

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-522601

(P2008-522601A)

(43) 公表日 平成20年7月3日 (2008. 7. 3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 7/06 (2006. 01)	C O 7 K 7/06	4 B O 6 3
C O 7 K 7/08 (2006. 01)	C O 7 K 7/08	4 C O 8 4
C O 7 K 14/47 (2006. 01)	C O 7 K 14/47	4 H O 4 5
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-544832 (P2007-544832)
 (86) (22) 出願日 平成17年12月9日 (2005. 12. 9)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年8月10日 (2007. 8. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/013244
 (87) 国際公開番号 W02006/061242
 (87) 国際公開日 平成18年6月15日 (2006. 6. 15)
 (31) 優先権主張番号 04029171.8
 (32) 優先日 平成16年12月9日 (2004. 12. 9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

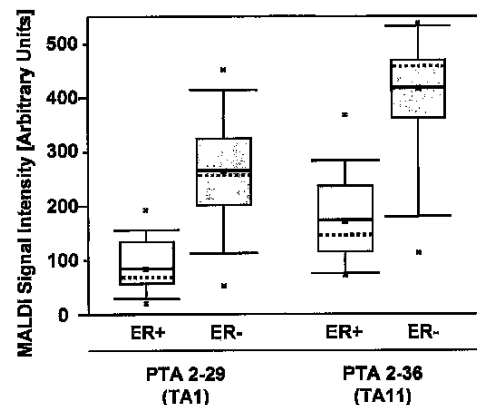
(71) 出願人 507193102
 ディギラブ・バイオヴィズィオン・ゲーエム
 ムベーハー
 ドイツ連邦共和国 3 0 6 2 5 ハノーヴァー,
 フェオドルーリュンネンシュトラ
 セ 5
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌を有する個体の層別化のための P T A ペプチドの使用

(57) 【要約】

本発明は癌を患っている個体の層別化の方法に関する。より詳細には、本発明は、P T A 断片が抗内分泌療法に感受性である癌細胞と前記療法には感受性がない癌細胞の区別を可能にするための発見に関する。それ故、P T A 断片は、免疫組織学によるエストラジオールレセプター検出のための代替であることができ、抗エストラジオール療法に対する癌細胞の耐性をモニターするためのマーカーであることができ、再発をモニターするために使用することができ、及び脱分化の状態、例えば、癌細胞の状態を決定するために使用することができる。P T A 断片は、血清又は血漿のような容易に入手できる患者サンプルから決定されるという利点を有する。本発明はさらに、特異的 P T A ペプチド及び核酸、それらの抗体、試験キット及び診断及び治療法、及び組成物を包含する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌の治療のための個体の層別化についての方法であって、前記癌の癌細胞が抗内分泌療法に感受性であるかどうかを決定するため、

- a) 個体のサンプル中のプロチモシン - アルファ (P T A) 断片の量を決定すること ;
 - b) a) の結果と陰性対照サンプルを使用して決定された結果又はすでに既知の基準値を比較すること ; 及び
 - c) 抗内分泌療法に対する癌細胞の感受性を決定すること ;
- の工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 2】

もし前記癌がエストラジオールレセプターを発現しているなら、前記陰性対照又は前記基準値と比較し、抗内分泌療法に感受性ではない前記癌細胞中で、前記 P T A 断片の前記量が増加している、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記陰性対照又は前記基準値と比較し、抗内分泌療法に感受性ではない前記癌細胞中で、前記 P T A 断片の前記量が、

- a) 前記陰性対照中のレグマインの量と比較して、又はレグマイン基準値と比較して、もし、同時にタンパク質レグマインが正常又は増加した量で存在するならば、増加しており ; 又は
 - b) 前記陰性対照中のレグマインの量と比較して、又はレグマイン基準値と比較して、もし、同時にタンパク質レグマインが不存在であるか、又は減少した量で存在していれば、減少している ;
- 請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記個体が、疾患状態 A、疾患状態 B、疾患状態 C 及び疾患状態 D と称される、異なった疾患状態に分類され、前記疾患が状態 A から、状態 B へ、状態 C へ、状態 D へ悪化し、そして

- a) 疾患状態 A が、前記サンプルがエストラジオールレセプター陽性であり、及び前記 P T A 断片の量が前記 P T A 断片についての基準値より下であることにより特徴付けられ ; 及び
- b) 疾患状態 B が、前記サンプルがエストラジオールレセプター陽性であり、及び前記 P T A 断片の量が前記 P T A 断片についての基準値と等しいか又は上であることにより特徴付けられ ; 及び
- c) 疾患状態 C が、前記サンプルがエストラジオールレセプター陰性であり、及び前記 P T A 断片の量が前記 P T A 断片についての基準値と等しいか又は上であることにより特徴付けられ ; 及び
- d) 疾患状態 D が、前記サンプルがエストラジオールレセプター陰性であり、及び前記 P T A 断片の量が前記 P T A 断片についての基準値より下であることにより特徴付けられる ;

30

請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 5】

抗内分泌療法を前記個体に適用すべきかを決定するための請求項 4 に記載の方法の使用であって、前記個体が疾患状態 A に分類される場合にのみ抗内分泌療法が適用される、前記使用。

【請求項 6】

攻撃的治療計画を必要としている、癌を患っている個体を決定する方法であって、前記個体のサンプル中のレグマインの発現を決定する工程を含んでなり、発現の消失又は陰性対照サンプルと比較して又は基準値と比較して減少した発現が、前記個体が攻撃的治療計画を必要としていることを示す、前記方法。

【請求項 7】

50

抗内分泌療法に感受性ではない癌細胞が、損なわれたステロイドシグナリング経路を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 P T A 断片が、プロテアーゼレグマインの作用により発生することが可能なペプチドである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記癌細胞が、乳癌細胞、結腸癌細胞、中枢神経系癌細胞、前立腺癌細胞及び卵巢癌細胞から成る群より選択される癌細胞である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記サンプルが、全血、血漿、血清、リンパ液、乳頭吸引液、乳汁、尿、組織、特別には腫瘍含有組織、及び大便から成る群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 11】

抗内分泌療法が抗エストラジオール療法である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 P T A 断片が、E L I S A、R I A、ウェスタンブロット、タンパク質チップアクセス、質量分析法、免疫組織学、フローサイトメトリー又は分子生物学的方法から成る群より選択される方法により決定される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

抗内分泌療法に対して減少した感受性又は耐性を獲得した癌細胞を有する個体を同定するため、抗内分泌療法で治療する個体の層別化のための請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法の使用。

20

【請求項 14】

抗エストロゲン、エストロゲン変調物質、アロマターゼ阻害薬、エストラジオールレセプター下方調節剤、タモキシフェン、アリミデックス、ゴセレリン、ファスロデックス、フェメラ、レントロン、アロマシン、ラロキシフェン、アタメスタン、T A S - 108、プロゲンタ、6 - M C D F、P S K 3 6 6 8 及びトレミフェンから成る群より選択される物質で治療する個体の層別化のために、前記物質に対して減少した感受性又は耐性を獲得した癌細胞を有する個体を同定する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法の使用。

30

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法の使用であって、

- a) 個体のサンプル中の内分泌レセプター；及び / 又は
- b) 個体のサンプル中のエストラジオールレセプター；及び / 又は
- c) 個体のサンプル中のプロゲステロンレセプター；及び / 又は
- d) 個体のサンプル中のレグマイン又はレグマイン活性

の決定が加わった、前記使用。

【請求項 16】

ペプチドであって、少なくとも 8 アミノ酸の P T A 断片であり、抗内分泌療法に感受性である乳又は結腸癌細胞で罹患した個体と比較して、抗内分泌療法に対して減少した感受性又は耐性を有する乳又は結腸癌細胞で罹患した個体のサンプル中に増加した量で存在し、但し、前記ペプチドは配列番号 11、12、13 及び 14 からは選択されない、前記ペプチド。

40

【請求項 17】

配列番号 14 の 2 ~ 45 位のアミノ酸配列の断片であり、配列番号 14 の少なくとも 8 の連続的アミノ酸を含んでなり、但し、前記ペプチドが配列番号 11 ~ 14 とは異なっている、請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 18】

前記ペプチドが配列番号 1 ~ 10 に従ったペプチドのいずれか一つである、請求項 16 又は 17 に記載のペプチド。

50

【請求項 19】

請求項 17 又は 18 に記載のペプチドの修飾形であって、アミノ酸位：

- a) 配列番号 14 の 2 位に対応する；N - アセチルセリン残基又はホスホセリン残基、及び / 又は
- b) 配列番号 14 の 8 位に対応する；ホスホスレオニン残基、及び / 又は
- c) 配列番号 14 の 13 位に対応する；ホスホスレオニン残基、及び / 又は
- d) 配列番号 14 の 14 位に対応する；ホスホスレオニン残基又はイソロイシン残基、及び / 又は
- e) 配列番号 14 の 4 位に対応する；ホスホグルタミン酸残基、及び / 又は
- f) 配列番号 14 の 15 位に対応する；グルタミン酸残基、及び / 又は
- g) 配列番号 14 の 18 位に対応する；グルタミン又はアスパラギン残基、及び / 又は
- h) 配列番号 14 の 21 位に対応する；グルタミン酸残基、及び / 又は
- i) 配列番号 14 の 29 位に対応する；セリン残基、及び / 又は
- j) 配列番号 14 の 36 位に対応する；アスパラギン酸又はヒスチジン残基、及び / 又は
- k) 配列番号 14 の 37 位に対応する；アルギニン残基、及び / 又は
- l) 配列番号 14 の 40 位に対応する；グルタミン残基

を有する前記ペプチドの修飾形。

【請求項 20】

請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の P T A 断片のネオエピトープに特異的に結合し、配列番号 11 ~ 14 に記載のペプチドには結合しない抗体、又はそれらの結合特異性を保持している前記抗体の断片。

