、B P I - 4 3、B P I - 4 4、B P I - 4 5、B P I - 4 6、B P I - 4 7、B P I - 4 8、B P I - 4 9、B P I - 5 0、B P I - 5 1、B P I - 5 2、B P I - 5 3、B P I - 5 4、B P I - 5 5、B P I - 5 6またはこれらの補体の少なくとも10個の連続したアミノ酸をコード化するヌクレオチド配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項125】 請求項123または124に記載の核酸分子からなるベクター。

【請求項126】 請求項125に記載のベクターからなる宿主細胞。

【請求項127】 請求項123または124に記載の核酸分子を発現するように遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項128】 (a) B P I - 1、B P I - 5、B P I - 6、B P I - 9、B P I - 1 0、B P I - 1 1、B P I - 1 2、B P I - 1 3、B P I - 1 4、B P I - 1 9、B P I - 2 0、B P I - 2 1、B P I - 2 3、B P I - 2 4、B P I - 2 5、B P I - 2 7、B P I - 2 8、B P I - 2 9、B P I - 3 1、B P I - 3 2、B P I - 3 3、B P I - 3 4、B P I - 3 7、B P I - 4 0、B P I - 4 1、B P I - 4 2、B P I - 4 3、B P I - 4 4、B P I - 4 5、B P I - 4 6、B P I - 4 7、B P I - 4 8、B P I - 4 9、B P I - 5 0、B P I - 5 1、B P I - 5 2、B P I - 5 3、B P I - 5 4、B P I - 5 5、B P I - 5 6から選択されるB P Iをコード化するヌクレオチド配列に相補的である10個以上の連続したヌクレオチドからなる少なくとも一のオリゴヌクレオチドプローブを、被検者からの生体試料から得られたRNAと、または前記RNAから複製されたcDNAと接触させ、この際、該接触は存在する場合にはヌクレオチド配列とのプローブのハイブリッド形成が行なえる条件下で起こる；

(b) 存在する際には、プローブ及びヌクレオチド配列間のハイブリッド形成を検出し；および

(c) 存在する際には、段階(b)で検出されたハイブリッド形成を、コントロールサンプルで検出されたハイブリッド形成と、または予め決定された参考範囲と比較する

ことからなる、被検者における乳癌をスクリーニングする、診断する若しくは予想するまたは被検者に投与された抗乳癌剤若しくは治療の効果をモニターする方法。

【請求項129】 段階(a)は、BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-41、BPI-42、BPI-43、BPI-44、BPI-45、BPI-46、BPI-47、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56から選択されるBPIをコード化するヌクレオチド配列に相補的である10個以上の連続したヌクレオチドからなる複数のオリゴヌクレオチドプローブを、被検者からの生体試料から得られたRNAと、または前記RNAから複製されたcDNAと接触させ、この際、該接触は存在する場合にはヌクレオチド配列とのプローブのハイブリッド形成が行なえる条件下で起こるからなる、請求項128に記載の方法。

【請求項130】 段階(a)は、ヌクレオチド配列をDNAアレイにハイブリッド形成する段階を含み、アレイの一以上は別個のBPIをコード化する複数のヌクレオチド配列に相補的であるプローブである、請求項128に記載の方法。

【請求項131】 非常にストリンジントな条件または適度にストリンジントな条件下で、下記核酸配列：GARTGYCARにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項132】 非常にストリンジントな条件または適度にストリンジントな条件下で、下記核酸配列：GAGTGCCAGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項133】 非常にストリンジントな条件または適度にストリンジントな条件下で、下記核酸配列：TGYCARGCNACNGGNTTYWS

NCCNMGNまたはTG YCARGCNACNGGNATGWSNCCNMGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項134】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TGCCAGGCCACCGGCTTCAGCCCCGCまたはTGCCAGGCCACCGGCATGAGCCCCGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項135】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GAYGAYTTYまたはGAYGAYATGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項136】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：YTNGARTTYTTYCCNMGN、ATHGARTTYTTYCCNMGN、YTNGARATGTTYCCNMGN、YTNGARTTYATGCCNMGN、YTNGARAGTAGTCCNMGN、ATHGARATGTTYCCNMGN、ATHGARTTYATGCCNMGN、またはATHGARATGATGCCNMGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項137】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：YTNGARTTYTTYCCNMGN、ATHGARTTYTTYCCNMGN、YTNGARATGTTYCCNMGN、YTNGARTTYATGCCNMGN、YTNGARAGTAGTCCNMGN、ATHGARATGTTYCCNMGN、ATHGARTTYATGCCNMGN、またはATHGARATGATGCCNMGNにもハイブリッド形成する、請求項135に記載の単離された核酸分子。

【請求項138】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GACGACTTCまたはGACGACATGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項139】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CTGGAGTTCTTCCCCCGC、ATCGAGTTCTTCCCCCGC、CTGGAGATGTTCCCCCGC

、CTGGAGTTCATGCCCCGC、CTGGAGAGTAGTCCCCGC、ATCGAGATGTTCCCCCGC、ATCGAGTTCATGCCCCGC、またはATCGAGATGATGCCCCGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項140】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CTGGAGTTCCTCCCCGC、ATCGAGTTCCTCCCCCGC、CTGGAGATGTTCCCCCGC、CTGGAGTTCATGCCCCGC、CTGGAGAGTAGTCCCCGC、ATCGAGATGTTCCCCCGC、ATCGAGTTCATGCCCCGC、またはATCGAGATGATGCCCCGCにもハイブリッド形成する、請求項138に記載の単離された核酸分子。

【請求項141】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GCNAAYまたはGCNGGNGGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項142】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GCCAACまたはGCCGGCGGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項143】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GTNTAYCARにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項144】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：YTN YTNGARAAY、YTNATHGARAAY、ATHYTNGARAAY、ATHATHGARAAY、YTN YTNGARGGNGGN、YTNATHGARGGNGGN、ATHYTNGARGGNGGN、ATHATHGARGGNGGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項145】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CCNGCNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項146】 核酸は、非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、下記核酸配列：Y T N Y T N G A R A A Y、Y T N A T H G A R A A Y、A T H Y T N G A R A A Y、A T H A T H G A R A A Y、Y T N Y T N G A R G G N G G N、Y T N A T H G A R G G N G G N、A T H Y T N G A R G G N G G N、A T H A T H G A R G G N G G Nにもハイブリッド形成する、請求項143に記載の単離された核酸分子。

【請求項147】 核酸は、非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、下記核酸配列：C C N G C Nにもハイブリッド形成する、請求項143に記載の単離された核酸分子。

【請求項148】 核酸は、非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、下記核酸配列：Y T N Y T N G A R A A Y、Y T N A T H G A R A A Y、A T H Y T N G A R A A Y、A T H A T H G A R A A Y、Y T N Y T N G A R G G N G G N、Y T N A T H G A R G G N G G N、A T H Y T N G A R G G N G G N、A T H A T H G A R G G N G G Nにもハイブリッド形成し、さらに非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、下記核酸配列：C C N G C Nにもハイブリッド形成する、請求項143に記載の単離された核酸分子。

【請求項149】 核酸は、非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、下記核酸配列：C C N G C Nにもハイブリッド形成する、請求項144に記載の単離された核酸分子。

【請求項150】 非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、下記核酸配列：G T G T A C C A Gにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項151】 非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、下記核酸配列：C T G C T G G A G A A C、C T G A T C G A G A A C、A T C C T G G A G A A C、A T C A T C G A G A A C、C T G C T G G A G G G C G G C、C T G A T C G A G G G C G G C、A T C C T G G A G G G C G G C、またはA T C A T C G A G G G C G G Cにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項152】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CCCCGCCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項153】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CTGCTGGAGAAC、CTGATCGAGAAC、ATCCTGGAGAAC、ATCATCGAGAAC、CTGCTGGAGGGCGGC、CTGATCGAGGGCGGC、ATCCTGGAGGGCGGC、またはATCATCGAGGGCGGCにもハイブリッド形成する、請求項150に記載の単離された核酸分子。

【請求項154】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CCCCGCCにもハイブリッド形成する、請求項150に記載の単離された核酸分子。

【請求項155】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CTGCTGGAGAAC、CTGATCGAGAAC、ATCCTGGAGAAC、ATCATCGAGAAC、CTGCTGGAGGGCGGC、CTGATCGAGGGCGGC、ATCCTGGAGGGCGGC、またはATCATCGAGGGCGGCにもハイブリッド形成し、さらに非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CCCCGCCにもハイブリッド形成する、請求項150に記載の単離された核酸分子。

【請求項156】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CCCCGCCにもハイブリッド形成する、請求項151に記載の単離された核酸分子。

【請求項157】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TGYTAYTGYCARAARにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項158】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TGCTACTGCCAGAAGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項159】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：YTNGAYGAYTAYYTNAAY、YTNGAYGAYTAYATHAAY、ATHGAYGAYTAYYTNAAY、ATHGAYGAYTAYATHAAY、YTNGAYGAYTAYYTNGGNGGN、YTNGAYGAYTAYATHGGNGGN、ATHGAYGAYTAYYTNGGNGGN、またはATCGAYGAYTAYATHGGNGGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項160】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CAYGCNCARにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項161】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GARYTNまたはGARATHにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項162】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CAYGCNCARにもハイブリッド形成する、請求項159に記載の単離された核酸分子。

【請求項163】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GARYTNまたはGARATHにもハイブリッド形成する、請求項159に記載の単離された核酸分子。

【請求項164】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CAYGCNCARにもハイブリッド形成し、さらに非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GARYTNまたはGARATHにもハイブリッド形成する、請求項159に記載の単離された核酸分子。

【請求項165】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GARYTNまたはGARATHにもハイブリッド形成する、請求項160に記載の単離された核酸分子。

【請求項166】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CTGGACGACTACCTGAAC、C

TGGACGACTACATCAAC、ATCGACGACTACCTGAAC、ATCGACGACTACATCAAC、CTGGACGACTACCTGGGCGGC、CTGGACGACTACATCGGCGGC、ATCGACGACTACCTGGGCGGC、またはATCGACGACTACATCGGCGGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項167】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CACGCCCAGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項168】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GAGCTGまたはGAGATCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項169】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GAGCTGまたはGAGATCにもハイブリッド形成する、請求項167に記載の単離された核酸分子。

【請求項170】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TTYGGNCCNGTNCCNMGNまたはATGGGNCCNGTNCCNMGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項171】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TTCGGCCCCGTGCCCCGCまたはATGGGCCCCCCGTGCCCCGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項172】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TAYTGYACNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項173】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GTNGTNGARGARにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項174】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にス

トリンジエントな条件下で、下記核酸配列：GTNGTNGARGARにもハイブリッド形成する、請求項173に記載の単離された核酸分子。

【請求項175】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：TACTGCACCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項176】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：GTGGTGGAGGAGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項177】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：TGGYTNGGNGAY、GAYGCNYTNGGNGAY、GCNGAYYTNGGNGAY、GARGGNYTNGGNGAY、GGNGARYTNGGNGAY、GTNWSNYTNGGNGAY、WSNGTNYTNGGNGAY、TGGATHGGNGAY、GAYGCNATHGGNGAY、GCNGAYATHGGNGAY、GARGGNATHGGNGAY、GGNGARATHGGNGAY、GTNWSNATHGGNGAY、またはWSNGTNATHGGNGAYにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項178】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：CARTGYGTNGTNGAYTTYTTYMGN、CARTGYGTNGTNGAYATGTTYMGN、CARTGYGTNGTNGAYTTYATGMGN、またはCARTGYGTNGTNGAYATGATGMGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項179】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：TGGCTGGGCGAC、GACGCCCTGGGCGAC、GCCGACCTGGGCGAC、GAGGGCCTGGGCGAC、GGCGAGCTGGGCGAC、GTGAGCCTGGGCGAC、AGCGTGCTGGGCGAC、TGGATCGGCGAC、GACGCCATCGGCGAC、GCCGACATCGGCGAC、GAGGGCATCGGCGAC、GGCGAGATCGGCGAC、GTGAGCATCGGCGA

C、またはAGCGTGATCGGCGACにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項180】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CAGTGCGTGGTGGACTTCTTCCGC、CAGTGCGTGGTGGACATGTTCCGC、CAGTGCGTGGTGGACTTTCATGCGC、またはCAGTGCGTGGTGGACATGATGCGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項181】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TGGYTNCARGTN、GAYGCNYTNCARGTN、GCNGAYYTNCARGTN、GARGGNYTNCAARGTN、GGNGARYTNCARGTN、GTNWSNYTNCARGTN、WSNGTNYTNCARGTN、TGGATHCARGTN、GAYGCNATHCARGTN、GCNGAYATHCARGTN、GARGGNATHCARGTN、GGNGARATHCARGTN、GTNWSNATHCARGTN、またはWSNGTNATHCARGTNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項182】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TAYTTYGTNまたはTAYATGGTNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項183】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TGGYTNCARGGN、GAYGCNYTNCARGGN、GCNGAYYTNCARGGN、GARGGNYTNCAARGGN、GGNGARYTNCARGGN、GTNWSNYTNCARGGN、WSNGTNYTNCARGGN、TGGATHCARGGN、GAYGCNATHCARGGN、GCNGAYATHCARGGN、GARGGNATHCARGGN、GGNGARATHCARGGN、GTNWSNATHCARGGN、またはWSNGTNATHCARGGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項184】 核酸は、非常にストリンジェントな条件または適度にス

トリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T A Y T T Y G T NまたはT A Y A T G G T Nにもハイブリッド形成する、請求項183に記載の単離された核酸分子。

【請求項185】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T G G C T G C A G G T G、G A C G C C C T G C A G G T G、G C C G A C C T G C A G G T G、G A G G G C C T G C A G G T G、G G C G A G C T G C A G G T G、G T G A G C C T G C A G G T G、A G C G T G C T G C A G G T G、T G G A T C C A G G T G、G A C G C C A T C C A G G T G、G C C G A C A T C C A G G T G、G A G G G C A T C C A G G T G、G G C G A G A T C C A G G T G、G T G A G C A T C C A G G T G、またはA G C G T G A T C C A G G T Gにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項186】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T A C T T C G T GまたはT A C A T G G T Gにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項187】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T G G C T G C A G G G C、G A C G C C C T G C A G G G C、G C C G A C C T G C A G G G C、G A G G G C C T G C A G G G C、G G C G A G C T G C A G G G C、G T G A G C C T G C A G G G C、A G C G T G C T G C A G G G C、T G G A T C C A G G G C、G A C G C C A T C C A G G G C、G C C G A C A T C C A G G G C、G A G G G C A T C C A G G G C、G G C G A G A T C C A G G G C、G T G A G C A T C C A G G G C、またはA G C G T G A T C C A G G G Cにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項188】 核酸は、非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T A C T T C G T GまたはT A C A T G G T Gにもハイブリッド形成する、請求項187に記載の単離された核酸分子。

【請求項189】 核酸は、非常にストリンジエントな条件または適度にス

トリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T A C T T C G T GまたはT A C A T G G T Gにもハイブリッド形成し、さらに非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T G G C T G C A G G G C、G A C G C C C T G C A G G G C、G C C G A C C T G C A G G G C、G A G G G C C T G C A G G G C、G G C G A G C T G C A G G G C、G T G A G C C T G C A G G G C、A G C G T G C T G C A G G G C、T G G A T C C A G G G C、G A C G C C A T C C A G G G C、G C C G A C A T C C A G G G C、G A G G G C A T C C A G G G C、G G C G A G A T C C A G G G C、G T G A G C A T C C A G G G C、またはA G C G T G A T C C A G G G Cにもハイブリッド形成する、請求項223に記載の単離された核酸分子。

【請求項190】 核酸は、非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：T G G C T G C A G G G C、G A C G C C C T G C A G G G C、G C C G A C C T G C A G G G C、G A G G G C C T G C A G G G C、G G C G A G C T G C A G G G C、G T G A G C C T G C A G G G C、A G C G T G C T G C A G G G C、T G G A T C C A G G G C、G A C G C C A T C C A G G G C、G C C G A C A T C C A G G G C、G A G G G C A T C C A G G G C、G G C G A G A T C C A G G G C、G T G A G C A T C C A G G G C、またはA G C G T G A T C C A G G G Cにもハイブリッド形成する、請求224に記載の単離された核酸分子。

【請求項191】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：G A Y G A R W S N Y T N C A R G T N G C N G A R M G NまたはG A Y G A R W S N A T H C A R G T N G C N G A R M G Nにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項192】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：G A C G A G A G C C T G C A G G T G G C C G A G C G CまたはG A C G A G A G C A T C C A G G T G G C C G A G C G Cにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項193】 非常にストリンジエントな条件または適度にストリンジエントな条件下で、下記核酸配列：G T N C A Y A A YまたはG T N C A Y G G

NGGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項194】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GTGCACAACまたはGTGCACGGCGGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項195】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CCNTTYCCNまたはCCNATGCCNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項196】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：CCCTTCCCCまたはCCCATGCCCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項197】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GTNCCNAAYまたはGTNCCNGGNGGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項198】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GTGCCCAACまたはGTGCCCGGCGGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項199】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TTYTTY、TTYATG、ATGTTY、またはATGATGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項200】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GARAAYまたはGARGGNGGNにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項201】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：TTC TTC、TTCATG、ATG TTC、またはATGATGにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項202】 非常にストリンジェントな条件または適度にストリンジェントな条件下で、下記核酸配列：GAGAACまたはGAGGGCGGCにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

イントロダクション

本発明は、乳癌の疾病素質ならびにその発症及び発達に関連するタンパク質及びタンパク質イソ型の、ならびにこれをコード化する遺伝子の同定に、ならびに臨床上のスクリーング、診断、予想、治療及び予防への、さらには薬剤のスクリーニング及び薬剤の開発へのこれらの使用に関するものである。

【0002】

発明の背景

乳癌は、米国において女性の間で最も頻繁に診断される非皮膚癌である。それは癌関与の死因として肺癌の次に多い。1997年にはおよそ180,000件の新たな乳癌が診断されるであろうし、約44,000人の女性がその病気により死亡することが予想される(ナショナル キャンサー インスティテュート(National Cancer Institute)、www.nci.org、米国、1999年)。英国において、乳癌は、女性にとってかなり最も一般的であり、新たに34,600件が1998年に存在している(キャンサー リサーチ キャンペーン(Cancer Research Campaign)、www.crc.org、英国、2000年)。乳癌の99パーセントは女性で発症している。乳癌発達のリスクは、年齢に応じて着実に増加する；乳癌発達による寿命へのリスクは、米国の女性に関して、8人中1人であると見積もられている。米国における乳癌治療の年間コストはおよそ100億ドルである(Fuqua等、2000年、アメリカン アソシエーション フォー リサーチ(American Association for Cancer Research)、www.aacr.org、米国)。乳癌の発病率は、過去50年間上昇しつづけてきたが、近年はプラトーになっている。これは乳房撮影による乳癌の早期発見の期間を反映したものである。多くの既存の要因が、女性がこの病気を持つことのリスクを増加させうる。これらとしては、老齡、以前の乳癌の病歴、著しい放射線照射、家族の強力な乳癌の病歴、上位の社会経済的クラス(upper socioeconomic class)、未産、早い月経開始、遅い閉経、または30歳を超える初妊娠の年齢が挙げられる。若いころの経口避妊薬の長期間の使用はわずかにリスクを高めるようである。長期間の閉経後のエス

トロゲン補充は、リスクを20%から40%に高める。初潮年齢の低下、出産パターンの変化、または外因性エストロゲン使用の増加が乳癌発病率の増加に寄与していることが推測されている（フクア（Fuqua）等、2000年、アメリカン アソシエーション フォー キャンサー リサーチ（American Association for Cancer Research）、www.aacr.org、米国）。

【0003】

乳癌の原因

乳癌は異質な病気である。女性ホルモンが多くの乳房腫瘍の発症と進行を駆り立てる重要な役割を果たしているが、その他の認識され、不明の関連要因が数多く存在する。同定された腫瘍遺伝子における摂動としては、HER-2および上皮成長因子受容体遺伝子の増幅、およびサイクリンD1の過剰発現がある。これらの腫瘍遺伝子の過剰発現は、非常に悪い予後に関与してきた。同様に、遺伝子的な変化またはp53遺伝子のような腫瘍のサプレッサー遺伝子の欠損が乳癌においてよく知られており、悪い予後にも関連してきた。研究者らは、閉経前の家族性乳癌を予測する、BRCA1およびBRCA2と呼ばれる、2種の遺伝子を同定した。遺伝的なリスクの判断が現在可能であり、これは化学的予防試験のための候補物質の同定を促進する（Fuqua等、2000年、アメリカン アソシエーション フォー キャンサー リサーチ（American Association for Cancer Research）、www.aacr.org、米国）。

【0004】

診断

乳癌の早期診断は、最も好ましい治療成果を確実にするために非常に重要である。先進のヘルスケアシステムを有する多くの国では、乳癌のスクリーニングプログラムを行っている。これは、具体的には、この年齢間において最大の利益がみられる50～60歳の間の乳房の定期的なX線（乳房撮影）の形態をとる。当局者によっては、このようなプログラムを60歳超および40～49歳群まで拡張することを提唱している。多くの国の衛生に関する当局者はまた、女性による定期的な乳房自己診断をも促進させている。これらスクリーニング方法の間に検出された異常や症状として現れているケースは、一般的に、細胞吸引による細胞

分析、触知不可能な病巣に対する定位若しく超音波技術によるコアニードルバイオプシー、または切開若しくは切除生検によって確認される。同時に、治療のオプション及び予後に関する他の情報、例えば、エストロゲン受容体（ER）やプロゲステロン受容体（PR）の状態などが測定される（ナショナル・キャンサー・インスティテュート（National Cancer Institute）、米国、2000年、ブレスト・キャンサーPDQ（Breast Cancer PDQ）、www.nci.org）。

【0005】

病気の進捗および予後

進捗は、どの程度癌が広がっているかを見つけるプロセスである。アメリカン・ジョイント・コミッティー・オン・キャンサー（American Joint Committee on Cancer）（AJCC）の進捗システムは、TNMシステムとして知られており、乳癌に関して最も頻繁に用いられているものである。進捗のためのTNMシステムは、情報に関する3つの重要要素がある。

【0006】

0～4の数に続く、Tの文字は、腫瘍の大きさおよび乳房の下の皮膚または胸壁への拡がりを記載する。より大きい数字は、より大きい腫瘍および/または乳房付近の組織へのより広い拡がりを意味する。

【0007】

0～3の数に続く、Nの文字は、癌が乳房付近のリンパ節に広がっているかどうか、及びもし広がっているならば、その罹患した節が腕の下の他の組織に癒着しているかどうかを示す。

【0008】

0または1に続く、Mの文字は、癌が、他の器官または乳房と隣り合っていないリンパ節に転移しているかどうかを示す。

【0009】

この情報をいくらか明解にするために、TNMの表記は、段階0～IV（0～4）と標識された、段階のより簡単なセットにグループ分けすることができる。一般的に、数が小さければ、癌の拡がりも少ない。段階IV（4）のように数が大きければ、より深刻な癌であることを意味する（アメリカン・キャンサー・ソ

サイエティ (American Cancer Society)、2000年、米国、www.cancer.org)。

【0010】

段階による乳癌生存率	
段階	5年の相対的生存率
0	100%
I	98%
IIA	88%
IB	76%
IIIA	56%
IIIB	49%
IV	16%

(アメリカン キャンサー ソサエティ、2000年、米国、www.cancer.org)

【0011】

解剖段階 (原発腫瘍の大きさ、腋窩リンパ節の関与) は重要な予後の要因であるが、他の特徴は予測値でもよい。例えば、ナショナル サージカル アジュバント ブレスト アンド ボウエル プロジェクト (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) (NSABP) 及びザ インターナショナル ブレスト キャンサー スタディ グループ (the International Breast Cancer Study Group) (IBCSG) の研究は、腫瘍の核グレード (nuclear grade) および組織学的グレードは、それぞれ、乳癌用合併療法による結果を示す重要な指標であることを示す。エストロゲン受容体の状態及び原発腫瘍の増殖能の測定 (S相および倍数性のチミジン標識指数またはフローサイトメトリー測定) が重要な独立して予想値を有するという実質的な証拠がある。段階IIの病気では、PRの状態は、ERの状態よりも大きい予後的意義を有する。腫瘍の血管新生、c-erbB-2、c-myc、p53の発現、及びリンパ管浸潤もまた、乳癌の患者において予後的指標である(ナショナル キャンサー インスティテュート、米国、2000年、ブレスト キャンサー PDQ、www.nci.org を参照)。

【0012】

乳癌の検出および治療における改良された診療道具の必要性

利点が公的な認識プログラムと組み合わせられたターゲット化した乳房撮影及び自己診断等の既存のスクリーニング方法をより積極的に適用することにより生じる兆候はあるものの、できる限り早期に乳癌を検出するためにはこれらのアプローチでは限界がある。乳房撮影スクリーニングの拡張やより幅広い年齢群への拡大を制限する重要な因子はコストである。乳房撮影は、高価なX線装置及びそれを操作し乳房造影図を解釈する高度に訓練された専門家を必要とする。加えて、現在、乳房撮影で検出された疑わしい病巣はバイオプシーによって良性であると確認されるまたは明確にされる必要がある。これは、その後に専門的な組織学的検査や解釈を必要とする侵襲性方法であり、最終的な診断を遅らせる。乳癌と診断されたら、病気を安定化させるまたは取り除く外科手術、放射線および化学療法のような治療介入の成功を確立することは困難である。寛解中の患者における残りの病気の程度を決定し、進行性の病気に再発の重要な早期発見をすることは特に困難でありうる。乳癌をスクリーニングし、存在を確認すること、ならびに治療に対する応答をモニターすることは、血清サンプルで病気を検出できる信頼できかつ高感度の試験を用いることによって大いに助けられ得る。

【0013】

病気の検出における血清タンパク質の変化

潜在的に診断および病気のモニターを補助できる血清タンパク質パターンには2つのタイプの変化がある。その1つは、癌細胞から血清に放出された通常は存在しない新規タンパク質を血清で検出することである。診断の有意性を有し得る変化の第2のタイプは、病気に応答して体で生産される血清中の特異的な反応性タンパク質を検出することである。いくつかの乳癌細胞によって血清中に放出され得るタンパク質の例としては、c - e r b B 2 / H E R 2 / n e uとして知られている成長因子レセプターの断片があり、これは正常な乳房細胞 (breast cell) の表面には少量で存在するが乳癌によってははるかに高レベルで存在する (Payne et al., 2000, Clin. Chem. 46:175-182)。診断のまたは予後の有意性を有する癌によって血清中に放出されるタンパク質の第2の例としては、前立腺血清抗原 (prostate serum antigen) またはP S Aがあり、これは前立腺癌の診断お

よびモニターに用いられるものである(Fowler et al., 2000, J. Urol. 163:813-818)。診断のまたは予後の有意性を有する数種の癌によって血清中に放出されるタンパク質の更なる例としては、癌 - 胎芽抗原 (carcino-embryonic antigen) またはC E Aがある(Lumachi et al., 1999, Anticancer Res, 5C: 4485-4489)。診断に関するこれらのマーカーの一般的な価値は、それらの特異性および感度が不十分であるために限定されており、これらの基準を十分に満たす新しいマーカーを見出す必要がある。

【0014】

一括して急性期タンパク質と呼ばれる多くの反応性タンパク質は、癌等の組織の損傷または感染に反応して放出されるIL-1のような初期の「アラーム」炎症媒介物 (early "alarm" inflammatory mediator) に反応して血清中で濃度を劇的に増加または減少する。診断のまたは予後の有意性を有する病気に反応して血清中に存在する反応性タンパク質の例としては、リウマチ性関節炎における血清アミロイドA (serum amyloid A) またはS A Aがある(Cunnane et al., 2000, J. Rheumatol. 27:56-63)。このようなタンパク質の選択された例の高感度の検出も乳癌の診断を補助し得る。他の疾患が乳癌と共に発症する高い割合、検出するのに時間がかかる性質、かなり不十分な試験、およびそれらが高価であるために、乳癌の陽性診断を導き出すまたは識別診断から乳癌を排除することに役立つ血清、血液または尿のサンプル中の一つの物質または複数の物質を測定することが切望されている。

【0015】

したがって、診断のための、高感度かつ特異的なバイオマーカーとしての乳癌関連タンパク質を同定し、重篤度を評価し、生存する被検者において乳癌の発症を予想し、および乳癌の治療をモニターする必要がある。加えて、迅速に、潜在的に、特異的に作用しかつ副作用がより少ない乳癌のための新しい治療剤の明確な必要性がある。

【0016】

発明の要約

本発明は、乳癌の臨床的なスクリーニング、診断、予想、治療および予防のた

めの、乳癌処置の有効性をモニターするための、臨床試験における参加者を選択するための、特定の治療的処置に最も反応しやすい患者を選択するための、および乳癌の治療薬をスクリーニングし開発するための方法および組成物を提供するものである。

【0017】

本発明の第一の態様は、2次元電気泳動により血清サンプルを分析して、少なくとも一の乳癌関連特徴(Breast Cancer-Associated Feature)(BF)、例えば本明細書で開示される一以上のBF、またはそれらの組み合わせの存在またはレベルを検出することからなる乳癌を診断する方法を提供することである。これらの方法はまた、治療の結果を臨床的にスクリーニングし、予想し、モニターする、特別な治療処置に最も反応しやすい患者を同定し、薬剤をスクリーニングおよび開発し、ならびに薬剤処置の新規なターゲットを同定するのに適している。

【0018】

本発明の第二の態様は、少なくとも一の乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoform)(BPI)、例えば本明細書で開示される一以上のBPIまたはそれらの組み合わせの存在またはレベルを血清サンプル中で検出することからなる乳癌を診断する方法を提供することである。これらの方法はまた、療の結果を臨床的にスクリーニングし、予想し、モニターする、特別な治療処置に最も反応しやすい患者を同定し、薬剤をスクリーニングおよび開発し、ならびに薬剤処置の新規なターゲットを同定するのに適している。

【0019】

本発明の第三の態様は、BPI、例えば本明細書で開示されるBPIに免疫特異的に結合することのできるモノクローナルおよびポリクローナル抗体を提供することである。

【0020】

本発明の第四の態様は、単離されたBPI、すなわちBPIと有意に異なる等電点または有意に異なる見かけの分子量を有するタンパク質またはタンパク質イソ型を含まないBPIからなる製剤を提供することである。

【0021】

本発明の第五の態様は、乳癌の発症または発達を防止または遅延し、乳癌の進行を防止または遅延し、または乳癌の症状を改善するために、被検者に、乳癌を有する被検者におけるBPIの発現もしくは活性（例えば、酵素または結合活性）またはその両方を調節する（すなわち、アップレギュレートするまたはダウンレギュレートする）、治療上有効な量の薬剤を投与することからなる、乳癌を処置する方法を提供することである。

【0022】

本発明の第六の態様は、BPI、BPI類似体、もしくはBPI関連ポリペプチドの発現または酵素もしくは結合活性を調節する（すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）薬剤のスクリーニング方法を提供することである。

【0023】

3.1. 定義

本明細書で用いられる「BPI類似体」という用語は、BPIと同様のまたは同一の機能を有するが、BPIのアミノ酸配列と同様のまたは同一のアミノ酸配列を有するまたはBPIと同様のまたは同一の構造を有する必要が必ずしもないポリペプチドを意味する。本明細書で用いられる、ポリペプチドのアミノ酸配列は、以下に示す少なくとも一つの基準を満たしていれば、BPIと「同様である」：(a) ポリペプチドは、BPIのアミノ酸配列と少なくとも30%（より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%）同一であるアミノ酸配列を有する；(b) ポリペプチドは、BPIの少なくとも5個のアミノ酸残基（より好ましくは、少なくとも10個のアミノ酸残基、少なくとも15個のアミノ酸残基、少なくとも20個のアミノ酸残基、少なくとも25個のアミノ酸残基、少なくとも40個のアミノ酸残基、少なくとも50個のアミノ酸残基、少なくとも60個のアミノ酸残基、少なくとも70個のアミノ酸残基、少なくとも80個のアミノ酸残基、少なくとも90個のアミノ酸残基、少なくとも100個のアミノ

酸残基、少なくとも125個のアミノ酸残基、または少なくとも150個のアミノ酸残基)をコード化するヌクレオチド配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコード化される:または、(c)ポリペプチドは、BPIをコード化するヌクレオチド配列と少なくとも30%(より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%)同一であるヌクレオチド配列によってコード化されている。本明細書で用いられる、BPIと「同様の構造」を有するポリペプチドとは、BPIのと同様の2次、3次または4次構造を有するポリペプチドを意味する。ポリペプチドの構造は、これらに限定されないが、X線結晶学、核磁気共鳴および結晶学的電子顕微鏡法を含む当業者に公知の方法によって決定されうる。

【0024】

本明細書で用いられる「BPI融合タンパク質」という用語は、(i)BPI、BPI断片、BPI関連ポリペプチド(BPI-related polypeptide)またはBPI関連ポリペプチドの断片のアミノ酸配列および(ii)異種ポリペプチド(すなわち、非BPI(non-BPI)、非BPI断片または非BPI関連ポリペプチド)のアミノ酸配列からなるポリペプチドを意味する。

【0025】

本明細書で用いられる「BPI同族体」という用語は、BPIと同様のアミノ酸配列を有するが、必ずしも該BPIと同様のまたは同一の機能を有さないポリペプチドを意味する。

【0026】

本明細書で用いられる「BPI類似体(ortholog)」という用語は、(i)BPIと同様のアミノ酸配列からなり、かつ(ii)BPIと同様のまたは同一の機能を有する非ヒトポリペプチドを意味する。

【0027】

本明細書で用いられる「BPI関連ポリペプチド」という用語は、BPI同族

体、API類似体、BPIのイソ型、BPI類似体、またはそれらのみ合わせを意味する。

【0028】

本明細書で用いられる「誘導体」という用語は、アミノ酸残基置換、欠失または付加の導入によって改変された第2のポリペプチドのアミノ酸配列からなるポリペプチドを意味する。誘導体ポリペプチドは、該第2のポリペプチドと同様のまたは同一の機能を有する。

【0029】

本明細書で用いられる「断片」という用語は、第2のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸残基（好ましくは、少なくとも10個のアミノ酸残基、少なくとも15個のアミノ酸残基、少なくとも20個のアミノ酸残基、少なくとも25個のアミノ酸残基、少なくとも40個のアミノ酸残基、少なくとも50個のアミノ酸残基、少なくとも60個のアミノ酸残基、少なくとも70個のアミノ酸残基、少なくとも80個のアミノ酸残基、少なくとも90個のアミノ酸残基、少なくとも100個のアミノ酸残基、少なくとも125個のアミノ酸残基、少なくとも150個のアミノ酸残基、少なくとも175個のアミノ酸残基、少なくとも200個のアミノ酸残基または少なくとも250個のアミノ酸残基）のアミノ酸配列からなるペプチドまたはポリペプチドを意味する。BPIの断片は、第2のポリペプチドの機能的活性を有していてもまたは有さなくてもよい。

【0030】

本明細書で用いられる「折りたたみ変化 (fold change)」という用語は、「折たたみ増加」および「折たたみ減少」を含み、第2のサンプル（もしくはサンプルセット）と比べた第1のサンプルもしくはサンプルセットにおけるBFの存在比 (abundance) の相対的な増加または減少またはポリペプチド（例えばBPI）の発現または活性における相対的な増加または減少を意味する。BFまたはポリペプチドの折りたたみ変化は、当業者に既知の任意の技術によって測定されるが、観察された増加または減少は用いる技術によって変化するであろう。好ましくは、折りたたみ変化は、以下に示す実施例において記載されたようにして本明細書において決定される。

【0031】

本明細書で用いられる「イソ型」という用語は、同じ遺伝子によってコード化されるが、それらのpIもしくはMWまたはその両方が異なるポリペプチドの変異体を意味する。このようなイソ型は、それらのアミノ酸組成（例えば、オルタナティブスプライシングまたは制限されたタンパク質分解（limited proteolysis）の結果として）が異なってもよく、加えて、またはその代わりに、異なる翻訳後修飾（例えば、配糖化、アシル化、リン酸化）から生じてよい。

【0032】

本明細書でBPIまたはBPI関連ポリペプチドの発現または活性に関して用いられる「調節する（modulate）」という用語は、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの発現または活性のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを意味する。本発明の開示に基づき、このような調節は、当業者に既知のまたは本明細書で開示されたアッセイによって測定され得る。

【0033】

2つのアミノ酸配列のまたは2つの核酸配列の一致率は、その配列を最適な比較目的に関して並べ（例えば、最適な配列のアライメントに関してギャップを第1の配列に導入しても良い）、対応する位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較することによって決定される。「最適なアライメント」とは、最も高い一致率を生じる2つの配列のアライメントである。一致率は、比較される配列中の同一なアミノ酸残基またはヌクレオチドの数によって決定される（すなわち、一致率（%）= 同一な位置の数 / 全位置数 × 100）。

【0034】

2つの配列間の一致率の決定は、当業者に既知の数学的アルゴリズムを用いてなされてもよい。2つの配列を比較するための数学的アルゴリズムの例としては、KarlinおよびAltschulのアルゴリズム（（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268）、KarlinおよびAltschulの改良されたアルゴリズム（（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:58735877）が挙げられる。Altschul等（（1990）J. Mol. Biol. 215:403410）のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムは、このようなアルゴリズムを組み込んでいる。BLASTヌクレオチド検

索 (BLAST nucleotide searches) は、該 N B L A S T プログラムをスコア = 100、ワードレングス (wordlength) = 12 で用いて実施され、本発明の核酸分子に相同性を有するヌクレオチド配列を得ることができる。B L A S T タンパク質検索は、該 X B L A S T プログラムをスコア = 50、ワードレングス = 3 で用いて実施され、本発明のタンパク質分子に相同性を有するアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップドアライメントを得るために、Altschul等(1997) (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) で説明されるようにして、ギャップド B L A S T (Gapped BLAST) が利用できる。代わりに、P S I - B l a s t を用いて、分子間の距離関係 (I d) を検出する反復検索を実施することができる。B L A S T、ギャップド B L A S T および P S I - B l a s t プログラムを用いる際に、それぞれのプログラム (例えば X B L A S T および N B L A S T) のデフォルトのパラメータが用いられ得る。http://www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照すること。

【0035】

配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの他の例として、MyersおよびMillerのアルゴリズム (CABIOS (1989)) が挙げられる。C G C 配列アライメントソフトウェアパッケージの一部である、A L I G N プログラム (version 2.0) は、このようなアルゴリズムを組み込んでいる。当該分野において既知の配列分析のための他のアルゴリズムとしては、TorellisおよびRobotti(1994) (Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5) で説明されている A D V A N C E および A D A M ; ならびに、PearsonおよびLipman(1988) (Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8) で説明されている F A S T A が挙げられる。F A S T A では、k t u p は検索の感度と速度を設定するコントロールオプションである。

【0036】

4. 図面の簡単な説明

図1は、正常な血清及び乳癌を有する被検者から採取された血清との組み合わせを示す劣化血清 (depleted serum) の、2次元電気泳動で得られたイメージであって、D S 1、D S 2、D S 4、D S 5、D S 6、D S 8、D S 9、D S 10、D S 11、D S 12 および D S 13 を称される11個のランドマーク特徴を同

定するために注釈がつけられている。

【0037】

5. 発明の詳細な説明

以下に詳細に説明される本発明は、哺乳動物被検者における乳癌の臨床的なスクリーニング、診断および予想のための、乳癌治療の結果をモニターするための、特別な治療処置に最も反応しやすい患者を同定するための、ならびに薬剤のスクリーニングおよび薬剤の開発のための方法および組成物を提供するものである。本発明はまた、乳癌を治療または予防するために哺乳動物被検者への治療用組成物の投与を包含する。哺乳動物被検者は、ヒト以外の哺乳動物であってもよいが、好ましくはヒト、より好ましくはヒト成人であり、すなわち、少なくとも21歳（より好ましくは、少なくとも35歳、少なくとも50歳、少なくとも60歳、少なくとも70歳または少なくとも80歳）のヒト被検者である。開示を明確にするために、しかし限定する意図はないが、本発明は血清サンプルの分析に関して説明される。しかしながら、当業者であればわかるように、以下に説明されるアッセイや技術は、他の体液（例えば血液、血漿または唾液）、乳癌を有するまたは発達するリスクのある被検者の組織サンプル（例えば乳房またはリンパ節生検のような生検）またはそれらのホモジネートを含む、他のタイプのサンプルにも適用可能である。本発明の方法および組成物は、生きた被検者のスクリーニング、診断および予想に有用であるが、例えば同じ病気を発達させるリスクを有する被検者の家族を同定するために、被検者の検死にも使用されてもよい。

【0038】

本明細書で用いられているように、血清とは、血液サンプルの凝固および遠心による沈殿によって生産される上清液を意味する。

【0039】

5.1 乳癌関連特徴（BF）

本発明の一つの態様において、2次元電気泳動が、乳癌のスクリーニング、予防または診断のために一以上の乳癌関連特徴（BF）の発現を検出または定量する、乳癌を有する被検者の予後を決定する、乳癌の進行をモニターする、乳癌治療の有効性をモニターするために、または薬剤開発を目的として、被検者、好ま

しくは生きた被検者からの血清を分析するために用いられる。本明細書で用いられる、「2次元電気泳動」(2D電気泳動)とは、等電点電気泳動、その後に電気泳動の変性を含む技術を意味する；これによって、複数の分離されたタンパク質を含む2次元ゲル(2Dゲル)が得られる。好ましくは、電気泳動を変性する工程は、ドデシル硫酸ナトリウム存在下のポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を用いる。特に好ましくは、高精度かつ自動操作可能な方法および装置(「好ましい技術」)であり、これは、国際出願第97GB3307号(WO98/23950として公開されている)および米国出願第08/980,574号、いずれも1997年12月1日付で出願されている、いずれも第23頁~第35頁における方法に特に関連させて参照することによって、その全体がここに組み込まれる。簡単にいえば、好ましい技術は、生体試料中の生体分子(例えば糖タンパク質を含むタンパク質)を同定し、選択し、特徴付けるための、効率的なコンピュータ補助方法および装置を提供するものである。2次元アレイは、電気泳動移動度および等電点に従って2次元ゲル上で生体分子を分離することによって得られる。2次元アレイ中で検出される複数の生体分子の同一性、見かけの分子量、等電点、および相対存在比を表わす、コンピュータによるアレイのデジタルプロフィールが得られ、それによって、複数の生体試料のプロフィールのコンピュータ介在比較(computer-mediated comparison)、さらには有益な分離されたタンパク質のコンピュータ補助の切り出しが可能になる。

【0040】

蛍光標識されたタンパク質を検出するための好ましいスキャナーは、WO 96/36882号におよびDavid A. Basijiの博士論文(タイトル「Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection (Total Internal Reflection, Electrophoresis)」、University of Washington (1997)、国際学位論部抄録(Dissertation Abstracts International)のVolume 58/12-B, page 6686)に説明されており、いずれの内容も参照することによってここに組み込まれる。これらの文献は、高速で自動化され統合された操作に関して特別に設計されたイメージスキャナーを説明している。該スキャナーは、蛍光染料または銀染料で染色されたゲル

、さらには貯蔵リン蛍光スクリーン (storage phosphor screen) を映像化することができる。Basi jiの学位論文は、レーザーの散乱または均質な蛍光 (homogeneous fluorescence) によるベースラインノイズからの調節された蛍光を区別するためのフェーズ感受性検出システム (phase-sensitive detection system) を提供するものであるが、スキャナーは非フェーズ感受性モード (non-phase-sensitive mode) でも操作されてもよい。このフェーズ感受性検出能は、従来の蛍光イメージングシステムに比べて装置の感度を1オーダー増加する。増強されたイメージの品質が工程の下流のイメージ分析を簡単にすると共に、高められた感度は装置の上流のサンプル調製物の負荷を少なくする。

【0041】

さらにより好ましいスキャナーは、アポロ2スキャナー (Apollo 2 scanner) (Oxford Glycosciences, Oxford, UK) であり、これは、上述のスキャナーの改良バージョンである。該アポロ2スキャナーでは、ゲルを精密なリード-スクリュードライブシステム (precision lead-screw drive system) でスキャナーを介して移す。ゲルをイメージング光学機器 (imaging optics) に精密に移送する再現性のある手段が提供されるので、Basi jiの学位論文に説明されているベルト駆動システム上にガラスプレートを設置することが好ましい。

【0042】

アポロ2スキャナーにおいて、ゲルは、既知の位置でガラスプレートを固定する3つのアライメントストップ (alignment stop) に対して固定される。上述の精密なトランスポートシステムとともにこれを行なうことによって、ゲルの絶対位置を予想し記録することができる。これにより、各特徴のゲル上の座標がより正確に決定され、所望であれば、その特徴の切り出しのためのカッティングロボットに連結することが確実にできる。アポロ2スキャナーにおいて、ゲルを保持するキャリアーは、イメージ形状寸法を修正するのに用いられる4つの不可欠な蛍光マーカ (integral fluorescent markers) を有する。これらのマーカは、スキャニングが正確に行われたことを確認する品質制御特徴 (quality control feature) である。

【0043】

Basijiの学位論文で説明されたスキャナーに比べて、アポロ2スキャナーの光学部品は逆に配置される。アポロ2スキャナーにおいて、レーザー、ミラー、導波管および他の光学部品は、スキャンされるガラスプレートの上である。Basijiの学位論文において説明されたスキャナーは、その下にこれらの部品を有する。アポロ2スキャナーでは、ガラスプレートは、光路がガラスプレートを通して残存するように、スキャナーゲル側に下方向に配置される (mounted onto the scanner gel side down)。このようにすることによって、ガラスプレートから離脱するゲル粒子は、光学機器上ではなく装置のベース上に落ちるであろう。これはシステムの機能に影響を与えないが、その信頼性を高める。

【0044】

シグナルの出力がピーク飽和なくまたはシグナルの平方根コード化なく全16ビットデータにデジタル化される、アポロ3スキャナーがさらにより好まし。補正アルゴリズム (compensation algorithm) もまた、スキャニングビームの経路に沿った検出感度の変動を修正するために適用されてきた。この変動は、光学における異常および導波管の収集効率の相違によるものである。キャリブレーションは、終始同じ蛍光を有するパースペックスプレートを用いて行なわれる。このプレートのスキャンから得られたデータは、各画素レベルからのシグナルをターゲットレベルまで増加させるのに必要な増倍係数を決定するのに用いられる。次に、これらの係数は、次のゲルのスキャンで用いられ、内部の光学的変化 (internal optical variations) を除去する。

【0045】

本明細書で用いられる「特徴」という用語は、2Dゲルで検出されるスポットを意味し、「乳癌関連特徴」(BF)という用語は、乳癌に冒されていない被検者からのサンプル(例えば、血清サンプル)と比較して乳癌を有する被検者からのサンプル(例えば、血清サンプル)中に異なって存在する特徴を意味する。本明細書で用いられる、特徴(または、以下で定義されるような、BPIのタンパク質イソ型)は、特徴、イソ型またはBPIを検出するための方法(例えば、2D電気泳動またはイムノアッセイ)によりを第1のおよび第2のサンプルに適用した際に異なるシグナルが得られる場合、第2のサンプルに関して第1のサン

ル中に「異なって存在する」。検出方法が、特徴、イソ型またはB P Iが第2のサンプルより第1のサンプルにおいてより多く存在することを示す場合、または特徴、イソ型またはB P Iがイソ型またはB P Iが第1のサンプルでは検出可能であり、第2のサンプルでは検出不可能である場合、特徴、イソ型またはB P Iは、第2のサンプルに関して第1のサンプル中で「増加する」。逆に、検出方法が、特徴、イソ型またはB P Iが第2のサンプルより第1のサンプルにおいてより少なく存在することを示す場合、または特徴、イソ型またはB P Iがイソ型またはB P Iが第1のサンプルでは検出不可能であり、第2のサンプルでは検出可能である場合、特徴、イソ型またはB P Iは、第2のサンプルに関して第1のサンプル中で「減少する」。

【0046】

好ましくは、2つのサンプルにおける特徴の相対存在比は、2段階で決定される。第一に、サンプル中の特徴の検出で得られたシグナルは、適切なバックグラウンドパラメーター、例えば、(a)分析されるサンプル中の総タンパク質量(例えば、ゲル上に載せられた総タンパク質)；(b)発現参考特徴(Expression Reference Feature)(ERF)、すなわち、試験される被検者の集団において、好ましい技術のばらつきの制限以内で、その存在比が不変である特徴、例えば、以下で開示されるERF；または(c)より好ましくは、サンプル中の全てのタンパク質から検出される総シグナルを参考にして標準化される。

【0047】

第二に、1つのサンプルまたはサンプルセット中の特徴に関する標準化シグナルは、第2のサンプルに関して第1のサンプル(またはサンプルセット)中で「異なって存在する」特徴を同定するために、他のサンプルまたはサンプルセット中の同じ特徴に関する標準化シグナルと比較される。

【0048】

本明細書で開示されたBFは、乳癌に冒されていない被検者からの血清サンプルと乳癌を有する被検者からの血清サンプルとを比較することによって同定された。乳癌に冒されていない被検者は、病気や症状が知られていない被検者(正常な被検者)および乳癌以外の病気(乳房の異常を含む)を有する被検者を含む。

【0049】

BFの4つのグループは、好ましい技術の方法および装置によって同定された。第1のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比べて初期乳癌を有する被検者の血清で減少するBFから構成される。これらのBFは、表Iに示されるような、見かけの分子量(MW)および等電点(pI)により記載できる。

【0050】

【表1】

表I 初期乳癌を有する被検者の血清中で減少するBF

BF#	特徴の存在率(% (フォアグラウト))	特徴の存在率(% (バックグラウト))	折りたたみ変化	pI	MW (Da)	P 値 (ランクサム試験)
BF-1	86	100	-1.49	7.27	30450	0.022371
BF-2	46	61	-1.45	6.65	47800	0.026919
BF-3	100	100	-1.44	7.61	48250	0.002279
BF-4	80	100	-1.41	5.29	34070	0.031476
BF-5	100	100	-1.33	4.90	72090	0.028553
BF-7	93	100	-1.32	4.83	65170	0.022503
BF-8	100	100	-1.31	5.13	37100	0.019952
BF-9	100	100	-1.26	5.11	22910	0.02864
BF-10	100	100	-1.25	4.89	31960	0.014466
BF-12	100	100	-1.24	4.73	47250	0.038099
BF-13	100	100	-1.23	5.03	30780	0.009829
BF-14	100	100	-1.22	6.07	33400	0.013643
BF-42	94	93	-1.36	4.98	35440	

【0051】

第2のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比べて初期乳癌を有する被検者の血清で増加するBFから構成される。これらのBFは、以下のようなMWおよびpIにより記載できる。

【0052】

【表2】

表 II 初期乳癌を有する被検者の血清中で増加するBF

BF#	特徴の存在率(%) (フォアグラウト)	特徴の存在率(%) (バックグラウト)	折りたたみ変化	pI	MW (Da)	P 値 (ラックサム試験)
BF-15	66	46	2.26	6.60	74830	0.029818
BF-16	66	69	1.50	5.74	35220	0.027283
BF-17	60	69	1.25	6.37	41260	0.016833
BF-18	100	100	1.23	6.20	67280	0.022262
BF-43	87	54	1.23	6.02	59410	
BF-44	67	85	1.77	5.38	67290	
BF-45	100	100	1.14	6.15	191760	

【0053】

第3のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比べて転移性乳癌を有する被検者の血清で減少するBFから構成される。これらのBFは、以下のよ
うなMWおよびpIにより記載できる。

【0054】

【表3】

表 III 転移性乳癌を有する被検者の血清で減少するBF

BF#	特徴の存在率(% (フォアカウント))	特徴の存在率(% (バックカウント))	折りたたみ変化	pI	MW (Da)	P 値 (ランカム試験)
BF-19	44	84	-1.91	5.16	94860	0.008122
BF-20	83	76	-1.83	5.22	31160	0.035008
BF-22	72	92	-1.79	6.08	59520	0.008979
BF-23	100	92	-1.66	7.01	55950	0.044225
BF-26	72	84	-1.51	5.32	24490	0.006342
BF-27	100	100	-1.45	5.97	91410	0.015438
BF-28	100	100	-1.35	5.11	22910	0.006103
BF-29	100	100	-1.32	5.26	20530	0.047503
BF-30	100	100	-1.31	4.79	47130	0.029112
BF-31	100	100	-1.25	5.15	73350	0.032217
BF-32	100	100	-1.21	6.51	51100	0.010398
BF-33	100	92	-1.21	5.35	81060	0.034048
BF-34	100	100	-1.16	6.72	47550	0.049559
BF-46	77	92	-1.73	5.13	20730	
BF-47	95	92	-1.45	4.31	27930	
BF-48	100	100	-1.19	6.44	44960	

【0055】

第4のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比べて転移性乳癌を有する被検者の血清で増加するBFから構成される。これらのBFは、以下のよ
うなMWおよびpIにより記載できる。

【0056】

【表4】

表 IV 転移性乳癌を有する被検者の血清で増加する B F

BF#	特徴の存在率(% (フォアグラウンド))	特徴の存在率(% (バックグラウンド))	折りたたみ変化	pI	MW (Da)	P 値 (ランカム試験)
BF-35	44	53	1.59	6.38	38110	0.014817
BF-36	94	92	1.58	4.51	51660	0.025214
BF-37	100	92	1.54	4.63	47200	0.048935
BF-38	66	92	1.44	4.80	38880	0.024158
BF-39	88	100	1.42	6.20	67280	0.029489
BF-40	100	100	1.37	5.34	16620	0.007728
BF-41	88	76	1.02	5.62	40830	0.034673

【 0 0 5 7 】

所定の B F に関して、乳癌に冒されていない被検者からの血清を分析して得られたシグナルに対する乳癌を有する被検者からの血清を分析して得られたシグナルは、使用される特定の分析プロトコルや検出技術に依存するだろう。したがって、本発明は、各実験が、本明細書の記載に基づいて、診断技術において公知であるような、使用される分析プロトコル及び検出技術に従って乳癌に冒されていない被検者における各 B F に関する参考範囲 (reference range) を確立することを包含するものである。好ましくは、乳癌を有することがわかっている被検者からの少なくとも 1 つのコントロール陽性血清サンプルまたは乳癌に冒されていないことがわかっている被検者からの少なくとも 1 つのコントロール陰性血清サンプル (およびより好ましくは、陽性および陰性両方のコントロールサンプル) が、分析される試験サンプルの各バッチに含まれる。一実施形態において、特徴の発現のレベルは、(a) エリア中で問題となっている特定の特徴と等価である ; および (b) 識別し得るタンパク質特徴を含まないイメージの隣接領域から得られたシグナルのレベルとして規定される、バックグラウンド値と比較して測定される。

【 0 0 5 8 】

好ましい実施形態においては、被検者 (例えば、乳癌を有することが疑われるまたは有することがわかっている被検者) の血清中の B F と関連するシグナルは、同じ 2 D ゲルで検出される一以上の E R F を参照して標準化される。当業者に

は明らかであるように、このようなERFは、好ましい技術を用いて異なるサンプルを比較することによって容易に検出される。適切なERFとしては、以下の表に記載されるものがある（ただしこれらに限定されない）。

【0059】

【表5】

表V 発現参考特徴

ERF#	MW (Da)	PI
ERF-1	53370	6.17
ERF-2	30780	5.03

【0060】

当業者であれば容易にわかるように、所定の特徴またはタンパク質イソ型の測定されたMWおよびpIは、2D電気泳動の各段階及びランドマークのマッチングで使用される正確な方法に依存してある程度まで異なるであろう。本明細書で用いられる、「MW」および「pI」という用語は、それぞれ、以下のセクション5に記載の参考プロトコルに厳密に従って測定される特徴またはタンパク質イソ型の見かけの分子量（ダルトン）及び見かけの等電点を意味するものと定義される。参考プロトコルに従う際及びサンプルを2連でまたはそれ以上の反復数で泳動する際には、BFまたはBPIの測定された平均pIにおける偏差は、一般的に3%未満であり、BFまたはBPIの測定された平均MWにおける偏差は、一般的に5%未満である。熟練者が参考プロトコル以外の方法を用いることを望む場合には、(a)参考プロトコルによって及び(b)逸脱した方法によって検出された各BFまたはタンパク質イソ型に関するMWおよびpIを比較するために、キャリブレーション実験を行なうべきである。

【0061】

BFは、乳癌の検出、予想、診断、モニターのためにまたは薬剤開発もしくは特別な治療処置に最も反応しやすい患者の同定のために使用することができる。本発明の一実施態様において、被検者（例えば、乳癌を有することが疑われる被検者）からの血清が、下記BF：BF-1、BF-2、BF-3、BF-4、B

F - 5、BF - 7、BF - 8、BF - 9、BF - 10、BF - 12、BF - 13、BF - 14、BF - 42の一以上の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。乳癌に冒されていない一被検者または複数の被検者からの血清（例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲）に対する被検者からの血清における当該一以上のBFの存在比の減少は、初期乳癌の存在を示す。

【0062】

本発明の他の実施態様においては、被検者からの血清が、下記BF：BF - 15、BF - 16、BF - 17、BF - 18、BF - 43、BF - 44、BF - 45の一以上の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。乳癌に冒されていない一被検者または複数の被検者からの血清（例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲）に対する被検者からの血清における当該一以上のBFの存在比の増加は、初期乳癌の存在を示す。

【0063】

他の実施態様においては、被検者からの血清が、（a）その存在比の減少が初期乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF - 1、BF - 2、BF - 3、BF - 4、BF - 5、BF - 7、BF - 8、BF - 9、BF - 10、BF - 12、BF - 13、BF - 14、BF - 42；および、（b）その存在比の増加が初期乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF - 15、BF - 16、BF - 17、BF - 18、BF - 43、BF - 44、BF - 45の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0064】

本発明の他の実施態様においては、被検者からの血清が、下記BF：BF - 19、BF - 20、BF - 22、BF - 23、BF - 26、BF - 27、BF - 28、BF - 29、BF - 30、BF - 31、BF - 32、BF - 33、BF - 34、BF - 46、BF - 47、BF - 48の一以上の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。乳癌に冒されていない一被検者または複数の被検者からの血清（例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲

)に対する被検者からの血清における当該一以上のBFの存在比の減少は、転移性乳癌の存在を示す。

【0065】

本発明の他の実施態様においては、被検者からの血清が、下記BF：BF-35、BF-36、BF-37、BF-38、BF-39、BF-40、BF-41の一以上の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。乳癌に冒されていない被検者または複数の被検者からの血清（例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲）に対する被検者からの血清における当該一以上のBFの存在比の増加は、転移性乳癌の存在を示す。

【0066】

他の実施態様においては、被検者からの血清が、(a)その存在比の減少が転移性乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF-19、BF-20、BF-22、BF-23、BF-26、BF-27、BF-28、BF-29、BF-30、BF-31、BF-32、BF-33、BF-34、BF-46、BF-47、BF-48；および、(b)その存在比の増加が転移性乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF-35、BF-36、BF-37、BF-38、BF-39、BF-40、BF-41の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0067】

当業者は、BFの適切な組み合わせを比較することによって、初期乳癌と転移性乳癌とを識別して診断することが可能になることを、容易に理解できる。

【0068】

さらなる実施態様においては、被検者からの血清が、(a)その存在比の減少が乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF-1、BF-2、BF-3、BF-4、BF-5、BF-7、BF-8、BF-9、BF-10、BF-12、BF-13、BF-14、BF-19、BF-20、BF-22、BF-23、BF-26、BF-27、BF-28、BF-29、BF-30、BF-31、BF-32、BF-33、BF-34、BF-42、BF-46、BF-47、BF-48；および、(b)その存在比の増加が乳

癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF - 15、BF - 16、BF - 17、BF - 18、BF - 35、BF - 36、BF - 37、BF - 38、BF - 39、BF - 40、BF - 41、BF - 43、BF - 44、BF - 45の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0069】

本発明のさらなる他の実施態様においては、被検者からの血清が、発現参考特徴(ERF)に対する一以上のBFの割合が乳癌が存在するかどうかを示す、下記BF: BF - 1、BF - 2、BF - 3、BF - 4、BF - 5、BF - 7、BF - 8、BF - 9、BF - 10、BF - 12、BF - 13、BF - 14、BF - 15、BF - 16、BF - 17、BF - 18、BF - 19、BF - 20、BF - 22、BF - 23、BF - 26、BF - 27、BF - 28、BF - 29、BF - 30、BF - 31、BF - 32、BF - 33、BF - 34、BF - 35、BF - 36、BF - 37、BF - 38、BF - 39、BF - 40、BF - 41、BF - 42、BF - 43、BF - 44、BF - 45、BF - 46、BF - 47、BF - 48の一以上の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0070】

特定の実施態様においては、コントロールサンプルまたは参考範囲におけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の減少が初期乳癌の存在を示す; BF - 1、BF - 2、BF - 3、BF - 4、BF - 5、BF - 7、BF - 8、BF - 9、BF - 10、BF - 12、BF - 13、BF - 14、BF - 42は、この目的に適切なBFである。他の特定の実施態様においては、コントロールサンプルまたは参考範囲におけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の増加が初期乳癌の存在を示す; BF - 15、BF - 16、BF - 17、BF - 18、BF - 43、BF - 44、BF - 45は、この目的に適切なBFである。

【0071】

さらなる特定の実施態様においては、被検者からの血清が、(a)コントロールサンプルにおけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の減少が初期乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組

み合わせ、即ち、BF - 1、BF - 2、BF - 3、BF - 4、BF - 5、BF - 7、BF - 8、BF - 9、BF - 10、BF - 12、BF - 13、BF - 14、BF - 42；および、(b)コントロールサンプルにおけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の増加が初期乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF - 15、BF - 16、BF - 17、BF - 18、BF - 43、BF - 44、BF - 45の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0072】

特定の実施態様においては、コントロールサンプルまたは参考範囲におけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の減少が転移性乳癌の存在を示す；BF - 19、BF - 20、BF - 22、BF - 23、BF - 26、BF - 27、BF - 28、BF - 29、BF - 30、BF - 31、BF - 32、BF - 33、BF - 34、BF - 46、BF - 47、BF - 48は、この目的に適切なBFである。他の特定の実施態様においては、コントロールサンプルまたは参考範囲におけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の増加が転移性乳癌の存在を示す；BF - 35、BF - 36、BF - 37、BF - 38、BF - 39、BF - 40、BF - 41は、この目的に適切なBFである。

【0073】

さらなる特定の実施態様においては、被検者からの血清が、(a)コントロールサンプルにおけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の減少が転移性乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF - 19、BF - 20、BF - 22、BF - 23、BF - 26、BF - 27、BF - 28、BF - 29、BF - 30、BF - 31、BF - 32、BF - 33、BF - 34、BF - 46、BF - 47、BF - 48；および、(b)コントロールサンプルにおけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の増加が転移性乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF - 35、BF - 36、BF - 37、BF - 38、BF - 39、BF - 40、BF - 41の定量的検出を目的として2

D電気泳動によって分析される。

【0074】

さらなる特定の実施態様においては、被検者からの血清が、(a)コントロールサンプルにおけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の減少が乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF-1、BF-2、BF-3、BF-4、BF-5、BF-7、BF-8、BF-9、BF-10、BF-12、BF-13、BF-14、BF-19、BF-20、BF-22、BF-23、BF-26、BF-27、BF-28、BF-29、BF-30、BF-31、BF-32、BF-33、BF-34、BF-42、BF-46、BF-47、BF-48；および、(b)コントロールサンプルにおけるBF/ERF比に対するテストサンプルにおける一以上のBF/ERF比の増加が乳癌の存在を示す、一以上のBF、またはこれらの組み合わせ、即ち、BF-15、BF-16、BF-17、BF-18、BF-35、BF-36、BF-37、BF-38、BF-39、BF-40、BF-41、BF-43、BF-44、BF-45の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0075】

好ましい実施態様においては、被検者からの血清が、複数のBFの定量的検出を目的として分析される。

【0076】

5.2 乳癌関連タンパク質イソ型(BPI)

本発明の他の態様において、被検者、好ましくは生きている被検者からの血清は、乳癌のスクリーニング若しくは診断のために、乳癌を有する被検者の予後を決定するために、乳癌治療の有効性をモニターするために、または薬剤開発のために、または特定の治療処置に最も反応しやすい患者を同定するために、一以上の乳癌関連タンパク質イソ型(BPI)の定量的検出に関して分析される。当該分野において既知であるように、所定のタンパク質は、同一のアミノ酸配列を有するタンパク質がpI、MWまたはその両方において異なりうるように、それらのアミノ酸組成が異なる(例えば、オルタナティブスプライシング若しくは制限

されたタンパク質分解 (limited proteolysis) の結果として) または異なる翻訳後修飾 (例えば、配糖化、リン酸化、アシル化) の結果として、またはその両方である、変異体 (イソ型) として発現されてもよい。これは、タンパク質イソ型の異なる存在は、問題となるタンパク質をコード化する遺伝子の特異的発現を必要としないということになる。本明細書で用いられる、「乳癌関連タンパク質イソ型」という用語は、乳癌に冒されていない被検者からの血清と比べて乳癌を有する被検者からの血清で異なって存在するタンパク質イソ型を意味する。

【0077】

B P I の4つのグループが、好ましい技術の方法および装置を用いて、B F の部分的なアミノ酸配列によって同定された。第1のグループは、第1のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比べて初期乳癌を有する被検者の血清で減少するB F から構成され、この際、特異的存在は有意である。これらのB P I に関するタンデム質量分光分析 (tandem mass spectrometry) によって同定された部分的なアミノ酸配列を表V I に示す。各B P I に関して、タンパク質配列の受託番号のリストが示され、それぞれはB P I に関して同定された全ての部分的アミノ酸配列に対応している。B P I によっては、タンデム質量分光分析由来の部分的な配列情報は、既知の公報データベースに記載されていることが見出されなかった。これらは、表V I において「NOVEL」として列挙され、これらのB P I に関する部分的アミノ酸配列情報は表X I I に示される。

【0078】

【表6】

表 VI 初期乳癌を有する被検者の血清で減少する B P I

BF#	BPI#	タンデム質量分光分析 からのアミノ酸配列	同定された配列の受託番号*
BF-1	BPI-1	CSVFYGAPSK VEYGFQVK FACYYPR	116602 (gb) P01028 (SWISS-PROT) 179674 (gb) 2347136 (gb) 443671 (gb)
BF-1	BPI-50	表 XII を参照	NOVEL
BF-5	BPI-5	QEDDLANINQWVK LCQDLGPGAFR	112907 (gb) P08697 (SWISS-PROT) 178751 (gb) 219410 (gb)
BF-5	BPI-6	WLQGSQELPR	223099 (gb) 229585 (gb) 223069 (gb) 229537 (gb) 113585 (gb) P01877 (SWISS-PROT) 2135473 (gb) 87783 (gb) 70058 (gb) 2190501 (gb) 2190363 (gb) 86666 (gb) 113583 (gb) P20758 (SWISS-PROT) 184749 (gb)

【 0 0 7 9 】

			113584 (gb) P01876 (SWISS-PROT) 3201900 (gb) 2160055 (gb) 2160054 (gb)
BF-5	BPI-40	QSLEASLAETEGR	623409 (gb) 88042 (gb) 307086 (gb) 547749 (gb) P13645 (SWISS-PROT) 71528 (gb) 186629 (gb)
BF-9	BPI-9	AKPALEDLR ATEHLSTLSEK THLAPYSDELRL VSFLSALEEYTK VQPYLDDFQK	178775 (gb) 113992 (gb) P02647 (SWISS-PROT) 178777 (gb) 229479 (gb)
BF-10	BPI-11	SEIDLFNIR GLGTDEESILTLTSLR GAGTDDHTLIR	113960 (gb) P08758 (SWISS-PROT) 809185 (gb)
BF-10	BPI-10	ETLLQDFR	122801 (gb) P02760 (SWISS-PROT) 223373 (gb)
BF-12	BPI-12	TEQWSTLPPETK VLSLAQEQVGGSPK QGSFQGGFR ADGSYAAWLSR AEMADQAAAWLTR	179674 (gb)2347136 (gb) 187771 (gb) 223961 (gb) 223962 (gb)
BF-13	BPI-13	ETLLQDFR	122801 (gb) P02760 (SWISS-PROT) 223373 (gb)
BF-14	BPI-14	YGIDWASGR TFAHYATFR LLGEVDHYQLALGK GEPGDPVNLLR QDGSVDFFR	3413516 (gb)
BF-14	BPI-53	表 XII を参照	NOVEL
BF-42	BPI-41	表 XII を参照	NOVEL

* GenBank データベースから同定された配列の受託番号 (Burks, et al. GenBank: Current Status and Future Directions, Methods in Enzymology 183:3 (1990) に記載される) は、受託番号の後に (gb) または (GBI) で示される。対応する配列登録は、SWISS-PROT データベース (Bairoch et al. The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments, Nucleic Acids Research, 21:3093-3096 (1993) に記載される) において同定され、SWISS-PROT 登録の受託番号はまた、対応する GenBank 登録に関する受託番号と並んで示されている。

【0080】

第2のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比較して初期乳癌を有する被検者の血清において増加するBPIから構成され、この際、特異の存在は有意である。これらのBPIに関するタンデム質量分光分析によって同定された部分的なアミノ酸配列を表VIIに示す。各BPIに関して、タンパク質配列

の受託番号のリストが示され、それぞれはBPIに関して同定された全ての部分的アミノ酸配列に対応している。BPIによっては、タンデム質量分光分析由来の部分的な配列情報は、既知の公報データベースに記載されていることが見出されなかった。これらは、表VIIにおいて「NOVEL」として列挙され、これらのBPIに関する部分的アミノ酸配列情報は表XIIに示される。

【0081】

【表7】

表VII 初期乳癌を有する被検者の血清で増加するBPI

BF#	BPI#	タンデム質量分光分析からのアミノ酸配列	同定された配列の受託番号*
BF-17	BPI-54	表XIIを参照	NOVEL
BF-18	BPI-55	表XIIを参照	NOVEL
BF-43	BPI-42	表XIIを参照	NOVEL
BF-44	BPI-43	表XIIを参照	NOVEL
BF-45	BPI-44	表XIIを参照	NOVEL

【0082】

第3のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比較して転移性乳癌を有する被検者の血清において減少するBPIからなり、この際、特異の存在は有意である。これらのBPIに関するタンデム質量分光分析によって同定された部分的なアミノ酸配列を表VIIIに示す。各BPIに関して、タンパク質配列の受託番号のリストが示され、それぞれはBPIに関して同定された全ての部分的アミノ酸配列に対応している。BPIによっては、タンデム質量分光分析由来の部分的な配列情報は、既知の公報データベースに記載されていることが見出されなかった。これらは、表VIIIにおいて「NOVEL」として列挙され、これらのBPIに関する部分的アミノ酸配列情報は表XIIに示される。

【0083】

【表8】

表 VIII 転移性乳癌を有する被検者の血清で減少するBPI

BF#	BPI#	タンデム質量分光分析 からのアミノ酸配列	同定された配列の受託番号*
BF-19	BPI-19	NGVAQEPVHLDSPAİK ATWSGAVLAGR CEGPIPDVTFELLR CLAPLEGAR HQFLLTGDTQGR LELHVDGPPPRPQLR	112892 (gb) P04217 (SWISS-PROT)
			339685 (gb)

【 0 0 8 4 】

BF-20	BPI-21	GSPAINVAVHVFR	443295 (gb) 1181952 (gb) 136464 (gb) P02766 (SWISS-PROT) 443297 (gb) 1336728 (gb) 4261798 (gb)
BF-20	BPI-20	AKPALEDLR DEPPQSPWDR ATEHLSTLSEK THLAPYSDEL VQPYLDDFQK	229479 (gb) 178775 (gb) 113992 (gb) P02647 (SWISS-PROT) 178777 (gb)
BF-22	BPI-49	表 XII を参照	NOVEL
BF-23	BPI-24	ATVVYQGER	543826 (gb) P02749 (SWISS-PROT) 319918 (gb)
BF-23	BPI-23	LEQEIATYR	547750 (gb) P35900 (SWISS-PROT) 542923 (gb) 2119209 (gb) 386803 (gb) 417200 (gb) P08727 (SWISS-PROT) 125081 (gb) P19012 (SWISS-PROT) 125077 (gb) P13646 (SWISS-PROT) 3603253 (gb) 1708589 (gb) P30654 (SWISS-PROT) 88057 (gb) 632732 (gb) 4321795 (gb) 1363944 (gb) 1346342 (gb) P08779 (SWISS-PROT) 88047 (gb) 547751 (gb) Q04695 (SWISS-PROT) 87774 (gb) 125080 (gb) P02533 (SWISS-PROT) 177139 (gb)
BF-23	BPI-25	QDGSVDFGR IRPFFPQQ LESDVSAQMEYCR EDGGGWWYNR DNDGWLTSDPR	182430 (gb) 399492 (gb) P02675 (SWISS-PROT) 484509 (gb) 223002 (gb)
BF-27	BPI-27	EPGLQIWR HVPNEVVQR	121116 (gb) P06396 (SWISS-PROT)
BF-27	BPI-51	表 XII を参照	NOVEL
BF-28	BPI-28	AKPALEDLR ATEHLSTLSEK THLAPYSDEL VSFLSALEEYTK VQPYLDDFQK	178775 (gb) 113992 (gb) P02647 (SWISS-PROT) 178777 (gb) 229479 (gb)
BF-29	BPI-29	LIVHNGYCDGR QEELCLAR	132404 (gb) P02753 (SWISS-PROT) 88364 (gb)

		FSGTWYAMAK YWGVASFLQK	
BF-30	BPI-52	表XIIを参照	NOVEL
BF-31	BPI-31	NGVAQEPVHLDSPAIK SGLSTGWTQLSK ATWSGAVLAGR CLAPLEGAR HQFLLTGDTQGR LETPDFQLFK	112892 (gb) P04217 (SWISS-PROT)
BF-32	BPI-32	GECQAEGVLFFQGDR VWVYPPEK DYFMPCPGR YYCFQGNQFLR	386789 (gb) 1335098 (gb) 1708182 (gb) P02790 (SWISS-PROT)
BF-33	BPI-33	ANVVFVQLPR TFTPQPPGLER LEALPNSLLAPLGR LAELPADALGPLQR NLPEQVFR	543800 (gb) P35858 (SWISS-PROT)
BF-34	BPI-34	DYFMPCPGR	386789 (gb) 1335098 (gb) 1708182 (gb) P02790 (SWISS-PROT)
BF-34	BPI-56	表XIIを参照	NOVEL
BF-46	BPI-45	表XIIを参照	NOVEL
BF-47	BPI-46	表XIIを参照	NOVEL
BF-48	BPI-47	表XIIを参照	NOVEL

* GenBank データベースから同定された配列の受託番号 (Burks, et al. GenBank: Current Status and Future Directions, Methods in Enzymology 183:3 (1990) に記載される) は、受託番号の後に (gb) または (GBI) で示される。対応する配列登録は、SWISS-PROT データベース (Bairoch et al. The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments, Nucleic Acids Research, 21:3093-3096 (1993) に記載される) において同定され、SWISS-PROT 登録の受託番号はまた、対応する GenBank 登録に関する受託番号と並んで示されている。

【0086】

第4のグループは、乳癌に冒されていない被検者の血清と比較して転移性乳癌を有する被検者の血清において増加するBPIからなり、この際、特異の存在は有意である。これらのBPIに関するタンデム質量分光分析によって同定された部分的なアミノ酸配列を表IXに示す。各BPIに関して、タンパク質配列の受託番号のリストが示され、それぞれはBPIに関して同定された全ての部分的アミノ酸配列に対応している。BPIによっては、タンデム質量分光分析由来の部分的な配列情報は、既知の公報データベースに記載されていることが見出されなかった。これらは、表IXにおいて「NOVEL」として列挙され、これらのB

P Iに関する部分的アミノ酸配列情報は表X I Iに示される。

【0087】

【表9】

表IX 転移性の乳癌を有する被検者の血清で増加するB P I

BF#	BPI#	タンデム質量分光分析 からのアミノ酸配列	同定された配列の受託番号*
BF-37	BPI-37	ALGHLDLSGNR VAAGAFQGLR YLFLNGNK ENQLEVLEVSWLHGLK	112908 (gb) P02750 (SWISS-PROT)
BF-40	BPI-48	表XIIを参照	NOVEL