【請求項 21】

核酸であって：

- a) 請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載のペプチドをコードする核酸配列；
 - b) a) の核酸配列に相補的である核酸配列；
 - c) ストリンジェント条件下、a) 及び b) の核酸にハイブリダイズし、最大で配列番号 14 をコードする核酸配列よりも短い核酸配列、但し、前記核酸配列は配列番号 11、12 又は 13 に記載の T A 1 又は T A 1 1 をコードしていない；
 - d) a) ~ c) のいずれか一つの前記核酸配列に関して縮重している核酸配列；
 - e) a) ~ d) のいずれか一つの核酸配列の誘導体及び / 又は断片、但し、前記核酸配列は配列番号 11、12 又は 13 に記載の T A 1 又は T A 1 1 をコードしていない；
 - f) さらに少なくとも一つの非 P T A 核酸配列を含んでなる、a)、b)、c)、d) 又は e) に記載の核酸配列；
 - g) f) に記載の核酸配列であって、前記少なくとも一つの非 P T A 核酸配列は核酸配列のラベル化のための配列；
- から成る群より選択される核酸。

【請求項 22】

さらにラベルを含んでなり、そのラベルは核酸配列ではない、請求項 21 に記載の核酸。

【請求項 23】

試験キットであって、

- a) 請求項 16 ~ 19 に記載のペプチド；及び / 又は
- b) 抗体又は請求項 20 に記載の前記抗体の断片；及び / 又は
- c) 請求項 21 ~ 22 に記載の核酸；及び

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法について前記試験キットをどのように使用するかの説明書、又は請求項 13 ~ 15 に記載の使用について前記試験キットをどのように使用するかの説明書を含んでなる試験キット。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の試験キットの製造のための、

- a) 請求項 16 ~ 19 に記載のペプチド；及び / 又は

b) 抗体又は請求項 20 に記載の前記抗体の断片；及び / 又は

c) 請求項 21 ~ 22 に記載の核酸；

の使用。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の使用であって、乳癌、結腸癌、中枢神経系癌、前立腺癌及び卵巣癌から成る群より選択される疾患の診断のための試験キットの製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は癌を患っている個体の層別化 (stratification) の方法に関する。より詳細には、本発明は、PTA断片が抗内分泌 (anti-endocrine) 療法に感受性である癌細胞と前記療法には感受性がない癌細胞の区別を可能にするための発見に関する。それ故、PTA断片は、免疫組織学によるエストラジオールレセプター検出のための代替であることができ、抗エストラジオール療法に対する癌細胞の耐性をモニターするためのマーカーであることができ、再発をモニターするために使用することができ、及び脱分化の状態、例えば、癌細胞の状態を決定するために使用することができる。PTA断片は、血清又は血漿のような容易に入手できる患者サンプルから決定されるという利点を有する。本発明はさらに、特異的PTAペプチド及び核酸、それらの抗体、試験キット及び診断及び治療法、及び組成物を包含する。

10

【0002】

20

背景技術

癌の早期及び正確な診断は癌の有効な療法を成功させるために非常に重要である。加えて、例えば、癌の段階、癌のタイプなどに関する層別化を行うことを可能にする、癌細胞の正確な表現形を特徴付けることは極めて重要である。癌の特定のケースのすべてのこれらの特性は、その患者の療法についての最適な戦略を選択するために重要である。例えば、乳癌のケースにおいて、乳癌細胞がエストラジオールレセプターに陽性であるかどうかは通常決定される。このことは正しい療法を選択するためには、非常に重要である。エストラジオールは細胞増殖の重要なメディエーターであり、結果的にエストラジオールはエストラジオールレセプター陽性腫瘍細胞の増殖を促進する。それ故、エストラジオールレセプター陽性癌細胞は通常、いわゆる抗体液性又は抗内分泌又は抗エストラジオール療法で治療される。この療法は、例えばエストラジオールレセプターに結合するがそれを活性化しないエストラジオールの類似体でエストラジオールレセプターを阻止することにより、エストラジオールシグナリング経路を標的とする。この目的のために使用される最も普通の医薬品はタモキシフェンである。タモキシフェンはエストラジオールレセプター陽性癌細胞、特にエストラジオールレセプター陽性乳癌細胞の治療のみに有益であり、エストラジオールレセプター陰性癌細胞には有益ではない。

30

【0003】

エストラジオールレセプターシグナリング経路は、中でも、PTA、PTアルファ、PT α 、ProT、ProTアルファ、ProT α 又はPTMAとして文献でも知られているプロチモシン - アルファと称されるタンパク質を含む。PTAは、110アミノ酸の配列長及び約10 ~ 12ダルトンの分子量を有する細胞内タンパク質である。中でも、PTAはクロマチンリモデリングに関与しており、REA (エストラジオールレセプター活性化因子の抑制因子) に結合する。REAへのPTAの結合はエストラジオールレセプター仲介遺伝子転写を増強する (Mol Cell Biol. 2000, 17:6224-32)。少数のPTA - 断片、即ち、チモシン1 (TA1、T α ₁、THNアルファ1) と称されるPTA2 - 29及びチモシン11 (TA11、T α ₁₁) と称されるPTA2 - 36が知られている。対応するPTA30 - 110及びPTA37 - 110断片はインビトロでのみ検出されているが、インビボでは検出されていない (J Bio Chem, 2003, 278:13286-93)。この特許出願で述べられているすべてのアミノ酸番号は、PTAの成熟の間に除去されるN - 末端メチオニンから始まっている。しばしば文献においてPTAアミノ酸の計数はメチオニンから始

40

50

まっではおらず、プロセスされた P T A の最初のアミノ酸である二番目のアミノ酸から始まっている。T A 1 は Goldstein et al. (Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1977, 74:725-729) により 1977 年にすでに同定されている。P T A の N 末端セリンは、インビボでリン酸化されていてよい (Biochemistry, 1993, 32:4587-96)。P T A 又は T A 1 は乳癌を含む多様なタイプの癌を患ったヒトにおいてその濃度が変化していることが示されている (Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1993, 90:9504-7, Eur J Cardiothorac Surg, 1997, 12:885-91, Br J Cancer, 1997, 76:1199-209)。臨床的研究は、T A 1 がメラノーマ及び結腸直腸癌患者において特定の免疫細胞の抗腫瘍活性を増加できることを示している (Int J Immunopharmacol, 1997, 19:493-500)。

【0004】

レグマインは遺伝子発現プロフィリング及び腫瘍組織アレー分析から最近発見されたアスパラギニルエンドペプチダーゼである。Liu et al. は原発性ヒト固形腫瘍の種々のタイプを分析し、分析された乳癌腫、結腸癌腫、前立腺癌腫、卵巣癌腫及び中枢神経系腫瘍の 75 ~ 100 % において、及び肺癌腫、リンパ腫及びメラノーマの少なくとも 40 % においてレグマインを検出した (Cancer Res., 2003, 63:2957-2864)。P T A はレグマインによりプロセスされ、T A 1 又は T A 1 1 を生じる (J Biol Chem, 2003, 278:13286-93)。レグマインは特定のアスパラギニル結合に対して高い蛋白分解性特異性を有する。好ましくは、アラニン又はプロリンがアスパラギンに関して P 3 位に、グリシンが P 1' 位に存在する (P 3 = N 末端側に 3 アミノ酸、P 1' = C 末端側に 1 アミノ酸、アスパラギンに対して)。レグマインの共通認識部位は A l a / P r o - X a a - X a a - A s n - G I y (配列番号 15) であり、切断が A s n と G I y の間で起こる。Wang et al. は L O H 1 4 q 3 2 . 1 と名付けた「ヘテロ接合性の喪失」(L O H) を同定し、それは中でも乳癌サンプル中に検出された (Cancer Res, 2004, 64 :64-71)。L O H 1 4 q 3 2 . 1 は染色体 1 4 の 3 2 . 1 領域中に位置している。中でもこの領域はレグマインをコードしている。それ故、L O H 1 4 q 3 2 . 1 はレグマインをコードしている遺伝子情報の欠失を表している。

【0005】

技術分野

本発明は、個体における癌、特に、癌細胞、特に乳癌及び結腸癌細胞内に、損なわれたステロイド又はエストラジオールシグナリング経路を有するタイプの癌の層別化、診断及び療法の分野である。本発明はプロチモシンアルファ (P T A) ペプチド (P T A 断片) 及び核酸を提供する。さらに、本発明は、特定のタイプの癌細胞の存在又は不存在を決定するためのバイオマーカーとして P T A、P T A 断片及び P T A 核酸を使用する方法、最も成功すると思われる抗癌療法のタイプを決定するための方法、及び療法の成功をモニターする、ならびに抗内分泌療法、好ましくは抗エストラジオール療法に対する癌細胞の減少した感受性又は耐性を決定するための方法に関する。さらに、本発明は、癌マーカー又はバイオマーカーの検出のための試験キット、及び P T A ペプチド及び核酸を含んでなる医薬製剤に関する。

【0006】

発明の概要

本発明の一つの側面は、癌の治療のために個体の層別化についての方法を提供し、前記癌の癌細胞が抗内分泌療法に感受性であるのかどうかを決定するため、前記方法は：

- a) 個体のサンプル中のプロチモシン - アルファ (P T A) 断片の量を決定すること；
 - b) a) の結果と陰性対照サンプルを使用して決定された結果又はすでに既知の基準値を比較すること；及び
 - c) 抗内分泌療法に対する癌細胞の感受性を決定すること；
- の工程を含んでなる。

【0007】

本発明のさらなる側面において、好ましくは、損なわれた又は妨げられた、又は完全には機能的ではない又は機能的でないステロイドシグナリング経路の結果として、陰性対照

10

20

30

40

50

と比較して又は基準値と比較して、抗内分泌療法に対して感受性ではない癌細胞ではPTA断片の量が変化している。さらに、抗内分泌療法に対して感受性ではない癌細胞において変化したPTA断片は、プロテアーゼレグマインの作用により発生されることが可能である。好ましくは、層別化に適した癌細胞は、乳癌細胞、結腸癌細胞、中枢神経系癌細胞、前立腺癌細胞及び卵巢癌細胞から成る群より選択される細胞であり、そして好ましくは、本発明に従って使用されるサンプルは、全血、血漿、リンパ液、乳頭吸引液、乳汁、尿及び大便から成る群より選択される。本発明の好ましい態様において、PTA断片の量は、損なわれたエストラジオールシグナリング経路を有する癌細胞中で変化している。好ましくは、前記PTA断片は、ELISA、RIA、ウェスタンブロット、タンパク質チップアッセイ、質量分析法、免疫組織学、フローサイトメトリー又は生体分子測定法から成る群より選択される方法により決定される。