* GenBank データベースから同定された配列の受託番号 (Burks, et al. GenBank: Current Status and Future Directions, Methods in Enzymology 183:3 (1990) に記載される) は、受託番号の後に (g b) または (G B I) で示される。対応する配列登録は、SWISS-PROT データベース (Bairoch et al. The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments, Nucleic Acids Research, 21:3093-3096 (1993) に記載される) において同定され、SWISS-PROT 登録の受託番号はまた、対応する GenBank 登録に関する受託番号と並んで示されている。

【0088】

当業者には明白であるように、本明細書の記載に基づいて、所定のB P Iは、表V I、V I I、V I I IまたはI XにおけるB P Iに関して提供されたデータに従って記載できる。B P Iは、上記B P Iに関して記載されたペプチド配列からなる(そのB P Iに関して記載されたペプチド配列の、好ましくは複数、より好ましくは全てからなる)タンパク質であり、B P Iに関して記載された値周辺のp I(述べられた値の、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内、さらにより好ましくは1%以内)を有し、さらに、B P Iに関して記載された値周辺のMW(述べられた値の、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内、さらにより好ましくは1%以内)を有する。

【0089】

一実施態様において、被検者からの血清が、乳癌に冒されていない被検者または複数の被検者からの血清(例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲)に対する被検者からの血清における一つのB P Iまたは複数のB P I(またはこれらの組み合わせ)の存在比の減少が初期乳癌の存在を示す、一以上の下記B P I: B P I - 1、B P I - 5、B P I - 6、B P I - 9、B P I

- 10、BPI - 11、BPI - 12、BPI - 13、BPI - 14、BPI - 40、BPI - 41、BPI - 50、BPI - 53またはこれらの組み合わせの定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0090】

本発明の他の実施態様においては、被検者からの血清が、乳癌に冒されていない一被検者または複数の被検者からの血清（例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲）に対する被検者からの血清における一つのBPIまたは複数のBPI（またはこれらの組み合わせ）の存在比の増加が初期乳癌の存在を示す、一以上の下記BPI：BPI - 42、BPI - 43、BPI - 44、BPI - 54、BPI - 55またはこれらの組み合わせの定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0091】

他の実施態様においては、被検者からの血清が、（a）その存在比の減少が初期乳癌の存在を示す、一以上のBPI、またはこれらの組み合わせ、即ち、BPI - 1、BPI - 5、BPI - 6、BPI - 9、BPI - 10、BPI - 11、BPI - 12、BPI - 13、BPI - 14、BPI - 40、BPI - 41、BPI - 50、BPI - 53；および、（b）その存在比の増加が初期乳癌の存在を示す、一以上のBPI、またはこれらの組み合わせ、即ち、BPI - 42、BPI - 43、BPI - 44、BPI - 54、BPI - 55の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0092】

本発明の他の実施態様においては、被検者からの血清が、乳癌に冒されていない一被検者または複数の被検者からの血清（例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲）に対する被検者からの血清における一つのBPIまたは複数のBPI（またはこれらの組み合わせ）の存在比の減少が転移性乳癌の存在を示す、一以上の下記BPI：BPI - 19、BPI - 20、BPI - 21、BPI - 23、BPI - 24、BPI - 25、BPI - 27、BPI - 28、BPI - 29、BPI - 31、BPI - 32、BPI - 33、BPI - 34、BPI - 45、BPI - 46、BPI - 47、BPI - 49、BPI - 51、BP

I - 5 2、B P I - 5 6の定量的検出を目的として2 D電気泳動によって分析される。

【0093】

本発明の他の実施態様においては、被検者からの血清が、乳癌に冒されていない一被検者または複数の被検者からの血清（例えば、コントロールサンプルまたは予め血清された参考範囲）に対する被検者からの血清における一つのB P Iまたは複数のB P I（またはこれらの組み合わせ）の存在比の増加が転移性乳癌の存在を示す、一以上の下記B P I：B P I - 3 7、B P I - 4 8の定量的検出を目的として2 D電気泳動によって分析される。

【0094】

他の実施態様においては、被検者からの血清が、（a）その存在比の減少が転移性乳癌の存在を示す、一以上のB P I、またはこれらの組み合わせ、即ち、B P I - 1 9、B P I - 2 0、B P I - 2 1、B P I - 2 3、B P I - 2 4、B P I - 2 5、B P I - 2 7、B P I - 2 8、B P I - 2 9、B P I - 3 1、B P I - 3 2、B P I - 3 3、B P I - 3 4、B P I - 4 5、B P I - 4 6、B P I - 4 7、B P I - 4 9、B P I - 5 1、B P I - 5 2、B P I - 5 6；および、（b）その存在比の増加が転移性乳癌の存在を示す、一以上のB P I、またはこれらの組み合わせ、即ち、B P I - 3 7、B P I - 4 8の定量的検出を目的として2 D電気泳動によって分析される。

【0095】

当業者は、B P Iの適切な組み合わせを比較することによって、初期乳癌と転移性乳癌とを識別して診断することが可能になることを、容易に理解できる。

【0096】

さらなる実施態様においては、被検者からの血清が、（a）その存在比の減少が乳癌の存在を示す、一以上のB P I、またはこれらの組み合わせ、即ち、B P I - 1、B P I - 5、B P I - 6、B P I - 9、B P I - 1 0、B P I - 1 1、B P I - 1 2、B P I - 1 3、B P I - 1 4、B P I - 1 9、B P I - 2 0、B P I - 2 1、B P I - 2 3、B P I - 2 4、B P I - 2 5、B P I - 2 7、B P I - 2 8、B P I - 2 9、B P I - 3 1、B P I - 3 2、B P I - 3 3、B P I

- 34、BPI - 40、BPI - 41、BPI - 45、BPI - 46、BPI - 47、BPI - 49、BPI - 50、BPI - 51、BPI - 52、BPI - 53、BPI - 56 ; および、(b) その存在比の増加が乳癌の存在を示す、一以上のBPI、またはこれらの組み合わせ、即ち、BPI - 37、BPI - 42、BPI - 43、BPI - 44、BPI - 48、BPI - 54、BPI - 55の定量的検出を目的として2D電気泳動によって分析される。

【0097】

よりさらなる実施態様においては、被検者からの血清が、一以上のBPIおよび一以上の既知の乳癌のバイオマーカー（例えば、放出c - erb - B2フラグメント (shed c-erb-B2 fragment) Payne et al. 2000, Clin. Chem. 46:175-182) の定量的検出を目的として分析される。この実施態様によれば、コントロールまたは参考範囲に対する各BPIおよび既知のバイオマーカーの存在比は、被検者が乳癌を有するかどうかを示す。

【0098】

好ましくは、BPIの存在比は、発現参考タンパク質イソ型 (Expression Reference Protein Isoform) (ERPI) に対して標準化される。ERPIは、好ましい技術の方法および装置を用いて、上述したERFの部分的なアミノ酸配列によって同定できる。ERPIの部分的なアミノ酸配列、およびその配列と同一性を有する既知のタンパク質を、表Xに示す。

【0099】

【表10】

表X

ERPI-#	ERF-#	同定された配列の受託番号*	タンデム質量分光分析からのアミノ酸配列
ERPI-1	ERF-2	122801 (gb) P02760 (SwissProt) 223373 (gb)	ETLLQDFR

*GenBank データベースから同定された配列の受託番号(Burks, et al. GenBank: Current Status and Future Directions, Methods in Enzymology 183:3 (1990)に記載される)は、受託番号の後に (g b) または (G B I) で示される。対応する配列登録は、SWISS-PROT データベース(Bairoch et al. The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments, Nucleic Acids Research, 21:3093-3096 (1993)に記載される)において同定され、SWISS-PROT 登録の受託番号はまた、対応する GenBank 登録に関する受託番号と並んで示されている。

【0100】

上記に示したように、本明細書に記載された B P I は、以前に知られていないタンパク質、さらにはイソ型が乳癌に関連すると従来知られていなかった既知のタンパク質のイソ型を包含する。各 B P I に関して、本発明はさらに、(a) 単離された B P I からなる製剤；(b) B P I の一以上の断片からなる製剤；および(c) 該 B P I に、該断片に、または該 B P I におよび該断片にの両方に結合する抗体を提供するものである。本明細書で用いられる際には、B P I は、混入タンパク質を実質的に含まない製剤中に、すなわち、存在する全タンパク質の 10%未満(好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満)が混入タンパク質である製剤中に存在する際に「単離される」。混入タンパク質は、2D電気泳動で測定される際に、単離された B P I のものとは有意に異なる p I または MW を有するタンパク質またはタンパク質イソ型である。本明細書で用いられる、「有意に異なる」p I または MW とは、好ましい技術に従って行なわれる、2D電気泳動で、混入タンパク質が B P I から分離(resolve)できるようなものである。

【0101】

一実施態様において、単離されたタンパク質が提供され、当該タンパク質は、B P I に関して表 V I、V I I、V I I I または I X で同定されたアミノ酸配列を有するペプチドからなり、当該タンパク質は、B P I に関して表 I、I I、I I I または I V で同定された値の 10%以内(好ましくは5%以内、より好まし

くは1%以内)のpIおよびMWを有する。

【0102】

本発明のBPIは、当業者に既知の方法によって定性的にまたは定量的に検出でき、これらとしては、本明細書に記載される好ましい技術に制限されないが、キナーゼアッセイ、イムノアッセイ、およびウェスタンブロットリングが挙げられる。一実施態様において、BPIは、それらのMWおよびpIにより2Dゲル上で分離され、ゲルを染色することによって可視化される。一実施態様において、BPIは、蛍光染料で染色され、蛍光スキャナーでイメージ化される。Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon)がこの目的に適した染料である。その代替の染料は、1999年10月5日付で出願された米国特許第09/412,168号に記載され、参考により完全に本明細書に引用される。

【0103】

または、BPIはイムノアッセイで検出できる。一実施態様において、イムノアッセイは、BPIが存在する場合に免疫特異的結合が起こるような条件下で試験される被検者からのサンプルを抗BPI抗体と接触させ、抗体による免疫特異的結合の量を検出または測定することによってなされる。抗BPI抗体は、本明細書で示唆される方法および技術によって生産することができる；当該分野において既知のこのような抗体の例を表XIに示す。表XIに示されるこれらの抗体は、BPIがそれ自身同じ系列のものであるタンパク質に結合することがすでに知られている。好ましくは、抗BPI抗体は、同じタンパク質の他のイソ型によりむしろBPIに優先的に結合する。好ましい実施態様においては、抗BPI抗体は、同じタンパク質の他のイソ型より、少なくとも2倍大きな親和性、より好ましくは少なくとも5倍大きな親和性、さらにより好ましくは少なくとも10倍大きな親和性でBPIに結合する。表XIに示される抗体がターゲットBPIに対して必要とされる優先的な選択性を発揮しない場合には、当業者は、このような抗体の形成をを目的としてBPI自体を用いることによってさらなる抗体を生成することができる。

【0104】

BPIは、ゲルから適切な膜(例えば、PVDF膜)に移された後、適当なア

ッセイで調べることができ、これらとしては、以下に制限されないが、本明細書に記載される抗BPI抗体、例えば、表XIで同定された抗体、または有益なBPIに対して生じるたのものを用いたウェスタン法及び「サンドイッチ免疫アッセイ」等の技術を用いた競合および非競合アッセイシステムが挙げられる。免疫プロット法は、BPIを同じ遺伝子によってコード化された他のイソ型から免疫特異的に識別するのに必要とされる選択性を発揮するこれらの抗BPI抗体を同定するために使用できる。

【0105】

【表11】

表 XI BPIまたはBPI関連ポリペプチドを認識する既知の抗体

BPI がメンバーであるファミリー群	抗体	製造元	カタログ No.
BPI-5	α -2-アンチプラスミン	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN-RHAPL
BPI-10	アネキシン v (リポコルチン v (lipocortin v))	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM-9020
BPI-11	α -1-ミクログロブリン	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	UCB-A750/R1H/1
BPI-13	α -1-ミクログロブリン	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	UCB-A750/R1H/1
BPI-21	トランスサイレチン	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL-125/2
BPI-23	ケラチン 16	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED-CLA 194
BPI-24	β -2-グリコプロテイン I 前駆体 (アポリポプロテイン H)	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL-20020A
BPI-25	ヒトフィブリノーゲン β -鎖	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	M22090M
BPI-27	ゲルゾリン前駆体, プラズマ (アクチン脱重合因子)	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	RDI-IGFBP2 abr
BPI-29	プラズマレチノール結合タンパク質	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	RDI-CLUST R CabG
BPI-32	ヘモベキシン前駆体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA-6019-1
BPI-33	インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸依存性鎖 (insulin-like growth factor binding protein complex acid labile chain)	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD-D22
BPI-34	ヘモベキシン前駆体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL-574

【0106】

一実施態様において、組織切片における抗体の結合は、異常なBPIの位置(1

ocalization)または一以上のB P Iの異常なレベルを検出するのに用いられる。特定の実施態様においては、B P Iに対する抗体を用いて、異常なレベルのB P Iが乳癌を示すB P Iのレベルに関して被検者からの組織サンプル(例えば、乳房生検)をアッセイできる。本明細書で用いられる、「異常なレベル(aberrant level)」は、乳癌に冒されていない被検者におけるレベルまたは参照レベルに比べて増加または減少するレベルを意味する。所望であれば、乳癌に冒されていない身体の部分から採取された、同じ被検者からの整合サンプル(matched sample)との比較を行なってもよい。

【0107】

適当なイムノアッセイが使用でき、これらとしては、以下に制限されないが、ウェスタン法、ラジオイムノアッセイ、E L I S A (酵素様免疫吸着法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈殿反応、ゲル拡散沈降反応(gel diffusion precipitin reaction)、免疫拡散アッセイ(immunodiffusion assay)、凝集アッセイ(agglutination assay)、補体固定化アッセイ(complement-fixation assay)、免疫放射定量測定法(immunoradiometric assay)、蛍光イムノアッセイ(fluorescent immunoassay)およびプロテインAイムノアッセイ(protein A immunoassays)が挙げられる。

【0108】

例えば、B P Iは、2段階サンドイッチアッセイによって液体サンプル(例えば、血清または血漿、C S F、血液、尿または組織ホモジネート)で検出することができる。第1の段階では、捕捉試薬(capture reagent)(例えば、抗A P I抗体)がB P Iを捕捉するために用いられる。当該分野において既知のこのような抗体の例は、表X Iに示される。捕捉試薬は、必要であれば固相に固定化されてもよい。第2の段階では、直接的または間接的に標識された検出試薬が捕捉されたB P Iを検出するために用いられる。一実施態様において、検出試薬は、レクチンである。B P Iと同じコアタンパク質を有する他のイソ型にまたは抗体によって認識される抗原決定基を共有する他のタンパク質によりむしろB P Iに優先的に結合するレクチンが、この目的のために使用できる。好ましい実施態様においては、選ばれたレクチンは、B P Iと同じコアタンパク質を有する他のイソ

型にまたは抗体によって認識される抗原決定基を共有する他のタンパク質により、少なくとも2倍大きな親和性、より好ましくは5倍大きな親和性、さらにより好ましくは10倍大きな親和性で、BPIに結合する。本明細書の記載に基づいて、所定のBPIを検出するのに適するレクチンは、当該分野において既知の方法によって容易に同定することができ、例えば、Sumar et al., *Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms*, Inの第158頁~第159頁の表I: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, *Lectins and Glycobiology*の第158頁~第174頁(その全体を参照することによってここに組み込まれる)に列挙された一以上のレクチンを試験することである。望ましいオリゴ糖特異性を有するレクチンは、例えば、ニトロセルロース膜等の適当な固体基板に移した後2Dゲル中、2Dゲルのレプリカ中でのBPIの検出能によって、または抗体による捕捉後の2段階アッセイにおいて、同定されうる。別の実施態様においては、検出試薬は、抗体、例えば、リン酸化アミノ酸に免疫特異的に結合する抗体等の、他の翻訳後修飾物を免疫特異的に検出する抗体である。このような抗体の例としては、以下に制限されないが、ホスホチロシン(phosphotyrosine)に結合するもの(BD Transduction Laboratories, catalog nos.: P11230-050/P11230-150; P11120; P38820; P39020)、ホスホセリン(phosphoserine)に結合するもの(Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, catalog no. 61-8100)およびホスホスレオニン(phosphothreonine)に結合するもの(Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, catalog nos. 71-8200, 13-9200)が挙げられる。

【0109】

所望であれば、相補的配列を含む、BPI、関連遺伝子、または関連核酸配列もしくはサブ配列(subsequences)をコード化する遺伝子はまたハイブリダイゼーションアッセイに用いることができる。BPI、または少なくとも8ヌクレオチド、好ましくは少なくとも12ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも15ヌクレオチドからなるそのサブ配列をコード化するヌクレオチドがハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。ハイブリダイゼーションアッセイは、BPIをコード化する遺伝子の異常な発現に関連する、症状、疾患または病気の状態の検出、予想、診断またはモニターに、または乳癌を示唆する徴候または症状

を有する被検者の特異の診断に使用できる。特に、このようなハイブリダイゼーションアッセイは、ハイブリダイゼーションが起こり得るような条件下で、BPIをコード化するDNAまたはRNAにハイブリダイズすることのできる核酸プローブと核酸を含む被検者のサンプルを接触させ、得られたハイブリッド形成を検出または測定することからなる方法によって、行なわれる。ヌクレオチドは、以下に記載するように、乳癌を有する被検者の治療に使用できる。

【0110】

本発明はまた、抗BPI抗体からなる診断キットを提供するものである。加えて、このようなキットは、必要であれば、一以上の下記を含んでもよい；(1) 診断、予想、治療のためのモニターまたはこれら用途の組み合わせのために抗BPI抗体を用いるための説明書；(2) 抗体に対する標識結合パートナー(labeled binding partner)；(3) 抗BPI抗体が固定化される固相(試薬ストリップなど)；および(4) 診断、予想若しくは治療用途またはこれらの組み合わせに関する規定承認を示すラベルまたはインサート。抗体に対する標識結合パートナーを提供しない場合には、抗BPI抗体それ自身が検出可能なマーカー、例えば化学発光、酵素、蛍光、または放射性成分などで標識されてもよい。

【0111】

本発明はまた、BPIをコード化するRNAにハイブリッド形成できる核酸プローブからなるキットを提供するものである。特定の実施態様においては、キットは、一以上の容器中に、適切な反応条件下で、ポリメラーゼ連鎖反応(例えばI nnis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CAを参照)、リガーゼ連鎖反応(E P 320, 308号を参照)、Q レプリカーゼの使用、サイクリックプローブリアクション(cyclic probe reaction)または当該分野において既知の他の方法などによって、BPIをコード化する核酸の少なくとも一部分を増幅し得る一対のプライマー(例えば、それぞれ6~30ヌクレオチド、より好ましくは10~30ヌクレオチド、およびさらにより好ましくは10~20ヌクレオチドの範囲の大きさのもの)を含む。

【0112】

キットはまた、複数のBPIまたはBPIをコードする複数の核酸を検出しよう

るものを提供する。さらにキットは、分離されたB P Iタンパク質、またはB P Iをコードする核酸の予め決定されている量を含み、例えば標準またはコントロールのためである。

【0113】

5.3 B P IおよびB P Iクラスターを同定するための統計的技術

折りたたみ変化(fold change)、ウィルコクソンランク - 合計テスト(Wilcoxon Rank-Sum test)およびt検定等の、単一の変化量の差の分析ツールが、診断的に乳癌と関連する個々のB FまたはB P Iを同定するのにまたは病気の経過を調節する個々のB P Iを同定するのに有用である。しかしながら、多くの場合、当業者は、病気の経過は、単離された個々のB FおよびB P Iよりむしろ、B FまたはB P Iの組み合わせを関連する(およびB P Iの組み合わせによって調節される)ことを理解している。このようなB FおよびB P Iの組み合わせを見出す戦略は、個々のB FおよびB P Iを見出す方法とは異なっている。このような場合、個々のB FおよびB P Iはそれぞれ、1つの変数としてみなすことができ、病気はこれらの変数の相互作用によって生じるジョイント、多変数効果(joint, multi-variate effect)とみなすことができる。

【0114】

以下のステップは、好ましい技術によって得られたデータからマーカを同定するのに用いることができる。

【0115】

第1のステップは、それぞれ乳癌に有意な関連を示すB FまたはB P Iの収集を同定することである。同定されたB FまたはB P Iと乳癌との関連は、個々のB FまたはB P Iが診断として用いられる場合、望ましいような高い有意性を有する必要はない。上述した試験(折りたたみ変化、ウィルコクソンランク - 合計テストなど)がこの段階で用いられる。次に、B FまたはB P Iの適切なコレクションが同定されたら、クラスターを同定できる精密な多変数分析を用いて、乳癌との有意なマルチ変数関連を評価する。

【0116】

線形判別分析(Linear Discriminant Analysis)(LDA)は、変数(即ち、B

FまたはB P I)のクラスターと乳癌との有意な関連を検出するのに使用できる、このような方法の一つである。L D Aを行う場合、質量及び変数の測定値のリニアな組み合わせが乳癌を有する被検者と乳癌に冒されていない被検者とを区別することによって病気の状態を状態を同定できるように、質量のセットが各変数(即ち、B FまたはB P I)を関連する。L D Aに対する増強によって、変数の段階的な包含(inclusion)(または除去)によりモデルの識別力を最適化することができる。したがって、L D Aの結果は、これらに限定されないが、診断、予想、治療または薬剤開発に用いることができるB FまたはB P Iのクラスターである。フレキシブル判別分析などの、L D Aの他の増強された変数は、変数の非線形組み合わせの使用により病気の状態を正常な状態と識別することができる。識別分析の結果は、p o s t - h o c試験によっておよびクラシフィケーションツリー(classification tree)等の別の技術を用いた分析を繰り返すことによっても確認できる。

【0117】

B FまたはB P Iのさらなるカテゴリーは、1サンプル群(例えば、病気の被検者からのサンプル)におけるB FまたはB P Iの特徴存在率(percentage feature presence)を他のサンプル群(例えば、コントロール被検者からのサンプル)におけるB FまたはB P Iの特徴存在率と比較することによる定性測定によって同定されうる。B FまたはB P Iの「特徴存在率(percentage feature presence)」は、B FまたはB P Iが選択された検出方法によって検出可能であるサンプル群におけるサンプルの割合である。例えば、B Fが病気の被検者からのサンプルの95パーセントで検出可能である場合には、そのサンプル群におけるそのB Fの特徴存在率は95パーセントである。病気ではない被検者からのサンプルの5%のみが検出可能なレベルの同じB Fを有する場合には、被検者のサンプルにおけるそのB Fの検出は、その被検者が乳癌に罹っていると考えられることを示唆する。

【0118】

5.4 臨床研究における使用

本発明の診断方法および組成物は、臨床研究をモニターする、例えば、乳癌の

治療のための薬剤を評価するのを補助しうる。一実施形態において、候補分子は、乳癌を有する被験者のBFまたはBPIレベルを乳癌に冒されていない被験者において見出されるレベルにまで回復させる、または治療された被験者においては、BFもしくはBPIレベルを非乳癌値にもしくはその近傍に保つ能力に関して、試験される。一以上のBFまたはBPIのレベルがアッセイされうる。

【0119】

他の実施形態においては、本発明の方法および組成物は、乳癌を有する個体を同定する臨床研究のための候補をスクリーニングするのに用いられる。次に、このような個体は、研究から除外若しくは含有されうるまたは治療若しくは分析のための別個のコホートに配置されうる。所望する場合には、候補は、乳癌を有する個体を同定するために同時にスクリーニングされる；これらのスクリーニングのための手順は当該分野において公知である。

【0120】

他の実施形態においては、本発明の方法および組成物は、所定の乳癌治療剤を用いた治療に最も反応しそうな個体（例えば、特異的な抗体による治療が開発された乳癌抗原を提示する患者）をスクリーニングするために用いられる。

【0121】

5.5 BPIの精製

特定の態様においては、本発明は、抗原決定基（即ち、抗原によって認識されうる）を含むまたは機能的に活性である単離された哺乳動物のBPI、好ましくはヒトBPI、およびその断片を、さらには前記をコード化する核酸配列を提供するものである。本明細書において用いられる「機能的に活性のある(functionally active)」とは、全長の（野生型の）BPIと関連する1以上の機能的な活性、例えば、BPI基質またはBPI結合パートナーへの結合性、抗原性（抗BPI抗体への結合性）、免疫原性、酵素活性などを示す物質をいう。

【0122】

特定の実施形態においては、本発明は、少なくとも5アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、または少なくとも75アミノ酸を含むBPIの断片を提供するものである。BPIの幾つかのまたは全ての領域が欠損し

ている断片も提供され、そのような断片からなるタンパク質（例えば、融合タンパク質）もまた提供される。これらをコード化する核酸も提供される。

【0123】

B P I、B P Iの一部、またはB P Iの前駆体をコード化する組換え核酸が同定されると、遺伝子産物が分析されうる。これは、産物の放射性標識さらにはゲル電気泳動、イムノアッセイなどによる分析などの、産物の物理的または機能的特性に基づくアッセイによって行われる。

【0124】

本明細書で同定されるB P Iは、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心、較差溶解度 (differential solubility)、またはタンパク質の精製のための他の標準的な技術を含む標準的な方法によって、単離および精製されうる。

【0125】

または、B P Iをコード化する組換え核酸が同定されると、B P Iの全アミノ酸配列が、組換え核酸に含まれる遺伝子のコーディング領域のヌクレオチド配列から推測されうる。その結果、タンパク質が当該分野において既知の標準的な化学的方法によって合成されうる(例えば、Hunkapiller et al., 1984, Nature 310:105-111を参照)。

【0126】

他の別の実施形態においては、天然のB P Iが上記記載したような標準的な方法(例えば、イムノアフィニティー精製)によって、天然源から精製されうる。

【0127】

好ましい実施形態においては、B P Iが上記好ましい技術によって単離される。調製スケール用の泳動(preparative-scale runs)では、2 pH単位またはそれ未満のpH範囲を有する狭範囲「ズームゲル」が、Westermeier, 1993, Electrophoresis in Practice (VCH, Weinheim, Germany), pp. 197-209(これは参考により完全に本明細書に引用される)に記載されている方法に従った、等電点段階では好ましい；この修飾によって、大容量の標的とするタンパク質をゲル上のせることができ、これによりゲルから回収されうる単離B P Iの量が増加する。調

製スケール用の泳動にこのようにして使用される際には、好ましい技術は、一回の泳動で単離されたBPIを、通常は、100ngまで得られ、1000ngまで得ることができる。当業者は、ズームゲルがゲル等電点電気泳動を用いる分離ストラテジーに使用できることを察知するであろう。

【0128】

したがって、本発明は、単離されたBPI、単離されたBPI関連ポリペプチド、およびBPIもしくはBPI関連ポリペプチドの単離された誘導体または断片を提供するものである；前記は、組換えDNA技術によってまたは化学的合成方法によって製造されうる。

【0129】

5.6 BPIをコード化するDNAの単離

BPIをコード化する遺伝子のクローニングに関する特定の実施形態が、例を用いて以下に示されるが、限定するものではない。

【0130】

DNAおよびRNA等の、BPIもしくはその断片、またはBPI関連ポリペプチドをコード化する配列からなる本発明のヌクレオチド配列は、従来の化学的アプローチまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅などの、当該分野において既知の方法を用いて合成される。また、本発明のヌクレオチド配列により、例えば、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリーまたは発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、BPI同族体もしくはBPI類似体をコード化する遺伝子が同定およびクローニングできる。

【0131】

例えば、PCR技術によってBPIをコード化する遺伝子をクローニングするために、固定化された(anchored)変性オリゴヌクレオチド(または一連の最も可能性のある(most likely)オリゴヌクレオチド)が、同一タンパク質の部分として同定される全てのBPIペプチド断片のために設計されうる。種々の条件下でのPCR反応は、1以上の種由来の関連するcDNAおよびゲノムDNA(例えば、脳組織由来のまたは免疫系の細胞由来の)を用いて実施され得る。また、ベクトル(vectorette)反応が、上述のようにオリゴヌクレオチド(好ましくはネス

ト状である(nested))を用いた入手可能なcDNAおよびゲノムDNAで実施されうる。ベクトルPCRは、ただ一つのプライマーの配列が知られているような状況で特定のDNA断片の増幅を可能にする方法である。従って、それは、配列情報が一の末端においてのみ入手可能であるDNAの伸長にPCRの適用を拡張する。(Arnold C, 1991, PCR Methods Appl. 1(1):3942; Dyer KD, Biotechniques, 1995, 19(4):5502)。ベクトルPCRは、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリープールをテンプレートとして用いて、例えば、BPIペプチド断片に関してコードする固定化された変性オリゴヌクレオチド(または最も可能性のあるオリゴヌクレオチド)であるプローブにより実施される。

【0132】

固定化された変性オリゴヌクレオチド(および最も可能性のあるオリゴヌクレオチド)は、全てのBPIペプチド断片のために設計されうる。これらのオリゴヌクレオチドは、標識されて、cDNAおよびゲノムDNAライブラリーを含むフィルターにハイブリダイズされてもよい。同一のタンパク質由来の異なるペプチドに対するオリゴヌクレオチドによって、ライブラリーの同じものがしばしば同定されるであろう。cDNAおよびゲノムDNAライブラリーは、適当なまたは所望する哺乳動物種から、例えばヒトから得てもよい。

【0133】

本発明のBPIまたはBPI断片をコード化するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列は、他のタンパク質をコード化する遺伝子の相補的な伸長に選択的にハイブリダイズする能力に有用である。用途によって、BPIをコード化するヌクレオチドの配列に対して、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%同一または100%同一であるヌクレオチド配列を得るために、種々のハイブリダイズ条件が用いられる。

【0134】

高度な選択性のためには、低塩または高温条件のような、比較的ストリンジェントな条件がデュプレックスを形成するために用いられる。本明細書において用いられる「非常にストリンジェントな条件」とは、0.5M NaHPO₄、7

%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、1 mM EDTA 中のフィルターに結合した DNA に 65 でハイブリダイズさせ、68 の 0.1 × SSC / 0.1 % SDS で洗浄することを意味する (Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3; 全体が本明細書に参照として組み込まれる)。用途によっては、デュプレックスの形成のためにより厳しくない条件が必要とされる。本明細書において用いられる「適度にストリンジェントな条件」とは、42 の 0.2 × SSC / 0.1 % SDS で洗浄することを意味する (Ausubel et al., 1989, 上記記載)。ハイブリダイズ条件は、ハイブリットデュプレックスを不安定化させるために、ホルムアミドの量を増加させて添加することによっても、よりストリンジェントにされうる。このように、特定のハイブリダイズ条件は容易に操作でき、一般的には所望する結果に応じて選択されるであろう。一般的には、50 %ホルムアミドの存在下での簡便なハイブリダイズ温度は、BPI をコード化する遺伝子の断片に 95 ~ 100 % 同一であるプローブのためには 42、90 ~ 95 % の同一性のためには 37、70 ~ 90 % の同一性のためには 32 である。

【0135】

ゲノムライブラリーの調製において、DNA断片が生成され、それらの幾つかは、BPIの一部または全部をコード化しているであろう。DNA断片を調製する適当な方法が本発明に使用される。例えば、DNAを種々の制限酵素を用いて特定部位で切断してもよい。または、マンガンの存在下でデオキシリボヌクレアーゼを用いてDNAをフラグメント化してもよく、またはDNAを、例えば、超音波処理によって、物理的に剪断してもよい。次に、DNA断片を、以下に制限されるものではないが、アガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーおよびショ糖勾配遠心分離などの、標準的な技術によって、サイズに従って分離できる。さらに、DNA断片は、以下に制限されるものではないが、プラスミド、コスミド、バクテリオファージラムダまたは T₄、および酵母人工染色体 (YAC) 等の適当なベクターに挿入されうる (例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D .M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II; Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., 及び John Wiley & sons, Inc., New Yorkを参照)。ゲノムライブラリーは、標識プローブへの核酸のハイブリッド形成によって、スクリーニングされてもよい(Benton and Davis, 1977, Science 196:180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961)。

【0136】

本明細書の記載に基づいて、ゲノムライブラリーは、当該分野において既知の最適なアプローチを用いてBPIのペプチドのアミノ酸配列に相当する標識変性オリゴヌクレオチドでスクリーニングされてもよい。使用されるプローブは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、または少なくとも100ヌクレオチドである。好ましくは、プローブは10ヌクレオチドまたはそれより長く、より好ましくは15ヌクレオチドまたはそれより長い。

【0137】

上記表VI、VII、VIIIおよびIXで示されるように、本明細書で開示されているBPIによっては、配列が公知の遺伝子によってコード化された既に同定されたタンパク質のイソ型に対応するものがある。このような遺伝子をスクリーニングするために、遺伝子またはその補体に相補的なプローブも用いられる；好ましくは、プローブは10ヌクレオチドまたはそれより長く、より好ましくは15ヌクレオチドまたはそれより長い。所定のBPIをコード化するヌクレオチド配列が知られていないときには、変性プローブがスクリーニングに使用できる。表XIIに、一連の変性プローブを、以下のBPIのそれぞれに対して提示する：BPI-41、BPI-42、BPI-43、BPI-44、BPI-45、BPI-46、BPI-47、BPI-48、BPI-49、BPI-50

、B P I - 5 1、B P I - 5 2、B P I - 5 3、B P I - 5 4、B P I - 5 5、
B P I - 5 6。本発明において質量分光分析によって配列決定のために用いられ
る方法においては、以下のアミノ酸群は、同一の質量を有するため区別できない
：ロイシン（L）およびイソロイシン（I）；アルパラギン（N）および2つの
グリシン（GG）。さらに、本発明の方法においてアミノ酸の配列決定に用いら
れるタンデム質量分光分析の質量正確性は、以下のアミノ酸群を区別するには不
十分であった：フェニルアラニン（F）および酸化メチオニン（M⁺）；トリプ
トファン（W）およびアスパラギン酸とアラニンとの組み合わせ（即ち、DAま
たはAD）；トリプトファン（W）およびグルタミン酸（E）とグリシン（G）
との組み合わせ（即ち、EGまたはGE）；トリプトファン（W）およびバリン
（V）とセリン（S）との組み合わせ（即ち、VSまたはSV）。表X I Iでは
、可能なアミノ酸配列が、それぞれ質量分光分析によって決定される各配列に対
して列挙され、各可能なアミノ酸配列に対する好ましい、完全に変性された一連
のプローブ群が、提示されている。

【0138】

【表12】

表XII BPIに関するアミノ酸配列およびプローブ

BF #	BPI #	質量分光分析によって決定される部分アミノ酸配列				望ましいプローブ	変性プローブ
		1つプロトン化されたペプチドの質量 ^a	コア配列 ^b	N-末端質量 ^c	C-末端質量 ^d		
BF-47	BPI-46	1180.57	ECQ	257.192	506.225	GAGTGCCAG	GARTGYCAR
BF-48	BPI-47	1249.65	CQATGFSPR	226.16	0	TGCCAGGCCACC GGCTTCAGCCCC CGC	TGYCARGCNACNG GN GNTTYWSNCCNM GN
BF-48	BPI-47	1249.65	CQATGMSPR	226.16	0	TGCCAGGCCACC GGCATGAGCCCC CGC	TGYCARGCNACNG GN GNATGWSNCCNM GN
BF-40	BPI-48	1566.75	DDF	341.23	848.378	GACGACTTC	GAYGAYTTY
BF-40	BPI-48	1566.75	DDM	341.23	848.378	GACGACATG	GAYGAYATG
BF-40	BPI-48	1037.51	LEFFPR	229.1	0	CTGGAGTTCTTC CCCCGC	YTNGARTTYTTYCC NMGN
BF-40	BPI-48	1037.51	IEFFPR	229.1	0	ATCGAGTTCTTC CCCCGC	ATHGARTTYTTYCC NMGN
BF-40	BPI-48	1037.51	LEMFP	229.1	0	CTGGAGATGTTC CCCCGC	YTNGARATGTTYC CNMGN
BF-40	BPI-48	1037.51	LEFMPR	229.1	0	CTGGAGTTCATG CCCCGC	YTNGARTTYATGC CNMGN
BF-40	BPI-48	1037.51	LEMMPR	229.1	0	CTGGAGAGTAGT CCCCGC	YTNGARAGTAGTC CNMGN
BF-40	BPI-48	1037.51	IEMFP	229.1	0	ATCGAGATGTTC CCCCGC	ATHGARATGTTYC CNMGN
BF-40	BPI-48	1037.51	IEFMPR	229.1	0	ATCGAGTTCATG CCCCGC	ATHGARTTYATGC CNMGN
BF-40	BPI-48	1037.51	IEMMPR	229.1	0	ATCGAGATGATG CCCCGC	ATHGARATGATGC CNMGN
BF-22	BPI-49	1192.59	AN	281.149	726.292	GCCAAC	GCNAAY
BF-22	BPI-49	1192.59	AGG	281.149	726.292	GCCGGCGGC	GCNGGNGGN
BF-43	BPI-42	1022.53	VYQ	271.166	361.186	GTGTACCAG	GTNTAYCAR
BF-43	BPI-42	999.552	LLEN	128.159	402.223	CTGCTGGAGAAC	YTNYTNGARAAY
BF-43	BPI-42	999.552	LIEN	128.159	402.223	CTGATCGAGAAC	YTNATHGARAAY
BF-43	BPI-42	999.552	ILEN	128.159	402.223	ATCCTGGAGAAC	ATHYTNGARAAY