10

【0008】

本発明の別の側面は、抗内分泌療法で治療する個体の層別化のために、前記療法への減少した感受性又は耐性を獲得した癌細胞を有する個体、好ましくは抗エストロゲン、エストロゲン変調物質、アロマターゼ阻害薬、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、エキセメスタン、レトロゾール及びアナストロゾールから成る群より選択される物質で治療する個体を同定する、本発明の方法の使用である。好ましくは、前記層別化は、内分泌レセプター、特にエストラジオールレセプター及び/又はプロゲステロンレセプターを決定することと組み合わせて、又は加えて行われる。

20

【0009】

本発明の別の側面は、PTA断片及び/又はそれらの多形形態であるペプチドであり、前記ペプチドは、損なわれたステロイドシグナリング経路を有しない癌細胞により罹患している個体と比較して、損なわれたステロイドシグナリング経路を有する癌細胞により罹患している個体のサンプル中では変化した量で存在し、但し、前記ペプチドはTA1又はTA11(配列番号11又は12)ではない。さらに、配列番号1~10に従った配列を有するペプチド、ならびにそれらの多形形態は、本発明の別の側面である。

30

【0010】

本発明のさらなる側面は、配列番号1~10のペプチドのネオエピトープ(neoepitope)へ特異的に結合するが、配列番号11~14(TA1、TA11、N-末端Metを有しないPTA、PTA)のペプチドには結合しない結合剤、好ましくは、抗体又はそれらの誘導体である結合剤である。

40

【0011】

本発明のさらに別の側面は、ペプチドをコードする核酸であり、前記ペプチドはPTA断片及び/又はそれらの多形形態であり、前記ペプチドは抗内分泌療法に感受性である癌細胞により罹患している個体と比較して、減少した内分泌療法に対する感受性又は耐性を有している癌細胞により罹患している個体のサンプル中に変化した量で存在し、但し、前記ペプチドは配列番号11~13(TA1、TA11、N-末端Metを有しないPTA)及びそれらの相補的核酸ではない。さらに本発明は、ストリンジェント条件下でこれらの核酸配列にハイブリダイズし、及び最大で配列番号13をコードする核酸配列よりも短い核酸配列長を有する核酸配列を含み、但し、前記核酸配列はTA1又はTA11(配列番号11又は12)をコードしていない。さらに本発明は前記核酸配列の縮重された核酸配列及び誘導体、及び/又は前記核酸配列の断片を含む。加えて、本発明に従った核酸配列は追加の核酸配列を含んでなることができ、前記追加の核酸配列は非PTA核酸配列であり、ここで非PTA核酸配列は好ましくは、前記核酸配列のラベル化のための配列である。

50

【0012】

本発明のさらなる側面は、少なくとも一つのラベルを含んでなる、本発明に従った核酸であって、ここで前記ラベルは核酸配列ではない。

本発明のさらなる側面は、本発明の核酸配列を含んでなるベクターである。

【0013】

50

さらに、本発明は、本発明の核酸配列又はベクターを含んでなる宿主細胞を含んでなる

。

本発明の別の態様は試験キットであって、

a) P T A 断片及び / 又はそれらの多形形態であるペプチドであり、前記ペプチドは、抗内分泌療法に感受性である癌細胞により罹患している個体と比較して、減少した内分泌療法に対する感受性又は耐性を有している癌細胞により罹患している個体のサンプル中に、変化した量で存在し、但し、前記ペプチドは配列番号 1 1 ~ 1 3 (T A 1、T A 1 1、N - 末端 M e t を有しない P T A) ではなく、好ましくは、配列番号 1 ~ 1 0 に従った配列を有するペプチド及び / 又は前記ペプチドの多形形態である ; 及び / 又は

b) 配列番号 1 ~ 1 0 に従ったペプチドのネオエピトープへ特異的に結合するが、配列番号 1 1 ~ 1 4 (T A 1、T A 1 1、N - 末端 M e t を有しない P T A、P T A) に従ったペプチドには結合しない結合剤、好ましくは、抗体又は断片、又は前記抗体の誘導体である結合剤 ; 及び / 又は

c) a) に従ったペプチドをコードする核酸配列、それらの相補的核酸配列、最大で配列番号 1 3 をコードする核酸配列よりも短い核酸配列長を有する a) に従った核酸にストリンジント条件下でハイブリダイズする核酸配列、但し、前記核酸配列は配列番号 1 1 又は 1 2 に従った T A 1 又は T A 1 1 をコードしていない ; 及び / 又は

d) c) の前記核酸配列及び誘導体及び / 又はそれらの断片に関して縮重されている核酸配列、但し、前記核酸配列は配列番号 1 1 又は 1 2 に従った T A 1 又は T A 1 1 をコードしていない ; 及び / 又は

e) さらに少なくとも一つの非 P T 核酸配列を含んでなる c) 又は d) に従った核酸、ここで前記少なくとも一つの非 P T 核酸配列は、好ましくは、核酸配列の標識化のための配列である ; 及び / 又は

f) さらにラベルを含んでなる、c)、d) 又は e) に従った核酸配列、前記ラベルは核酸配列ではない ; 及び / 又は

g) c)、d)、e) 又は f) に従った核酸配列を含んでなるベクター、及び / 又は

h) c)、d)、e) 又は f) に従った核酸、又は g) に従ったベクターを含んでなる宿主細胞 ; 及び

障害の存在、不存在、再発の予後を決定するために、どのように試験キットを使用するか

の説明書 ;

を含んでなる。

【 0 0 1 4 】

本発明のさらなる側面は、上記試験キットの a) ~ h) に従ったペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞のいずれか一つを含んでなる医薬製剤、又は本発明に従った試験キット又は医薬製剤の製造のための上記試験キットの a) ~ h) に従ったペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞のいずれか一つの使用である。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の側面は、

a) 上記試験キットの a) ~ h) に従ったペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞のいずれか一つ ; 及び / 又は

b) P T A 又は断片及び / 又はそれらの多形形態であるペプチド ; 及び / 又は

c) 加えて、少なくとも一つの非 P T A アミノ酸を含んでなる、b) に従ったペプチド ; 及び / 又は

d) P T A に特異的な、又は断片及び / 又はそれらの多形形態に特異的な結合剤 ; 及び / 又は

e) P T A 及び / 又は断片及び / 又はそれらの多形形態をコードする核酸 ; 及び / 又は前記核酸に相補的であるか、又は前記核酸にストリンジント条件下でハイブリダイズする核酸配列 ; 及び / 又は

f) 加えて、少なくとも一つの非 P T A ヌクレオチドを含んでなる、e) に従った核酸 ; 及び

10

20

30

40

50

本発明に従った方法又は使用のため、前記キットをどのように使用するのかの説明書；
を含んでなる、試験キットである。

【0016】

本発明のさらなる側面は、前の章のa)～h)に従ったペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞のいずれか一つを含んでなる、乳癌、結腸癌、中枢神経系癌、前立腺癌及び卵巢癌から成る群より選択される疾患の治療及び／又は予防及び／又は診断のための医薬組成物である。加えて、本発明は、乳癌、結腸癌、中枢神経系癌、前立腺癌及び卵巢癌から成る群より選択される疾患の治療及び／又は予防及び／又は診断のための試験キット及び／又は医薬組成物の製造のための、前の章のa)～h)に従ったペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞のいずれか一つの使用を含んでなる。

10

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、癌を有する個体の層別化のためのプロチモシナルファ（PTA）の特定の断片の使用、即ち、損なわれたステロイド、特にエストラジオール又はプロゲステロンシグナリング経路を有する患者癌細胞が存在するかどうかを決定することに関する。より特定のには、本発明は、癌細胞がER陽性であり及びERシグナリングにおいて機能的であること（図12、状態A）、又は癌細胞がER陰性であること、又はER陽性であるが非機能的ERシグナリングを有すること（図12、状態B、C又はD）を決定することを可能にする。PTA及びいくつかの特有のPTA断片（TA1、TA11）は癌に関連して記載されているが、PTA断片が、ステロイドシグナリング損傷癌細胞を、完全に機能的なステロイドシグナリング、特にエストラジオール又はプロゲステロンシグナリングを有する癌細胞から区別するための癌マーカーとして提案されたことはない。また、免疫組織学による、癌組織におけるステロイドレセプター、特にエストラジオールレセプター又はプロゲステロンレセプター検出を診断するための代替法としての又は診断することに加えて、PTA断片を使用することが提案されたこともない。エストラジオールはPTAの発現を刺激するので（Endocrinology, 2001, 142:3493-501）、エストラジオールは、機能的エストラジオールシグナリング経路を有する細胞において、PTA断片の増加を生じることが期待できる。驚くことに、我々は、損なわれたエストラジオールシグナリングを有する癌細胞を含んでなる組織サンプル中、及び損なわれたエストラジオールシグナリングを有する癌細胞を含んでなる腫瘍を患った個体の血漿中に、PTA断片が増加した量で存在する（図2）ことを発見した。

20

30

【0018】

理論に縛られるわけではないが、もし特定の癌細胞中のステロイドシグナリング経路が損なわれ、不全であり、又は健康な細胞と同様に働いていなければ、変化した、特に増加した量のPTA断片がこれらの細胞中にのみ存在することが推定される（図12、状態B及びC）。しかしながら、癌の後期段階において、又は高度に脱分化した癌細胞において（図12、状態D）、癌細胞の脱分化の結果として（LOH14q32.1、例えば、レグマイン遺伝子の欠損）、多分プロテアーゼ活性（例えば、レグマイン活性）の減少又は欠乏により、PTA断片は減少する、又は失われていてもよい。図12は、ERの発現についての発明者の理論、PTA断片及びレグマイン、及びこれらのマーカーの相関を、癌の異なった状態又は段階及び適切な療法とともに図示している。

40

【0019】

特に乳癌及び結腸直腸癌において、癌細胞が機能的又は損なわれていないステロイドシグナリング、特にエストラジオールシグナリング経路を有するかどうかを知ることは重要である。これらのタイプの癌において、少なくとも一部はステロイド又はエストラジオール仲介細胞増殖シグナルの結果として、非常にしばしば癌細胞が増殖する。もしこうした経路が治療されるべき癌細胞中で機能的であれば、これらの細胞増殖経路の一つを阻止することを試みる療法のみが成功することが可能である。結果的に、抗内分泌、抗ステロイド又は抗エストラジオールで治療されるべき腫瘍細胞中に、シグナリング経路が存在することを確かめることが非常に重要である。一般に、もし癌組織サンプルの免疫組織学的分