BF-43	BPI-42	999.552	IEN	128.159	402.223	ATCATCGAGAAC	ATHATHGARAAY
BF-43	BPI-42	999.552	LLEGG	128.159	402.223	CTGCTGGAGGGC GGC	YTNYTNGARGGNG GN
BF-43	BPI-42	999.552	LIEGG	128.159	402.223	CTGATCGAGGGC GGC	YTNATHGARGGNG GN
BF-43	BPI-42	999.552	IIEGG	128.159	402.223	ATCCTGGAGGGC GGC	ATHYTNARGGGNG GN
BF-43	BPI-42	999.552	IIEGG	128.159	402.223	ATCATCGAGGGC GGC	ATHATHGARGGNG GN
BF-43	BPI-42	1027.43	PA	269.064	590.31	CCCGCC	CCNGCN
BF-1	BPI-50	976.452	CYCQK	218.212	0	TGCTACTGCCAG AAG	TGYTAYGYCARA AR
BF-27	BPI-51	1293.65	LDDYLN	328.22	232.128	CTGGACGACTAC CTGAAC	YTNAYGAYTAYY TNAAY
BF-27	BPI-51	1293.65	LDDYIN	328.22	232.128	CTGGACGACTAC ATCAAC	YTNAYGAYTAYA THAAY
BF-27	BPI-51	1293.65	IDDYLN	328.22	232.128	ATCGACGACTAC CTGAAC	ATHGAYGAYTAYY TNAAY
BF-27	BPI-51	1293.65	IDDYIN	328.22	232.128	ATCGACGACTAC ATCAAC	ATHGAYGAYTAYA THAAY
BF-27	BPI-51	1293.65	LDDYLGG	328.22	232.128	CTGGACGACTAC CTGGCGGC	YTNAYGAYTAYY TNGGNGGN
BF-27	BPI-51	1293.65	LDDYIGG	328.22	232.128	CTGGACGACTAC ATCGCGGC	YTNAYGAYTAYA THGGNGGN
BF-27	BPI-51	1293.65	IDDYLGG	328.22	232.128	ATCGACGACTAC CTGGCGGC	ATHGAYGAYTAYY TNGGNGGN
BF-27	BPI-51	1293.65	IDDYIGG	328.22	232.128	ATCGACGACTAC ATCGCGGC	ATCGAYGAYTAYA THGGNGGN
BF-27	BPI-51	1332.73	HAQ	333.174	663.395	CACGCCCAG	CAYGCNCAR
BF-27	BPI-51	1480.77	EL	360.25	878.412	GAGCTG	GARYTN
BF-27	BPI-51	1480.77	EI	360.25	878.412	GAGATC	GARATH
BF-30	BPI-52	991.372	FGPVPR	318.937	0	TTCGGCCCCGTG CCCCGC	TTYGGNCCNGTNC CNMGN
BF-30	BPI-52	991.372	MGPVPR	318.937	0	ATGGGCCCCGTG CCCCGC	ATGGGNCCNGTNC CNMGN
BF-45	BPI-44	1042.47	YCT	297.13	321.17	TACTGCACC	TAYTGYACN
BF-45	BPI-44	1210.65	VVEE	421.153	333.182	GTGGTGGAGGAG	GTNGTNGARGAR
BF-14	BPI-53	1182.61	WLGD	0	711.46	TGGCTGGGCGAC	TGGYTNGNGAY
BF-14	BPI-53	1182.61	DALGD	0	711.46	GACGCCCTGGGC GAC	GAYGCNYTNGGNG AY

BF-14	BPI-53	1182.61	ADLGD	0	711.46	GCCGACCTGGGC GAC	GCNGAYYTNGGNG AY
BF-14	BPI-53	1182.61	EGLGD	0	711.46	GAGGGCCTGGG CGAC	GARGGNYTNGGN GAY
BF-14	BPI-53	1182.61	GELGD	0	711.46	GGCGAGCTGGG CGAC	GGNGARYTNGGN GAY
BF-14	BPI-53	1182.61	VSLGD	0	711.46	GTGAGCCTGGGC GAC	GTNWSNYTNGGN GAY
BF-14	BPI-53	1182.61	SVLGD	0	711.46	AGCGTGCTGGGC GAC	WSNGTNYTNGGN GAY
BF-14	BPI-53	1182.61	WIGD	0	711.46	TGGATCGGCGAC	TGGATHGNGAY
BF-14	BPI-53	1182.61	DAIGD	0	711.46	GACGCCATCGGC GAC	GAYGCNATHGGNG AY
BF-14	BPI-53	1182.61	ADIGD	0	711.46	GCCGACATCGGC GAC	GCNGAYATHGGNG AY
BF-14	BPI-53	1182.61	EGIGD	0	711.46	GAGGGCATCGGC GAC	GARGGNATHGGN GAY
BF-14	BPI-53	1182.61	GEIGD	0	711.46	GGCGAGATCGGC GAC	GGNGARATHGGN GAY
BF-14	BPI-53	1182.61	VSIGD	0	711.46	GTGAGCATCGGC GAC	GTNWSNATHGGN GAY
BF-14	BPI-53	1182.61	SVIGD	0	711.46	AGCGTGATCGGC GAC	WSNGTNATHGGN GAY
BF-14	BPI-53	1070.49	QCVVDFFR	0	0	CAGTGCGTGGTG GACTTCTTCCGC	CARTGYGTNGTNG AYTTYTYMGN
BF-14	BPI-53	1070.49	QCVDMFR	0	0	CAGTGCGTGGTG GACATGTTCCGC	CARTGYGTNGTNG AYATGTTYMGN
BF-14	BPI-53	1070.49	QCVDFMR	0	0	CAGTGCGTGGTG GACTTCATGCGC	CARTGYGTNGTNG AYTTYATGMGN
BF-14	BPI-53	1070.49	QCVVDMMR	0	0	CAGTGCGTGGTG GACATGATGCGC	CARTGYGTNGTNG AYATGATGMGN
BF-44	BPI-43	1213.65	WLQV	0	687.255	TGGCTGCAGGTG	TGGYTNARGTN
BF-44	BPI-43	1213.65	DALQV	0	687.255	GACGCCCTGCAG GTG	GAYGCNYTNARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	ADLQV	0	687.255	GCCGACCTGCAG GTG	GCNGAYYTNARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	EGLQV	0	687.255	GAGGGCCTGCAG GTG	GARGGNYTNARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	GELQV	0	687.255	GGCGAGCTGCAG GTG	GGNGARYTNARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	VSLQV	0	687.255	GTGAGCCTGCAG GTG	GTNWSNYTNARG TN

BF-44	BPI-43	1213.65	SVLQV	0	687.255	AGCGTGCTGCAG GTG	WSNGTNYTNCARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	WIQV	0	687.255	TGGATCCAGGTG	TGGATHCARGTN
BF-44	BPI-43	1213.65	DAIQV	0	687.255	GACGCCATCCAG GTG	GAYGCNATHCARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	ADIQV	0	687.255	GCCGACATCCAG GTG	GCNGAYATHCARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	EGIQV	0	687.255	GAGGGCATCCAG GTG	GARGGNATHCARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	GEIQV	0	687.255	GGCGAGATCCAG GTG	GGNGARATHCARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	VSIQV	0	687.255	GTGAGCATCCAG GTG	GTNWSNATHCARG TN
BF-44	BPI-43	1213.65	SVIQV	0	687.255	AGCGTGATCCAG GTG	WSNGTNATHCARG TN
BF-44	BPI-43	1190.63	YFV	213.987	567.385	TACTTCGTG	TAYTTYGTN
BF-44	BPI-43	1190.63	YMV	213.987	567.385	TACATGGTG	TAYATGGTN
BF-44	BPI-43	1213.63	WLQG	0	729.296	TGGCTGCAGGGC	TGGYTNCARGGN
BF-44	BPI-43	1213.63	DALQG	0	729.296	GACGCCCTGCAG GGC	GAYGCNYTNCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	ADLQG	0	729.296	GCCGACCTGCAG GGC	GCNGAYTNCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	EGLQG	0	729.296	GAGGGCCTGCAG GGC	GARGGNYTNCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	GELQG	0	729.296	GGCGAGCTGCAG GGC	GGNGARYTNCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	VSLQG	0	729.296	GTGAGCCTGCAG GGC	GTNWSNYTNCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	SVLQG	0	729.296	AGCGTGCTGCAG GGC	WSNGTNYTNCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	WIQG	0	729.296	TGGATCCAGGGC	TGGATHCARGGN
BF-44	BPI-43	1213.63	DAIQG	0	729.296	GACGCCATCCAG GGC	GAYGCNATHCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	ADIQG	0	729.296	GCCGACATCCAG GGC	GCNGAYATHCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	EGIQG	0	729.296	GAGGGCATCCAG GGC	GARGGNATHCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	GEIQG	0	729.296	GGCGAGATCCAG GGC	GGNGARATHCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	VSIQG	0	729.296	GTGAGCATCCAG GGC	GTNWSNATHCARG GN
BF-44	BPI-43	1213.63	SVIQG	0	729.296	AGCGTGATCCAG	WSNGTNATHCARG

【 0 1 4 2 】

						GGC	GN
BF-42	BPI-41	1288.65	DESLQVAER	242.12	0	GACGAGAGCCTG CAGGTGGCCGAG CGC	GAYGARWSNYTNC ARGTNGCNGARM GN
BF-42	BPI-41	1288.65	DESIQVAER	242.12	0	GACGAGAGCATC CAGGTGGCCGAG CGC	GAYGARWSNATHC ARGTNGCNGARM GN
BF-46	BPI-45	1303.65	VHN	226.19	727.295	GTGCACAAC	GTNCAYAAAY
BF-46	BPI-45	1303.65	VHGG	226.19	727.295	GTGCACGGCGG C	GTNCAYGGNGGN
BF-17	BPI-54	1042.49	PFP	457.159	244.144	CCCTTCCCC	CCNTTYCCN
BF-17	BPI-54	1042.49	PMP	457.159	244.144	CCCATGCCC	CCNATGCCN
BF-18	BPI-55	913.427	VPN	271.24	332.09	GTGCCCAAC	GTNCCNAAY
BF-18	BPI-55	913.427	VPGG	271.24	332.09	GTGCCCGGCGG C	GTNCCNGGNGGN
BF-34	BPI-56	1158.49	FF	278.078	586.302	TTCTTC	TTYTTY
BF-34	BPI-56	1158.49	FM	278.078	586.302	TTCATG	TTYATG
BF-34	BPI-56	1158.49	MF	278.078	586.302	ATGTTC	ATGTTY
BF-34	BPI-56	1158.49	MM	278.078	586.302	ATGATG	ATGATG
BF-34	BPI-56	1712.79	EN	292.2	1177.59	GAGAAC	GARAAAY
BF-34	BPI-56	1712.79	EGG	292.2	1177.59	GAGGGCGGC	GARGGNGGN

- a これは、1つのプロトン (H^+) の付加を有する中性ペプチド (M) の質量に対応する。
- b 「コア配列」は、ペプチドの断片質量スペクトルの解釈から明らかにされるペプチドの部分アミノ酸配列である。
- c ペプチドのN-末端質量は、コア配列の出発点とペプチドのN-末端との間の質量である。
これは、ペプチドのN-末端からコア配列まで伸長する構成アミノ酸残基の付加に対応する中性質量である (本明細書の文章においては、アミノ酸残基は、一般構造: $-NH-CHR-CO-$ のアミノ酸残基をいう)。
- d C-末端質量は、コア配列の末端とペプチドのC-末端との間の質量である。
この質量は、水分子 (H_2O) および1つのプロトン (H^+) の付加を有するコア配列の末端からペプチドのC-末端に伸長する構成アミノ酸残基の付加に対応する (本明細書の文章においては、アミノ酸残基は、一般構造: $-NH-CHR-CO-$ のアミノ酸残基をいう)。

【0143】

上記表XIIでは、好ましい、変異された一連のプロープは、GCG SeqWeb (商標) 配列分析ソフトウェア (SeqWeb™ version 1.1, part of Wisconsin Package Version 10, Genetics Computer Group, Inc.)において使用されているGCG Nucleotide Ambiguity Codesを用いて記載される。これらのNucleotide Ambiguity Codesは、以下の意味を有する。

【0144】

GCGコード	意味
A	A
C	C
G	G
T	T
U	T
M	AまたはC
R	AまたはG
W	AまたはT
S	CまたはG
Y	CまたはT
K	GまたはT
V	AまたはCまたはG
H	AまたはCまたはT
D	AまたはGまたはT
B	CまたはGまたはT
X	GまたはAまたはTまたはC
N	GまたはAまたはTまたはC

【0145】

GCGは、IUPAC - IUBによって報告されるアミノ酸コードおよびヌクレオチド表現に対する文字コードを使用している。これらのコードは、EMBL、GenBank及びPIR databasesを用いたコードと適合する。IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry. A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds (Recommendations 1993), Blackwell Scientific publications, 1993を参照。

【0146】

ライブラリーがスクリーニングされる際に、BPIまたはその断片をコード化する挿入DNAを有するクローンは、対応する変性オリゴヌクレオチドプローブ（またはその補体）の群の1種またはそれ以上にハイブリッド形成するであろう。このようなオリゴヌクレオチドプローブのゲノムライブラリーへのハイブリッド形成は、当該分野において既知の方法を用いて実行される。例えば、上述の変性オリゴヌクレオチド群、もしくはそれらの補体（またはそのような群のいずれか、もしくはその補体）を用いたハイブリッド形成は、上記定義された高度にストリンジентな条件もしくは適度にストリンジентな条件下で行なわれる、または $2 \times \text{SSC}$ 、 $1.0\% \text{SDS}$ 中で、 50°C で行なわれ、上記高度にストリンジентなまたは適度にストリンジентな条件で記載した洗浄条件を用いて洗浄される。

【0147】

本発明のさらなるの態様においては、BPI全体、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、またはBPI関連ポリペプチドの断片前記のいずれかコード化するヌクレオチド配列を含むクローンはまた、発現ライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。例えば、関連する源由来のDNAを単離し、ランダムな断片を調製して、ベクター中に挿入された配列がベクターが次に導入される宿主細胞によって発現されうるように発現ベクター（例えば、バクテリオファージ、プラスミド、ファージミドまたはコスミド）の中に連結(ligated)する。続いて、種々のスクリーニングアッセイが、発現させられたBPIまたはBPI関連ポリペプチドを選択するために用いられうる。一実施形態において、本発明の種々の抗BPI抗体が、当該分野において既知の方法を用いて所望するクローンを同定するために用いられうる。例えば、Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Appendix IVを参照。ライブラリー由来のコロニーまたはプラークを抗体と接触させて、抗体に結合したこれらのクローンを同定する。

【0148】

一実施形態において、BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、またはBPI関連ポリペプチドの断片をコード化するDNAを含むコロニーまたはプラークは、参照として本明細書に引用されるOlsvick et al., 29th ICAAC, Houston, Tex. 1989に従って、DYNAビーズを用いて検出されうる。抗BPI抗体は、トシル化されたDYNAビーズM280に架橋された後、これらの抗体含有ビーズは組換えポリペプチドを発現するコロニーまたはプラークと接触させられる。BPIまたはBPI関連ポリペプチドを発現するコロニーまたはプラークは、ビーズに結合しているものとして同定される。

【0149】

または、抗BPI抗体は、シリカまたはセライト(Celite)（登録商標）樹脂等の、適当な支持体に非特異的に固定化されうる。次に、この材料を用いて、本明細書に記載されるようなBPIタンパク質またはBPI関連ポリペプチドを発現する細菌コロニーに吸着する。

【0150】

他の態様においては、B P I全体またはその一部をコード化する実質的に純粋なDNA（即ち、混入核酸を実質的に含まないDNA）をゲノムDNAから単離するのにPCR増幅が用いられてもよい。好ましくは、このようなDNAは、少なくとも95%純粋であり、より好ましくは99%純粋である。本明細書に開示されているB P Iのペプチド配列に対応するオリゴヌクレオチド配列、変性体(degenerate)などが、プライマーとして使用できる。

【0151】

PCRは、例えば、Perkin-Elmer Cetusサーマルサイクラー(Perkin-Elmer Cetus thermal cycler)及びTaqポリメラーゼ(Gene Amp（登録商標）またはAmpliTaq DNAポリメラーゼ)を用いることによって行なわれる。PCR反応に使用される、数種の異なる変性プライマーを合成することを選択してもよい。変性プライマーとDNA中の対応する配列とのヌクレオチド配列の相似性をより大きくまたはより小さくするために、PCR反応を開始するのに用いられるハイブリッド形成条件のストリンジェンシーを変化させることも可能である。B P Iをコード化する配列のセグメントの増幅が成功した後、そのセグメントを分子的にクローニングし、配列を決定し、完全なゲノムクローンを単離するためのプローブとして利用してもよい。これにより、さらに、以下に記載されるように、遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現の分析、および機能分析のためのそのタンパク質産物の生産が可能になるであろう。

【0152】

B P Iをコード化する遺伝子はまた、核酸のハイブリッド形成によるmRNAの選択さらにはインビトロ翻訳によって同定されてもよい。この方法において、断片はハイブリッド形成によって相補的mRNAを単離するために用いられる。このようなDNA断片は、他の種（例えば、マウス、ヒト）のB P Iをコード化する、入手可能で精製されたDNAを表してもよい。単離されたmRNAの単離産物のインビトロの翻訳産物の免疫沈降または機能アッセイ（例えば、インビトロでの凝集能；レセプターへの結合性）によって、mRNA、およびこれにより所望の配列を含む相補的DNA断片が同定される。加えて、特定のmRNAが、

細胞から単離されたポリソームのB P Iを特異的に認識する固定化抗体への吸着によって、選択されうる。B P Iをコード化する放射性標識されたc D N Aは、選択されたm R N A（吸着ポリソーム由来の）をテンプレートとして用いて合成されうる。次に、放射性標識されたm R N Aまたはc D N Aは、他のゲノムD N A断片の中からB P Iをコード化するD N A断片を同定するためのプローブとして用いられうる。

【0153】

B P Iをコード化するゲノムD N Aを単離することの別の方法としては、これらに限定されるものではないが、既知の配列から遺伝子配列そのものを化学的に合成することまたはB P Iをコード化するm R N Aに対してc D N Aを作製することが挙げられる。例えば、B P Iをコード化する遺伝子のc D N AクローニングのためのR N Aは、B P Iが発現する細胞から単離されうる。当業者は、本明細書の記載から、他の方法を使用してもよく、またこれは本発明の概念の範囲内であることを理解するであろう。

【0154】

適当な真核細胞が、B P Iをコード化する遺伝子の分子クローニングのための核酸源として役に立ちうる。B P Iをコード化する核酸配列は、脊椎動物、哺乳動物、霊長類、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、ニワトリ、ウマ、イヌまたはマウス源から単離されうる。D N Aは、クローニングされたD N A（例えば、D N A「ライブラリー」）から当該分野において既知の標準的な方法によって、化学的合成によって、c D N Aクローニングによって、または所望する細胞から精製されたゲノムD N Aまたはその断片のクローニングによって、得ることができる（例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II.を参照）。ゲノムD N Aから誘導されるクローンは、コーディング領域に加えて調節およびイントロンD N A領域を含んでいてもよい；c D N Aから誘導されるクローンはエキソン配列のみを含んでいるであろう。

【0155】

さらに、同定され、単離された遺伝子またはcDNAは、適当なクローニングベクター内に挿入されうる。当該分野において既知の数多くのベクター-宿主系が用いられうる。当業者が推測するように、選択されるベクター系が使用される宿主細胞と適合することが唯一の制限事項である。このようなベクターとしては、以下に限定されるものではないが、ラムダ誘導体等のバクテリオファージ、PBR322やpUCプラスミド誘導体若しくはBluescriptベクター(Stratagene)等のプラスミドまたはアデノウイルス、アデノ-関連ウイルス(adeno-associated virus)若しくはレトロウイルス等の修飾ウイルスが挙げられる。クローニングベクターへの挿入は、例えば、相補的な付着端を有するクローニングベクターにDNA断片を連結することによって、達成されうる。しかしながら、DNAを断片化するために用いられる相補的な制限部位がクローニングベクター中に存在しない場合には、DNA分子の末端を酵素的に修飾してもよい。または、DNA末端にヌクレオチド配列(リンカー)を連結することによって、所望する部位を作製してもよい；これらの連結されるリンカーは、制限エンドヌクレアーゼの認識配列をコード化する特定の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。代替りの方法としては、開裂されたベクターおよびBPIをコード化する遺伝子が、ホモポリマーテーリング(homopolymeric tailing)によって修飾されてもよい。組換え分子は、遺伝子配列の多くのコピーが生成されるように、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションなどを介して宿主細胞中に導入することができる。

【0156】

特定の実施形態においては、BPIをコード化する単離された遺伝子、cDNAまたは合成DNA配列を取り込んでいる組換えDNA分子で宿主細胞を形質転換することによって、遺伝子の多重コピーの生成ができる。このようにして、遺伝子は、形質転換体を成長させ、形質転換体から組換えDNA分子を単離し、必要であれば単離された組換えDNAから挿入された遺伝子を回収することによって、大量に得られる。

【0157】

本発明のヌクレオチド配列としては、天然のB P Iと実質的に同じアミノ酸配列を有するアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列、機能的に同等のアミノ酸を有するアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列、B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、またはB P I関連ポリペプチドの断片をコード化するヌクレオチド配列が挙げられる。

【0158】

特定の実施形態においては、B P I関連ポリペプチドをコード化する単離された核酸分子は、1以上のアミノ酸の置換、付加または欠失がコード化されたタンパク質中に導入されるように、1以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失をB P Iのヌクレオチド配列中に導入することによって作製される。当業者に既知の標準的な技術が、例えば、特定部位の突然変異誘発およびPCRで媒介された突然変異などの、突然変異を導入するのに使用できる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1以上の推定された非必須アミノ酸残基に代えられる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を同様の電荷を有する側鎖を持つアミノ酸残基で置換することをいう。同様の電荷を有する側鎖を持つアミノ酸残基の群は当該分野において定義される。これらの群としては、塩基性の側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、電荷のない極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 γ -分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。または、飽和突然変異誘発(saturation mutagenesis)などによって、コーディング配列の全部または一部にランダムに突然変異が導入されてもよく、得られた突然変異体は、活性を保持する突然変異体を同定するために、生物学的活性に関してスクリーニングされる。突然変異誘発後は、コード化されたタンパク質を発現でき、タンパク質の活性が決定される。

【0159】

5.7 BPIをコード化するDNAの発現

BPI、BPIの類似体、BPI関連ペプチド、または前記いずれかの断片若しくは他の誘導体をコードするヌクレオチド配列は、適当な発現ベクター、即ち、挿入されたタンパク質のコーディング配列の転写及び翻訳の必要な要素(element)を含むベクター中に挿入されうる。必要な転写及び翻訳シグナルはまた、BPIをコード化する若しくはその隣接領域、またはBPI関連ポリペプチドをコード化する天然遺伝子若しくはその隣接領域によって供給されうる。様々な宿主-ベクター系が、タンパク質のコーディング配列を発現するのに本発明において利用される。これらとしては、以下に制限されないが、ウィルス(例えば、ワクチニアウィルス、アデノウィルス等)に感染させた哺乳動物細胞系；ウィルス(例えば、バキュロウィルス)に感染させた昆虫細胞系；酵母ベクターを含む酵母等の微生物；またはバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、若しくはコスミドDNAで形質転換された細菌が挙げられる。ベクターの発現系は、その強さや特異性が異なる。使用される宿主-ベクター系によって、数多くの適当な転写及び翻訳要素のうちの一が使用されてもよい。特定の実施態様においては、ヒト遺伝子をコード化するヌクレオチド配列(またはヒトBPIの機能的に活性のある部分をコード化するヌクレオチド配列)が発現される。さらなる他の実施態様においては、BPIのドメインを有するBPIの断片が発現される。

【0160】

ベクターへのDNA断片の挿入について従来記載されるいずれかの方法が、適当な転写及び翻訳コントロールシグナルならびにタンパク質のコーディング配列から構成されるキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築するのに使用される。これらの方法としては、インビトロの組換えDNA及び合成技術ならびにインビボの組換え体(遺伝子組換え)が挙げられる。BPIまたはこの断片をコード化する核酸配列の発現は、BPIまたはこの断片が組換えDNA分子で形質転換された宿主で発現するように第2の核酸配列によって制御されてもよい。例えば、BPIの発現は、当該分野において既知のプロモーターまたはエンハンサー要素によって制御されてもよい。BPIまたはBPI関連ポリペプチドをコード化する遺伝子の発現を制御するのに使用されるプロモーターとしては、以下に制限され

ないが、SV40初期プロモーター(early promoter)領域(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター(Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42)、テトラサイクリン(Tet)プロモーター(Gossen et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:55475551); -ラクタマーゼプロモーター((-lactamase promoter)(Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731)、またはtacプロモーター(DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25;また、"Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94をも参照)等の原核生物の発現ベクター; ノパリンシンセターゼプロモーター領域(Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213)またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871)、及び光合成酵素リブローズ2リン酸カルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120)を有する植物の発現ベクター; Gal4プロモーター、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター等の酵母または他の真菌由来のプロモーター要素、ならびに組織特異性を発揮しかつ形質転換動物で利用されてきた、以下の動物の転写制御領域: 膵腺房細胞中で活性を有するエラスターゼI遺伝子制御領域(Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 膵臓ベータ細胞中で活性を有するインスリン遺伝子制御領域(Hanahan, 1985, Nature 315:115-122)、リンパ系細胞中で活性を有する免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444)、精巣、乳房、リンパ系及び肥満細胞中で活性を有するマウス乳腺癌ウイルスの制御領域(Leder et al., 1986, Cell 45:485-495)、肝臓中で活性を有するアルブミン遺伝子制

御領域(Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276)、肝臓中で活性を有する - フェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58) ; 肝臓中で活性を有する - 1 - アンチトリプシン遺伝子制御領域(Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171)、骨髄細胞中で活性を有する - グロブリン遺伝子制御領域(Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94) ; 脳の乏突起膠細胞中で活性を有するミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712) ; 骨格筋中で活性を有するミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域(Sani, 1985, Nature 314:283-286) ; ニューロン細胞(neuronal cell)中で活性を有するニューロン特異的エノラーゼ(neuronal-specific enolase) (NSE) (Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83) ; ニューロン細胞中で活性を有する脳誘導神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor) (BDNF) (Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Com. 253:818-823) ; 星状細胞中で活性を有する神経膠線維酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター(Gomes et al., 1999, Braz J Med Biol Res 32(5):619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83)及び視床下部中で活性を有する性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378)が挙げられる。

【0161】

特定の実施態様においては、BPIをコード化する核酸に連結されるプロモーター、一以上の複製のオリジン、及び必要であれば、一以上の選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）からなるベクターが使用される。

【0162】

特定の実施態様においては、発現構築物は、BPIまたはBPI関連ポリペプチドのコーディング配列を3つのpGEXベクター（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター；Smith and Johnson, 1988, Gene 7:31-40）のそれぞれのEcoRI制限部位にサブクローニングすることによって作製される。これによって、正確なリーディングフレーム中でサブクローンからBPI産物またはBPI関連ポリペプチドが発現できる。

【0163】

哺乳動物宿主細胞では、数多くのウィルスを基礎とした発現系が利用される。アデノウィルスが発現ベクターとして使用される場合には、BPIのコーディング配列またはBPI関連ポリペプチドのコーディング配列は、アデノウィルスの転写/翻訳制御複合体、例えば、レイトプロモーター(late promoter)及び3部分リーダー配列(tripartite leader sequence)に連結されてもよい。次に、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボ組換えによってアデノウィルスのゲノムに挿入されてもよい。ウィルスゲノムの非必須領域(例えば、領域E1またはE3)の挿入によって、生育可能でかつ感染宿主中で抗体分子を発現できる組換えウィルスが得られるであろう(例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照)。特定の開始シグナルはまた、挿入された抗体のコーディング配列の効率的な翻訳に必要であるかもしれない。これらのシグナルとしては、ATG開始コドン及び隣接配列が挙げられる。さらに、開始コドンは、完全な挿入物の翻訳を確かに行なうために所望のコーディング配列と同じリーディングフレームにいなければならない。これらの外因性の翻訳制御シグナル及び開始コドン様々なオリジン由来であってもよく、天然及び合成双方であってもよい。発現の有効性は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含ませることによって促進されてもよい(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544を参照)。

【0164】

BPIまたはBPI関連ポリペプチドをコード化する遺伝子の挿入物を含む発現ベクターは、3種の一般的なアプローチによって同定できる:(a)核酸のハイブリダイゼーション、(b)「マーカー」遺伝子機能の存在または不存在、及び(c)挿入配列の発現。第一のアプローチでは、発現ベクター中に挿入されたBPIをコード化する遺伝子の存在が、BPIをコード化する挿入遺伝子と同一性を有する配列からなるプローブを用いた核酸のハイブリダイゼーションによって検出できる。第二のアプローチでは、組換えベクター/宿主系が、ベクターへのBPIをコード化する遺伝子の挿入によって生じる特定の「マーカー」遺伝子機能(例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、形質転換の表現

型、バキュロウィルスにおけるオクルージョンボディ (occlusion body) の形成など) の存在または不存在に基づいて同定及び選択できる。例えば、B P I をコード化する遺伝子がベクターのマーカージェン配列内に挿入されると、B P I 挿入物をコード化する遺伝子を含む組換え体は、マーカージェン機能の不存在によって同定できる。第三のアプローチでは、組換え発現ベクターは、組換え体によつた発現される遺伝子産物 (即ち、B P I) をアッセイすることによって同定できる。このようなアッセイは、例えば、抗 B P I 抗体との結合などの、インビトロのアッセイシステムにおける B P I の物理的なまたは機能的な特性を基礎とするものでありうる。

【 0 1 6 5 】

加えて、挿入された配列の発現を調節する、または所望の特定の様式で遺伝子産物を修飾、処理する宿主細胞株が選択されてもよい。特定のプロモーターからの発現は特定のインデューサーの存在下で上昇できる ; このため、遺伝子操作された B P I または B P I 関連ポリペプチドの発現を制御してもよい。さらに、異なる宿主細胞は、翻訳及び翻訳後プロセッシング及び修飾 (例えば、配糖化、タンパク質のリン酸化) に関する特徴的な及び特異的な機構を有する。適当な細胞系または宿主系が、発現される外来タンパク質の所望の修飾及びプロセッシングを確かに行なうために選択されうる。例えば、細菌系での発現は配糖化されない産物を生産するであろうし、酵母における発現は配糖化された産物を生産するであろう。一次転写産物の適当なプロセッシング、配糖化、及び遺伝子産物のリン酸化に関する細胞機構 (cellular machinery) を有する真核宿主細胞を使用してもよい。このような哺乳動物宿主細胞としては、以下に制限されないが、C H O、V E R Y、B H K、H e l a、C O S、M D C K、2 9 3、3 T 3、W I 3 8、および特に、例えば、S K - N - A S、S K - N - F I、S K - N - D Z のヒト神経芽細胞腫 (Sugimoto et al., 1984, J. Natl. Cancer Inst. 73: 51-57)、S K - N - S H のヒト神経芽細胞腫 (Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704: 450-460)、ダオイのヒト小脳髄芽細胞腫 (Daoy human cerebellar medulloblastoma) (He et al., 1992, Cancer Res. 52: 1144-1148)、D B T R G - 0 5 M G グリア芽細胞腫細胞 (Kruse et al., 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol. 28A: 609-614)、I M R

- 3 2 のヒト神経芽細胞腫(Cancer Res., 1970, 30: 2110-2118)、1 3 2 1 N 1 のヒト星状細胞腫(Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1977, 74: 4816)、M O G - G - C C M のヒト星状細胞腫(Br. J. Cancer, 1984, 49: 269)、U 8 7 M G のヒトグリア芽細胞腫 - 星状細胞腫(Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1968, 74: 465-486)、A 1 7 2 のヒトグリア芽細胞腫(Olopade et al., 1992, Cancer Res. 52: 2523-2529)、C 6 のラット神経膠腫細胞(Benda et al., 1968, Science 161: 370-371)、N e u r o - 2 a のマウス神経芽細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 65: 129-136)、N B 4 1 A 3 のマウス神経芽細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1962, 48: 1184-1190)、S C P のヒツジ脈絡叢(Bolin et al., 1994, J. Virol. Methods 48: 211-221)、G 3 5 5 - 5、P G - 4 のネコ正常星状細胞(Haapala et al., 1985, J. Virol. 53: 827-833)、M p f のフェレット脳(Trowbridge et al., 1982, In Vitro 18: 952-960)等のニューロン細胞系、ならびに例えば、C R L 7 0 3 0 及び H s 5 7 8 B s t 等の C T X T N A 2 のラットの正常な脳皮質(Radany et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6467-6471)等の正常な細胞系が挙げられる。さらに、異なるベクター / 宿主発現系が異なる程度のプロセッシング反応を行なってもよい。

【 0 1 6 6 】

組換えタンパク質の長期間で高収率の生産のために、安定した発現が好ましい。例えば、異なって発現するまたは経路の異なる遺伝子タンパク質を安定して発現する細胞系を操作してもよい。ウィルスの複製オリジンを含む発現ベクターを用いるよりむしろ、宿主細胞に、適当な発現制御要素(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)によって制御されるDNA及び選択マーカーを形質転換してもよい。外来DNAを導入後、操作された細胞を栄養強化培地で1~2日間生育させた後、選択培地に切り換えてもよい。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、これにより細胞はそのクロモソーム中にプラスミドを安定して組み込み、生育して細胞増殖巣を形成することができ、さらに、クローニングされて細胞系に拡張できる。この方法は、異なって発現するまたは経路の異なる遺伝子タンパク質を発現する細胞系を操作するのに好ましく使用される。このような操作された細胞

系は、異なって発現するまたは経路の異なる遺伝子タンパク質の内因性の活性に影響を与える化合物のスクリーニング及び評価に特に有用である。

【0167】

多くの選択系が使用され、これらとしては、以下に制限されないが、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ(Wigler, et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy, et al., 1980, Cell 22:817)遺伝子が、それぞれ、 $t k^{-}$ 、 $h g p r t^{-}$ または $a p r t^{-}$ 細胞で使用できる。また、代謝拮抗剤耐性が、メトトレキセートに対する耐性を付与する、 $d h f r$ (Wigler, et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527) ; ミコフェノール酸(mycophenolic acid)に対する耐性を付与する、 $g p t$ (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072) ; アミノグリコシド G - 4 1 8 に対する耐性を付与する、 $n e o$ (Colberre-GarBPin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) ; 及びハイグロマイシンに対する耐性を付与する、 $h y g r o$ (Santerre, et al., 1984, Gene 30:147) 遺伝子に関して選択の基礎として使用できる。

【0168】

他の特定の実施態様においては、B P I、断片、類似体、または誘導体を、融合物、またはキメラタンパク質産物(異種タンパク質配列にペプチド結合を介して結合されたタンパク質、断片、類似体、または誘導体からなる)として発現してもよい。例えば、本発明のポリペプチドを、免疫グロブリン(I g A、I g E、I g G、I g M)の定常ドメイン、またはその一部(C H 1、C H 2、C H 3、またはその組み合わせ及びその一部)と融合して、キメラポリペプチドを得てもよい。このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増加し、さらに免疫系への上皮のバリアを介した抗原のデリバリーを促進する。インビボでの半減期の増加及び精製の容易さは、ヒト C D 4 ポリペプチドの始めの2つのドメイン及び哺乳動物の免疫グロブリンの重または軽鎖の定常領域の様々なドメインからなるキメラタンパク質について示された。例えば、E P 3 9

4, 827; Traunecker et al., Nature, 331:8486 (1988)を参照。免疫系への上皮のバリアを介した抗原の促進されたデリバリーは、IgGまたはFc断片等のFcRn結合パートナーに接合された抗原(例えば、インスリン)について示された(例えば、PCT公開公報 WO 96/22024及びWO 99/04813を参照)。

【0169】

BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、またはBPI関連ポリペプチドの断片をコード化する核酸は、発現ポリペプチドの検出及び精製を助けるためにエピトープタグ(例えば、ヘマグルチニン(「HA」)タグまたはフラグタグ(flag tag))に融合されてもよい。例えば、Janknecht et al.によって記載されたシステムによって、ヒト細胞系で発現した非変性融合タンパク質を容易に精製できる(Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。

【0170】

融合タンパク質は、適当なコーディングフレーム中に、当該分野において既知の方法によって所望のアミノ酸配列をコード化する適当な核酸配列を相互に連結し、当該分野において一般的に既知の方法によってキメラ産物を発現することによって作製できる。または、融合タンパク質は、例えば、ペプチド合成器の使用によって、タンパク質合成技術によって作製してもよい。

【0171】

cDNA及びゲノム配列双方がクローニング、発現されうる。

【0172】

5.8 BPIのドメインの構造

BPIによってはドメインが当該分野において既知であり、科学的な文献に記載されている。さらに、BPIのドメインは、当業者に既知の技術を用いて同定できる。例えば、BPIの一以上のドメインは、下記プログラム: ProDom、TMpred、及びSAPSの一以上を用いて同定できる。ProDomは、ポリペプチドのアミノ酸配列をコンパイルされたドメイン(compiled domain)のデータベースと比較するものである(例えば、<http://www.toulouse.inra.fr/pr>

odom.html; Corpet F., Gouzy J. & Kahn D., 1999, Nucleic Acids Res., 27:263-267を参照)。TMpredは、ポリペプチドの膜スパン領域(membrane-spanning region)およびこれらの配向を予想するものである。このプログラムは、TMbase、天然に生じる膜内外タンパク質のデータベースの統計学的な分析に基づくアルゴリズムを使用するものである(例えば、<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED#form.html>; Hofmann & Stoffel. (1993) "TMbase - A database of membrane spanning proteins segments." Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347, 166を参照)。SAPSプログラムは、チャージクラスター(charge-cluster)、繰り返し、疎水性領域、組成ドメイン(compositional domain)のような統計学的に有意な特徴に関してポリペプチドを分析するものである(例えば、Brendel et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2002-2006を参照)。ゆえに、本明細書の記載に基づいて、当業者は、酵素または結合活性を有するBPIのドメインを同定でき、さらに、このようなドメインをコード化するヌクレオチド配列を同定できる。次に、これらのヌクレオチド配列は、BPIの酵素または結合活性を保持するBPI断片の組換え発現に使用できる。

【0173】

本明細書の記載に基づいて、当業者は、酵素または結合活性を有するBPIのドメインを同定でき、さらに、このようなドメインをコード化するヌクレオチド配列を同定できる。次に、これらのヌクレオチド配列は、BPIの酵素または結合活性を保持するBPI断片の組換え発現に使用できる。

【0174】

一実施態様において、BPIは、既知のポリペプチドの同定されたドメインと十分同等なアミノ酸配列を有する。本明細書に使用される、「十分同等な」ということばは、第1及び第2のアミノ酸またはヌクレオチド配列が共通の構造ドメイン若しくは共通の機能的な活性または双方を有するまたはコード化するのに十分多数の第2のアミノ酸またはヌクレオチド配列と一致するまたは等価の(例えば、同じ側鎖を有する)アミノ酸残基またはヌクレオチドを含む第1のアミノ酸またはヌクレオチド配列を意味する。

【0175】

B P I ドメインは、当業者によく知られた技術を用いてその機能を評価できる。例えば、ドメインは、当業者に既知の技術を用いてキナーゼ活性についてまたはDNAへの結合能について評価できる。キナーゼ活性は、例えば、ポリペプチドの基質のリン酸化能を測定することによって、評価できる。DNA結合能は、例えば、電気移動度シフトアッセイ(mobility shift assay)においてDNA結合素子へのポリペプチドの結合能を測定することによって、評価できる。