50

析がエストラジオールレセプターの存在を明らかにしたら、例えば、機能的エストラジオール経路の存在が提案される。この手順は、本発明が克服したいいくつかの欠点を有する。例えば、免疫組織学的検査は、試験者の主観的所見、ルーチン及び熟練に依存し、加えて、異なった試験者間及び異なった実験室間で直接比較できない。対照的に、P T Aの断片のようなペプチドを測定することは、所見スコアに変換する必要がなく、それ故より客観的である特異的値を提供する。さらに免疫組織学は、サンプルが採られた正確及び正しい位置にある程度いつも依存し、加えて、視覚検査のために染色されたサンプルの非常に小さな切片に依存する。対照的に、組織抽出物からペプチドを測定することは、全組織サンプルを使用することができ、それ故、全サンプルを代表するある種の平均ペプチドシグナルを与える。特に、もし局所腫瘍組織ではなく、全血、血漿、血漿、リンパ液その他のようなより全身的サンプルがP T A断片を決定するために使用されるなら、結果は腫瘍の正確な位置にはさらに依存しない。加えて、手術後又は化学、放射線又は他の療法間又は後の、非常に小さな腫瘍、残存腫瘍又は転移は、場所を特定するのが困難であり、それ故、少しの腫瘍組織サンプルを得ることも困難であろう。

10

【0020】

加えて、特許請求された方法は、抗内分泌療法の有効性を、例えば毎日モニタリングすることを可能にする。特に、本発明に従った方法は、血液サンプルのような容易に利用できるサンプルを使用して、有効性をモニターすることを可能にする。加えて、本発明に従った方法による層別化は、療法計画に対して減少した感受性又は耐性を発生する、抗内分泌療法をうけている個体の早期決定を可能にする。

20

【0021】

本発明の方法は、癌疾患の状態に関して、例えば、どの程度癌細胞がすでに脱分化しているかについて患者を分類することも可能にする。状態（状態A、B、C及びD、図12）は、組み合わせられたエストラジオールレセプターの存在又は不存在の決定により、及びP T A断片の決定により、及び場合によりレグマインの不存在又は存在を決定することにより、決定することができる；

状態A：エストラジオールレセプターの存在、P T A断片がないか又は減少したP T A断片量；

状態B：エストラジオールレセプターの存在、P T A断片の存在又は増加したP T A断片量；

30

状態C：ないか又は減少したエストラジオールレセプター、P T A断片の存在又は増加したP T A断片量；

状態D：ないか又は減少したエストラジオールレセプター、P T A断片がないか又は減少したP T A断片量。

癌細胞の脱分化は通常、疾患の進行の間に起こり、癌細胞は、胚性又は幹細胞からそれらを分化させる特定の表現型を連続的に失うにつれて、胚性又は幹細胞の方向に連続的に発達する。胚性又は幹細胞は無限の様式で増殖する能力を有する。結果的に、より脱分化した癌細胞は、療法の間に根絶することがより困難になり、及び増殖に関して、転移に関してより活動的になり、化学療法又は放射線療法のような療法戦略に対する耐性をより容易に得、及び最初の療法が成功した後により再発しやすくなる。結果的に、患者の予後は、癌細胞の脱分化が増加するにつれて連続的に悪化し、それ故療法は、患者の治癒の可能性を保つためにより攻撃的であることを必要とする。しかしながら、このことは療法の有害な副作用を増加させる結果となる。これらの理由のため、患者の治癒の十分な可能性と療法に付随する有害な副作用の合理的程度間のバランスを有するように、療法がどの程度の攻撃性であるべきかを決定するため、癌細胞の状態を知ることが重要である。

40

【0022】

本発明に従った方法の別の側面は、癌の再発をモニターすることに関する。それ故、容易に得ることが可能であるサンプルを使用し、初期の段階で個体中の癌細胞の再発を決定することが可能である。

【0023】

50

さらに、例えば、血液、血漿、及び血漿又は尿サンプルを得ることは、医師の特別の技術を必要とせず、看護師のようなより専門的でない医療関係者により行うことが可能である。

【0024】

本発明に従って使用されるサンプルは、組織又は体液のような、個体から誘導されるいずれのサンプルであってもよい。例えば、サンプルは全血、血液細胞（白血球、B細胞、T細胞、単球、マクロファージ、赤血球及び紡錘細胞のような）、血清、血漿、血液濾過液、乳頭吸引液、尿、リンパ液、リンパ節組織、大便、脳脊髄液、結腸又は直腸からの組織又は他の組織及び器官からの組織、腫瘍組織、ならびにそれらの組み合わせであることができる。

10

【0025】

診断標準としてのペプチドの測定は、結果の分析にロボット及びコンピューターシステムを使用し、ELISA、RIAその他のような標準技術の使用により自動化することが可能であるので、免疫組織学検査と比較して通常より容易であり、安価で、誤差が少なく、及びより少ない操作者の処理しか必要としない。

【0026】

免疫組織学による腫瘍組織サンプル中のエストラジオールレセプターの検出は、抗エストラジオール療法を使用すべきかどうかを決定するための現在の判断基準である。しかしながら、かなりの数のエストラジオールレセプター陽性腫瘍は抗エストラジオール療法に感受性ではない。このことについての一つのもっともらしい理由は、エストラジオールレセプターは存在するけれども、不全なエストラジオール経路又は不全なエストラジオールレセプターであるためであろう（図12、状態B）。この場合、エストラジオールレセプターの存在は、エストラジオール仲介細胞増殖には十分ではなく、それ故、腫瘍増殖の理由ではありえない。結果として、状態B（そして状態C及びDでも）の患者において抗エストラジオール療法はうまくいかない。本発明の新規方法は、タンパク質、即ち、プロチモシンアルファ（PTA）に由来するペプチド断片を検出するので、この問題を回避する。PTAはエストラジオール経路、そして多分他のステロイドシグナリング経路にも関与する。特に、PTAは、エストラジオールレセプターそれ自身と比較して、エストラジオールのシグナル伝達カスケードのより後の工程で関与する。加えて、PTAは、細胞増殖の調節に関与する他のシグナリング経路にも関与することができ、単にエストラジオールレセプターの存在の代わりにPTA断片を決定することの別の利点であろう。

20

30

【0027】

さらに、特定のPTA断片を発生するプロテアーゼ、レグマインは、それ自身、抗内分泌療法から恩恵を受けるであろう患者の及び抗内分泌療法から恩恵を受けないであろう患者の、患者のサブグループへの層別化のためのマーカーとして適している。同様のことが、レグマインの断片及び多形形態について当てはめることができる。特に癌の非常に後期の段階、例えば、図12の状態Dは、レグマイン又はレグマイン活性の消失により又は減少した量により、又はLOH 14q32.1 (Cancer Res, 2004, 64:64-71)のようなレグマインをコードする遺伝子情報の消失により決定することができる。レグマインはヒト染色体14の32.1位（14q32.1）に位置している；Ensembl database, version 35, Nov. 2005, European Bioinformatics Institute (EBI), Heidelberg, Germany 及び the Sanger Institute, Hinxton, Great Britain; http://nov2005.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/contigview?gene=ENSG00000100600 を参照されたい。

40

【0028】

PTA又はPTA断片の量、基準値及び陰性対照サンプル

本発明に従った用語「量」とは、物質の存在又は不存在、又は決定された物質の定量的又は半定量的濃度又は含量を意味する。物質の「不存在」は一般に、物質の量を決定するために使用された方法の感度に依存する。もし物質の量が基準値と、又は陰性対照サンプルを使用して決定された値と比較された場合、好ましくは、両方の値間の量における相違は、1.5倍以上、好ましくは2倍以上、好ましくは3倍以上、好ましくは5倍以上、好

50

ましくは10倍以上、好ましくは20倍以上、好ましくは30倍以上、好ましくは60倍以上、好ましくは100倍以上の、両方のデータ間の値における相違を表すことと定義される。

【0029】

本発明に従った基準値、例えば、乳癌患者におけるPTA2-29の濃度についての特定の基準値は経験的に決定することができる。この目的のためには、PTA2-29の濃度を、癌細胞中のエストラジオールレセプターの存在又は不存在が既知である乳癌患者からの一連のサンプル中で測定することが可能である。これらの経験的データを使用し、PTA-29の濃度についてのカットオフ値を決定することができ、それはエストラジオールレセプター陰性乳癌患者サンプルからエストラジオールレセプター陽性を区別することを可能にする。引き続いての未知の患者サンプルの測定において、これらの未知の患者がエストラジオールレセプター陽性又はエストラジオールレセプター陰性乳癌を患っているかどうかを決定するために、このカットオフ値を使用することが可能である。さらに、エストラジオールレセプターの存在又は不存在の決定及びPTA断片の決定の組み合わせを、図12に示されているように、前記未知の患者サンプルに存在する癌細胞の異なった状態を決定するために使用することができる。

10

【0030】

基準値を作る別の手段は、PTA、即ち、配列番号13又は14に従った完全PTA分子の量であることができる。例えば、PTAに対するPTA断片の比が計算され、健康な個体に存在する比に対応する閾値より上では、比は本明細書で記載した癌細胞状態B及びCの指標である。

20

【0031】

例えば、もし乳癌サンプルに由来する未知の患者サンプルがエストラジオールレセプター陽性又は陰性であるかどうかを決定することが意図されたとすると、エストラジオールレセプター陽性乳癌サンプルに由来する別の患者サンプルを使用することが可能であり、PTA2-29について測定された両方の値を比較する。エストラジオールレセプター陰性サンプルと比較して、エストラジオールレセプター陽性乳癌サンプルがより少ないPTA2-29しか含んでおらず、未知サンプル中のPTA2-29について測定された値が、陰性対照サンプルとして使用されたエストラジオールレセプター陽性サンプル中の値よりも高いならば、未知のサンプルはエストラジオールレセプター陰性サンプルである。乳癌を有していない個体、又は一般にエストラジオールとは無関係に増殖する癌のタイプを患っている個体からのサンプル、又は非悪性疾患の患者からのサンプルなどを陰性対照として使用することも可能である。一般に、これらのサンプルが、改変されたエストラジオール経路を有する細胞を含有していない、又はそのような細胞を有する個体に由来しないことが明白である限り、多様な種類の陰性対照サンプルを使用することができる。

30

【0032】

ペプチド、タンパク質及びPTA

用語「ペプチド」とは、2又はそれ以上、好ましくは、3又はそれ以上、4又はそれ以上、6又はそれ以上、8又はそれ以上、10又はそれ以上、13又はそれ以上、16又はそれ以上、好ましくは21又はそれ以上のペプチド結合により共有結合で連結されたアミノ酸を含んでなる化合物を指す。大きなペプチドは普通、タンパク質と称されるが、一般にペプチドとタンパク質は同義語である。PTAの完全アミノ酸配列は、もしPTAのようなタンパク質の名前が、例えば、PTAペプチドではなくPTA又はPTA断片ではなくPTAのように、語ペプチド又は断片の付加なく本明細書で使用されるならば、天然に観察されるものを意味する。PTA断片はPTAペプチドの同義語である。PTAは、N末端メチオニンが除去される前の又は除去された後の完全アミノ酸配列を表す、例えば、配列番号13及び14。好ましくは、ペプチド及び/又はタンパク質及び/又はPTA断片は、少なくとも30%、好ましくは40%、好ましくは50%、好ましくは60%、好ましくは70%、好ましくは75%、好ましくは80%、好ましくは85%、好ましくは90%、好ましくは95%、好ましくは97%、好ましくは99%、好ましくは99

40

50

%以上の純度で精製されている。本発明のペプチド及び/又はタンパク質は、ペプチド及び/又はタンパク質の誘導体及び/又は多形形態、例えば、特定のペプチド又はタンパク質の非グリコシル化形態及び前記ペプチド又はタンパク質の一つ又はいくつかの異なってグリコシル化された形態のような類似のペプチド及び/又はタンパク質の混合物を含んでなることができる。グリコシル化、リン酸化などのような特定の修飾は、天然のように必ずしもすべての分子がこれらの修飾を受けず、又はいくつかの修飾は一部にのみ起こるように、又は可逆的であるか又は特定のペプチド又はタンパク質の異なった誘導体間に平衡が存在するように、そうでなければ均質なペプチド又はタンパク質サンプルのすべての分子中には存在しないことが普通である。

【0033】

本発明に従った用語「ペプチド」及び「タンパク質」は、アミノ酸のみを含んでなる化合物、ならびに炭水化物、脂質、リン基又は他の部分のような非アミノ酸構成物も含んでなる化合物を含み、及びペプチド結合のみを含んでなる化合物及び他の結合、例えば、エステル、チオエステル又はジスルフィド結合も含んでなる化合物を含む。例えば、PTAが最もN末端のセリンでリン酸化可能であること、及び前記N末端セリンがしばしば追加のアセチル基を含んでなることは、当該技術分野で公知である。それ故、天然に存在するPTAのN末端は、セリン、ホスホセリン、アセチルセリン、アセチルホスホセリンであり得る。

【0034】

用語「非PTAアミノ酸又は非PTAアミノ酸配列」は、天然に生じる多様なPTA配列のいずれにもそこには存在しない、PTAのN又はC末端に付加されたいずれかのアミノ酸を意味し、そのいくつかを図9に示されている。

【0035】

ペプチドの修飾

本発明に従ったペプチド又はタンパク質の修飾は、翻訳後修飾、化学修飾、酵素的修飾による修飾及び他の機構による修飾を含んでなることができる。可能な修飾の例には、限定されるわけではないが：グリコシル化、リン酸化、スルファチル化、ピログルタミン酸修飾、システイン-ジスルフィド架橋、チオエステル架橋、メチル化、アセチル化、アシル化、ファメシル化、ホルミル化、ゲラニルゲラニル化、ビオチン化、ステアロイル化、パルミチル化、リポ化、C-マンノシル化、ミリスチル化、アミド化、脱アミド化、メチル化、脱メチル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、ヨード化、酸化、ペグ化、プレニル化、ADP-リボシル化、脂質、ホスファチジルイノシトール、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)-アンカー、リン酸ピリドキサールの付加、カルボキシアミドメチルシステインを生じる、カルボキシメチルシステインを生じる、又はピリジルエチルシステインを生じるシステイン残基の修飾、リボン酸を生じるリジン残基の修飾、ピログルタミン酸を生じるグルタミン酸の修飾などが含まれる。

【0036】

本発明に従ったペプチド又はタンパク質の修飾は、通常ではないアミノ酸、化学的又は酵素的に修飾されたアミノ酸などを含んでなることができ、限定されるわけではないが：アルファアミノ酪酸、ベータアミノ酪酸、ベータアミノイソ酪酸、ベータアラニン、ガンマ酪酸、アルファアミノアジピン酸、4-アミノ安息香酸、アミノエチルシステイン、アルファアミノペニシラン酸、アリシン、4-カルボキシグルタミン酸、シスタチオニン、カルボキシグルタミン酸、カルボキシアミドメチルシステイン、カルボキシメチルシステイン、システイン酸、シトルリン、デヒドロアラニン、ジアミノ酪酸、デヒドロアミノ-2-酪酸、エチオニン、グリシン-プロリンジペプチド、4-ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリン、ホモセリン、ホモシステイン、ヒスタミン、イソバリン、リジノアラニン、ランチオニン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、2-ピピリジン-カルボン酸、ピログルタミン酸、ピロリジン、プロリン-ヒドロキシプロリンジペプチド、サルコシン、4-セレノシステイン、シンデシン、チオプロリンなどが含まれる。さらなる例は、ABRFのウェブサイトで検索可能な「Delta Mass」

10

20

30

40

50

データベース、「Association of Biomolecular Resource Facilities」:<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home?AvgMass=all>、で見ることが可能である。さらに、ペプチドはペプチド模倣構造を含んでなる、又はペプチド模倣構造であることができる。

【0037】

好ましくは、本発明に従ったPTA-断片は以下の修飾を含んでなることができる：

- ・PTAアミノ酸配列の2位に：セリンの代わりにN-アセチルセリン又はホスホセリン；
- ・PTAアミノ酸配列の8位に：スレオニンの代わりにホスホスレオニン；
- ・PTAアミノ酸配列の13位に：スレオニンの代わりにホスホスレオニン；
- ・PTAアミノ酸配列の14位に：スレオニンの代わりにホスホスレオニン。

10

【0038】

ペプチドの断片及び多形形態

ペプチド又はタンパク質の多形形態はアミノ酸配列中の相違により特徴付けられる。

ペプチド及び/又はタンパク質の多形形態は、天然に存在する突然変異（図9参照）による、又は分子生物学、遺伝学又は化学（核酸又はペプチド合成）のような技術を使用した配列の実験的又はランダム操作により起こされた突然変異による、配列の変異を意味する。さらにペプチド及び/又はタンパク質の多形形態は、配列アラインメントにより決定された、好ましくは70%配列同一性、好ましくは75%、好ましくは80%、好ましくは85%、好ましくは90%、好ましくは95%、好ましくは97%、及び好ましくは99%のお互いの配列同一性を有する。アミノ酸残基が、もし二つの配列の配列アラインメント内において、アミノ酸が同一位置に置かれていたら、このアミノ酸残基はこれら二つの配列内で同一と見なされる。例えば、もし第一の仮定配列「ACDEFGHIKL」及び欠失された「G」を有する第二の仮定配列「ACDEFGHIKL」がアラインされたすると、第二の配列の「F」と「H」の間にギャップが挿入され、「ACDEF-HIKL」を生じ、それにより第一の配列に対する第二の配列のより良いアラインメントを可能にする。生じたアラインメントにおいての結果として、10位の内の新しい9位が同一のアミノ酸残基で占められ、90%の第二の配列に対する第一の配列の配列同一性を生じる。どのようにして配列アラインメントを計算するかについての方法は以下に与えられている。

20

【0039】

好ましくは、ペプチド又はタンパク質（特に、ペプチド又はタンパク質断片）、及び/又はそれらの多形形態は、少なくとも8アミノ酸残基、好ましくは10、好ましくは12、好ましくは15、好ましくは20、好ましくは50、好ましくは少なくとも100アミノ酸残基を含んでなり、それは両方のペプチド又はタンパク質のアラインメント内の同一位置に存在する。

30

【0040】

本発明に従ったPTA断片であるペプチドは、PTAアミノ酸配列の少なくとも8、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25アミノ酸を含んでなることが可能である。核酸であるPTA断片は、PTAアミノ酸配列の一部をコードする少なくとも15、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも120、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300ヌクレオチドを含んでなることが可能である。最も好ましくは、PTA断片の多形形態は、図9に示したPTA多形のような天然に存在するPTAの配列の断片から成っており、ここで図9のPTA多形中に示された一つ又はそれより多くのアミノ酸残基は、PTAのアミノ酸配列（配列番号14）内の特定の位置に通常存在するアミノ酸残基と交換することができる。