【0176】

5.9 B P I に対する抗体の生産

本発明によると、B P I、B P I 類似体、B P I 関連タンパク質または前記いずれかの断片若しくは誘導体が、免疫原等の免疫特異的に結合する抗体を得るための免疫原として使用されてもよい。このような免疫原は、上記した方法などの、いずれかの公知の手段によって単離できる。本発明の抗体としては、以下に制限されないが、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異(bispecific)、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、F a b 断片及びF (a b ') 断片、F a b 発現ライブラリーによって生産される断片、抗イデオタイプ(抗I d)抗体、及び上記いずれかのエピトープ結合断片挙げられる。本明細書で使用される「抗体」ということばは、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性のあるタンパク質、即ち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を有する分子を意味する。本発明の免疫グロブリン分子は、いずれのクラス(例えば、I g G、I g E、I g M、I g D及びI g A)であってもまたは免疫グロブリン分子のサブクラスであってもよい。

【0177】

一実施態様において、B P I をコード化する遺伝子の遺伝子産物を認識する抗体は、公的に利用できる。例えば、これらのB P I および/またはこれらのイソ型を認識する抗体としては、その抗体は上記表Xに示されるような市販により購入できるB P I - 5、B P I - 10、B P I - 11、B P I - 13、B P I - 21、B P I - 23、B P I - 24、B P I - 25、B P I - 27、B P I - 29、B P I - 32、B P I - 33、B P I - 34を認識する抗体が挙げられる。他の実施態様においては、当業者に既知の方法を用いて、B P I、B P I 類似体、

B P I 関連タンパク質、または前記いずれかの誘導体若しくは断片を認識する抗体を産生する。

【0178】

本発明の一実施態様において、B P I の特異的なドメインに対する抗体が生産される。特定の実施態様においては、B P I の親水性断片が抗体の生産を目的とする免疫原として使用される。

【0179】

抗体の生産において、所望の抗体のスクリーニングは、当該分野において既知の技術、例えば、E L I S A (酸素結合免疫吸着検査法) によって達成できる。例えば、B P I の特定のドメインを認識する抗体を選択するために、このようなドメインを含むB P I 断片に結合する産物について生成したハイブリドーマをアッセイしてもよい。第1のB P I 同族体に特異的に結合するが第2のB P I 同族体には特異的に結合しない(またはあまり強く結合しない)抗体を選択するために、第1のB P I 同族体へのポジティブな結合及び第2のB P I 同族体への結合の欠損(または抑制された結合)に基づいて選択できる。同様にして、B P I に特異的に結合するが同じタンパク質の異なるイソ型(B P I と同じコアペプチドを有する異なるグリコフォーム(glycoform)など)には特異的に結合しない(またはあまり強く結合しない)抗体を選択するために、B P I へのポジティブな結合及び異なるイソ型(例えば、異なるグリコフォーム(glycoform))への結合の欠損(または抑制された結合)に基づいて選択できる。ゆえに、本発明は、B P I の異なる一のイソ型または複数のイソ型(例えば、グリコフォーム)に比べてB P I により大きな親和性(好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも5倍、さらにより好ましくは少なくとも10倍大きな親和性)で結合する抗体(好ましくはモノクローナル抗体)を提供するものである。

【0180】

本発明の方法で使用されるポリクローナル抗体は、免疫処置された動物の血清由来の抗体分子の異質な集団である。分画されない免疫血清もまた使用できる。当該分野における様々な方法が、B P I 、 B P I の断片、B P I 関連ポリペプチド、またはB P I 関連ポリペプチドの断片に対するポリクローナル抗体の生産に

使用される。特定の実施態様においては、B P IまたはB P I関連ポリペプチドのエピトープに対するウサギのポリクローナル抗体が得られる。例えば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の生産を目的として、様々な宿主動物が、天然または合成（例えば、組換え）バージョンのB P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、またはB P I関連ポリペプチドの断片による注射によって免疫処置でき、これらとしては、以下に制限されないが、ウサギ、マウス、ラットなどが挙げられる。本明細書に記載される好ましい技術は、このような免疫処置に適する単離されたB P Iを提供する。B P Iがゲル電気泳動によって精製される際には、B P Iはポリアクリルアミドゲルから前もって抽出されてあるいは抽出されずに免疫処置に使用できる。様々なアジュバントが、宿主の種によって、免疫学的な応答を促進するのに使用され、これらとしては、以下に制限されないが、完全または不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム等の無機質ゲル(mineral gel)、リゾレシチン等の界面活性物質、プルロニックポリオール(pluronic polyol)、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、及びB C G（カルメット - ゲラン杆菌(bacille Calmette-Guerin)）またはコリネバクテリウム パルヴム(corynebacterium parvum)等のアジュバントが挙げられる。さらなるアジュバントもまた当該分野において既知である。

【0181】

B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、またはB P I関連ポリペプチドの断片に対するモノクローナル抗体(m A b)の調製を目的として、培養物における連続的な細胞系による抗体分子の生産のために提供される技術が使用される。例えば、元々、Kohler and Milstein (1975, Nature 256:495-497)によって開発されたハイブリドーマ技術、さらにはトリオーマ技術(trioma technique)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72)、及びヒトのモノクローナル抗体を生産するためのE B V - ハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。このような抗体は、I g G、I g M、I g E、I g A、I g Dなどのいずれかの免疫グロブリンのクラスであっても及びこのい

れかのサブクラスであってもよい。本発明のmAbを生産するハイブリドーマは、インビトロでまたはインビボで培養されてもよい。本発明のさらなる実施態様においては、モノクローナル抗体は、既知の技術(PCT/US90/02545号、参考により本明細書に引用される)を用いて無菌動物で生産されてもよい。

【0182】

モノクローナル抗体としては、以下に制限されないが、ヒトのモノクローナル抗体及びキメラモノクローナル抗体(例えば、ヒト-マウスキメラ)が挙げられる。キメラ抗体は、ヒトの免疫グロブリンの定常領域及びマウスのmAb由来の変領域を有するもの等の、異なる部分が異なる動物種由来である分子である。(例えば、Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号;及びBoss et al., 米国特許第4,816,397号を参照、これらは参考により完全に本明細書に引用される。)ヒト化抗体は、非ヒト種由来の一以上の相補的決定領域(complementarily determining region)(CDR)及びヒトの免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である(例えば、Queen, 米国特許第5,585,089号を参照、これは参考により完全に本明細書に引用される)。

【0183】

キメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、例えば、PCT公開公報 WO 87/02671号;欧州特許出願第184,187号;欧州特許出願第171,496号;欧州特許出願第173,494号;PCT公開公報 WO 86/01533号;米国特許第4,816,567号;欧州特許出願第125,023号;Better et al., 1988, Science 240:1041-1043;Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443;Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:521-3526;Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218;Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005;Wood et al., 1985, Nature 314:446-449;and Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559;Morrison, 1985, Science 229:1202-1207;Oi et al., 1986, Bio/Techniques 4:214;米国特許第5,225,539号;Jones et al., 1986, Nature 321:552-52

5; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; 及び Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060に記載される方法を用いて、当該分野において既知の組換えDNA技術によって製造できる。

【0184】

完全にヒトの抗体が、ヒト被検者の治療のための処置には特に望ましい。このような抗体は、内因性の免疫グロブリンの重及び軽鎖遺伝子を発現することはできないがヒトの重及び軽鎖遺伝子を発現できる形質転換マウスを用いて製造できる。形質転換マウスを、選択された抗原、例えば、本発明のBPIの全部または一部で一般的な方法で免疫処置する。この抗原に対するモノクローナル抗体は、公知のハイブリドーマ技術を用いて得られる。形質転換マウスによって收容されるヒトの免疫グロブリントランスジーンは、B細胞の分化中に再配列した(rearrange)後、クラススイッチ及び体細胞突然変異を受ける。ゆえに、このような技術を用いることにより、治療上有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を産生することができる。ヒト抗体を生産するこの技術の概要として、Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を生産するこの技術ならびにこのような抗体を生産するためのプロトコルの詳細な記載として、米国特許第5,625,126号;米国特許第5,633,425号;米国特許第5,569,825号;米国特許第5,661,016号;及び米国特許第5,545,806号を参照。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) 及び Genpharm (San Jose, CA)などの会社が上記したのと同様の技術を用いて選択された抗原に対するヒト抗体を提供するのに携わっている。

【0185】

選択されたエピトープを認識する完全にヒトの抗体は、「ガイド選択(guided selection)」と称される技術を用いて得られる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウスの抗体を用いて、同じエピトープを認識する完全にヒトの抗体の選択をガイドする(Jespers et al. (1994) Bio/technology 12:899-903)。

【0186】

本発明の抗体は、当該分野において既知の様々なファージディスプレイ方法(phage display method)を用いても得られる。ファージディスプレイ方法では、機能的な抗体ドメインを、これらをコード化するポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面に表示する。特に、このようなファージは、レパトリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現する抗原結合ドメインを表示するのに利用できる。有益な抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原により、例えば、標識抗原または固体表面若しくはビースに結合または捕捉された抗原を用いて、選択または同定できる。これらの方法に使用されるファージは、具体的には、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIタンパク質のいずれかに組換えにより融合されたFab、Fv、またはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインでファージから発現されるfd及びM13結合ドメインを含む線状ファージである。本発明の抗体を作製するのに使用できるファージディスプレイ方法としては、Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT出願第PCT/GB91/01134号; PCT公開公報 WO 90/02809号; WO 91/10737号; WO 92/01047号; WO 92/18619号; WO 93/11236号; WO 95/15982号; WO 95/20401号; ならびに米国特許第5,698,426号; 第5,223,409号; 第5,403,484号; 第5,580,717号; 第5,427,908号; 第5,750,753号; 第5,821,047号; 第5,571,698号; 第5,427,908号; 第5,516,637号; 第5,780,225号; 第5,658,727号; 第5,733,743及び第5,969,108号に開示されるものが挙げられる; これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0187】

上記引用文献に記載されるのと同様にして、ファージの選択後、例えば、以下に詳細に記載されるようにして、ファージの抗体のコーディング領域を、単離し

て、これを用いてヒト抗体等の、全体の抗体、または他の所望の抗原結合断片を得、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌等の、所望の宿主で発現させてもよい。例えば、Fab、Fab'及びF(ab')₂断片を組換えで生産する技術はまた、PCT公開公報 WO 92/22324号; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); 及び Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); 及び Better et al., Science 240:1041-1043 (1988)に開示されるものなどの当該分野において既知の方法を用いて使用されてもよい(当該引用文献は参考により完全に本明細書に引用される)。

【0188】

単鎖Fvs及び抗体を生産するのに使用できる技術の例としては、米国特許第4,946,778号及び第5,258,498号; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); 及び Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)に記載されるものが挙げられる。

【0189】

本発明はさらに、当該分野において既知の方法によって作製できる、二重特異抗体(bispecific antibody)の使用を提供するものである。全長の二重特異抗体の従来の生産は、2本の鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現(coexpression)に基づくものである(Milstein et al., 1983, Nature 305:537-539)。免疫グロブリンの重及び軽鎖の任意組合せにより、これらのハイブリドーマ(クアドロマ(quadroma))は10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生産し、これらのうち1個のみが正確な二重特異的構造を有する。一般的にアフィニティクロマトグラフィー段階によって行なわれる、正しい分子の精製は、むしろ扱いにくく、産物の収率は低い。同様の方法は、1993年5月13日に公開されたWO 93/08829号に、およびTraunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659に開示される。

【0190】

異なる及びもり好ましいアプローチによると、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体の可変ドメインを、免疫グロブリンの定常ドメイン配列

に融合する。この融合は、好ましくは、ヒンジの少なくとも一部、C H 2、及び C H 3領域からなる、免疫グロブリンの重鎖の定常ドメインを用いる。融合物の少なくとも一中に存在する、軽鎖の結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域 (C H 1) を有することが好ましい。免疫グロブリンの重鎖の融合物、および必要であれば免疫グロブリンの軽鎖をコード化するDNAを、別の発現ベクターに挿入して、適当な宿主生物体に一緒にトランスフェクションする(co-transfect)。これにより、構築に使用される3種のポリペプチド鎖の等しくない割合が最適な収率を提供する際に実施態様における3種のポリペプチド断片の相互の割合を調節するのに大きな柔軟性が得られる。しかしながら、等しい比率の少なくとも2種のポリペプチド鎖の発現により高い収率が得られる際にはまたはその比率が特定の有意性を持たない際には一つの発現ベクター中に2種または3種すべてのポリペプチド鎖に関するコーディング配列を挿入することが可能である。

【0191】

このアプローチの好ましい実施態様においては、二重特異抗体は、一方のアームに第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対 (第2の結合特異性を提供する) から構成される。二重特異分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が容易な分離を提供するので、この非対称な構造は所望の二重特異化合物を望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの分離を容易にすることが見出された。このアプローチは、1994年3月3日に公開されたWO 94/04690号に開示される。二重特異抗体の形成に関するさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210を参照。

【0192】

本発明は、抗BPI免疫グロブリン分子の機能的に活性のある断片、誘導体または類似体を提供するものである。機能的に活性のあるとは、断片、誘導体または類似体が、断片、誘導体または類似体がこれ由来である抗体によって認識される同じ抗原を認識する抗 - 抗 - イディオタイプ抗体(anti-anti-idiotypic antibody) (即ち、3次抗体(tertiary antibody)) を誘発できることを意味する。詳細には、好ましい実施態様においては、免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗

原性は、抗原を特異的に認識するCDR配列のC末端であるフレームワーク及びCDR配列の欠損によって促進される。どのCDR配列が抗原に結合するかを決定するために、CDR配列を含む合成ペプチドが、当該分野において既知の結合アッセイ方法によって抗原を用いた結合アッセイで使用できる。

【0193】

本発明は、以下に制限されないが、 $F(ab')_2$ 断片及びFab断片などの抗体の断片を提供するものである。特定のエピトープを認識する抗体の断片は、既知の技術によって得られる。 $F(ab')_2$ 断片は、可変領域、軽鎖の定常領域及び重鎖のCH1ドメインから構成され、抗体分子のペプシンによる消化によって得られる。Fab断片は、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド結合を還元することによって得られる。本発明はまた、本発明の抗体の重鎖及び軽鎖のダイマー、またはFvs若しくは単鎖抗体(SCA)などのこの最小断片(例えば、米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 及び Ward et al., 1989, Nature 334:544-54に記載されるような)、または本発明の抗体と同等の特異性を有する他の分子を提供するものである。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重及び軽鎖断片を連結し、これにより単鎖ポリペプチドを得ることによって形成される。大腸菌(E. coli)における機能的なFv断片のアセンブリに関する技術を使用してもよい(Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041)。

【0194】

他の実施態様においては、本発明は、免疫グロブリンではない他のタンパク質のアミノ酸配列(またはその一部、好ましくはタンパク質の少なくとも10、20または50アミノ酸部分)にN末端若しくはC末端のいずれかで、例えば、免疫グロブリンが共有結合(例えば、ペプチド結合)を介して融合する、本発明の免疫グロブリン(またはその機能的に活性のある断片)の融合タンパク質を提供するものである。好ましくは、免疫グロブリン、またはその断片は、定常ドメインのN末端で他のタンパク質に共有結合する。上述したように、このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増加し、さらに免疫系へ

の上皮のバリアを介した抗原のデリバリーを促進する。

【0195】

本発明の免疫グロブリンは、修飾される、即ち、共有結合が免疫特異的な結合を損なわない限りいずれかのタイプの分子の共有結合によって、修飾される類似体及び誘導体を包含する。例えば、以下に制限されないが、免疫グロブリンの誘導体及び類似体としては、例えば、配糖化、アセチル化、ペギレーション(pegylation)、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導化、タンパク質分解による切断(proteolytic cleavage)、細胞のリガンド若しくは他のタンパク質への連結などによって、さらに予め修飾されるものが挙げられる。数多くの化学的な修飾が既知の技術によって行なわれ、これらとしては、以下に制限されないが、特異的な化学的な切断、アセチル化、ホルミル化などが挙げられる。さらに、類似体または誘導体は一以上の非古典的なアミノ酸を含んでもよい。

【0196】

前記抗体は、例えば、これらのタンパク質の撮像、適当な生理学的なサンプルにおけるこれらのレベルの測定を目的として、診断方法になど、本発明のBPIの位置ぎめ及び活性に関連する当該分野において既知の方法に使用される。

【0197】

5.10 抗体の発現

本発明の抗体は、特に、化学的な合成によってまたは組換え発現によって、抗体の合成に関する当該分野において既知の方法によって製造でき、組換え発現技術によって製造されるのが好ましい。

【0198】

抗体、またはその断片、誘導体若しくは類似体の組換え発現は、抗体をコード化する核酸の構築を必要とする。抗体のヌクレオチド配列が知られている際には、抗体をコード化する核酸を、簡単に言うと、抗体をコード化する配列の一部を含む重複したオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニリング及びライゲーション、さらにはPCRによるリガンドオリゴヌクレオチドの増幅を含む、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからの組み立てられてもよい(例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242に記載されるよ

うにして)。

【0199】

または、抗体をコード化する核酸を、抗体をクローニングすることによって得てもよい。特定の抗体をコード化する核酸を含むクローンを利用することはできないが抗体分子の配列が知られている場合には、抗体をコード化する核酸を、配列の3'若しくは5'末端にハイブリッド形成可能な合成プライマーを用いたPCR増幅によってまたは特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたクローニングによって適当な源(例えば、抗体cDNAライブラリー、または抗体を発現する組織若しくは細胞から得られたcDNAライブラリー)から得てもよい。

【0200】

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子を利用することができない(またはこのような抗体をコード化する核酸をクローニングするためのcDNAライブラリーのための源)場合には、特定の抗原に特異的な抗体を、例えば、ウサギ等の、動物を免疫処置してポリクローナル抗体を得ることによって、またはより好ましくは、モノクローナル抗体を得ることによって、当該分野において既知の方法によって得てもよい。または、抗体の少なくともFab部分をコード化するクローンを、特定の抗原に結合するFab断片のクローン用のFab発現ライブラリー(例えば、Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281に記載されるような)をスクリーニングすることによってまたは抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって(例えば、Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937を参照)、得てもよい。

【0201】

抗体分子の少なくとも可変ドメインをコード化する核酸が得られたら、これを抗体分子の定常領域をコード化するヌクレオチド配列を含むベクターに導入してもよい(例えば、PCT公開公報 WO 86/05807号; PCT公開公報 WO 89/01036号; 及び米国特許第5,122,464号を参照)。完全な抗体分子を発現させることができる核酸との同時発現(co-expression)用の完全な軽または重鎖を含むベクターもまた使用できる。次に、抗体をコード化

する核酸は、スルフヒドリル基を含まないアミノ酸残基との鎖内ジスルフィド結合に関係する一以上の可変領域システイン残基を置換（または欠損）するのに必要なヌクレオチドの置換または欠損を導入するのに使用できる。このような修飾は、ヌクレオチド配列に特定の突然変異または欠損を導入することに関する当該分野において既知の方法によって行なわれ、これとしては、例えば、以下に制限されないが、化学的な突然変異誘発、インビトロの特定部位の突然変異誘発(Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551)、PCTを基礎とした方法などが挙げられる。

【0202】

さらに、適当な生物学的な活性を有するヒトの抗体分子由来の遺伝子と一緒に適当な抗原特異性を有するマウスの抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによる「キメラ抗体」の製造を目的として開発された技術(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454)が使用できる。上記したように、キメラ抗体は、マウスのmAb由来の可変領域及びヒト抗体の定常領域を有するもの、例えば、ヒト化抗体などの、異なる部分が異なる動物種由来である分子である。

【0203】

本発明の抗体分子をコード化する核酸が得られたら、抗体分子の製造用のベクターを、当該分野において既知技術を用いて組換えDNA技術によって製造してもよい。ゆえに、抗体分子配列を含む核酸を発現することによる本発明のタンパク質を調製する方法をここで説明する。当業者に既知の方法を用いて、抗体分子のコーディング配列ならびに適当な転写及び翻訳コントロールシグナルを含む発現ベクターを構築できる。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、及びインビボの遺伝子組換えが挙げられる。例えば、Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 及び Ausubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY)を参照。

【0204】

発現ベクターを公知の技術によって宿主細胞に移入した後、トランスフェクションされた細胞を公知の技術によって培養して、本発明の抗体を生産する。

【0205】

本発明の組換え抗体を発現するのに使用される宿主細胞は、大腸菌(*Escherichia coli*)等の細菌細胞、または特に全体の組換え抗体分子を発現するためには、好ましくは真核細胞のいずれであってもよい。特に、ヒトのサイトメガロウイルス由来の主要な中間初期遺伝子プロモーター要素(major intermediate early gene promoter element)等のベクターと組み合わせた、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞が抗体の有効な発現系である(Foecking et al., 198, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2)。

【0206】

様々な宿主 - 発現ベクター系が、本発明の抗体分子を発現するのに利用される。このような宿主 - 発現ベクター系は、有益なコーディング配列が生産された後精製されるベヒクルを表わすが、適当なヌクレオチドのコーディング配列で形質転換またはトランスフェクションされると、*in situ*で本発明の抗体分子を発現する細胞をも表わす。これらとしては、以下に制限されないが、抗体のコーディング配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*))；抗体のコーディング配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)、ピチア属(*Pichia*))；抗体のコーディング配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)で感染させた昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)で感染された若しくは抗体のコーディング配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノム由来(例えば、メタロチオネインプロモーター)若しくは哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルスレイトプロモーター(adenovirus late promoter)；ワクチニアウイルス 7.5 Kプロモーター)由来のプロモ

ーターを含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞）が挙げられる。

【0207】

細菌系では、数多くの発現ベクターが発現される抗体分子に意図された用途によって好ましく選択される。例えば、抗体分子からなる薬剤組成物を得るために、大量のこのようなタンパク質を製造しようとする際には、容易に精製される融合タンパク質産物を高レベルで発現させるベクターが望ましい。このようなベクターとしては、以下に制限されないが、融合タンパク質が製造されるように、抗体のコーディング配列がlacZコーディング領域を有するフレームにベクター中に連結される、大腸菌発現ベクターpUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791) ; pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509) などが挙げられる。pGEXベクターもまた、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を有する融合タンパク質として外来ポリヌクレオチドを発現させるのに使用される。通常、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズに吸着及び結合させた後、遊離グルタチオンの存在下で溶出することによって溶解細胞から容易に精製できる。pGEXベクターは、クローニングされたターゲット遺伝子産物がGST部分から放出されるように、トロンピンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0208】

昆虫系では、オートグラフィア カリフォルニア核多角体病ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) (AcNPV) が外来遺伝子を発現するベクターとして使用される。このウイルスはスポドプテラ フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞中で成長する。抗体のコーディング配列を、ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン (polyhedrin) 遺伝子）中に個々にクローニングして、AcNPVプロモーター（例えば、ポリヘドリン (polyhedrin) プロモーター）の制御下におく。哺乳動物の宿主細胞では、数多くのウイルスに基づいた発現系（例えば、アデノウイルス発現系）が使用される。

【0209】

上述したように、挿入された配列の発現を調節する、または望ましい特定の方法で遺伝子産物を修飾、処理する宿主細胞株が選ばれる。タンパク質産物のこのような修飾（例えば、配糖化）及びプロセッシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能に重要である。

【0210】

組換え抗体の長期間で高収率の生産のために、安定した発現が好ましい。例えば、有益な抗体を安定して発現する細胞系は、抗体のヌクレオチド配列及び選択可能なヌクレオチド配列（例えば、ネオマイシンまたはハイグロマイシン）を有する発現ベクターに細胞をトランスフェクションさせて、選択マーカーの発現で選択することによって、製造できる。このように操作された細胞系は、抗体分子と直接または間接的に相互作用する化合物のスクリーニング及び評価に特に有用である。

【0211】

抗体分子の発現レベルは、ベクターの増幅によって増加できる（レビューとして、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)を参照）。抗体を発現するベクター系のマーカーが増幅可能である際には、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルの増加によりマーカー遺伝子のコピー数が増加するであろう。増幅された領域は抗体遺伝子と会合するので、抗体の生産もまた向上するであろう(Crousse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0212】

宿主細胞は、本発明の2種の発現ベクターと一緒にトランスフェクション(co-transfect)されるが、この際、第1のベクターは重鎖由来のポリペプチドをコード化し、第2のベクターは軽鎖由来のポリペプチドをコード化する。この2種のベクターは、重及び軽鎖のポリペプチドを同等に発現できる同じ選択マーカーを含んでもよい。または、重及び軽鎖のポリペプチド双方をコード化するを単一のベクターを用いてもよい。このような状況では、軽鎖は、過剰の毒性のある遊離

重鎖を防止するために重鎖の前に置かれなければならない(Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重及び軽鎖に関するコーディング配列は、cDNAまたはゲノムDNAからなってもよい。

【0213】

本発明の抗体分子が組換えにより発現したら、抗体分子は、抗体分子の精製に関する当該分野において既知の方法によって、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAまたは特定の抗原によるなどのアフィニティークロマトグラフィー、及びサイズカラムクロマトグラフィー(sizing column chromatography)）、遠心、較差溶解度(differential solubility)によって、またはタンパク質の精製に関する他の標準的な技術によって、精製される。

【0214】

または、融合タンパク質は、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を用いることによって容易に精製される。例えば、Janknecht et al.によって記載されるシステムによって、ヒト細胞系で発現する非変性融合タンパク質が容易に精製できる(Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。このシステムでは、有益な遺伝子を、遺伝子のオープンリーディングフレームが6個のヒスチジン残基から構成されるアミノ末端タグに翻訳により融合されるように、ワクチニア組換えプラスミドにサブクローニングされる。タグは、融合タンパク質のマトリックス結合ドメインとして作用する。組換えワクチニアウィルスで感染させた細胞からの抽出物を、Ni²⁺ニトリル酢酸(nitriloacetic acid) - アガロースカラムにのせ、ヒスチジン標識タンパク質(histidine-tagged protein)をイミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出する。

【0215】

5.11 接合抗体

好ましい実施態様において、抗BPI抗体またはこの断片は、診断または治療部分と接合される。抗体は、診断にまたは所定の処置レジメの有効性を決定するのに使用できる。検出は抗体を検出可能な物質にカップリングすることによって

容易に行なえる。検出可能な物質としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料；放射性核種、陽電子放出金属（陽電子射出断層撮影に使用される）、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。一般的に、本発明による診断として使用される抗体に接合できる金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照。適当な酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適当な補欠分子族としては、ストレプトアビジン、アビジン及びビオチンが挙げられる；適当な蛍光材料としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジルアミンフルオレセイン(dichlorotriazinylamine fluorescein)、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンが挙げられる；適当な発光材料としては、ルミノールが挙げられる；適当な生物発光材料としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられる；さらに、適当な放射性核種としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 及び ^{99}Tc が挙げられる。

【0216】

抗BPI抗体またはこの断片を、治療剤または薬剤部分(drug moiety)に接合して所定の生物学的な応答を修飾してもよい。治療剤または薬剤部分は、典型的な化学治療剤に限定されると解されるものではない。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的な活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌のエキソトキシン(pseudomonas exotoxin)、若しくはジフテリア毒素等の毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、血栓剤または抗脈管形成剤(anti-angiogenic agent)、例えば、アンギオスタチン(angiostatin)若しくはエンドスタチン(endostatin)等のタンパク質；または、リンホカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor)(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony stimulating factor)(G-CSF)、神経成長因子(NGF)

若しくは他の成長因子等の生体応答調節剤が挙げられる。

【0217】

このような治療部分の抗体への接合技術は既知であり、例えば、Arnon et al. , "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy" , in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), p p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp . 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照。

【0218】

または、抗体を、米国特許第4,676,980号においてSegalによって記載されるようにして2次抗体に接合して抗体異種接合体(antibody heteroconjugate)を形成してもよい。

【0219】

治療部分が接合されたまたは接合されない抗体を、単独でまたは細胞毒性因子および/またはサイトカインと組み合わせて投与される治療剤として使用してもよい。

【0220】

5.12 乳癌の診断

本発明によると、乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られている被検者から得られた組織、血清、血漿または尿のテストサンプルが、診断若しくはモニターに、または特定の治療のための処置に反応すると最も考えら

れる患者を同定するのに使用できる。一実施態様においては、コントロールサンプル（乳癌に冒されていない一被検者または複数の被検者からの）または予め決定された参考範囲に比してテストサンプルにおける一以上のBFまたはBPI（またはこれらのいずれか組み合わせ）の存在比が減少することによって、乳癌の存在が示される；この目的に適するBF及びBPIは、上記で詳述したように、それぞれ、表I、III、VI及びVIIで同定される。本発明の他の実施態様においては、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲に比してテストサンプルにおける一以上のBFまたはBPI（またはこれらのいずれか組み合わせ）の存在比が増加することによって、乳癌の存在が示される；この目的に適するBF及びBPIは、上記で詳述したように、それぞれ、表II、IV及びVIIIで同定される。他の実施態様においては、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲に比したテストサンプルにおける一以上のBFまたはBPI（またはこれらのいずれか組み合わせ）の相対存在比が、乳癌のサブタイプ（例えば、家族性または散在性乳癌）を示す。さらなる他の実施態様においては、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲に比したテストサンプルにおける一以上のBFまたはBPI（またはこれらのいずれか組み合わせ）の相対存在比が、乳癌の程度または重篤度を示す。前記方法のいずれかにおいて、本明細書に記載される一以上のBPIの検出は、必要であれば、乳癌の一以上のさらなるバイオマーカーの検出と組み合わせられてもよい。当該分野における適当な方法を、BF及びBPIのレベルを測定するのに使用でき、これらとしては、本明細書に記載される好ましい技術に制限されるものではないが、キナーゼアッセイ、BPIを検出および/または視覚化するイムノアッセイ（例えば、ウェスタン法、免疫沈降、その後にドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学など）が挙げられる。BPIが既知の機能を有する場合には、その機能に関するアッセイを用いて、BPIの発現を測定してもよい。さらなる実施態様においては、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲に比してテストサンプルにおける表VIまたはVII（またはこれらのいずれか組み合わせ）に示される一以上のBPIを含むmRNAの存在比が減少することによって、乳癌の存在が示される。さらなる実施態様においては、コントロールサン

ブルまたは予め決定された参考範囲に比してテストサンプルにおける表V I I I またはI X (またはこれらのいずれか組み合わせ) に示される一以上のB P I をコード化するm R N Aの存在比が増加することによって、乳癌の存在が示される。適当なハイブリダイゼーションアッセイは、B P Iをコード化するm R N Aを検出するおよび/または視覚化すること(例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、in situハイブリダイゼーションなど)によって、B P Iの発現を検出するのに使用できる。

【0221】

本発明の他の実施態様においては、B P Iに特異的に結合する、標識抗体、これらの誘導体及び類似体を、乳癌を検出、診断、またはモニターする診断目的に使用してもよい。好ましくは、乳癌は、動物で、より好ましくは哺乳動物で、及び最も好ましくはヒトで検出される。

【0222】

5.13 スクリーニングアッセイ

本発明は、B P Iに結合するまたはB P Iの発現若しくは活性に刺激若しくは阻害効果を有する物質(例えば、候補化合物またはテスト化合物)を同定する方法を提供するものである。本発明はまた、B P I関連ポリペプチド若しくはB P I融合タンパク質に結合するまたはB P I関連ポリペプチド若しくはB P I融合タンパク質の発現若しくは活性に刺激若しくは阻害効果を有する物質、候補化合物またはテスト化合物を同定する方法を提供するものである。物質、候補化合物またはテスト化合物の例としては、以下に制限されるものではないが、核酸(例えば、DNA及びRNA)、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティックス(peptidomimetics)、小分子及び他の薬剤が挙げられる。物質は、生物学的なライブラリー(biological library); 空間的にアドレス可能な平行固相(spatially addressable parallel solid phase)または液相ライブラリー; 逆重畳積分を必要とする合成ライブラリー方法; 「one-bead one-compound」ライブラリー方法; およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー方法などの、当該分野において既知のコンビナトリアルライブラリー(combinatorial library)方法において数多くのアプローチのいずれかを用いて

行なわれる。生物学的なライブラリーのアプローチはペプチドライブラリーに制限されるが、他の4つのアプローチは化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは小分子ライブラリーに適用できる (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; 米国特許第5,738,996号; 及び米国特許第5,807,683号、これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される)。

【0223】

分子ライブラリーの合成方法の例は当該分野において見出され、例えば、DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al., 1993, *Science* 261:1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; および Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233に見出され、これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0224】

化合物のライブラリーは存在して(present)もよく、例えば、溶液中に(例えば、Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421)、またはビーズ(Lam, 1991, *Nature* 354:82-84)、チップ(Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556)、細菌(米国特許第5,223,409号)、孢子(米国特許第5,571,698号; 第5,403,484号; 及び第5,223,409号)、プラスミド(Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869)またはファージ(Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirala et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; および Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310)上に存在してもよい。これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0225】

一実施態様において、BPI、BPIの断片(例えば、機能的に活性のある断片)、BPI関連ポリペプチド、BPI関連ポリペプチドの断片、またはBPI融合タンパク質と相互作用する(即ち、これらに結合する)物質は、細胞を基礎とするアッセイシステムで同定される。この実施態様によると、BPI、BPI

の断片、B P I 関連ポリペプチド、B P I 関連ポリペプチドの断片、またはB P I 融合タンパク質を発現する細胞を、候補化合物またはコントロール化合物と接触させて、候補化合物のB P I との相互作用能を測定する。必要であれば、このアッセイは、複数（例えばライブラリー）の候補化合物をスクリーニングするのに使用してもよい。例えば、細胞は、原核生物（例えば、大腸菌(E. coli)）で由来あってもまたは真核生物（例えば、酵母または哺乳動物）由来であってもよい。さらに、細胞は、B P I、B P I の断片、B P I 関連ポリペプチド、B P I 関連ポリペプチドの断片、またはB P I 融合タンパク質を内因的に発現してもまたはB P I、B P I の断片、B P I 関連ポリペプチド、B P I 関連ポリペプチドの断片、またはB P I 融合タンパク質を発現するように遺伝子操作されてもよい。場合によっては、B P I、B P I の断片、B P I 関連ポリペプチド、B P I 関連ポリペプチドの断片、またはB P I 融合タンパク質または候補化合物は、B P I 及び候補化合物間の相互作用を検出できるように、例えば、放射性標識（ ^{32}P 、 ^{35}S 若しくは ^{125}I など）または蛍光標識（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン(all ophycocyanin)、o - フタルアルデヒドまたはフルオレスカミンなど）で標識される。候補化合物がB P I、B P I の断片、B P I 関連ポリペプチド、B P I 関連ポリペプチドの断片、またはB P I 融合タンパク質と直接または間接的に相互作用できることは、当業者に既知な方法によって測定できる。例えば、候補化合物及びB P I、B P I の断片、B P I 関連ポリペプチド、B P I 関連ポリペプチドの断片、またはB P I 融合タンパク質間の相互作用は、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降またはウェスタンブロット分析によって測定できる。

【0226】

他の実施態様においては、B P I、B P I の断片（例えば、機能的に活性のある断片）、B P I 関連ポリペプチド、B P I 関連ポリペプチドの断片、またはB P I 融合タンパク質と相互作用する（即ち、これらに結合する）物質は、細胞を含まないアッセイシステムで同定される。この実施態様によると、天然の若しくは組換えB P I 若しくはこの断片、または天然の若しくは組換えB P I 関連ポリ

ペプチド若しくはこの断片、またはB P I融合タンパク質若しくはこの断片を、候補化合物またはコントロール化合物と接触させて、候補化合物のB P IまたはB P I関連ポリペプチドまたはB P I融合タンパク質との相互作用能を測定する。必要であれば、このアッセイは、複数（例えばライブラリー）の候補化合物をスクリーニングするのに使用してもよい。好ましくは、B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片、またはB P I融合タンパク質を、まず、例えば、B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片、またはB P I融合タンパク質を、これを特異的に認識、結合する固定化抗体と接触させることによって、またはB P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片、またはB P I融合タンパク質の精製された調製物を、タンパク質に結合するように設計された表面と接触させることによって、固定化する。B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片、またはB P I融合タンパク質は、一部が若しくは完全に精製されてもよく（例えば、部分的にまたは完全に他のポリペプチドを含まない）または細胞溶解産物の一部であってもよい。さらに、B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片は、B P I若しくはこれの生物学的に活性のある部分、またはB P I関連ポリペプチドおよびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等のドメインからなる融合タンパク質であってもよい。または、B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片またはB P I融合タンパク質は、当業者に既知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals; Rockford, IL）を用いてビオチン化されてもよい。候補化合物のB P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片、またはB P I融合タンパク質との相互作用能は、当業者に既知の方法によって測定できる。

【0227】

他の実施態様においては、細胞を基礎とするアッセイシステムは、B P Iの生産若しくは分解に応答できるまたはB P Iの翻訳後修飾に応答できる、酵素等の、タンパク質、またはこの生物学的に活性のある部分に結合するまたはこの活性を調節する物質を同定するのに使用される。1次スクリーニングでは、複数（例

例えばライブラリー)の化合物を、(i)BPI、BPIのイソ型、BPIの同族体、BPI関連ポリペプチド、BPI融合タンパク質、または前記いずれかの生物学的に活性のある断片；および(ii)BPI、BPIのイソ型、BPIの同族体、BPI関連ポリペプチド、BPI融合タンパク質または断片の生産、分解、または翻訳後修飾を調節する化合物を同定するために、BPI、BPIのイソ型、BPIの同族体、BPI関連ポリペプチド、BPI融合タンパク質または断片のプロセッシングに応答できるタンパク質を自然にまたは組換えにより発現する細胞と接触させる。必要であれば、次に、1次スクリーニングで同定された化合物を、有益な特定のBPIを自然にまたは組換えにより発現する細胞に対して2次スクリーニングでアッセイしてもよい。候補化合物の、BPI、イソ型、同族体、BPI関連ポリペプチド、またはBPI融合タンパク質の生産、分解、または翻訳後修飾の調節能は、以下に制限されるものではないが、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降またはウェスタンブロット分析などの、当業者に既知の方法によって測定できる。