40

【0041】

抗内分泌療法及び癌又は癌細胞の層別化

本発明に従った個体又は患者の層別化、又は癌又は癌細胞のタイプの層別化とは、前記

50

個体又は患者、又は癌のタイプ又は癌細胞のタイプを、特定の特徴又は表現型に基づいてサブグループに分割することを意味する。それ故、例は、癌患者の二つのグループへの癌患者の層別化、抗内分泌療法から恩恵を受けるであろう一つのグループ（図12の癌状態A）及び抗内分泌療法から恩恵を受けないであろう別のグループ（図12の癌状態B、C及びD）、又は抗内分泌治療に感受性である癌のタイプ（図の癌状態A）及びこうした治療には感受性ではない癌のタイプ（癌状態B、C及びD）のグループへの癌のタイプの層別化、又は機能的エストラジオールシグナリング経路を有する癌細胞（図12の癌状態A）及び損なわれたステロイド又はエストラジオールシグナリング経路を有する癌細胞（癌状態B、C及びD）への癌細胞の層別化、である。層別化は、細胞の表現型、細胞の免疫学的特性、特定の医学治療に対する患者の提案された感受性などのような多様な判断基準に基づいて行うことができる。表現型の特徴、又は癌又は癌細胞のタイプの他の特徴付けに基づいた層別化は、それらがステロイド、好ましくはエストラジオール又はプロゲステロンに応答するかどうかを決定することを含む。エストラジオール及びプロゲステロンは、もしこれらの細胞がこれらの刺激に対する機能的シグナリング経路を所有していれば、細胞の成長及び増殖を促進するステロイドホルモンである。特に乳癌患者において、これらの刺激の阻止が療法において普通に使用される。しかしながら、エストラジオール刺激を阻止することから恩恵を受ける可能性のある癌患者の状態は、癌細胞の表面でのエストラジオールレセプターの存在又は不存在の免疫組織学的決定により、又はエストラジオールレセプターの定量的決定により、及び対応するステロイド又はエストラジオールシグナリング経路の機能性を決定することによらずに、主として決定される。この種の療法は抗内分泌療法と称されている。抗内分泌療法は一般に、エストラジオール又はプロゲステロンレセプターのようなステロイドレセプターへのリガンドの結合によるこうしたレセプターの阻止のような異なった機構（これらのレセプターのシグナリングカスケードを刺激しないが、天然のリガンドに対してこれらのレセプターを阻止する）を使用することができる。この種の物質はSERM（選択的エストラジオールレセプター変調剤）とも称される。抗内分泌療法に使用することが可能である別の機構は、エストラジオールレセプター（エストラジオールレセプター下方調節剤；ERD）のようなステロイドレセプターの下方調節である。抗エストラジオール療法へのさらなるアプローチは、体により産生されているエストラジオールの量を低下させることである。例えば、閉経後の助成において、エストラジオールはもはや産生されないが、ホルモンアンドロゲンはエストラジオールに変換される。アロマターゼと称される特定の酵素がアンドロゲンからエストラジオールへの変換に関与しており、それ故、種々の機構によるアロマターゼの阻害を抗内分泌療法として使用することが可能である。一般に、すべての記載した及び可能なさらなる抗内分泌療法の機構を、エストラジオール、プロゲステロンその他のような、細胞増殖に関与する多様な種類のステロイドに対して使用することができる。これらの治療目的のために使用中の又は臨床試行中の物質は、中でも、タモキシフェン（商品名：ノルバデックス）、アリミデックス（商品名：アナストロゾール）、ゴセレリン（商品名：ゾラデックス）及びファスロデックス、すべてAstraZeneca, Sodertalje, Sweden, から、フェメラ（商品名：レトロゾール）及びレントロン（商品名：フォルメスタン）、両方ともNovartis, Basel, Switzerland, から、アロマシン（商品名：エキセメスタン）Pfizer, New York, NY, USA, から、ラロキシフェン（商品名：エビスタ）、Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA, から、アタメスタン、Biomedicines Inc., Alameda, CA, USA, から、TAS-108、Taiho Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan, から、プロゲンタ、Zonagen Inc., The Woodlands, TX, USA, から、6-MCDF、AVAX Technologies, Kansas-City, USA, から、PSK3668、ProSkelia SAS / Strakan Pharmaceuticals Ltd., Galashiels, Great Britain, から、トレミフェン（商品名：ファレストン）、GTx, Inc., Memphis, TN, USA から、である。

10

20

30

40

【0042】

損なわれたステロイドシグナリング経路及び損なわれたステロイドシグナリング経路の決定

50

本発明に従った、損なわれたステロイドシグナリング経路とは、こうした損なわれたステロイドシグナリング経路により影響された細胞においては、ステロイドによる刺激による細胞性反応、特に細胞増殖が起こらないことを意味している。損なわれたステロイドシグナリング経路が部分的にのみ不全であることも可能であり、減少した細胞増殖のような、減少しているがしかし完全には失われていない細胞性反応を生じる。その結果、例えば、損なわれたステロイドシグナリング経路を有する細胞は、タモキシフェンのような抗エストラジオールでの治療のような抗内分泌治療に対して応答しないか又はより少ない程度で応答し、及び抗エストラジオールにより増殖が損なわれないか又は抗エストラジオールにより増殖が部分的にのみ損なわれる。当該技術分野で既知の多様な方法を、ステロイド経路、特にエストラジオール又はプロゲステロンシグナリング経路が細胞増殖において機能的であるかどうかを決定するために使用することができる。インビトロ培養細胞をエストラジオール又はプロゲステロンで刺激することができ、そして刺激した及び刺激しない増殖を、例えば、放射活性 3 H - チミジン取り込みアッセイ、又はミトコンドリアの代謝活性を測定する M T T - (ジフェニルテトラゾリウムプロミド)アッセイのような代謝活性を測定するアッセイにより、又は当該技術分野で既知の他のアッセイにより決定することが可能である。もしくは又は加えて、機能的ステロイドシグナリングを示すマーカータンパク質又はペプチドの発現を、E L I S A、R I A、蛍光標識細胞分取 (F A C S)、ウェスタンブロッティング、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、逆転写酵素 P C R、R T - P C R、ノーザンブロッティングなどのような標準免疫学的又は分子生物学的技術により、又は、シグナリングに關与するタンパク質の変化を、例えば、リン酸化タンパク質、プロセスされた又は分解されたタンパク質、又は増加した又は減少した量の発現の検出により測定することができる。

10

20

30

40

50

【0043】

配列アラインメントの調製及び配列相同性の計算

配列の相同性を計算するため、G A P (Nucleic Acids Res.12:387-95)、B L A S T P、B L A S T N、F A S T A (J Mol Biol. 215:403-10) 又は公知の Smith Watermann-algorithm を含む、G C G ソフトウェア式 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, USA) のようなコンピュータプログラムを使用することができる。アミノ酸比較又はアラインメントに使用される好ましいパラメータは、Needleman and Wunsch (J Mol Biol. 48:443-53) のアルゴリズム、B L O S U M 62 マトリックス (Proc Natl Acad Sci U S A. 89:10915-9)、12 のギャップペナルティ、4 のギャップ長ペナルティ及び 0 の同一性の閾値を含んでなる。G A P ソフトウェアも、記載したパラメータで使用するのに適している。記述したパラメータはアミノ酸比較についてのデフォルトパラメータであり、配列末端のギャップは相同性値を減少させない。もし 8 ~ 20 アミノ酸長配列のような非常に短い配列を比較するならば、期待値を 100000 まで増加させ、及びワード長を 2 まで減少させる必要がある。さらに適したアルゴリズムは、ギャップ開始パラメータ、ギャップ伸長パラメータの使用、及びプログラムハンドブック Wisconsin Package, バージョン 9、1997 年 9 月から、に見られるマトリックスの使用である。最も適したアルゴリズムの選択は、実施する比較の種類に依存する。もし二つの配列データベースを比較するならば、F A S T A 及び B L A S T アルゴリズムが好ましい。70% の配列同一性は 70% の相同性とも称される。同一性とは、アラインメントの両方の配列内の同一位置に、同じアミノ酸が存在することを意味する。

【0044】

ペプチド模倣体

本発明に従ったペプチドは、部分的に又は完全にペプチド模倣体を示すように製造又は合成することができる。このことはより明確な特性を有するペプチド及び / 又はタンパク質を設計することを可能にする。例えば、D - アミノ酸をペプチド結合のタンパク分解を防止するために使用することができる。本発明に従った「ペプチド模倣体」は、アミノ酸又はアミノ酸配列の機能を模倣する構造である。「ペプチド模倣体」又は「ペプチドの模倣体」はしばしば、タンパク分解に対する増強された耐性のような追加の特性を有する。

ペプチド模倣体は、アミノ酸を連結することができる別の種類の共有結合でいくつか又はすべてのペプチド結合を置き換えることが可能である。ペプチド模倣体は、中でも、(i)アミノ酸修飾、(ii)ジペプチド類似体、(iii)生物学的半減期を増加させるペプチド主鎖修飾、及び(iv)二次構造模倣体、を含んでなることができる。いくつかのペプチド模倣体は、例えば、ペプチドに対する自由度の程度を制限している。アミノ酸修飾の例は、アルファ-Cアルキル化、アルファ-Nアルキル化など共有結合によりお互いに連結された二つのアミノ酸側鎖を有するペプチドであるジペプチド類似体、アミド結合アイソスターのようなペプチド主鎖の修飾、又はL-からD-アミノ酸へ及びインバースN-からC-配列へ変化させることにより得られるレトロ-インバーソ(retro-inverso)異性体などである。二次構造模倣体は、アルファ-ヘリックス(例えば、ベータ-アミノ酸による)、ベータ-シート、ベータ-ターン(例えば、輪止め(linchpin)構造による)及びガンマ-ターンのような構造の模倣体を含んでなる。ペプチド模倣体のさらなる例は、ペプチド及びタンパク質の溶解性又は免疫原性特性を修飾できる、スピーゲルマー(spiegelmers)(登録商標)(NOXXON Parma AG, Berlin, Germany)又はペグ化のような修飾である。

10

【0045】

核酸、相補性及び縮重核酸及び誘導体

本発明に従った核酸又は核酸配列は、これらの核酸が一本鎖又は二本鎖、線状、環状又は分枝であるかどうかに関わらず、すべての種類のデオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)又はそれらの組み合わせを意味する。好ましくは、核酸分子は精製された核酸分子であり、それは調製物が50%、好ましくは60%、70%、80%、90%、95%、99%、好ましくは99%以上の特定の核酸分子、又は一つ又はそれより多くの特定の核酸分子の特定の混合物を含有することを意味する。核酸分子の例は、ゲノムDNA、cDNA(相補DNA)、mRNA(メッセンジャーRNA)、組換えで生成された核酸分子、化学的に合成された核酸分子又は酵素的に発生させた核酸分子(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により)、又は当該技術分野で既知の方法を使用し、原核又は真核細胞、ウイルス、組織、器官、又は細菌、酵素、昆虫、虫(worm)などの全生物体のような天然源から精製された核酸である。さらに本発明に従った核酸分子は、核酸の誘導体を部分的に又は完全に意味することができ、その誘導体は、ホスホロチオエート、ペプチド核酸(PNA)、N3', P5'-ホスホロアミデート、モルホリノホスホロアミデート、2'-O-メトキシエチル核酸、2'-フルオロ-核酸、アラビノ-核酸、ロックト核酸(LNA、リボースの2'-酸素と4'-炭素を連結するメチレン架橋を含有するリボヌクレオチド)のような天然には観察することができないヌクレオチド又はヌクレオチド様分子を含んでなる。

20

30

【0046】

本発明に従った核酸はさらに、アンチセンス核酸、リボザイム、三重鎖形成核酸、RNAi-核酸、ポリメラーゼ連鎖反応のプライマーとして適した、インサイツハイブリダイゼーションに適した、ノーザン又はサザンブロットのようなハイブリダイゼーション実験に適した、又は核酸チップ実験に適した核酸、好ましくはPTA又はPTA断片の発現のための、又はPTA発現を抑制するように方向付けられたアンチセンス核酸の発現のためのベクター又はウイルスベクターとして適した核酸、を含んでなる。核酸は好ましくは、PTAをコードするmRNAの完全長の配列長、意図される使用に依存して、好ましくは600未満、500未満、400未満、300未満、200未満、100未満、50未満、40未満、30未満、20未満、15未満のヌクレオチドを有する。もし核酸が発現ベクターを表すとすれば、例えば、バキュロウイルスのような多くのウイルスは大きなゲノムを有し、非常に大きなベクターを生じるので、核酸分子の長さはより長く、数千のヌクレオチドまでであることが可能である。アンチセンス及び三重鎖形成核酸分子は、好ましくは、6~50、好ましくは10~30、15~30、20~30ヌクレオチドの配列長を有する。リボザイムは、好ましくは、標的RNAにハイブリダイズする配列を有し、前記ハイブリダイズする配列は対応するアンチセンス核酸と同じ長さを有し、加えて、当該

40

50

技術分野で公知の触媒リボザイム配列を含んでなる。ポリメラーゼ連鎖反応でプライマーとして使用するための核酸は、好ましくは、10～60、好ましくは15～60、15～50、15～40、15～30ヌクレオチドの長さを有する。

【0047】

相補核酸配列は、お互いにハイブリダイズして二重鎖又は三重鎖核酸分子を形成する核酸配列を意味する。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ハイブリダイゼーションが配列特異的であり、ランダムではないことを確実にするストリンジント実験条件下で起こる。核酸についてのストリンジントハイブリダイゼーション条件は当該技術分野で既知であり、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor, New York, 1998 又は Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Asibeo et al., John Wiley & Sons, Inc., New York. に公開されている。ハイブリダイゼーション条件についてのストリンジント条件の例は、3.5 x SSC、0.02%フィコール、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5 mM NaH₂PO₄ (pH 7)、0.5% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、2 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)を含有する緩衝液中、65 °Cでのハイブリダイゼーションである。SSCは、0.15 M塩化ナトリウム及び0.15 Mクエン酸ナトリウムをpH 7で含有する緩衝液を表す。ハイブリダイゼーションに続いて、二重鎖核酸が付着している膜を、室温にて2 x SSCで、及び68 °Cまでの温度にて0.1% SDS含有0.1～0.5 x SSCで洗浄する。ストリンジント実験ハイブリダイゼーション条件についての他のプロトコールは、当該技術分野で知られており、そして本発明の範囲内である。特異的ハイブリダイゼーションは、少なくとも40%、好ましくは50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%のお互いに相補的である核酸配列部分がお互いにハイブリダイズする。ストリンジント実験条件下で二重鎖核酸構造が安定である限り、全核酸配列がお互いにハイブリダイズすることは必要ではない。

10

20

【0048】

縮重核酸配列とは、ほとんどのアミノ酸は少なくとも二つの異なったコドンによりコードされているので、異なったアミノ酸配列が多種の核酸配列によりコードすることが可能であることを意味している。このため、同一のアミノ酸配列を非常に異なったヌクレオチドの配列でコードすることが可能である。

【0049】

非PTAヌクレオチド又は非-PTA核酸配列とは、PTA核酸配列の5'又は3'末端のいずれかのヌクレオチドを意味し、それは天然に存在する多様なPTA核酸配列のいずれの一つにもこの位置には存在していない。

30

【0050】

ラベル化核酸、ペプチド、タンパク質及び結合剤

本明細書において、用語「ラベル」とは：(i)検出可能なシグナルを提供し；(ii)第一又は第二のラベルにより提供される検出可能なシグナルを修飾するために第二のラベルと相互作用し、例えば、FRET；(iii)電荷、疎水性、形状又は他の物理学的パラメータにより、移動度、例えば、電気泳動移動度に影響し；又は(iv)捕捉部分を提供する、例えば、親和性、抗体/抗原、イオン複合体形成、縮重核酸配列を生じる；ように機能するいずれかの部分を指す。

40

【0051】

本発明は、核酸、ペプチド、結合剤、抗体のような物質、ならびに前記物質の断片、誘導体及び多形形態を含んでなり、それらはラベル又は他の機能性基を含んでなることが可能である。蛍光分子、放射性分子、発光分子、酵素、毒素、染料、金属粒子、磁性粒子、ポリマー粒子、ビオチン又は他の有機分子のようなすべての種類のラベル及び機能性基が適している。特に、質量分析のためには同位元素ラベル又は等圧性(isobaric)ラベルが適している。同位元素ラベルは、酸素-18、窒素-15、重水素、トリチウム、炭素-14、硫黄-35又はリン-32などのような、それらの天然の分子量とは異なった分子量を有する同位元素の使用により得ることが可能である。等圧性ラベルは、これ

50

らのラベルがインタクトであり、そして質量分析計中でフラグメント化されていない限り、同一の分子量を有する。それ故、サンプルの分析に先立って限られた数の質量相違しか存在しないので、等圧ラベルは質量分析法を使用してより都合よく分析することが可能である。蛍光分子の例は、フルオレスセイン、テキサスレッド、ローダミン、BODIPY、サイバークリーンなどのようなフルオロフォア、グリーン蛍光タンパク質、レッド蛍光タンパク質、ブルー蛍光タンパク質、ウミシイタケ蛍光タンパク質その他のような蛍光性タンパク質又はそれらの断片又は誘導体である。ラベル又は機能性基として適した放射性同位元素の例は、リン - 32 又は - 33、硫黄 - 35、ヨウ素 - 125、トリチウム、炭素 - 14、カルシウム - 45、クロム - 51 及び核酸及び / 又はペプチド及び / 又はタンパク質とカップリング可能であるすべての他の既知の放射性同位元素である。酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどである。適した毒素は、微生物毒素、毒性ペプチド、毒性小有機分子、合成毒素、又は医学目的に使用される毒素のようなすべての種類の毒素である。適した色素の例はジゴキシゲニンである。粒子の例は、種々の粒子直径、好ましくは $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$ の間のものである。金属粒子は、種々の物質、好ましくは金、銀、白金のような重元素又は他の適した金属又は合金、又はそれらの混合物である。磁性粒子の例は、鉄、好ましくは Fe_3O 、 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 などのような鉄酸化物を含む、すべての種類の磁性又は磁化可能な材料から作製される粒子である。ポリマー粒子の例は、ポリアクリルアミド、アガロース、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレンなどのようなポリマーから作製された粒子である。当該技術分野で知られているように、ビオチン、キチン、マルトース又はグルタチオンなどのような多様な他のラベルも使用することが可能である。

10

20

30

40

50

【0052】

さらに、以後ラベル配列と称される、特定の追加の核酸又はアミノ酸配列を含んでなるラベル又は機能性基を使用することができる。例えば、核酸配列を含んでなるラベル配列は、例えば、ラベル配列に特異的なプローブでのハイブリダイゼーションにより、ポリメラーゼ連鎖反応などによるラベル配列の検出により、例えば、ラベル化物質の検出に使用することが可能である。アミノ酸配列を含んでなるラベル配列の例は、his - タグ、flag - タグ、myc - タグ又は抗体、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、ストربتアビジン、キチン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質、種々のレクチンなどのような全タンパク質又はそれらの断片である。これらのラベルは、抗体の使用により、又はプロテイン A、プロテイン G、プロテイン Y、プロテイン A / G、グルタチオン、ビオチン、キチン、マルトース又は他の糖のようなこれらのラベルに結合するリガンドの使用により検出することが可能であり、又はこれらのラベル配列は、もしラベル配列が、例えば、HIV - Tat ペプチド、アンテナペディア (Antennapedia) ペプチド、VP22 ペプチドなどであれば、細胞内へのラベル化物質の輸送のような他の様式で機能することができる。ラベル配列は、特にラベル配列がアミノ酸配列を含んでなれば、前記ラベル配列に特異的な結合剤でラベル化物質を捕捉することにより、ラベル物質を精製するためにも一般に使用することができる。

【0053】

ベクター

核酸配列はベクターの一部であることができる。本発明に従ったベクターは、環状又は線状又は分枝状、一本鎖又は二本鎖、リボ核酸、デオキシリボ核酸又はそれらの組み合わせであり得る。ベクターは裸の核酸、例えばタンパク質、脂質、リボソーム、リン酸カルシウム沈降物又は他の物質、又はそれらの組み合わせが付随した核酸であり得る。ベクターは、前記核酸又はベクターを含んでなるウイルス又は細胞でもあり得る。ベクターは、例えば、PTA、PTA ペプチド、PTA 核酸及び / 又は断片、それらの誘導体又は多形態の量を増強する又は減少させるために適していることができる。前記 PTA、PTA ペプチド、PTA 核酸及び / 又は断片、それらの誘導体又は多形態の量を増加させるベクターは、例えば、過渡的又は安定発現ベクターである。前記 PTA、PTA ペプチド、

P T A 核酸及び / 又は断片、それらの誘導体又は多形形態の量を減少させるベクターは、例えば、例えば P T A 核酸配列特異的アンチセンス核酸、リボザイム、三重鎖形成核酸、RNA i 分子などをコードする核酸配列を含んでなる。ベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、パキウウイルス、ファージ又は当該技術分野で既知の他のウイルスのようなウイルスの形態で存在することができる。ウイルスは、生きているウイルス又は増殖及び / 又は感染のためにヘルパーウイルスを必要とするウイルスであることができる。ベクターは、ヒト、マウス、ラットなどのような特定の種、哺乳動物、齧歯動物などのような特定の種の群、又は筋肉組織、脾臓、肝臓、脂肪組織などのような特定の器官又は組織、脂肪細胞、筋肉細胞、脾臓の細胞、神経細胞、胃腸管からの細胞などのような特定のタイプの細胞に非特異的又は特異的で、又は細菌、酵母、昆虫細胞、C O S 細胞又は C H O 細胞のような細胞株に特異的であることができる。ベクターの特異性は、特異的細胞タイプ又は種でのみ活性である特異的プロモーター核酸配列のためであることができ、又ベクターは、特異的細胞などへベクターを標的化する機構により特異的であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