【0228】

他の実施態様においては、BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、BPI関連ポリペプチドの断片、またはBPI融合タンパク質と競合して相互作用する(即ち、これらに結合する)物質は、競合結合アッセイで同定される。この実施態様によると、BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、BPI関連ポリペプチドの断片、またはBPI融合タンパク質を発現する細胞を、候補化合物及びBPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、BPI関連ポリペプチドの断片またはBPI融合タンパク質と相互作用することが知られている化合物と接触させる；次に、候補化合物の、BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、BPI関連ポリペプチドの断片、またはBPI融合タンパク質との競合的な相互作用能を測定する。または、BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチドまたはBPI関連ポリペプチドの断片と競合して相互作用する(即ち、これらに結合する)物質は、BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチド、BPI関連ポリペプチドの断片、またはBPI融合タンパク質を候補化合物及びBPI、BPI関連ポリペプチドまたはBPI融合タンパク質と相互作用する

ことが知られている化合物と接触させることによって、細胞を含まないアッセイシステムで同定される。上述したように、候補化合物の、B P I、B P Iの断片、B P I関連ポリペプチド、B P I関連ポリペプチドの断片、またはB P I融合タンパク質との相互作用能は、当業者に既知の方法によって測定できる。これらのアッセイは、細胞を基礎とするものであってもあるいは細胞を含まないものであっても、複数（例えばライブラリー）の候補化合物をスクリーニングするのに使用できる。

【0229】

他の実施態様においては、B P I、またはB P I関連ポリペプチドを調節する（即ち、アップレギュレーションする(upregulate)またはダウンレギュレーションする(downregulate)）物質は、B P I、またはB P I関連ポリペプチドを発現する細胞（例えば、原核生物由来または真核生物由来の細胞）を、候補化合物またはコントロール化合物（例えば、リン酸緩衝生理食塩水（P B S））と接触させて、B P I、B P I関連ポリペプチド、またはB P I融合タンパク質、B P Iをコード化するm R N A、またはB P I関連ポリペプチドをコード化するm R N Aの発現を測定することによって同定される。候補化合物の存在下での選択されたB P I、B P I関連ポリペプチド、B P Iをコード化するm R N A、またはB P I関連ポリペプチドをコード化するm R N Aの発現のレベルを、候補化合物の不存在下での（例えば、コントロール化合物の存在下での）B P I、B P I関連ポリペプチド、B P Iをコード化するm R N A、またはB P I関連ポリペプチドをコード化するm R N Aの発現のレベルと比較する。次に、候補化合物が、この比較に基づいてB P I、またはB P I関連ポリペプチドの発現の調節剤として同定できる。例えば、B P Iまたはm R N Aの発現が不存在下に比べて候補化合物の存在下の方が有意に大きい場合には、その候補化合物はB P Iまたはm R N Aの発現の刺激剤として同定される。または、B P Iまたはm R N Aの発現が不存在下に比べて候補化合物の存在下の方が有意に小さい場合には、その候補化合物はB P Iまたはm R N Aの発現の阻害剤として同定される。B P Iまたはこれをコード化するm R N Aの発現のレベルは、当業者に既知の方法によって測定できる。例えば、m R N Aの発現は、ノーザンプロット分析またはR T - P C R

によって評価でき、また、タンパク質のレベルは、ウェスタンブロット分析によって評価できる。

【0230】

他の実施態様においては、BPI、またはBPI関連ポリペプチドの活性を調節する物質は、BPIまたはBPI関連ポリペプチドを含む調製物、またはBPIまたはBPI関連ポリペプチドを発現する細胞（例えば、原核または真核細胞）を、テスト化合物またはコントロール化合物と接触させて、テスト化合物の、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性の調節（例えば、刺激または阻害）能を測定することによって同定される。BPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性は、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの細胞のシグナル伝達経路（例えば、Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃など）の誘導を検出する、適当な基質でのターゲットの触媒若しくは酵素活性を検出する、レポーター遺伝子（例えば、BPIまたはBPI関連ポリペプチドに応答でき、検出マーカー、例えば、ルシフェラーゼをコード化する核酸に操作により連結される調節要素）の誘導を検出する、または細胞の応答、例えば、細胞の分化、若しくは細胞の増殖を検出することによって、評価できる。この記載に基づいて、当業者に既知の技術がこれらの活性を測定するのに使用できる（例えば、米国特許第5,401,639号を参照、これは参考により完全に本明細書に引用される）。次に、候補化合物は、候補化合物の効果をコントロール化合物と比較することによってBPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性の調節剤として同定されうる。適当なコントロール化合物としては、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）及び一般的な生理食塩水（NS）が挙げられる。

【0231】

他の実施態様においては、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの発現、活性または発現及び活性の双方を調節する（即ち、アップレギュレーションする（upregulate）またはダウンレギュレーションする（downregulate））物質は、動物モデルで同定される。適当な動物の例としては、以下に制限されないが、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌ及びネコが挙げられる。好ましくは、使用される動物は、乳癌のモデル（例えば、エストロゲンが枯渇した重篤な合併免

疫不全(MDA-MB-345 estrogen-deprived Severe Combined Immunodeficient) (SCID) マウスにおけるMDA - MB - 345等のヒトの乳癌細胞系の異種移植片、Eccles et al. 1994 Cell Biophysics 24/25, 279)を表わす。この実施態様によると、テスト化合物またはコントロール化合物は、適当な動物に(例えば、経口で、直腸にまたは腹腔内若しくは静脈内に等の非経口で)投与され、BPIまたはBPI関連ポリペプチドの発現、活性または発現及び活性の双方に関する効果を測定する。BPIまたはBPI関連ポリペプチドの発現の変化は、上記で概説した方法によって評価できる。

【0232】

さらなる他の実施態様においては、BPIまたはBPI関連ポリペプチドは、BPIまたはBPI関連ポリペプチドに結合するまたはこれと相互作用する他のタンパク質を同定するための2-ハイブリッドアッセイ(two-hybrid assay)または3ハイブリッドアッセイ(three hybrid assay)における「バイトタンパク質(bait protein)」として使用される(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Bio/Techniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; 及びPCT公開公報第WO 94/10300号を参照)。当業者には考えられるように、このような結合タンパク質はまた、例えば、本発明のBPIを含むシグナル経路の上流または下流要素として本発明のBPIによるシグナルの伝達にかかわりがあると考えられる。

【0233】

好ましい実施態様において、本明細書に記載されるスクリーニング及びアッセイは、例えば、BPI、BPI類似体、若しくはBPI関連ポリペプチド、前記いずれかの断片、またはBPI融合タンパク質の活性を調節する(またはこの発現及び活性双方を調節する)化合物をスクリーニングするまたは同定するのに使用される。

【0234】

本発明はさらに、上記スクリーニングアッセイによって同定される新規な物質および本明細書に記載されるような処置へのこれらの使用を提供するものである

。

【0235】

5.14 BPIの治療用途

本発明は、治療化合物の投与による様々な病気及び疾患の処置及び予防を提供するものである。このような化合物としては、以下に制限されるものではないが、BPI、BPI類似体、BPI関連ポリペプチド及びこれらの誘導體（断片を含む）；前記に対する抗体；BPI、BPI類似体、BPI関連ポリペプチド及びこれらの断片をコード化する核酸；BPIまたはBPI関連ポリペプチドをコード化する遺伝子に対するアンチセンス核酸；ならびにBPIまたはBPI関連ポリペプチドをコード化する遺伝子の調節剤（例えば、アゴニスト及びアンタゴニスト）が挙げられる。本発明の重要な特徴は、乳癌に係わりのあるBPIをコード化する遺伝子の同定である。乳癌は、乳癌被検者の血清中で減少する一以上のBPIの機能及び発現を促進する治療化合物の投与によって、または乳癌を有する被検者の血清中で増加する一以上のBPIの機能及び発現を抑制する治療化合物の投与によって処置（例えば、症状を改善するまたは開始若しくは進行を遅延する）または予防されうる。

【0236】

一実施態様において、それぞれがBPIに特異的に結合する一以上の抗体は、単独でまたは一以上のさらなる治療化合物若しくは処置と組み合わせて投与される。このような治療化合物または処置の例としては、以下に制限されないが、タキソール、シクロフォスファミド、タモキシフェン、フルオロウラシル及びドキソルビシンが挙げられる。

【0237】

好ましくは、抗体等の生物学的な産物は、投与される被検者に対して同種異系である。好ましい実施態様においては、ヒトのBPI若しくはヒトのBPI関連ポリペプチド、ヒトのBPI若しくはヒトのBPI関連ポリペプチドをコード化する核酸配列、またはヒトのBPI若しくはヒトのBPI関連ポリペプチドに対する抗体を、治療（例えば、症状を改善するまたは開始若しくは進行を遅延する）または予防のためにヒト被検者に投与する。

【0238】

5.14.1 乳癌の処置および予防

乳癌は、乳癌に冒されていない被検者の血清と比較して乳癌を有する被検者の血清中に異なって存在する、一以上のBPIのレベル若しくは活性（即ち、機能） - または一以上のBFのレベル - を調節する（即ち、増加するまたは減少する）化合物を乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られているまたは乳癌が発達する危険のある被検者に投与することによって、処置または予防される。一実施態様において、乳癌は、乳癌を有する被検者の血清中で減少する、一以上のBPIのレベル若しくは活性（即ち、機能） - または一以上のBFのレベル - をアップレギュレーションする(upregulate)（即ち、増加する）化合物を乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られているまたは乳癌が発達する危険のある被検者に投与することによって、処置または予防される。他の実施態様においては、乳癌を有する被検者の血清中で増加する、一以上のBPIのレベル若しくは活性（即ち、機能） - または一以上のBFのレベル - をアップレギュレーションする(upregulate)化合物を投与する。このような化合物の例としては、以下に制限されないが、BPI、BPIの断片及びBPI関連ポリペプチド；BPI、BPIの断片及びBPI関連ポリペプチドをコード化する核酸（例えば、遺伝子治療に使用される）；ならびに酵素活性を有する上記BPIまたはBPI関連ポリペプチドでは、酵素活性を調節することが知られている化合物または分子が挙げられる。使用できる他の化合物、例えば、BPIアゴニストが、インビトロアッセイを用いて同定できる。

【0239】

乳癌は、乳癌を有する被検者の血清中で増加する、一以上のBPIのレベル若しくは活性 - または一以上のBFのレベル - をダウンレギュレーションする(downregulate)化合物を乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られているまたは乳癌が発達する危険のある被検者に投与することによっても、処置または予防される。他の実施態様においては、乳癌を有する被検者の血清中で減少する、一以上のBPIのレベル若しくは活性 - または一以上のBFのレベル - をダウンレギュレーションする(downregulate)化合物を投与する。このような

化合物の例としては、以下に制限されないが、BPIアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、BPIに対する抗体、およびBPIの酵素活性を阻害する化合物が挙げられる。他の有効な化合物、例えば、BPIアンタゴニスト及び小分子BPIアンタゴニストが、インビトロアッセイを用いて同定できる。

【0240】

好ましい実施態様においては、治療およびまたは予防は、個々の被検者の必要性に合わせられる。ゆえに、特定の実施態様においては、一以上のBPIのレベル若しくは機能、または一以上のBFのレベルを促進する化合物が、当該一以上のBPIのレベル若しくは機能、または当該一以上のBFのレベルがないまたはコントロール若しくは正常な参考範囲に比して減少する、乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られている被検者に治療のためにまたは予防のために投与される。さらなる実施態様においては、一以上のBPIのレベル若しくは機能、または一以上のBFのレベルを促進する化合物が、当該一以上のBPIのレベル若しくは機能、または当該一以上のBFのレベルがコントロール若しくは参考範囲に比して増加する、乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られている被検者に治療のためにまたは予防のために投与される。さらなる実施態様においては、一以上のBPIのレベル若しくは機能、または一以上のBFのレベルを減少する化合物が、当該一以上のBPIのレベル若しくは機能、または当該一以上のBFのレベルがコントロール若しくは参考範囲に比して増加する、乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られている被検者に治療のためにまたは予防のために投与される。さらなる実施態様においては、一以上のBPIのレベル若しくは機能、または一以上のBFのレベルを減少する化合物が、当該一以上のBPIのレベル若しくは機能、または当該一以上のBFのレベルがコントロール若しくは参考範囲に比して減少する、乳癌を有すると疑われているまたは乳癌を有することが知られている被検者に治療のためにまたは予防のために投与される。このような化合物の投与による、BPIの機能若しくはレベル、またはBFのレベルの変化は、例えば、サンプル（例えば、血清、血液若しくは尿のサンプルまたは生検組織等の組織サンプル）を得、当該BFのレベルまたは当該BPIのレベル若しくは活性、または当該BPIをコー

ド化するmRNAのレベル、または前記いずれかの組み合わせをインビトロでアッセイすることによって、容易に検出されうる。このようなアッセイは、本明細書に記載されるような化合物の投与の前後に行なわれる。

【0241】

本発明の化合物としては、いずれの化合物に制限されるものではないが、例えば、このような化合物がタキソール、シクロフォスファミド、タモキシフェン、フルオロウラシル及びドキシソルビシンでない場合には乳癌のBPIまたはBFのプロフィールを正常に回復する、小有機分子、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸などが挙げられる。

【0242】

5.14.2 遺伝子治療

特定の実施態様において、BPI、BPIの断片、BPI関連ポリペプチドまたはBPI関連ポリペプチドの断片をコード化する配列を有する核酸は、遺伝子治療によってBPIの機能を促進するために投与される。遺伝子治療とは、発現するまたは発現可能な核酸の被検者への投与を意味する。この実施態様において、核酸は、BPIの機能を促進することによって治療効果を仲介するそのコード化されたポリペプチドを生産する。

【0243】

当該分野において利用できるいずれの遺伝子治療方法も本発明に従って使用できる。具体的な方法を以下に説明する。

【0244】

遺伝子治療法の一般的なレビューに関しては、Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; 及び Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression*, A Lab

oratory Manual, Stockton Press, NYを参照。

【0245】

好ましい態様において、化合物は、BPIまたはこれの断片若しくはキメラタンパク質をコード化する核酸からなり、当該核酸は、適当な宿主中でBPIまたはこれの断片若しくはキメラタンパク質を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、BPIのコーディング領域に操作により連結されたプロモーターを有し、当該プロモーターは誘導性(inducible)または構成性(constitutive) (および、必要であれば、組織特異的) である。他の特定の実施態様においては、BPIのコーディング配列及びいずれかの他の所望の配列がゲノムの所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接し(flank)、これによりBPI核酸の染色体内の発現を提供する核酸分子が使用される(Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。

【0246】

被検者への核酸のデリバリーは直接的であってもよく、この場合には、被検者は核酸または核酸を運搬する(carrying)ベクターに直接暴露される；このアプローチはインビボ遺伝子治療として知られている。または、被検者への核酸のデリバリーは間接的であってもよく、この場合には、細胞にまずインビトロで核酸を形質転換した後、被検者に移植する；このアプローチはex vivo遺伝子治療として知られている。

【0247】

特定の実施態様において、核酸は直接インビボで投与され、この際、核酸は発現してコード化産物を生産する。これは、当該分野において既知の数多くの方法によって、例えば、適当な核酸の発現ベクターの一部としてこれを構築し、細胞内になるように投与することによって、例えば、欠損若しくは弱毒化レトロウイルスまたは他のウィルスベクターを用いた感染によって(米国特許第4,980,286号を参照)；裸のDNAを直接注入することによって；微粒子の衝撃(microparticle bombardment) (例えば、遺伝子ガン；Biolistic, Dupont)の使用によって；脂質、細胞表面レセプターまたはトランスフェクション剤(transfect

ing agent)で被覆することによって；リポソーム、微粒子またはマイクロカプセルへの封入によって；核に入ることが知られるペプチドに連結された核酸を投与することによって；またはレセプターを特異的に発現する細胞タイプを標的にするのに使用できる、レセプターが介するエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）を受けるリガンドに連結された核酸を投与することによって達成できる。他の実施態様においては、リガンドが、核酸がリソソームにより分解されるのを防止できる、エンドソームを破壊する融合誘導ウィルスペプチドを有する、核酸-リガンド複合体を形成してもよい。さらなる他の実施態様においては、核酸は、特定のレセプターを標的にすることによって、細胞に特異的な取り込み及び発現についてインビボで標的にされる（例えば、1992年4月16日付のPCT公開公報WO 92/06180号 (Wu et al.)；1992年12月23日付のWO 92/22635号 (Wilson et al.)；1992年11月26日付のWO 92/20316号 (Findeis et al.)；1993年7月22日付のWO 93/14188号 (Clarke et al.)、1993年10月14日付のWO 93/20221号 (Young)を参照)。または、核酸は、相同組換えによって、細胞内に導入され、発現用の宿主細胞DNA内に取り込まれてもよい(Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。

【0248】

特定の実施態様において、BPIをコード化する核酸を含むウィルスベクターが使用される。例えば、レトロウィルスベクターが使用できる (Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599を参照)。これらのレトロウィルスベクターは、ウィルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みに必要でないレトロウィルスの配列を削除するように予め修飾された。遺伝子治療に使用されるBPIをコード化する核酸をベクター中にクローニングして、これにより、被検者への遺伝子のデリバリーが容易になる。レトロウィルスベクターに関するより詳細は、Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302に見出され、これには幹細胞を化学療法により耐性にするために造血幹細胞にmdr1遺伝子をデリバリーするのにレトロウィルスベクターを使用することが記載される。遺

伝子治療におけるレトロウィルスベクターの使用を説明する他の引用文献は、Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; および Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114がある。

【0249】

アデノウィルスは、遺伝子治療に使用できる他のウィルスベクターである。アデノウィルスは、遺伝子を気道上皮にデリバリーするための特に魅力的なベヒクルである。アデノウィルスは、自然には、気道上皮に感染して軽い病気を引き起こす。アデノウィルスを基礎とするデリバリーシステムに関する他のターゲットとしては、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、及び筋肉がある。アデノウィルスは、非分裂細胞を感染できるという利点を有する。Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503には、アデノウィルスを基礎とする遺伝子治療のレビューが示される。Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10には、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を伝達するのにアデノウィルスベクターを使用することが示される。遺伝子治療におけるアデノウィルスの使用の他の例は、Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT公開公報 WO 94/12649号; 及び Wang, et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783に見出される。

【0250】

遺伝子治療に使用されるアデノ - 関連ウィルス(Adeno-associated virus) (AAV) がまた報告されている(Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; 米国特許第5,436,146号)。

【0251】

他の遺伝子治療法は、エレクトロポレーション、リポフェクション(lipofection)、リン酸カルシウムによるトランスフェクション(calcium phosphate mediated transfection)、またはウィルスの感染等の方法によって組織培養の細胞に遺伝子を伝達することに係る。一般的に、伝達方法としては、細胞への選択マーカ

一の伝達がある。次に、細胞を選択下におき、取り込まれて、伝達された遺伝子を発現している細胞を単離する。さらに、これらの細胞を被検者にデリバリーする。

【0252】

この実施態様において、核酸は、得られる組換細胞のインビボでの投与前に細胞中に導入される。このような導入は、以下に制限されないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウィルスまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、クロモソームによる遺伝子の伝達(chromosome-mediated gene transfer)、マイクロセルによる遺伝子の伝達(microcell-mediated gene transfer)、スフェロプラスト融合などの、当該分野においていずれかの既知の方法によって行なわれる。外来遺伝子の細胞への導入に関して数多くの技術が当該分野において既知であり(例えば、Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92を参照)、受容細胞の必要な発達上の及び生理学的な機能が破壊しない際には、本発明に従って使用してもよい。核酸が細胞で発現可能であり、好ましくはその細胞子孫に受け継がれかつ発現可能であるように、細胞に核酸を安定して伝達するための技術が提供されるべきである。

【0253】

得られた組換細胞は、当該分野において既知の様々な方法によって被検者にデリバリーされうる。好ましい実施態様においては、上皮細胞を、例えば、皮下に注射する。他の実施態様においては、組換皮膚細胞を被検者に皮膚移植片として適用してもよい。組換血球(例えば、造血幹または前駆細胞)は静脈内に投与されることが好ましい。使用されることが予想される細胞の量は、所望の効果、被検者の状態に依存し、当業者に決定できる。

【0254】

核酸を遺伝子治療を目的として導入できる細胞は、望ましい、使用される細胞タイプを包含し、以下に制限されないが、ニューロン細胞(neuronal cells)、グリア細胞(例えば、オリゴデンドロサイト(oligodendrocytes)または星状細胞)

、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球等の血球；様々な幹または前駆細胞、特に例えば、骨髄、臍帯血、抹消血または胎児肝から得られるような、造血幹または前駆細胞が挙げられる。

【0255】

好ましい実施態様においては、遺伝子治療に使用される細胞は、処置される被検者にとって自己由来である。

【0256】

組換細胞を遺伝子治療に使用する実施態様においては、BPIをコード化する核酸を核酸が細胞またはその子孫に発現可能であるように細胞中に導入した後、組換細胞を治療効果を目的としてインビボで投与する。特定の実施態様においては、幹または前駆細胞が使用される。インビトロで単離、維持されうる幹または前駆細胞が本発明のこの実施態様に従って使用できる（例えば、1994年4月28日付の、PCT公開公報WO 94/08598号；Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985；Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229；及びPittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771を参照）。

【0257】

特定の実施態様においては、遺伝子治療を目的として導入される核酸は、核酸の発現が適当な転写の誘導物質の存在または不存在を制御することによって制御可能であるように、コーディング領域に操作により連結される誘導プロモーターを含む。

【0258】

BPIをコードするDNAの直接的な注入はまた、例えば、米国特許第5,589,466号に記載された技術に従って行なわれてもよい。これらの技術は、「裸のDNA (naked DNA)」、即ち、適当な担体に加えてリポソーム、細胞、または他の材料の不存在下での単離されたDNAの注入を包含する。タンパク質をコード化し、適当なプロモーターに操作により連結されたDNAの注入によって、注入部位付近の細胞中でタンパク質が生産され、注入されたDNAによってコード化されたタンパク質に対する被検者の免疫反応が誘発される。好ましい実施

態様において、(a) B P Iをコード化するDNA及び(b)プロモーターからなる裸のDNAは、被検者に注射されて、B P Iに対する免疫反応を誘発する。

【0259】

5.14.3 乳癌を処置するためのB P Iの阻害

本発明の一実施態様において、乳癌は、乳癌に冒されていない被検者の血清と比較して乳癌を有する被検者の血清中で上昇する一以上のB P Iのレベルおよび/または機能を中和する(阻害する)化合物の投与によって処置または予防される。これを目的として有用である化合物としては、以下に制限されないが、抗B P I抗体(及びその結合領域を含む断片や誘導體)、B P Iアンチセンスまたはリボザイム核酸、ならびに相同組換えによって内因性のB P I機能を「ノックアウトする(knockout)」のに使用される機能障害性B P Iをコード化する核酸が挙げられる(例えば、Capecchi, 1989, Science 244:1288 - 1292を参照)。B P Iの機能を阻害する他の化合物は、既知のインビトロアッセイ、例えば、テスト化合物の、B P Iの他のタンパク質若しくは結合パートナーとの結合の阻害能、または既知のB P Iの機能の阻害能に関するアッセイを使用することによって同定できる。好ましくは、このような阻害は、インビトロまたは細胞培養中でアッセイされるが、遺伝的なアッセイを使用してもよい。好ましい技術を使用して、化合物の投与前後でB P Iのレベルを検出してもよい。好ましくは、適当なインビトロまたはインビボアッセイを用いて、下記により詳述するように、特定の化合物の効果及びその投与が疾患組織の処置について兆候を示すかどうかを決定する。

【0260】

特定の実施態様において、B P Iの機能を阻害する化合物は、B P Iの血清レベルまたは機能活性の増加(例えば、正常なレベルまたは所望のレベルより大きい)が乳癌に冒されていない被検者の血清または所定の参考範囲と比較して検出される被検者に治療のためにまたは予防のために投与される。当該分野における標準的な方法を用いて、上記で概説したように、B P Iのレベルまたは機能の増加を測定できる。好ましいB P I阻害組成物としては、小分子、即ち、1000ダルトン以下の分子がある。このような小分子は本明細書に記載されるスクリー

ニング方法によって同定されうる。

【0261】

5.14.4 BPIのアンチセンスレギュレーション

特定の実施態様において、BPIの発現は、BPIアンチセンス核酸の使用によって阻害される。本発明は、BPIまたはその一部をコード化する遺伝子またはcDNAに対するアンチセンスである少なくとも6ヌクレオチドを含む核酸の治療を目的とするまたは予防を目的とする使用を提供するものである。本明細書で使用される、BPI「アンチセンス」核酸は、BPIをコード化するRNA（好ましくはmRNA）の一部に対する配列の相補性によってハイブリッド形成できる核酸を意味する。アンチセンス核酸は、BPIをコード化するmRNAのコーディングおよび/または非コーディング領域に相補的であってもよい。このようなアンチセンス核酸は、BPIの発現を阻害する化合物として有用であり、乳癌の処置または予防に使用できる。

【0262】

本発明のアンチセンス核酸は、2本鎖または1本鎖のオリゴヌクレオチド、RNA若しくはDNAまたはこれらの修飾若しくは誘導体であり、細胞に直接投与されてもまたは外因性の導入された配列の転写によって細胞内で生産されてもよい。

【0263】

本発明はさらに、以下に記載されるように、製薬上許容できる担体における有効量の本発明のBPIアンチセンス核酸からなる薬剤組成物を提供するものである。

【0264】

他の実施態様においては、本発明は、本発明のBPIアンチセンス核酸を含む有効量の組成物を有する細胞を提供することからなる原核または真核細胞におけるBPI拡散配列の発現の阻害方法を提供するものである。

【0265】

BPIアンチセンス核酸及びその使用を下記に詳細に説明する。

【0266】

5.14.4.1 BPIアンチセンス核酸

BPIアンチセンス核酸は、少なくとも6個のヌクレオチドを有し、6~約50オリゴヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドであることが好ましい。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、または少なくとも200ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、DNA若しくはRNAまたはこれらのキメラ混合物若しくは誘導体または修飾体であってもよく、1本鎖であってもまたは2本鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸主鎖で修飾されてもよい。オリゴヌクレオチドは、ペプチド等の他の付加基(appended group); 細胞膜(例えば、Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; 1998年12月15日に公開された、PCT公開公報WO 88/09810号を参照)若しくは血液脳関門(例えば、1988年4月25日に公開された、PCT公開公報WO 89/10134号を参照)での輸送を容易にする物質; ハイブリダイゼーションの引き金になる切断物質(hybridization-triggered cleavage agent)(例えば、Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958-976を参照)または挿入剤(例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549を参照)を含んでもよい。

【0267】

本発明の好ましい態様において、BPIアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは1本鎖DNAで形成されることが好ましい。オリゴヌクレオチドは、当該分野において通常知られている置換基でその構造のいずれかの位置で修飾されてもよい。

【0268】

BPIアンチセンスオリゴヌクレオチドは、下記5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルクエオ

シン(beta-D-galactosylqueosine)、イノシン、N6 - イソペンチルアデニンアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 β - D - マンノシルクエシン(beta-D-mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v) (uracil-5-oxyacetic acid (v))、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、クエオシン(queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2, 6 - ジアミノプリン、及び他の塩基類似体の少なくとも一を有していてもよい。

【0269】

他の実施態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも一の修飾糖部分、例えば、下記糖部分：アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシロース、及びヘキソースの一を有する。

【0270】

さらなる他の実施態様においては、オリゴヌクレオチドは、少なくとも一の下記修飾リン酸主鎖(modified phosphate backbone)：ホスホロチオエート(phosphorothioate)、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホルアミデート(phosphoramidate)、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、ホルムアセタール(formacetal)、またはホルムアセタールの類似体を有する。

【0271】

さらなる他の実施態様においては、オリゴヌクレオチドは、 β - アノマーオリゴヌクレオチドである。 β - アノマーオリゴヌクレオチドは、一般的な α - ユニットとは反対に、ストランドが相互に平行に走っている相補的なRNAと特異的

な2本鎖ハイブリッドを形成する(Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。

【0272】

オリゴヌクレオチドは、他の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションの引き金になる架橋剤(hybridization triggered cross-linking agent)、輸送剤、またはハイブリダイゼーションの引き金になる切断物質(hybridization-triggered cleavage agent)に接合されてもよい。

【0273】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、(Biosearch, Applied Biosystems などから市販されているような)自動型のDNA合成器を使用することによって、当該分野において既知の標準的な方法によって合成されてもよい。例としては、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドをSteinらの方法(1988, Nucl. Acids Res. 16:3209)によって合成してもよく、また、メチルホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを制御された多孔質ガラスポリマー支持体の使用によって調製してもよい(Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448-7451)。

【0274】

特定の実施態様においては、本発明のBPIアンチセンス核酸は、外因性の配列からの転写によって細胞内で製造される。例えば、ベクターを細胞によって取り込まれるようにインビボで導入して、この細胞内でベクターまたはこの一部を転写して、本発明のアンチセンス核酸(RNA)を製造する。このようなベクターは、BPIアンチセンス核酸をコード化する配列を含むであろう。このようなベクターは、所望のアンチセンスRNAを製造するように転写できるものである限り、エピソームであってもまたはクロモソームに組み込まれてもよい。このようなベクターは、当該分野における組換えDNA技術標準によって構築できる。ベクターは、哺乳動物細胞での複製及び発現に使用される、プラスミド、ウィルス、または当該分野において既知の他のものであってもよい。BPIアンチセンスRNAをコード化する配列の発現は、哺乳動物、好ましくはヒト、細胞中で作用する当該分野において既知のプロモーターによることができる。このようなプロモーターは、誘導性(inducible)であってもまたは構成性(constitutive)であっ

てもよい。このようなプロモーターの例は上記で概説する。

【0275】

本発明のアンチセンス核酸は、BPIをコード化する遺伝子、好ましくはBPIをコード化するヒト遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的である配列を有する。しかしながら、好ましいものの、完全な相補性は必要ではない。本明細書中で称される「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列とは、ストリンジेंटな条件（例えば、65(Cでの7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTAにおけるハイブリダイゼーション及び68(Cでの0.1×SSC/0.1%SDSによる洗浄からなる非常にストリンジेंटな条件、または42(Cでの0.2×SSC/0.1%SDSによる洗浄からなる適度にストリンジेंटな条件)下でRNAとハイブリッド形成して、安定したデュプレックスを形成できるのに十分な相補性を有する配列を意味する；ゆえに、2本鎖のAPIアンチセンス核酸の場合には、デュプレックスDNAの1本鎖を試験されてもよく、またはトリプレックスの形成をアッセイしてもよい。ハイブリッド形成能は、相補性の度合い及びアンチセンス核酸の長さの双方に依存するであろう。通常、ハイブリッド形成する核酸が長くなるほど、核酸が含むBPIをコード化するRNAとの塩基のミスマッチが増加するが、依然として安定なデュプレックス(または、場合によってはトリプレックス)を形成する。当業者は標準的な方法の使用によりミスマッチの許容できる程度を確認して、ハイブリッド形成複合体の融点を測定できる。

【0276】

5.14.4.2 BPIアンチセンス核酸の治療用途

BPIアンチセンス核酸は、ターゲットBPIが乳癌を有すると疑われているまたは乳癌に冒されている被検者の血清中で過剰に発現する際に乳癌を処置または予防するのに使用できる。好ましい実施態様においては、1本鎖DNAのBPIアンチセンスオリゴヌクレオチドが使用される。

【0277】

BPIをコード化するRNAを発現するまたは過剰に発現する細胞型は、当該分野において既知の様々な方法によって同定できる。このような細胞型としては

、以下に制限されないが、白血球（例えば、好中球、マクロファージ、単球）及び定住細胞（例えば、星状細胞、グリア細胞、ニューロン細胞、及び上皮細胞）挙げられる。このような方法としては、以下に制限されないが、BPIに特異的な核酸とのハイブリダイゼーション（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーションなど）、細胞型からのRNAがBPIにインビトロで翻訳されることができるとを観察すること、イムノアッセイなどが挙げられる。好ましい態様においては、被検者からの1次組織を、例えば、免疫細胞化学またはin situハイブリダイゼーションによって、処置前にBPIの発現についてアッセイできる。

【0278】

製薬上許容できる担体における有効量のBPIアンチセンス核酸からなる、本発明の薬剤組成物は、乳癌を有する患者に投与できる。

【0279】

乳癌の処置に有効であろうBPIアンチセンス核酸の量は、標準的な臨床技術によって決定できる。

【0280】

特定の実施態様においては、一以上のBPIアンチセンス核酸からなる薬剤組成物は、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセルにより投与される。本発明の様々な実施態様においては、このような組成物はBPIアンチセンス核酸の一様の放出を達成するのに使用される。

【0281】

5.14.5 阻害性リボザイムおよび3重らせんアプローチ

他の実施態様において、乳癌の症状は、BPIをコード化する遺伝子配列を既知の遺伝子「ロックアウト」、リボザイムまたは3重らせん方法と組み合わせて使用してBPIの遺伝子発現を減少することによってBPIのレベルまたはBPI活性を減少することにより緩和されてもよい。このアプローチでは、リボザイムまたは3重らせん分子は、BPIをコードする遺伝子の活性、発現または合成を調節し、これにより乳癌の症状を緩和するのに使用される。このような分子は、突然変異型または非突然変異型のターゲット遺伝子の発現を抑制するまたは

阻害するように設計されてもよい。このような分子の製造及び使用技術は当業者にはよく知られている。

【0282】

BPIをコード化する遺伝子mRNA転写物を触媒で切断するように設計されるリボザイム分子は、ターゲット遺伝子mRNAの翻訳、従って遺伝子産物の発現を防止するのに使用できる。(例えば、1990年10月4日に公開された、PCT国際公報WO 90/11364号; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225を参照)。

【0283】

リボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒することができる酵素RNA分子である。(レビューとして、Rossi, 1994, Current Biology 4, 469-471を参照)。リボザイムの作用メカニズムは、相補的なターゲットRNAへのリボザイム分子の配列特異的なハイブリッド形成、さらにはエンドヌクレアーゼによる切断(endonucleolytic cleavage event)を含む。リボザイム分子の組成は、ターゲット遺伝子mRNAに相補的な一以上の配列を含まなければならず、また、mRNAの切断に応答できる既知の触媒配列を含まなければならない。この配列については、例えば、米国特許第5,093,246号を参照し、これは参考により完全に本明細書に引用される。

【0284】

認識配列に特異的な部位でmRNAが切断するリボザイムをAPIをコード化するmRNAを破壊するのに使用できるが、シュモクザメのリボザイムの使用が好ましい。シュモクザメのリボザイムはターゲットmRNAと相補的な塩基対を形成するフランキング領域によって要求される一でmRNAを切断する。ターゲットmRNAが下記2塩基配列: 5' - UG - 3' を有することが唯一の必要条件である。シュモクザメのリボザイムの構築及び製造は当該分野においてよく知られており、Myers, 1995, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, New York, (see especially Figure 4, page 833)におよびHaseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334, 585-591に十分記載されており、これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0285】

好ましくは、リボザイムは、切断認識部位がA P Iをコード化するm R N Aの5'末端付近に位置するように、すなわち、有効性を上げかつ非機能性m R N A転写物の細胞内の蓄積を最小限にするように、操作される。

【0286】

本発明のリボザイムはまた、テトラヒメナ サーマフィラ(Tetrahymena thermophila)に自然に発生する(I V S、またはL - 19 I V S R N Aとして知られる)、Thomas Cech and collaborators (Zaug, et al., 1984, Science, 224, 574-578; Zaug and Cech, 1986, Science, 231, 470-475; Zaug, et al., 1986, Nature, 324, 429-433; University Patents Inc.による国際公開公報W O 88 / 0 4 3 0 0号; Been and Cech, 1986, Cell, 47, 207-216)によって広範に記載されるものなどのR N Aエンドヌクレアーゼ(以降、「C e c h型リボザイム(Cech-type ribozyme)」)をも含む。C e c h型リボザイムは、ターゲットR N A配列とハイブリッド形成した後ターゲットR N Aの切断が起こる8塩基対の活性部位を有する。本発明は、B P Iをコード化する遺伝子中に存在する8塩基対の活性部位配列を標的とする上記C e c h型リボザイムを包含する。

【0287】

アンチセンスアプローチにおけるのと同様、リボザイムは、修飾オリゴヌクレオチド(例えば、安定性、ターゲッティングなどを改善するため)からなってもよく、インビボでB P Iを発現する細胞にデリバリーされなければならない。好ましいデリバリー方法は、トランスフェクションされた細胞がB P Iをコード化する内因性のm R N Aを破壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを製造するように、強力な構成性p o l I I Iまたはp o l I Iプロモーターの制御を受けてリボザイムを「コード化する」D N A構築物を用いるものである。リボザイムは、アンチセンス分子とは異なり、触媒性であるため、より低い細胞内濃度が有効のために必要である。

【0288】

内因性B P I発現はまた、ターゲット相同組換(targeted homologous recombination)を用いて、B P Iをコード化する遺伝子、またはこのような遺伝子のプ

ロモーターを不活性化するまたは「ロックアウトする」ことによって抑制されてもよい(例えば、Smithies, et al., 1985, Nature 317:230-234; Thomas and Capecchi, 1987, Cell 51:503-512; Thompson et al., 1989, Cell 5:313-321; 及び Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438を参照。これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される)。例えば、内因性遺伝子(BPIをコード化する遺伝子のコーディング領域または調節領域)に相同性のあるDNAに隣接する非機能性BPIをコード化する突然変異遺伝子(または完全に関連のないDNA配列)が、インビボでターゲット遺伝子を発現する細胞にトランスフェクションするのに、選択マーカーおよび/またはネガティブな選択マーカーと共にまたはこのようなマーカーなしで、使用できる。ターゲット相同組換による、DNA構築物の挿入によって、ターゲット遺伝子の不活性化が起こる。このようなアプローチは、ES(胚幹)細胞の修飾が不活性なターゲット遺伝子を有する動物の子孫を得るのに使用できる農業分野で特に適する(例えば、Thomas and Capecchi, 1987 and Thompson, 1989, supraを参照)。しかしながら、このアプローチは、組換DNA構築物が直接投与されるまたは適当なウイルスベクターを用いてインビボの必要な部位に標的とされる場合にはヒトでの使用に適合してもよい。

【0289】

または、BPIをコード化する遺伝子の内因性の発現は、遺伝子の調節領域(即ち、遺伝子のプロモーターおよび/またはエンハンサー)に相補的であるデオキシリボヌクレオチド配列を標的として体内の標的細胞でのBPIをコード化する遺伝子の転写を防止する3重らせん構造を形成することによって抑制できる。(一般的に、Helene, 1991, Anticancer Drug Des., 6(6), 569-584; Helene, et al., 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660, 27-36; 及び Maher, 1992, Bioassays 14(12), 807-815を参照)。

【0290】

転写の阻害を目的とした3重らせんの形成に使用される核酸分子は、1本鎖で、デオキシヌクレオチドから構成されなければならない。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、通常デュプレックスの一方のストランドに存在するプリン

またはピリミジンの相当の大きさのストレッチを必要とする、フーグスティーン型塩基対ルールにより3重らせんの形成を促進するように設計されなければならない。ヌクレオチド配列はピリミジンを基礎とし、これにより得られる3重らせんの3本の会合ストランドにT A T及びC G C⁺が生じる。このピリミジンリッチな分子は、そのストランドに平行な方向でデュプレックスの1本鎖のプリンリッチな領域との塩基の相補性を提供する。加えて、プリンリッチである、例えば、G残基のストレッチを含む核酸分子が選択されてもよい。これらの分子はC G対がリッチであるDNAデュプレックスと3重らせんを形成するであろう。この際、大部分のプリン残基は標的となるデュプレックスの1本鎖上に位置し、これによりトリプレックスの3本のストランドにG G Cトリプレットが生じる。

【0291】

または、3重らせんの形成について標的とされうる潜在的な配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加する。スイッチバック分子は、まずデュプレックスの一方のストランドと、次に他方と塩基対を形成するように、5' - 3'、3' - 5'を交互に合成され、デュプレックスの一方のストランドに存在するプリンまたはピリミジンを相当の大きさにストレッチに対する必要性を排除する。

【0292】

本明細書に記載されるアンチセンス、リボザイム、または3重らせん分子を突然変異した遺伝子の発現を阻害するのに利用する際には、技術が、存在するB P Iの濃度が正常な表現型に必要なものに比して低い状況が生じるほど非常に有効にB P Iの正常な遺伝子アレルによって製造されるm R N Aの転写(3重らせん)または翻訳(アンチセンス、リボザイム)を抑制するまたは阻害することが可能である。このような場合には、B P Iをコード化する遺伝子の活性の実質的に正常なレベルを維持できるようにするために、遺伝子治療を用いて、細胞中に正常な遺伝子活性を発揮し、どんなアンチセンス、リボザイム、または3重らせん処置を利用しているとしてもその処理を受けやすい配列を含まないB P Iをコード化し、発現する核酸分子を導入してもよい。または、遺伝子が細胞外タンパク質をコード化する場合には、正常なB P IをB P I活性の必要なレベルを維持するた

めに一緒に投与してもよい。

【0293】

本発明のアンチセンスRNA及びDNA、リボザイム、ならびに3重らせん分子は、上記したように、DNA及びRNA分子の合成に関して当該分野において既知のいずれかの方法によって調製される。これらとしては、例えば、固相ホルミアミダイト化学合成等の当該分野においてよく知られているオリゴデオキシリボヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する技術がある。または、RNA分子を、アンチセンスRNA分子をコード化するDNA配列のインピトロ及びインピボの転写によって形成してもよい。このようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適当なRNAポリメラーゼプロモーターを含む広範なベクター中に取り込まれてもよい。または、使用されるプロモーターによって、RNAを構成によりまたは誘導により合成するアンチセンスcDNA構築物を細胞系に安定して導入してもよい。

【0294】

5.15 治療または予防用化合物に関するアッセイ

本発明はまた、乳癌の処置または予防を目的とする化合物の効能を同定または確認するために薬剤の発見に使用されるアッセイを提供するものである。テスト化合物は、これらが乳癌を有する被検者のBF若しくはBPIレベルを乳癌を持たない被検者で見出されるレベルに回復できるかまたは乳癌の実験動物モデルで同様の変化をもたらすことができるかについてアッセイできる。乳癌を有する被検者のBF若しくはBPIレベルを乳癌を持たない被検者で見出されるレベルに回復するまたは乳癌の実験動物モデルで同様の変化をもたらすことができる化合物は、さらなる薬剤の発見のための先導化合物(lead compound)として使用できる、または治療のために使用できる。BF及びBPIの発現は、好ましい技術、免疫アッセイ、ゲル電気泳動、さらに視覚化、BPI活性の検出、または本明細書で示唆される若しくは当業者に既知の他の方法によってアッセイされうる。このようなアッセイは、候補薬剤のスクリーニング、臨床上のモニターまたは薬剤の開発に使用でき、BFまたはBPIの存在比が臨床的病気の代理マーカー(surrogate marker)として機能できる。

【0295】

様々な特定の実施態様においては、インビトロアッセイが被検者の疾患に関わる細胞型を代表する細胞を用いて行なわれ、化合物がこのような細胞型に所望の効果をもつかどうかを決定できる。

【0296】

治療に使用される化合物は、ヒトで試験される前に適当な動物モデルで試験されてもよく、これらとしては、以下に制限されないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどが挙げられる。インビボ試験では、ヒトに投与される前に、当該分野において既知のいずれかの動物モデルが使用されてもよい。乳癌の動物モデルの例としては、以下に制限されないが、エストロゲンが枯渇した重篤な合併免疫不全(MDA-MB-345 estrogen-deprived Severe Combined Immunodeficient) (SCID) マウスにおけるMDA - MB - 345 (Eccles et al., 1994 Cell Biophysics 24/25, 279)等のヒト乳癌細胞系の異種移植片が挙げられる。これらは、これらのモデルで示される病理が乳癌のものと同様であるため、BFIまたはBPIレベルを調節するテスト化合物を試験するのに利用できる。また、本明細書の開示に基づいて、形質転換動物を一以上のBPIをコード化する一遺伝子または複数の遺伝子の「ノックアウト」突然変異で製造できることは当業者には明らかである。遺伝子の「ノックアウト」突然変異は、遺伝子産物に関連した活性がほとんどまたは完全に存在しないように、突然変異遺伝子を発現させない、または異常な形態で若しくは低レベルで発現させる突然変異である。好ましくは、形質転換動物は哺乳動物であり、より好ましくは、形質転換動物はマウスである。

【0297】

一実施態様において、BPIの発現を調節するテスト化合物は、BPIを発現する、非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、サル、ウサギ、及びモルモット)、好ましくは乳癌の非ヒト動物モデルで同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物を動物に投与し、一以上のBPIの発現に関するテスト化合物の効果測定する。一BPI(または複数のBPI)の発現を変更するテスト化合物は、テスト化合物で処置された動物または動物群におけ

る選択された一BPI若しくは複数のBPI（またはこれをコード化するmRNA）のレベルをコントロール化合物で処置された動物または動物群におけるBPIまたはmRNAのレベルと比較することによって同定されうる。当業者に既知の技術、例えば、*in situ*ハイブリダイゼーションを用いて、mRNA及びタンパク質レベルを測定できる。動物は、テスト化合物の効果をアッセイするために犠牲にされてもあるいはされなくてもよい。

【0298】

他の実施態様においては、BPIまたはこの生物学的に活性のある部分の活性を調節するテスト化合物は、BPIを発現する、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、サル、ウサギ、及びモルモット）、好ましくは乳癌の非ヒト動物モデルで同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物を動物に投与し、BPIの活性に関するテスト化合物の効果を測定する。一BPI（または複数のBPI）の活性を変更するテスト化合物は、コントロール化合物で処置された動物及びテスト化合物で処置された動物をアッセイすることによって同定できる。BPIの活性は、BPIの細胞の2次メッセンジャーの誘導（例えば、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃など）を検出する、BPIまたはその結合パートナーの触媒若しくは酵素活性を検出する、レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼまたはグリーン蛍光タンパク質(green fluorescent protein)等の、検出可能なマーカーをコード化する核酸に操作により連結される本発明のBPIに応答できる調節要素）の誘導を検出する、または細胞の応答（例えば、細胞の分化若しくは細胞の増殖）を検出することによって、評価できる。当業者に既知の技術がBPIの活性の変化を検出するのに使用できる（例えば、米国特許第5,401,639号を参照、これは参考により本明細書に引用される）。

【0299】

さらなる他の実施態様においては、一BPI（または複数のBPI）のレベルまたは発現を調節するテスト化合物が、乳癌を有するヒト被検者、好ましくは乳癌を有するものおよび最も好ましくは重篤な乳癌を有するもので同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物をヒト被検者に投

与して、B P Iの発現に関するテスト化合物の効果を、生体試料（例えば、乳癌の生検または血清、血漿、若しくは尿などの体液）中のB P Iまたはこれをコード化するm R N Aの発現を分析することによって測定される。B P Iの発現を変更するテスト化合物は、コントロール化合物で処置した被検者若しくは被検者群におけるB P Iまたはこれをコード化するm R N Aのレベルをテスト化合物で処置した被検者若しくは被検者群におけるのと比較することによって同定できる。または、B P Iの発現の変化は、テスト化合物の投与前後の被検者若しくは被検者群におけるB P Iまたはこれをコード化するm R N Aのレベルを比較することによって同定してもよい。当業者に既知の技術を用いて、生体試料を得、m R N Aまたはタンパク質の発現を分析できる。例えば、本明細書に記載される好ましい技術を用いて、B P Iのレベルの変化を評価できる。

【0300】

他の実施態様においては、一B P I（または複数のB P I）の活性を調節するテスト化合物が、乳癌を有するヒト被検者、好ましくは乳癌を有するものおよび最も好ましくは重篤な乳癌を有するもので同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物をヒト被検者に投与して、B P Iの活性に関するテスト化合物の効果を測定する。B P Iの活性を変更するテスト化合物は、コントロール化合物で処置した被検者からの生体試料をテスト化合物で処置した被検者からの試料と比較することによって同定できる。または、B P Iの活性の変化は、テスト化合物の投与前後の被検者若しくは被検者群におけるB P Iの活性を比較することによって同定してもよい。B P Iの活性は、生体試料（例えば、乳癌の生検または血清、血漿、若しくは尿などの体液）においてB P Iの細胞のシグナル伝達経路（例えば、細胞内のC a 2 +、ジアシルグリセロール、I P 3など）の誘導、B P I若しくはその結合パートナーの触媒若しくは酵素活性、または細胞の応答、例えば、細胞の分化若しくは細胞の増殖を検出することによって評価できる。当業者に既知の技術を用いて、B P Iの2次メッセンジャーの誘導の変化または細胞応答の変化を検出することができる。例えば、R T - P C Rが、細胞の2次メッセンジャーの誘導の変化を検出するのに使用できる。

【0301】

好ましい実施態様においては、B P Iのレベルまたは発現をコントロールの被検者（例えば、乳癌に冒されていないヒト）で検出されるレベルに変更するテスト化合物は、さらなる試験または治療用途を目的として選択される。他の好ましい実施態様においては、B P Iの活性をコントロールの被検者（例えば、乳癌に冒されていないヒト）で見出される活性に変更するテスト化合物は、さらなる試験または治療用途を目的として選択される。

【0302】

他の実施態様においては、乳癌に関連する一以上の症状の重篤度を減少するテスト化合物が、乳癌を有するヒト被検者、好ましくは乳癌を有する被検者および最も好ましくは重篤な乳癌を有する被検者で同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物を被検者に投与して、乳癌の一以上の症状に関するテスト化合物の効果を測定する。一以上の症状を抑制するテスト化合物は、コントロール化合物で処置された被検者をテスト化合物で処置された被検者と比較することによって同定できる。乳癌に精通している医師に既知の技術を用いて、テスト化合物が乳癌に関連する一以上の症状を抑制するかどうかを決定できる。例えば、乳癌を有する被検者において記憶を促進するまたは錯乱を抑制するテスト化合物は乳癌を有する被検者を処置するのに有益であろう。

【0303】

好ましい実施態様においては、乳癌を有するヒトにおいて乳癌に関連する一以上の症状の重篤度を減少するテスト化合物は、さらなる試験または治療用途を目的として選択される。

【0304】

5.16 治療用及び予防用組成物ならびにこれらの使用

本発明は、被検者に有効量の本発明の化合物を投与することからなる処置（および予防）方法を提供するものである。好ましい態様では、化合物は実質的に精製される（例えば、その効果を制限するまたは望ましくない副作用をもたらす物質を実質的に含まない）。被検者は、好ましくは動物であり、このような動物としては、以下に制限されないが、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられ、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。特

定の実施態様においては、非ヒト哺乳動物が被検者である。

【0305】

化合物が核酸を含む際に使用できる配合物及び投与方法は上記したとおりである；さらなる適当な配合物及び投与経路を以下に記載する。

【0306】

例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、化合物を発現できる組換え細胞、レセプターが介するエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）、レトロウィルス若しくは他のベクターの一部としての核酸の構築など、様々なデリバリーシステムが知られており、本発明の化合物を投与するのに使用できる。導入方法は、経腸または非経口であってもよく、以下に制限されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路が挙げられる。化合物は、簡便な経路によって、例えば、輸注若しくは大量注射によって、上皮若しくは粘膜皮膚の内層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を介した吸収によって投与されてもよく、他の生物学的に活性のある薬剤と一緒に投与されてもよい。投与は、全身であってもまたは局所であってもよい。加えて、脳室内及び髄腔内注射等の、適当な経路によって中枢神経系に本発明の薬剤組成物を導入することが望ましい；脳室内注射は、例えば、オマヤレザバー等の、レザバーに付けられた脳室内カテーテルによって容易に行なわれる。肺への投与もまた、吸入器またはネブライザーの使用、ならびにエアゾール剤(aerosolizing agent)による配合によって使用できる。

【0307】

特定の実施態様においては、処置の必要のある領域に局所的に本発明の薬剤組成物を投与することが望ましい；これは、例えば、以下に制限されるものではないが、外科手術中の局所注入、例えば、外科手術後の創傷被覆材と組み合わせた、局所適用によって、注射によって、カテーテルによって、坐剤によって、またはインプラントによって、達成される。この際、インプラントはシアラスティック膜(sialastic membrane)等の膜などの、多孔質、非多孔質、またはゲル状材料、または繊維からなる。一実施態様においては、投与は、血清へのまたは悪性腫瘍または腫瘍性若しくは腫瘍前性(pre-neoplastic)組織の部位（または前部位(f

ormer site))での直接注射によってもよい。

【0308】

他の実施態様においては、化合物は、ベシクル、特にリポソームにデリバリーされてもよい (Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327を参照; 一般的に同書を参照)。

【0309】

さらなる他の実施態様においては、化合物は、制御放出系でデリバリーされてもよい。一実施態様においては、ポンプが使用されてもよい (Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照)。他の実施態様においては、ポリマー材料が使用されてもよい (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105を参照)。さらなる他の実施態様においては、制御放出系を、治療のターゲット、即ち、脳に配置して、これにより全身系の投与量の一部のみを必要としてもよい (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照)。

【0310】

他の制御放出系は、Langer (1990, Science 249:1527-1533)によるレビューに記載される。

【0311】

本発明の化合物がタンパク質をコード化する核酸である特定の実施態様においては、核酸は、例えば、レトロウィルスベクター (米国特許第4,980,28

6号を参照)の使用によって、または直接注射によって、または微粒子の衝撃(microparticle bombardment)(例えば、遺伝子ガン; Biolistic, Dupont)の使用によって、または脂質若しくは細胞表面レセプター若しくはトランスフェクション剤(transfecting agent)で被覆することによって、または核に入ることが知られるホメオボックス様ペプチドに連結された核酸を投与する(例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照)ことなどによって、適当な核酸の発現ベクターの一部としてこれを構築し、細胞内になるように投与することによって、インビボで投与されてそのコード化されたタンパク質の発現を促進することができる。または、核酸を細胞内に導入して、相同組換えによって、発現用の宿主細胞DNA内に取り込んでよい。

【0312】

本発明はまた、薬剤組成物を提供するものである。このような組成物は、治療上有効な量の化合物、及び製薬上許容できる担体からなる。特定の実施態様において、「製薬上許容できる」ということばは、連邦若しくは州政府の調節局(regulatory agency)によって認可されるまたは米国薬局方若しくは動物、より特にヒトで使用される他の通常認識される薬局方に列挙されることを意味する。「担体」ということばは、これと共に治療が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはベヒクルを意味する。このような医薬品担体(pharmaceutical carrier)は、水及びピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等の石油、動物、植物または合成由来のものなどの油などの油などの、滅菌液体であってもよい。水は、薬剤組成物を静脈内に投与する際に好ましい担体である。生理食塩水ならびにデキストロース及びグリセロール水溶液もまた、特に注射溶液用の、液状担体として使用できる。適当な医薬品賦形剤(pharmaceutical excipient)としては、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は、必要であれば、少量の湿潤若しくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、粉末、徐放性配合物などの形態を

とりうる。組成物は、通常の結合剤やトリグリセリド等の担体と共に、坐剤として配合されてもよい。経口用の配合物としては、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含んでもよい。適当な医薬品担体の例は、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載される。このような組成物は、被検者への適当な投与形態を提供できるように適当な量の担体と共に、好ましくは精製形態の、治療上有効な量の化合物を含むであろう。配合物は、投与の形態に適合するものでなければならない。

【0313】

好ましい実施態様においては、組成物は、ヒトへの静脈内投与に適する薬剤組成物として定常的な方法に従って配合される。具体的には、静脈内投与用の組成物は、滅菌等張緩衝水溶液における溶液である。必要であれば、組成物はまた、可溶化剤及び注射部位での痛みを和らげるためにリドカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。通常、成分は、例えば、活性物質の量を示すアンプルまたは小さい袋等の密閉容器における乾燥凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、単位投与形態(unit dosage form)で別々にまたは一緒に混合して供給される。組成物を輸注によって投与しようとする際には、滅菌された医薬品グレードの水または生理食塩水を含む輸液ボトルで調剤されてもよい。組成物を注射によって投与する際には、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを、成分を投与前に混合するように提供されてもよい。

【0314】

本発明の化合物は、中和または塩の形態として配合できる。製薬上許容できる塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等由来のものなどの遊離アミノ基で形成されたもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等由来のものなどの遊離カルボキシル基で形成されたものが挙げられる。

【0315】

乳癌の処置に有効であろう本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術によって

決定できる。加えて、インビボアッセイを、必要であれば、最適な投与量範囲の見極めるのを助けるのに使用してもよい。また、配合物中に使用される正確な投与量は、投与経路、及び病気または疾患の重篤度によって異なるであろうし、開業医の判断や各被験者の状況に従って決定されるべきである。しかしながら、静脈内投与に関する適当な投与量の範囲は、通常、体重1 kg当たり約20～500 µgの活性化合物である。鼻腔内投与に関する適当な投与量の範囲は、通常、約0.01 pg/kg体重から約1 mg/kg体重である。有効な投与量はインビトロまたは動物モデル試験システムから引き出される用量反応曲線から外挿されてもよい。

【0316】

坐剤は、通常、0.5重量%～10重量%の範囲の活性成分を含む；経口用配合物は、10%～95%の活性成分を含むことが好ましい。

【0317】

本発明はまた、本発明の薬剤組成物の一以上の成分で充填された一以上の容器からなる医薬品パック(pharmaceutical pack)またはキットを提供するものである。必要であれば、このような容器に、医薬または生物学的な製品の製造、使用または販売を規制する政府の局(governmental agency)によって定められた形態の注意書きをつけてもよい。この注意書きは、(a)ヒトへの投与に関する製造、使用または販売の局による認可、(b)使用に関する説明書、または両方を反映するものである。

【0318】

6. 実施例：乳癌患者の血清中で異なって発現するタンパク質の同定

下記方法を用いて、(a)初期乳癌を有する15人の患者、(b)転移性乳癌を有する17人の患者からの血清サンプル、及び(c)乳癌に罹っていない被検者から採取された13個の関連しないコントロールサンプル中のタンパク質を、等電点電気泳動さらにはSDS-PAGEによって分離し、分析した。以下に記載される方法の6.1.1～6.1.19(含む)を、ここでは「参考プロトコル」と称する。

【0319】

1. 材料および方法

6.1.1 サンプルの調製

タンパク質アッセイ(Pierce BCA Cat # 23225)を、受け取られた各血清サンプルについて行なった。タンパク質の分離の前に、各サンプルを、有益なタンパク質を干渉するまたは有益なタンパク質の分析を制限するタンパク質を除去することによってタンパク質の分離を促進、簡便化し、分析を容易にするために、特定のタンパク質を選択的に除去するために処理した。1999年6月1日に提出の、国際特許第PCT/GB99/01742号を参照。これは参考により完全に本明細書に引用され、特に3及び6頁を参照。

【0320】

アルブミン、ハプトグロビン、トランスフェリン及び免疫グロブリンG(IgG)の血清からの除去(「血清除去」)は、サンプルをアルブミン、ハプトグロビン及びトランスフェリンを選択的に除去するための固定化抗体、ならびに免疫グロブリンGを選択的に除去するためのプロテインG(protein G)を含む一連の「Hi-Trap」カラムに通すアフィニティクロマトグラフィー精製によって達成された。タンデムに組み合わされた2個のアフィニティカラムを、抗体をHi-Trapカラムに含まれるプロテインG-セファローズ(プロテインG-セファローズHi-Trapカラム(Protein G-Sepharose Hi-Trap column)(1ml) Pharmacia Cat. No. 17-0404-01)にカップリングすることによって調製した。これは、カラムに下記溶液を順次循環することによって行なわれた:(1) ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)(Gibco BRL Cat. No. 14190-094); (2) 濃縮抗体溶液; (3) 200mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.35; (4) 架橋溶液(200mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.35、20mM ジメチルピメリミデート(dimethylpimelimidate)); および(5) 500mM エタノールアミン、500mM NaCl。次に、3番目の(非誘導化(un-derivatised))プロテインG Hi-Trapカラムをタンデムカラムアセンブリの下端に取り付けた。

【0321】

クロマトグラフィー方法を、一連の7種までの泳動が連続的に行なわれるよう

に、Akta Fast Protein Liquid Chromatography (F P L C) システムを用いて自動化した。サンプルを、アフィニティークロマトグラフィー媒体が選択的に上記タンパク質に結合することによりサンプルからこれらを除去する3個のHi - T r a pカラムに通した。カラムにのせ、洗浄する段階中にカラムから溶出した非結合材料の(「流動フラクション(Flowthrough fraction)」)及びImmunopure Gentle Ag/Ab溶出緩衝液(Immunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer)(Pierce Cat . No. 21013)での溶出段階によって溶出した結合タンパク質の(「結合/溶出フラクション(Bound/Eluted fraction)」)フラクション(具体的には、3ml / 管)を集めた。非結合材料を含む溶出液をフラクション中に集めて、これを貯め、遠心限外濾過によって脱塩/濃縮し、2次元PAGE (2D PAGE)によるさらなる分析まで貯めて待った。

【0322】

約300 µgの全タンパク質を含む一定容積の除去血清を分取し、等容の10% (w/v) SDS (Fluka 71729)、2.3% (w/v) ジチオトレイトール(BDH 443852A)を添加した。サンプルを95 °Cで5分間加熱した後、20 °Cに冷却した。125 µlの下記緩衝液をさらにサンプルに添加した：

8 M 尿素(BDH 452043w)

4% CHAPS (Sigma C3023)

6.5 mM ジチオトレイトール (D T T)

2% (v/v) Resolytes 3.5 - 10 (BDH 44338 2x)

この混合物をボルテックスし、15 °Cで13000 rpmで5分間遠心し、上清を等電点電気泳動によって分析した。

【0323】

6.1.2 等電点電気泳動

等電点電気泳動 (I E F) を、製造社の指示書に記載される方法に従って、Immobiline (登録商標) DryStrip Kit (Pharmacia BioTech)を用いて行なった。Immobiline (登録商標) DryStrip Kit, Pharmacia, # 18-1038-63, Edition ABの指示書を参照(参考により完全に本明細書に引用される)。固定化pH勾配(Immobilized pH Gradient) (I P G) ストリップ (18 cm、pH 3 ~ 10の

非リニアストリップ ; Pharmacia Cat. # 17-1235-01) を、Immobiline DryStrip のユーザーズマニュアルに記載されるようにして、8 M 尿素、2% (w/v) CHAPS、10 mM DTT、2% (v/v) Resolytes 3.5-10の溶液中で20 で一晩再水和した。IEFでは、50 μ lの上清(上記と同様にして調製)をストリップにのせ、カップローディングユニット(cup-loading unit)をストリップの基本的な末端に置いた。次に、のせられたゲルを鉱油(Pharmacia 17-3335-01)で被覆して、Pharmacia EPS3500XL power supply (Cat 19-3500-01)を用いて、下記プロフィールに従って、電圧を即座にストリップに印加した :

初期電圧 = 300 Vで2時間

3時間にわたる300 V ~ 3500 Vのリニアな傾斜

19時間3500 Vで保持

この方法のすべての段階で、電流制限は12 μ lで10 mAに設定し、ワット数の制限を5 Wに設定した。温度は、泳動中20 に維持された。

【0324】

6.1.3 ゲル平衡およびSDS-PAGE

最終の19時間段階の後、ストリップを即座に取り除いて、下記組成 : 6 M 尿素 ; 2% (w/v) DTT ; 2% (w/v) SDS ; 30% (v/v) グリセロール(Fluka 49767) ; 0.05 M Tris/HCl, pH 6.8 (Sigma Cat T-1503)の第1の溶液中に20 で10分間浸漬した。このストリップを第一の溶液から取り出して、下記組成 : 6 M 尿素 ; 2% (w/v) ヨードアセトアミド(Sigma I-6125) ; 2% (w/v) SDS ; 30% (v/v) グリセロール ; 0.05 M Tris/HCl, pH 6.8の第2の溶液中に20 で10分間浸漬した。第2の溶液から取り除いた後、ストリップを、以下に示されるように修飾して、Hochstrasser et al., 1988, Analytical Biochemistry 173: 412-423 (参考により完全に本明細書に引用される)に従って、SDS-PAGE用の支持ゲルにのせた。

【0325】

6.1.4 支持ゲルの調製

ゲルを、下記寸法：23 cm幅×24 cm長（後ろの板）；中央の19 cmに2 cm深さのノッチのある23 cm幅×24 cm長（前の板）の2枚のガラス板の間にキャストした。SDS-PAGEゲルの共有結合を促進するために、後ろの板を、エタノールにおけるγ-メタクリル-オキシプロピルトリメトキシシラン(BindSilane (商標)；Pharmacia Cat. # 17-1330-01)の0.4%溶液で処理した。前の板を、ゲルの接着を抑制するために(RepelSilane (商標) Pharmacia Cat. # 17-1332-01)で処理した。過剰の試薬を水で洗浄することによって除去し、板を乾燥させた。この段階で、ゲルの識別として、および板の被覆面を同定するマーカーとして、粘着性のバーコードを、ゲルマトリックスと接触しないような位置に後ろの板に付けた。

【0326】

乾燥板を、13個のゲルサンドイッチを収容できるキャストボックスに組み込んだ。各サンドイッチの上及び下板を、2.5 cm幅の、1 mm厚のスペーサーによって間隔をあけた。サンドイッチに、ゲル重合後のサンドイッチの分離を容易にするためにアセテートシートをはさんだ。次に、キャストイングをHochstrasser et al., op. citに従って行なった。

【0327】

9 ~ 16%のリニアなポリアクリルアミドの濃度勾配を、Angelique gradient casting system (Large Scale Biology)を用いて、前の板のノッチのレベルより2 cm下の位置まで広がるように、キャストした。ストック溶液は下記のとおりであった。アクリルアミド（水における40%）は、Serva (Cat. # 10677)からであった。架橋剤は、全出発モノマー含量の2.6% (w/w)の濃度の、PD A (BioRad 161-0202)であった。ゲル緩衝液は、0.375 M Tris / HCl, pH 8.8であった。重合触媒は0.05% (v/v) TEMED (BioRad 161-0801)であり、開始剤は0.1% (w/v) APS (BioRad 161-0700)であった。SDSはゲルに含ませず、スタッキングゲルを使用しなかった。キャストされたゲルを、20℃で一晩重合した後、6 mlのゲル緩衝液の入った密閉ポリエチレンバッグ中に4℃で貯蔵し、4週間以内に使用した。

【0328】

6.1.5 SDS-PAGE

0.5% (w/v) アガロース(Fluka Cat 05075)を、泳動緩衝液(0.025 M Tris, 0.198 M グリシン(Fluka 50050), 1% (w/v) SDS, 微量のプロモフェノールブルーを追加)中に調製した。アガロースが溶解するまで、アガロース懸濁液を攪拌しながら70℃に加熱した。支持2次元ゲルの上部をアガロース溶液で充填し、平衡化ストリップをアガロース中に置き、ゲルが完全に2次元ゲルと接触するまでパレットナイフで軽くたたいた。Amess et al., 1995, Electrophoresis 16: 1255-1267(参考により完全に本明細書に引用される)に記載されるように、ゲルを2次元泳動タンクに置いた。活性ゲル領域を効率よく冷却できるように、緩衝液のレベルがポリアクリルアミドを含む2次元ゲルの領域の上部より若干高くなるまで、タンクを泳動緩衝液(上記と同様)で満たした。泳動緩衝液をゲルによって形成された上部の緩衝液コンパートメントに添加した後、電圧をConsort E-833 power supplyを用いて即座にゲルに印加した。1時間、ゲルを20 mA/ゲルで泳動した。ワット数の制限は6ゲルを含むタンクで150 Wに設定し、電圧の制限は600 Vに設定した。次に、1時間後、プロモフェノールブルーのラインがゲルの下端から0.5 cmになるまで、電圧及びワット数の制限を前記と同様にして、ゲルを40 mA/ゲルで泳動した。緩衝液の温度は泳動中16℃に維持された。ゲルは2連で泳動しなかった。

【0329】

6.1.6 染色

電気泳動の作業が終了したら、ゲルを固定のためにタンクからすぐに取り出した。ゲルカセットの上の板を注意深く取り除き、ゲルを下板に結合させたままにした。次に、ゲルが付いた下板を、12ゲルを収容できる、染色装置に入れた。ゲルを、ゲル上を連続的に循環させた、40% (v/v) エタノール(BDH 28719)、10% (v/v) 酢酸(BDH 100016X)、50% (v/v) 水(MilliQ-Millipore)の固定化溶液中に完全に浸した。一晩インキュベートした後、固定化液をタンクから排出し、ゲルを、7.5% (v/v) 酢酸, 0.05% (w/v) SDS, 92.5% (v/v) 水に30分間浸漬することによって下塗した(prime)。次に、下塗溶液を排出し、ゲルを、Sypro Red (Molecular Probes, Inc.

、 Eugene, Oregon)の染色溶液中に4時間、完全に浸漬することによって染色した。この目的に使用できる他の染料は、1999年10月5日に提出された、米国特許出願第09/412,168号に記載され、これは参考により完全に本明細書に引用される。

【0330】

6.1.7 ゲルの撮像(imaging)

コンピュータで判読可能な出力を、上記5.1に記載されたApollo 2 スキャナー(Oxford Glycosciences, Oxford, UK)で蛍光染色されたゲルを撮像することによって得た。このスキャナーは、イメージの形状寸法(geometry)を修正するのに使用され、スキャニングが正しく行なわれたことを確認するための特性のコントロール特徴(quality control feature)である4種の必須の蛍光マーカー(M1、M2、M3、M4と称する)を有するゲルキャリアを有する。

【0331】

スキャニングでは、ゲルを染色液から取り除き、水で洗浄して、簡単に空気乾燥して、Apollo 2で撮像した。撮像後、ゲルを少量の染色溶液を含むポリエチレンバッグ中に密閉した後、4 で貯蔵した。

【0332】

6.1.8 データのデジタル分析

データを、以下により詳細に記載されるように、5.4及び5.5で米国特許出願第08/980,574号(WO 98/23950号として公開)(参考により完全に本明細書に引用される)に記載されるのと同様にして処理した。

【0333】

スキャナーからの出力を、まずMELANIE(登録商標) II 2D PAGE 分析プログラム(Release 2.2, 1997, BioRad Laboratories, Hercules, California, Cat. # 170-7566)を用いて処理し、登録点であるM1、M2、M3、及びM4を自動的に検出し;イメージの縁を自動的に切り落とし(即ち、ゲル、例えば、参考フレームの境界より外側にあるスキャンされたイメージの領域からのシグナルを除去する);ちりによるアーチファクトを除去し(filter out);特徴を検出、定量し;さらにGIFフォーマットでイメージファイルを作製した。特徴は、下記パ

ラメーターを用いて検出した：

平滑性(smooths) = 2

ラプラス閾値 50

部分閾値(Partial threshold) 1

飽和 = 100

とがり = 0

最小長さ(Minimum Perimeter) = 10

6.1.9 pI及びMW値の代入

ランドマーク識別(Landmark identification)を用いて、イメージで検出された特徴のpI及びMWを測定した。DS1、DS2、DS4、DS5、DS6、DS8、DS9、DS10、DS11、DS12、及びDS13と称される、11個の顕著な特徴(landmark feature)を標準的な血清イメージで同定した。これらの顕著な特徴を図1に示し、表XIIIに示されるpI及びMW値を代入した。

【0334】

【表13】

表XIII 本研究で使用された顕著な特徴

名称	PI	MW (Da)	名称	PI	MW (Da)
DS1	5.55	185070	DS9	5.22	23000
DS2	6.20	100000	DS10	5.52	13800
DS4	5.15	73470	DS11	6.65	56170
DS5	4.10	44160	DS12	9.01	12060
DS6	6.98	31720	DS13	4.75	41230
DS8	4.47	23920			

【0335】

可能な限り多くのランドマークをデータの各ゲルイメージで同定した。次に、研究ゲルにおける各特徴を、2つの最も近いランドマークに対してリニアな内挿または外挿(MELANIE(登録商標)-IIソフトウェアを用いて)を行なうことに

よってpI値に代入し、2つの最も近いランドマークに対してリニアな内挿または外挿(MELANIE(登録商標)-IIソフトウェアを用いて)を行なうことによつてMW値に代入した。

【0336】

6.1.10 1次マスターイメージによるマッチング

イメージを編集して、ちりによるひどいアーチファクトを除去し、タンパク質の特徴のスミアリング等のひどい異常性を有する、またはローディング若しくは全体のイメージの輝度が低すぎて最も輝度の高い特徴を超える同定ができない、または解像度が低すぎて特徴の正確な検出ができないイメージを拒否した。次に、全体のサンプルセットからの一つの共通したイメージと対を形成することによつて、イメージを比較した。この共通のイメージ、「1次マスターイメージ(primary master image)」は、タンパク質のロード(最大のロードは最大の特徴の検出と一致する)、良好に解像されたミオグロビン領域(ミオグロビンを内部標準として使用した)、及び一般的なイメージの質に基づいて選択された。さらに、1次マスターイメージは、分析に含まれるすべてのものの一般的に代表となると考えられるイメージであるものを選択した。(1次マスターゲルが研究ゲルの代表であると判断されるこのプロセスは、下記方法で再チェックされ、1次マスターゲルが代表となりえないと見られる場合には、これを拒否して、代表的な1次マスターゲルが見出されるまでこのプロセスを繰り返した。)

それぞれの残った研究ゲルイメージを、共通のタンパク質の特徴が以下に記載されるように1次マスターゲルとそれぞれ個々のゲルイメージとの間で対になるように1次マスターゲルに個々にマッチングさせた。

【0337】

6.1.11 サンプル間のクロスマッチング

異なって発現する特徴を同定することを目的として大多数のサンプルの統計学的な分析を容易にするために、各研究ゲルの形状寸法を、以下のようにしてタンパク質の特徴のパターン、及び1次マスターのもの間の最大のアライメントについて調節した。それぞれの研究ゲルのイメージを、個々に、多重解像ゆがみ方法(multi-resolution warping procedure)を用いて1次マスターイメージの形状寸

法に変換した。この方法は、相互のサンプルの電気泳動分離プロセスの物理的なパラメータの小さな変化によって生じるゆがみに関してイメージの形状寸法を修正するものである。観察された変化は、見出されたゆがみが、局所的及び全体的なスケールで変動する、単純な形状寸法のゆがみではなく、むしろ滑らかな流れである。

【0338】

多重解像モデル(multi-resolution modeling)における基本的な原則は、平滑なシグナルを「スケールスペース(scale space)」での漸進的な変化(evolution)として形成し、このスペースで、連続的なより細かいスケールでの細部を高分解シグナルを得るために低解像近似に加える。このようなタイプのモデルは、ベクターの流れ場(参考イメージの各画素位置で規定される)に適用され、これにより任意の平滑な流れを比較的少ない自由度で形成できる。各イメージをまず、初期イメージ由来のイメージの、スタック、またはピラミッド状に、変えたが、平滑にされ、各レベル(ガウスピラミッド)で各方向に2の係数によって解像度を減少させ、相当するイメージの差を各レベルで計算し、平滑イメージ及びその祖先(ラプラスピラミッド)間の差異を表わす。ゆえに、ラプラスイメージは異なるスケールでのイメージの細部を表わす。

【0339】

2種の所定のイメージ間のゆがみを評価するために、ピラミッドでレベル7で(即ち、解像度を7回連続して減少した後)計算を行なった。ラプラスイメージを双方向での隣接するグリッド位置間で50%重複する、 16×16 画素のグリッドに分け、参考及びテストイメージの相当するグリッド区間の相互相関を計算した。次に、ゆがみの変位(distortion displacement)を、相関マトリックスの最大の位置によって得た。すべての変位が特定のレベルで算出された後、ピラミッドの次のレベルに内挿し、テストイメージに適用した後、変位に対するさらなる相関を次のスケールで算出した。

【0340】

ゆがみ(warping)プロセスによって、1次マスターイメージ、及び他のサンプルのイメージにおける共通の特徴間の良好なアライメントが得られた。MELANIE

(登録商標) II 2D PAGE分析プログラムを用いて、1次マスター及び各他のイメージ間で約500～700個のマッチした特徴の対を算出、記録した。このプログラムの精度は、上記したようなイメージのアライメントによって有意に向上した。さらに精度を向上するために、すべての対を最終的にMelView対話式編集プログラム(MelView interactive editing program)で目で調べ、正しくないと認識された残りの対を除いた。このような認識により不適当な対の数が好ましい技術(同様の生体試料の繰り返しの分析によって測定される)の全体的な再現性を超える場合には、1次マスターゲルであると選択されたゲルは1次マスターゲルとして機能する研究ゲルの代表には不十分であると判断された。この場合には、1次マスターゲルとして選択されたゲルは拒否され、異なるゲルを1次マスターゲルとして選択し、プロセスを繰り返した。

【0341】

次に、すべてのイメージを一緒に加えて複合マスターイメージを作製し、すべての部分イメージのすべてのゲルの特徴の位置及び形状を下記のようにしてこの複合マスターに重ねた。すべての初期の対を計算、修正及び保存した後、第二の通過を行ない、これにより元の(ゆがみのない)イメージを2回目に1次マスターの形状寸法に変換した。この時間は対のゲルの特徴の重心によって規定される多重連絡点(multiple tie-point)の平滑な内挿によって計算される流れ場を使用した。ゆえに、複合マスターイメージは、その特徴のディスクリプタで1次マスターイメージを初期化することによって得られた。各イメージを1次マスターの形状寸法に変換したら、複合マスターイメージにピクセル単位でデジタルで合わせ、上記した方法によって対にならなかった特徴は複合マスターイメージの記述(description)に添加されたと考えられ、重心は流れ場の修正を用いてマスター形状寸法に調節された。

【0342】

処理の最終的な段階は、複合マスターイメージ及びその特徴のディスクリプタに相当され、これは共通の形状寸法に変換された研究におけるすべてのイメージからのすべての特徴が表わす。これらの特徴を、これらの間の重複度合いによって、関連するセットまたは「クラスター」に分けた。次に、各クラスターに、単

一の同定指数、分子クラスター指数(molecular cluster index) (MCI) を与えた。

【0343】

MCIは、異なるイメージでのマッチした特徴のセットを明らかにする。ゆえに、MCIは、異なるサンプルにおける2次元分離の等しい位置で溶出するタンパク質または複数のタンパク質を表わす。

【0344】

6.1.12 プロフィールの構築

研究されたすべての成分ゲルを最終的な複合マスターイメージに合わせた後、各特徴の強さを測定、保存した。この分析の最終結果は、それぞれの同定された特徴に関して：1) 複合マスターイメージ内の相当する特徴(MCI)に対する単一の識別コード、2) ゲル内の特徴のx、y座標、3) BFの等電点(pI)、4) BFの見掛け分子量(MW)、5) シグナル値、6) それぞれの前記測定の標準偏差、及び7) この特徴がマッチするマスターゲルへの各特徴のMCIの連結方法を、含んだデジタルプロフィールの形成であった。実験情報管理システム(Laboratory Information Management System) (LIMS)によって、このMCIプロフィールは、ゲルプロフィールデータベースのコンピューター分析によって同定されたタンパク質を検索できるように、これから生じた実際の貯蔵されたゲルに追跡可能であった。また、LIMSにより、プロフィールを元のサンプルまたは患者にまで追跡することもできた。

【0345】

6.1.13 プロフィールの統計学的な分析

以下に記載する補足的な統計学的なストラテジーを用いて、マスター群のMCIからBFを同定した。しかしながら、当業者は、使用されるさらなる統計学的方法を選択することができ、本発明はこれらの分析方法に制限されるものではないと解される。

【0346】

MCI内の各BFの平均の割合を表わす折りたたみ変化(fold change)を、コントロール及び乳癌サンプルの各セット間の各MCIについて算出した。折りた

たみ変化の平均に関する95%の信頼限界を算出した。信頼限界を超えるまたは未満である折りたたみ変化を有するMCIを、95%の選択率の有意な折りたたみ変化の閾値の基準を満たしたBFとして選択した。MCIの折りたたみ変化は95%の信頼限界に基づくものであるため、有意な折りたたみ変化の閾値はそれ自体95%であることになる。

【0347】

第二の重複しないストラテジー(non-overlapping strategy)は、ウィルコクソンランク - 合計テスト(Wilcoxon Rank-Sum test)の使用によるものである。このテストは、各MCIを基礎としてコントロール及び乳癌サンプル間で行なわれる。0.05以下のp - 値を記録したMCIを、95%の選択率の統計学的に有意なBFとして選択した。

【0348】

第三の重複しない選択ストラテジーは、質的な存在または不存在のみに基づくものである。この方法を用いて、特徴の存在率(%)を、このような質的な基準のみ、即ち、存在または不存在に基づいて潜在的なBFである各MCIについてコントロールサンプル及び乳癌患者サンプルで算出した。乳癌サンプルで95%以上の特徴の存在率(%)及びコントロールサンプルで5%以下の特徴の存在率(%)を記録したMCIを、95%の選択率の質的に異なるBFとして選択した。95%の選択率の質的に異なるBFの第2の群を、コントロールサンプルで95%以上の特徴の存在率(%)及び乳癌血清サンプルで5%以下の特徴の存在率(%)を記録したMCIによって形成した。

【0349】

制限されるものではないが、これらの3種の分析ストラテジーの一以上の適用によって、BFが(a)所定の選択率の有意な折りたたみ変化の閾値、または(b)ウィルコクソンランク - 合計テスト(Wilcoxon Rank-Sum test)によって測定される際の統計学的な有意性、または(c)所定の選択率の質的な差異に基づいて選択できた。

【0350】

ERFはすべての血清サンプル中に存在し、変動係数はすべてのサンプルで1

0%未満であった。

【0351】

6.1.14 選択されたタンパク質の回収および分析

BFにおけるタンパク質をロボットで切り出し、処理してトリプシンペプチドを得た；これらのペプチドの部分的なアミノ酸配列を、当業者に既知の技術を用いて、質量分光分析によって、さらには1997年6月18日に提出された特許第08/877,605号(WO 98/53323号として公開)及び1998年6月15日に提出された特許第09/094,996号に記載されるような、de novo配列決定(de novo sequencing)によって決定した。これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0352】

6.2 結果

これらの初期実験により、乳癌に冒されていない13人の患者からの血清に比して15人の初期乳癌患者からの血清中で減少した13種の特徴及び増加した7種の特徴；乳癌に冒されていない13人の患者からの血清に比して17人の転移性乳癌患者からの血清中で減少した15種の特徴及び増加した7種の特徴が同定された。これらのBFの詳細は、表I、II、III及びIVに示される。各BFは、正常な血清と比べて乳癌血清中に異なって存在した($p < 0.05$)。好ましいBF(BF-3、BF-13、BF-19、BF-22、BF-26、BF-28、BF-40)によっては、差異が非常に有意であった($p < 0.01$)。

【0353】

部分的なアミノ酸配列をこれらのBF中で異なって存在したBPIについて決定した。これらのBPIの詳細は、表VI、VII、VIII及びIXに示される。公的なデータベースのコンピューター検索によって、部分的なアミノ酸配列(表XIIに記載されるようにコア配列ならびにN-末端及びC-末端の集団(mass)を有する)、またはこのような部分的なアミノ酸配列をコード化するオリゴヌクレオチドが調べられた公的なデータベースに記載されていなかった少なくとも16個のBPIが同定された。

【0354】

本発明は、本願に記載される特定の実施態様の点で制限されるものではなく、これらの実施態様は本発明の個々の態様を単に詳細に説明するものであると解される。本明細書で列挙されたものに加えて、本発明の概念に含まれる機能的に等価な方法及び装置は、前記説明及び添付図面から当業者には明らかであろう。このような修飾及び変更は、添付の特許請求の範囲の概念に含まれると解される。本願で列挙された引用文献、特許及び特許出願のそれぞれの内容は、参考により完全に本明細書に引用される。

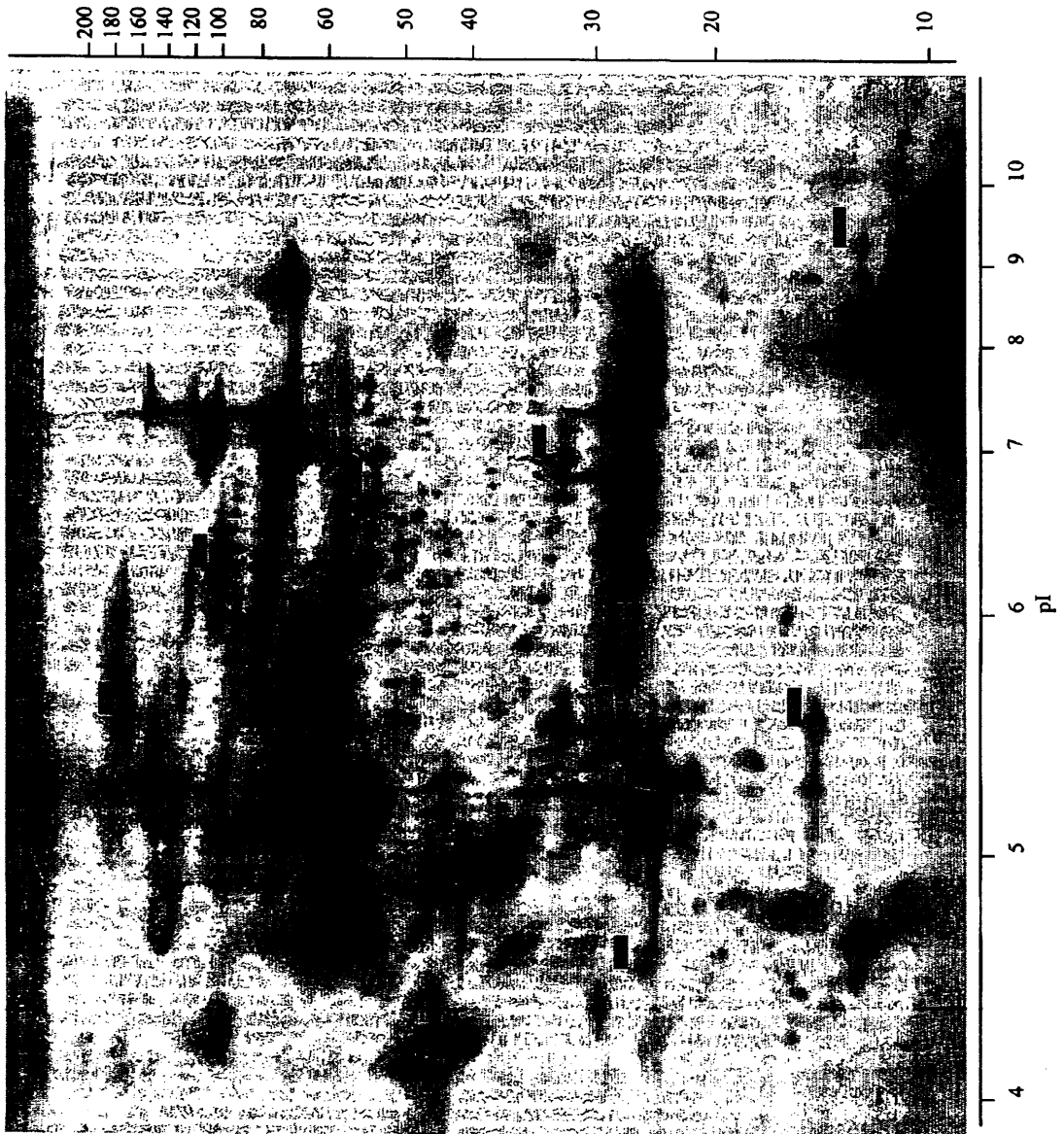
【図面の簡単な説明】

【図1】

正常な血清及び乳癌を有する被検者から採取された血清との組み合わせを示す劣化血清 (depleted serum) の、2次元電気泳動で得られたイメージであって、DS1、DS2、DS4、DS5、DS6、DS8、DS9、DS10、DS11、DS12およびDS13を称される11個のランドマーク特徴を同定するために注釈がつけられている。

【図1】

図1



【手続補正書】**【提出日】**平成14年2月14日(2002.2.14)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 (a) 2次元電気泳動によって被検者からの体液のテストサンプルを分析して、特徴の2次元アレイを形成し、該アレイは、その相対存在比が乳癌の存在、不存在、段階若しくは重篤度と相関するまたは乳癌の発症若しくは経過を予想する、BF-1、BF-2、BF-3、BF-4、BF-5、BF-7、BF-8、BF-9、BF-10、BF-12、BF-13、BF-14、BF-15、BF-16、BF-17、BF-18、BF-19、BF-20、BF-22、BF-23、BF-26、BF-27、BF-28、BF-29、BF-30、BF-31、BF-32、BF-33、BF-34、BF-35、BF-36、BF-37、BF-38、BF-39、BF-40、及びBF-41から選ばれる少なくとも一の選択された乳癌関連特徴(Breast Cancer-Associated Feature)(BF)からなり；および

(b) テストサンプルにおける各選択された特徴の存在比を、乳癌に冒されていない一人以上のヒトからの体液における前記選択された特徴の存在比と、または乳癌に冒されていない被検者の前記特徴に関して予め決定された参考範囲と、またはテストサンプルにおける少なくとも一の発現参考特徴(Expression Reference Feature)(ERF)の存在比と比較する

ことからなる、被検者において乳癌をスクリーニングする、診断する若しくは予想する、被検者における乳癌の段階若しくは重篤度を測定する、乳癌が発達する危険のある被検者を同定する、または乳癌を有する被検者に投与される治療の効果をモニターする方法。

【請求項2】 体液は血清または血漿である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 段階(b)は、サンプルにおける各選択された特徴の存在比を、乳癌に冒されていない一人以上のヒトからの血清における前記選択された特徴の存在比とまたは乳癌に冒されていない被検者における前記特徴に関して予め決定された参考範囲と比較することからなる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 被検者からの血清または血漿のサンプルにおいて、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI) : BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56の少なくとも一を定量的に検出することからなる、被検者において乳癌をスクリーニングする、診断する若しくは予想する、被検者における乳癌の段階若しくは重篤度を測定する、乳癌が発達する危険のある被検者を同定する、または乳癌を有する被検者に投与される治療の効果をモニターする方法。

【請求項5】 被検者からの血清のサンプルにおいて、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI) : BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-40、BPI-50、BPI-53、BPI-54、BPI-55の少なくとも一を定量的に検出することからなる、被検者において初期乳癌をスクリーニングする、診断するまたは予想する方法。

【請求項6】 被検者からの血清のサンプルにおいて、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI) : BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-48、BPI-49

、B P I - 5 1、B P I - 5 2、B P I - 5 3、B P I - 5 6の少なくとも一を定量的に検出することからなる、被検者において転移性乳癌をスクリーニングする、診断するまたは予想する方法。

【請求項7】 乳癌関連タンパク質イソ型(B P I) B P I - 27を検出することからなる、請求項4または6に記載の方法。

【請求項8】 乳癌関連タンパク質イソ型(B P I) B P I - 37を検出することからなる、請求項4または6に記載の方法。

【請求項9】 定量的に検出する段階はサンプルの少なくとも一のアリコートを試験することからなり、該試験する段階は、

(a) アリコートを予め選択されたB P Iに対して免疫特異的である抗体と接触させ；および

(b) 抗体及びアリコート中の少なくとも一種間で生じる結合を定量的に測定することからなる、請求項4～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 定量的に検出する段階は複数の予め選択されたB P Iの定量的な検出について複数の抗体を用いて複数のアリコートを試験することからなる、請求項4～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 該一の抗体または複数の抗体はモノクローナル抗体である、請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】 単離された乳癌関連タンパク質イソ型(B P I) B P I - 49からなる製剤。

【請求項13】 下記配列：A NまたはA G Gを有するペプチドからなる単離されたヒトタンパク質からなる製剤。

【請求項14】 タンパク質は約6.08の等電点(p I)及び約59520の見掛け分子量(MW)を有する、請求項13に記載の製剤。

【請求項15】 p Iが6.08の10%以内であり、MWが59520の10%以内である、請求項14に記載の製剤。

【請求項16】 下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms)(B P I)：B P I - 1、B P I - 5、B P I - 6、B P I - 9、B P I - 10、B P I - 11、B P I - 12、B P I - 13、B P I -

14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56の一に免疫特異的に結合できる抗体。

【請求項17】 モノクローナル抗体である、請求項16に記載の抗体。

【請求項18】 治療上有効な量の請求項16または17に記載の抗体または該抗体の断片若しくは誘導体及び製薬上許容できる担体からなり、該断片若しくは誘導体は、請求項16または17に記載の抗体の結合ドメインを含むものである、薬剤組成物。

【請求項19】 乳癌を処置または予防する必要がある被検者に、治療上有効な量の請求項16または17に記載の抗体または該抗体の断片若しくは誘導体を投与することからなり、該断片若しくは誘導体は、請求項16または17に記載の抗体の結合ドメインを含むものである、乳癌を処置または予防する方法。

【請求項20】 乳癌を処置または予防する必要がある被検者に、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI) : BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、またはBPI-56の一以上をコード化する核酸を治療上有効な量投与することからなる乳癌を処置または予防する方法。

【請求項21】 乳癌を処置または予防する必要がある被検者に、下記乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI) : BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-

20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56の一以上の発現を阻害する核酸を治療上有効な量投与することからなる乳癌を処置または予防する方法。

【請求項22】 核酸はBPIアンチセンス核酸またはリボザイムである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 (a) BPI、BPIの断片、またはBPI関連ポリペプチドを候補物質と接触させ；および

(b) 候補物質がBPI、BPIの断片、またはBPI関連ポリペプチドと相互作用するか否かを決定する

ことからなる、BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、及びBPI-56から選択される乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI)、BPIの断片、またはBPI関連ポリペプチドと相互作用する物質のスクリーニングまたは同定方法。

【請求項24】 (a) BPIまたはBPI関連ポリペプチドを発現する細胞の第1集団を候補物質と接触させ；

(b) 該BPIまたは該BPI関連ポリペプチドを発現する細胞の第2集団をコントロール物質と接触させ；および

(c) 細胞の第1及び第2集団における該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドまたは該BPI若しくは該BPI関連ポリペプチドをコード化するmRNAの発現のレベルを比較する、または細胞の第1及び第2集団における細胞の2次

メッセンジャーの誘導のレベルを比較する

ことからなる、B P I - 1、B P I - 5、B P I - 6、B P I - 9、B P I - 10、B P I - 11、B P I - 12、B P I - 13、B P I - 14、B P I - 19、B P I - 20、B P I - 21、B P I - 23、B P I - 24、B P I - 25、B P I - 27、B P I - 28、B P I - 29、B P I - 31、B P I - 32、B P I - 33、B P I - 34、B P I - 37、B P I - 40、B P I - 48、B P I - 49、B P I - 50、B P I - 51、B P I - 52、B P I - 53、B P I - 54、B P I - 55、及びB P I - 56から選択される乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (B P I)、またはB P I 関連ポリペプチドの発現または活性を調節する物質のスクリーニングまたは同定方法。

【請求項25】 (a) 候補物質を第1の哺乳動物または哺乳動物群に投与し；

(b) コントロール物質を第2の哺乳動物または哺乳動物群に投与し；

(c) 第1及び第2の群におけるB P I 若しくはB P I 関連ポリペプチドのまたはB P I 若しくはB P I 関連ポリペプチドをコード化するm R N A の発現のレベルを比較し；および

(d) 必要であれば、第1及び第2の群におけるB P I 若しくはB P I 関連ポリペプチドのまたはB P I 若しくはB P I 関連ポリペプチドをコード化するm R N A の発現のレベルを、正常なコントロール哺乳動物におけるB P I 若しくはB P I 関連ポリペプチドのまたはB P I 若しくはB P I 関連ポリペプチドをコード化するm R N A の発現のレベルと比較する、または細胞の第1及び第2集団における細胞の2次メッセンジャーの誘導のレベルを、正常なコントロール哺乳動物における細胞の2次メッセンジャーの誘導のレベルと比較する

ことからなる、B P I - 1、B P I - 5、B P I - 6、B P I - 9、B P I - 10、B P I - 11、B P I - 12、B P I - 13、B P I - 14、B P I - 19、B P I - 20、B P I - 21、B P I - 23、B P I - 24、B P I - 25、B P I - 27、B P I - 28、B P I - 29、B P I - 31、B P I - 32、B P I - 33、B P I - 34、B P I - 37、B P I - 40、B P I - 48、B P

I - 49、BPI - 50、BPI - 51、BPI - 52、BPI - 53、BPI - 54、BPI - 55、及びBPI - 56から選択される乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI)、またはBPI関連ポリペプチドの発現または活性を調節する物質のスクリーニングまたは同定方法。

【請求項26】 哺乳動物は乳癌の動物モデルまたは乳癌を有するヒト被検者である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 (a) 第1のアリコートにおいて、候補物質をBPIまたはBPI関連ポリペプチドと接触させ、および

(b) 候補物質の添加後の第1のアリコートにおけるBPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性を、コントロールのアリコートにおけるBPIまたはBPI関連ポリペプチドの活性と、または予め決定された参考範囲と比較する

ことからなる、BPI - 1、BPI - 5、BPI - 6、BPI - 9、BPI - 10、BPI - 11、BPI - 12、BPI - 13、BPI - 14、BPI - 19、BPI - 20、BPI - 21、BPI - 23、BPI - 24、BPI - 25、BPI - 27、BPI - 28、BPI - 29、BPI - 31、BPI - 32、BPI - 33、BPI - 34、BPI - 37、BPI - 40、BPI - 48、BPI - 49、BPI - 50、BPI - 51、BPI - 52、BPI - 53、BPI - 54、BPI - 55、及びBPI - 56から選択される乳癌関連タンパク質イソ型(Breast Cancer-Associated Protein Isoforms) (BPI)、またはBPI関連ポリペプチドの活性を調節する物質のスクリーニングまたは同定方法。

【請求項28】 BPIまたはBPI関連ポリペプチドは組換タンパク質である、請求項23、24または27に記載の方法。

【請求項29】 BPI - 49またはこれの補体をコード化するヌクレオチド配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項30】 BPI - 49またはこれの補体の少なくとも10個の連続したアミノ酸をコード化するヌクレオチド配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項31】 請求項29または30に記載の核酸分子からなるベクター

。

【請求項32】 請求項29または30に記載の核酸分子を発現するように遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項33】 (a) BPI-1、BPI-5、BPI-6、BPI-9、BPI-10、BPI-11、BPI-12、BPI-13、BPI-14、BPI-19、BPI-20、BPI-21、BPI-23、BPI-24、BPI-25、BPI-27、BPI-28、BPI-29、BPI-31、BPI-32、BPI-33、BPI-34、BPI-37、BPI-40、BPI-48、BPI-49、BPI-50、BPI-51、BPI-52、BPI-53、BPI-54、BPI-55、BPI-56から選択されるBPIをコード化するヌクレオチド配列に相補的である10個以上の連続したヌクレオチドからなる少なくとも一のオリゴヌクレオチドプローブを、被検者からの生体試料から得られたRNAとまたは前記RNAから複製されたcDNAと接触させ、この際、該接触は存在する場合にはヌクレオチド配列とのプローブのハイブリッド形成が行なえる条件下で起こる；

(b) 存在する際には、プローブ及びヌクレオチド配列間のハイブリッド形成を検出し；および

(c) 存在する際には、段階(b)で検出されたハイブリッド形成を、コントロールサンプルで検出されたハイブリッド形成と、または予め決定された参考範囲と比較する

ことからなる、被検者における乳癌をスクリーニングする、診断する若しくは予想するまたは被検者に投与された抗乳癌剤若しくは治療の効果をモニターする方法。

【請求項34】 非常にストリンジेंटな条件または適度にストリンジेंटな条件下で、核酸配列：GCNAAYまたは核酸配列：GCCAACにハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 00/03143
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 G01N33/561 C12Q1/68 C07K16/30 C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, STRAND, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 46884 A (MATRITECH INC) 11 December 1997 (1997-12-11) page 3, line 10 -page 4, line 14 page 4, line 24 -page 5, line 29 page 26, line 30 - line 34; claims 1-6	1-5,7
X	WO 99 32625 A (UNIV MICHIGAN) 1 July 1999 (1999-07-01) page 1, line 11 - line 14 figure 9 examples 11,15	1-5,7
X	WO 98 35229 A (WILLIAMS KEITH LESLIE ;BOLIS SHIRLEY (AU); HERBERT BEN (AU); MOLLO) 13 August 1998 (1998-08-13) page 1 -page 4 claims 1-5,8,9	1-5,7
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 April 2001		Date of mailing of the international search report 23.05.2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

7

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 00/03143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 775 620 A (CARDIFF ROBERT D ET AL) 4 October 1988 (1988-10-04) abstract ---	1-5
X	US 5 188 964 A (MCGUIRE WILLIAM L ET AL) 23 February 1993 (1993-02-23) tables 3A,3B ---	1-5
X	US 5 798 266 A (QUAY STEVEN C ET AL) 25 August 1998 (1998-08-25) example 9 ---	1-5
X	BINI LUCA; MAGI BARBARA ET AL.: "Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue" ELECTROPHORESIS, vol. 18, December 1997 (1997-12), pages 2832-2841, XP000923292 the whole document ---	1-5,7
X	WILLIAMS KATHERINE; CHUBB CYNTHIA; HUBERMAN ELIEZER; GIOMETTI CAROL S: "Analysis of differential protein expression in normal and neoplastic human breast epithelial cell lines" ELECTROPHORESIS, vol. 19, February 1998 (1998-02), pages 333-343, XP000923169 the whole document ---	1-5,7
X	FRANZEN BO; LINDER STIG ET AL.: "Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions" ELECTROPHORESIS, vol. 18, 1997, pages 582-587, XP000923187 the whole document ---	1-5,7
P,X	PAGE MARTIN J; AMESS BOB ET AL.: "Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mamoplasties" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 96, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12589-12594, XP000978052 the whole document ---	1-5,7
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 00/03143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BELT, K.T. ET AL.: "Polymorphism of Human Complement Component C4" IMMUNOGENETICS, vol. 21, 1985, pages 173-180, XP000974623 the whole document	6
A	-& DATABASE SWISSPROT 'Online! ID:C04-Human ACC: PO1028, 21 July 1986 (1986-07-21) XP002155799 cited in the application abstract	6
X	----- MATOSES CUQUERELLA S ET AL: "SERUM LEVELS OF COMPLEMENT AND OF ITS COMPONENTS IN BREAST CANCER PATIENTS" ONCOLOGIA (MADRID), vol. 12, no. 4, 1989, pages 170-176, XP000974634 ISSN: 0378-4835 abstract	6
X	----- VIJAYAKUMAR T ET AL: "TOTAL HEMOLYTIC COMPLEMENT CH50 AND ITS FRACTIONS C3 AND C4 IN THE SERA OF PATIENTS WITH CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY UTERINE CERVIX AND BREAST" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 7, no. 4, 1987, pages 300-303, XP000974622 ISSN: 0271-9142 abstract	6
X	----- NICULESCU F ET AL: "PERSISTENT COMPLEMENT ACTIVATION ON TUMOR CELLS IN BREAST CANCER" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 140, no. 5, May 1992 (1992-05), pages 1039-1043, XP000974678 ISSN: 0002-9440 abstract	6
X	----- CUQUERELLA S M ET AL: "ACTIVITY OF THE TOTAL COMPLEMENT AND CONCENTRATION OF ITS COMPONENTS C1q C3 C4 AND C1-INACTIVATOR IN CANCER" MEDICINA CLINICA, vol. 91, no. 20, 1988, pages 769-774, XP000974630 ISSN: 0025-7753 abstract; table 2	6
	----- -/--	

7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. l. Application No
 PCT/GB 00/03143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOMINIONI L ET AL: "POST OPERATIVE INFECTIONS AND VARIATIONS OF COMPLEMENT COMPONENTS IN CANCER PATIENTS" TUMORI, vol. 66, no. 5, 1980, pages 583-594, XP000974648 ISSN: 0300-8916 abstract ---	6
X	TROFATTER, JAMES A. ET AL: "An expression-independent catalog of genes from human chromosome 22" GENOME RES. (1995), 5(3), 214-24, XP000971718 abstract ---	158
X	DATABASE SWISSPROT 'Online! ACC: P08758, 1 November 1988 (1988-11-01) "Annexin V" XP002165484 cited in the application abstract ---	12,13, 96-102, 123-127
X	SATO H. ET AL: "Annexin V inhibits the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced activation of Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway upstream of Shc in MCF-7 cells." ONCOGENE, (8 JUN 2000) 19/25 (2904-2912). XP000997489 the whole document ---	12,13, 96-102, 123-127
A	the whole document ---	8
X	DATABASE SWISSPROT 'Online! ACC: P02647, 21 July 1986 (1986-07-21) "Apolipoprotein A-I Precursor (APO-AI)" XP002165485 cited in the application abstract ---	12,13, 96-102, 123-127
X	WO 96 33214 A (FOULK RUSSELL ;GENBACEV OLGA (US); CLAUSER KARL R (US); FISHER SUS) 24 October 1996 (1996-10-24) abstract page 31, line 10 - line 34 example 4 ---	12,13, 96-102, 123-127 8
A	abstract page 31, line 10 - line 34 example 4 ---	8
X	DATABASE GENBANK 'Online! ACC: g319918, 22 June 1999 (1999-06-22) "Apolipoprotein H precursor" XP002165486 cited in the application abstract ---	12,13, 96-102, 123-127
	-/--	

7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 00/03143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCNEIL H P ET AL: "ANTI-PHOSPHOLIPID ANTIBODIES ARE DIRECTED AGAINST A COMPLEX ANTIGEN THAT INCLUDES A LIPID-BINDING INHIBITOR OF COAGULATION BETA-2 GLYCOPROTEIN I APOLIPOPROTEIN H" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 87, no. 11, 1990, pages 4120-4124, XP000990799 1990 ISSN: 0027-8424	12, 13, 96-102, 123-127
A	the whole document	8
X	DATABASE SWISSPROT 'Online! ACC: P06396, 1 January 1988 (1988-01-01) "Gelsolin Precursor" XP002165487 cited in the application abstract	12, 13, 96-102, 123-127
X	ASCH H L ET AL: "Widespread loss of gelsolin in breast cancers of humans, mice, and rats." CANCER RESEARCH, (1996 NOV 1) 56 (21) 4841-5. , XP000992730 the whole document	8-13, 96-102, 123-127
X	DONG, Y. ET AL: "Proximal promoter sequences mediate reduced expression of the tumor suppressor gelsolin in human breast cancer cells." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (MARCH, 1999) VOL. 40, PP. 367. MEETING INFO.: 90TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, USA APRIL 10-14, 1999 AMERICAN , XP000992723 the whole document	8-13, 96-102, 123-127
X	MIELNICKI L M ET AL: "Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, (1999 MAY 25) 249 (1) 161-76. , XP000998107 the whole document	8-13, 96-102, 123-127
	-/--	

7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 00/03143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ASCH H L ET AL: "Down-regulation of gelsolin expression in human breast ductal carcinoma in situ with and without invasion." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, (1999 MAY) 55 (2) 179-88. , XP000998257 the whole document ---	8-13, 96-102, 123-127
X	ASCH, H. L. ET AL: "Progressive loss of gelsolin expression in human breast epithelium during the evolution from normal to DCIS to invasive cancer." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (MARCH, 1999) VOL. 40, PP. 607. MEETING INFO.: 90TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, USA APRIL 10-14, 1999 AMERICAN , XP000992724 abstract ---	8-13, 96-102, 123-127
X	PORTER, REBECCA M. (1) ET AL: "Monoclonal antibodies to cytoskeletal proteins: An immunohistochemical investigation of human colon cancer." JOURNAL OF PATHOLOGY, (1993) VOL. 170, NO. 4, PP. 435-440. , XP000998256 abstract ---	8-13, 96-102, 123-127
X	DONG Y ET AL: "Concurrent deregulation of gelsolin and cyclin D1 in the majority of human and rodent breast cancers." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1999 JUN 11) 81 (6) 930-8. , XP000998259 the whole document ---	8-13, 96-102, 123-127
X	DATABASE GENBANK 'Online! ACC/ID: 035510, 1 January 1998 (1998-01-01) "Clusterin" XP002165488 cited in the application abstract ---	12,13, 96-102, 123-127
X	YANG CHIN-RANG ET AL: "Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs)." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 10, 15 May 1999 (1999-05-15), pages 2165-2174, XP000989489 ISSN: 0305-1048 ---	12,13, 96-102, 123-127
A	page 2173, left-hand column, paragraph 4 ---	8
	-/-	

7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 00/03143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; SIMBOLI-CAMPBELL M ET AL: "1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells." retrieved from STN Database accession no. 97060385 XP002165626 abstract & JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, (1996 JUL) 58 (4) 367-76. ,	8,12,13, 96-102, 123-127
A	--- DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; RENNIE P S ET AL: "Relationship between variant forms of estrogen receptor RNA and an apoptosis-related RNA, TRPM-2, with survival in patients with breast cancer." retrieved from STN Database accession no. 94073809 XP002165627 abstract & CANCER, (1993 DEC 15) 72 (12) 3648-54. ,	8,12,13, 96-102, 123-127
A	--- DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; HUOVINEN R ET AL: "Mitotic activity, apoptosis and TRPM-2 mRNA expression in DMBA-induced rat mammary carcinoma treated with anti-estrogen toremifene." retrieved from STN Database accession no. 94011528 XP002165628 abstract & INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1993 OCT 21) 55 (4) 685-91. ,	8,12,13, 96-102, 123-127
E	--- WO 00 55628 A (HARE MICHAEL JOHN O ;OXFORD GLYCOSCIENCES UK LTD (GB); AMESS BOB) 21 September 2000 (2000-09-21) the whole document -----	1-5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 00/03143**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.: -
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 157, 193
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-13, 96-130 (all partially, in so far as BF1, BPI-50, BPI-11, BPI-41, BPI-24, BPI-27, and BPI-9 are concerned), 41-45, 71-75, 158, 192 (fully)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: Claims 1-13, 96-130 (in part), 41-45, 157, 158 (in full)

Method for diagnosis of breast cancer using BF-1 as a marker

2. Claims: Inventions 2-43: Claims 1-40, 46-156, 159-202 (in part)

Method for diagnosis of breast cancer using BF-2, BF-3, ..., BF-48 as a marker (as listed in claim 6)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 103,104,107,110 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 157,193

The initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of the claim may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT). For these reasons, a meaningful search over the whole breadth of the claim is impossible. Consequently, no search could be accomplished for claims 157 and 191.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 00/03143

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746884 A	11-12-1997	US 5914238 A	22-06-1999
		AU 709726 B	02-09-1999
		AU 3154297 A	05-01-1998
		CA 2228301 A	11-12-1997
		EP 0842433 A	20-05-1998
		JP 2000501509 T	08-02-2000
WO 9932625 A	01-07-1999	AU 1935399 A	12-07-1999
		EP 1037989 A	27-09-2000
WO 9835229 A	13-08-1998	AU 5972998 A	26-08-1998
US 4775620 A	04-10-1988	AT 125626 T	15-08-1995
		CA 1336171 A	04-07-1995
		DE 3588043 D	31-08-1995
		DE 3588043 T	21-03-1996
		EP 0167616 A	15-01-1986
		JP 2617289 B	04-06-1997
		JP 8275778 A	22-10-1996
		JP 1047392 A	21-02-1989
		JP 2537539 B	25-09-1996
		JP 1052800 A	28-02-1989
		JP 1955428 C	28-07-1995
		JP 6081760 B	19-10-1994
		JP 2896362 B	31-05-1999
		JP 10123138 A	15-05-1998
		JP 2723203 B	09-03-1998
		JP 61501048 T	22-05-1986
WO 8503132 A	18-07-1985		
US 5188964 A	23-02-1993	AU 7785091 A	11-11-1991
		CA 2079345 A	13-10-1991
		EP 0525115 A	03-02-1993
		WO 9116632 A	31-10-1991
		US 5447843 A	05-09-1995
US 5798266 A	25-08-1998	AU 4085097 A	19-03-1998
		EP 0932699 A	04-08-1999
		JP 2000514564 T	31-10-2000
		WO 9808976 A	05-03-1998
WO 9633214 A	24-10-1996	AU 718493 B	13-04-2000
		AU 5557596 A	07-11-1996
		CA 2218535 A	24-10-1996
		EP 0822940 A	11-02-1998
		JP 11504318 T	20-04-1999
WO 0055628 A	21-09-2000	AU 3177500 A	04-10-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	48/00	C 0 7 K	14/82	4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/00		16/32	4 C 0 8 6
C 0 7 K	14/82	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
	16/32		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 Q	1/02	
	1/21		1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/483	F
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	27/447		33/53	D
	33/15			M
	33/483		33/566	
	33/50		33/574	A
	33/53			Z
			33/577	B
	33/566		37/00	1 0 2
	33/574	C 1 2 N	15/00	A
		G 0 1 N	27/26	3 1 5 H
	33/577			3 1 5 G
	37/00			3 2 5 A
	1 0 2	A 6 1 K	37/02	
		C 1 2 N	5/00	A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA26 AA29 AA40 CA26 DA12
DA13 DA14 DA36 DA78 FB02
FB03 FB05
4B024 AA12 BA36 BA45 CA04 EA04
GA11 HA01 HA14
4B063 QA19 QQ03 QR33 QR55 QR59
QS33 QS34
4B065 AA90X AA93Y AB01 BA02
CA24 CA25 CA46
4C084 AA13 AA30 BA01 ZB26
4C085 AA13 AA14 BB23 BB31 CC21
EE01
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14
ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75
DA86 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	蛋白质，基因及其用于诊断和治疗乳腺癌的用途		
公开(公告)号	JP2003507027A	公开(公告)日	2003-02-25
申请号	JP2001517168	申请日	2000-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	OXFORD GLYCOSCI英国		
申请(专利权)人(译)	牛津科学格力高塞特(英国)有限公司		
[标]发明人	ヘラスヘラスムジャンセラゲアスラチャンドラシリ		
发明人	ヘラス,ヘラス,ムジャンセラゲ,アスラ,チャンドラシリ		
IPC分类号	G01N33/483 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/30 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577 G01N37/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 C07K14/4748 C07K16/3015 G01N33/57415 Y02A90/26		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.H A61K48/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/483.F G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A G01N33/574.Z G01N33/577.B G01N37/00.102 C12N15/00.A G01N27/26.315.H G01N27/26.315.G G01N27/26.325.A A61K37/02 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/CA26 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR33 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA30 4C084/BA01 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB23 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	1999019258 1999-08-13 GB 2000007754 2000-03-30 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于乳腺癌的筛查，诊断和预后，监测乳腺癌治疗的功效以及开发药物的方法和组合物。描述了可通过血清二维电泳检测到的乳腺癌相关特征(BF)。本发明进一步提供了可在脑脊髓液，血清或血浆中检测到的乳腺癌相关蛋白同工型(BPI)，包含分离的BPI的制剂，对BPI具有免疫特异性的抗体以及包含该异构体的试剂盒。这是一回事。