宿主細胞

宿主細胞とは、前の章に記載した核酸及び / 又はベクターを含んでなる細胞を意味する。核酸又はベクターは、細胞中に過渡的に又は安定に存在することができ、前記核酸又はベクターはサイトゾル、又は核又はミトコンドリアのような細胞の特定の小器官に存在することができる。ベクター配列又はそれらの断片は、例えば、プラスミドの形態でサイトゾルに存在することが可能であり、又はベクター配列は、部位（配列）特異的、又はランダム又は他の機構により、細胞のゲノム又はミトコンドリアのゲノム内に、又は細胞に存在するプラスミド内に部分的に又は完全に組み込まれていることができる。

【 0 0 5 5 】

結合剤、抗体及び誘導体

本発明の別の態様は、本発明の P T A ペプチドに特異的な結合剤である。これらの結合剤は、例えば、ヒト、マウス、ラット及びウシ P T A は、特に N 末端が非常に類似しているので、ヒト P T A のみに特異的であることはできない。それ故、多くの P T A 特異的結合剤はこれら及び他の種の P T A へも結合するであろう。しかしながら、例えば、ヒトにおいての診断的又は治療的目的には、このことは問題にすべきものではない。本発明に従った結合剤は、中でも、これらのペプチドに特異的なレセプター、これらのペプチドを特異的に結合するファージ、これらのペプチドを特異的に結合するスビーゲルマー（登録商標）、これらのペプチドを特異的に結合する小有機分子、レセプター、ファージ、小有機分子、スビーゲルマー（登録商標）のような、これらのペプチドを特異的に結合する物質で表面被覆された粒子である。好ましくは、特異的結合剤は、前記ペプチドを結合する、又は前記ペプチドの断片、誘導体又は多形形態を結合する特異的抗体を含んでなる。P T A 断片にのみ存在し、P T A の完全配列には存在しないエピトープである P T A 断片のネオエピトープを認識する抗体も含まれる。また前記抗体の断片も、これらの断片が前記ペプチドに特異的に結合する限りは含まれる。好ましくは、前記ペプチドに特異的な結合剤は、I g G、I g A、I g E、I g D 又は I g Y 抗体のような抗体であり、前記抗体は、いずれの種から由来してもよく、精製された形態で、細胞培養上清、抗血清、腹水液として、又は卵内に含有されている形態で存在することができる。抗体は、好ましくは、ヒト、マウス、ラット又は他の哺乳動物、又は卵、好ましくは鶏卵に由来することができ、又は抗体を、当該技術分野で既知の組換え技術を使用して産生することができる。抗体はモノクローナル、オリゴクローナル又はポリクローナル抗体であることができる。

【 0 0 5 6 】

抗体は、好ましくは、精製された特異的抗体、非特異的抗体又はアルブミンのような他のタンパク質をさらに含んでなる精製された特異的抗体、全抗血清から調製された、細胞培養上清から調製された、卵から調製された、又は腹水液から調製された抗体、又は精製されていない抗体、好ましくは精製されていない抗血清、精製されていない細胞培養上清、精製されていない腹水液、又は精製されていない組換え抗体であることができる。好ま

しくは、本発明に従った精製された抗体又は抗体断片又は誘導体は、少なくとも30%、好ましくは、少なくとも40%、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%含んでなり、又は、好ましくは、少なくとも98%の前記抗体及び/又は抗体断片及び/又はそれらの誘導体を含んでなる。

【0057】

特異的結合剤とは、例えば抗体を意味し、それはPTA断片のようなペプチドリガンドに特異的に結合し、それは本発明の核酸に特異的に結合する。抗体又は核酸のような結合剤の結合の特異性は、例えば、標準ウェスタンブロッティング、ノーザンブロッティング、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、又は当該技術分野で既知の他の方法により試験することができる。サンプルとして、例えば、試験されるべき抗体が恐らく特異的であるPTA断片をコードする核酸でトランスフェクトされた細胞を使用することができる。陰性対照として、同一のしかしトランスフェクトされていない細胞株、又は非PTA断片でトランスフェクトされた細胞株を使用することができる。抗体の特異性を決定するため、両方の細胞株からの溶解液を、ウェスタンブロットで試験することができる。抗体のような特異的結合剤は、PTAトランスフェクト細胞からの溶解物中でのみ正しい分子量のバンドを認識するが、陰性対照からの溶解物中では認識しない。核酸の特異性を決定するためには、RNAを両方の細胞株から精製し、例えば、ノーザンブロット又は逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により試験することができる。RT-PCRは、PTAトランスフェクト細胞株から単離されたRNAを使用すると、正しいサイズのPCR産物のみを与える。ノーザンブロットにおいて、特異的結合核酸は、トランスフェクトされた細胞株のRNAサンプル中にのみ正しい分子量のバンドを認識するが、陰性対照からのRNAは認識しない。しかしながら、当該技術分野で知られているように、陰性対照にもシグナルがあり得るが、もし結合剤が細胞内にトランスフェクトされたリガンドに特異的であるならば、陰性対照中のシグナルは明らかにより低い。特異性はさらに、ノーザンブロットにおける洗浄工程のストリンジェンシーを増加させることにより試験することが可能であり、それは陰性対照中のシグナルを徐々に減少させ、一方、PTAトランスフェクト細胞のシグナルは依然として存在する。

【0058】

本発明はさらに、異なった種に由来する抗体の一部を含んでなる抗体、例えば、マウス抗体の抗原結合ドメイン、及びヒト抗体由来の抗体又は抗体断片のもう一方の部分を含んでなる、例えば、ヒト化抗体のような抗体の誘導体を含んでなる。本発明は、抗体の断片がいまだにPTA断片又はそれらの多形形態に特異的に結合する限り、それらの抗体も含む。可能な抗体の例は、中でも、Fab2又はFab抗体断片である。本発明に従った抗体のさらなる誘導体は、有機化合物、無機化合物、ペプチド又はタンパク質のような他の物質に共有結合又は非共有結合で結合された抗体又は抗体の断片である。抗体のこうした誘導体の例は、放射性核種、毒素、酵素、フルオロフォア、蛍光性タンパク質、染料又はラベル配列(前の章に記載したラベル配列)でラベルされた抗体である。

【0059】

医薬組成物

本発明の別の態様は医薬組成物である。これらの医薬組成物は、PTA断片又はそれらの多形形態、又は前記断片又は多形形態をコードする核酸、又は相補的又は縮重配列、前記核酸を含んでなるベクター、前記核酸又は前記ベクターを含んでなる宿主細胞、を含んでなる。

【0060】

本発明の医薬組成物は、癌、特に改変されたステロイドシグナリング経路、特に改変されたエストラジオールシグナリング経路を有する癌細胞、特に乳癌又は結腸癌の療法、予防、再発の治療のために使用することができる。

【0061】

医薬組成物は、経口的、舌下的に投与され、静脈内に注射され、皮下に注射され、腫瘍内、筋肉、脂肪又は他の組織内へ注射され、皮膚上又は粘膜上へ局所投与され、肺内部へ

10

20

30

40

50

エアロゾールとして吸入され、直腸又は他の経路を介して投与されることができる。医薬組成物は、錠剤、ピル剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、個体へ経皮的に物質を放出する絆創膏、チンキ剤、口蓋垂、懸濁剤、液剤、好ましくは注射又は連続的注入液としての使用のための滅菌生理学的塩化ナトリウム溶液、などとして供給することができる。医薬組成物は、充填添加剤、抗菌添加剤、保存添加剤、着色添加剤、フレーバー添加剤、芳香添加剤、保護又は安定化添加剤などのような添加剤を含んでなることができる。好ましい保護又は安定化添加剤は、ペプチド及びタンパク質の分解を抑制する物質であり、例えば、ペプチド及びタンパク質を分解、凝集から、又は活性の消失から保護するための、プロテアーゼ阻害剤又はアルブミン（好ましくはヒトアルブミン）のような担体タンパク質である。医薬組成物は、必要に応じて一度又は繰り返して個体に適用することができる。日、週、月に1回又はそれ以上、又はより長い時間間隔で適用することができる。医薬組成物は、単独で又は他の医薬組成物と併用して使用することができる。併用された医薬組成物は、治療されている又は試験されている個体に対して相加的未満、相加的及び相乗的効果を有することができる。医薬組成物は、 $3\mu\text{g}$ まで、 $10\mu\text{g}$ まで、 $30\mu\text{g}$ まで、 $100\mu\text{g}$ まで、 $300\mu\text{g}$ まで、 1mg まで、 30mg まで、 300mg まで又は 300mg 以上のPTA断片、前記断片をコードする核酸、前記断片に特異的に結合する結合剤、前記断片又は誘導体、又はそれらの多形形態又はそれらの組み合わせに特異的に結合する抗体を含んでなることができる。

10

【0062】

もし医薬組成物が診断組成物として使用されるならば、それは単独で又は他の診断組成物又は診断法と併用して使用することができる。二つ又はそれより多くの医薬組成物及び/又は診断法の併用による診断の結果は、診断の信頼性が相加的未満でもあり得るが、相加的に改良することが可能であり、又は診断を相乗的に改良することができる。医薬組成物は、癌細胞、好ましくは損なわれたステロイドシグナリング経路、好ましくは損なわれたエストロジオールシグナリング経路を有する癌細胞、好ましくは乳癌又は結腸癌細胞の存在を証明するため、又は不存在を証明するために診断で使用することができる。

20

【0063】

サンプルを分析するために適した方法

一般に、サンプル中に存在するペプチドを検出する、及び分析するために適したすべての方法を、本発明の方法において使用することが可能であり、本発明のペプチド、核酸及び断片、誘導体の存在、不存在又は量を決定するために使用することができる。好ましくは、質量分析、タンパク質チップアッセイ、免疫学及び分子生物学法を使用することができる。

30

【0064】

適した質量分析法は、中でも、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）、連続的又はパルスエレクトロスプレーイオン化法（ESI）及びイオンスプレー又は熱スプレー又はマッシュクラスター衝撃（MCI）のような関連する方法である。イオン源は、リニア又はノンリニア反射飛行時間（TOF）、単一又は多四重極、単一又は多磁気セクター、フーリエ変換イオンサイクロン共鳴（FTICR）、イオントラップ、及びそれらの組み合わせ（例えば、イオントラップ/飛行時間）を含む検出様式と一致させることができる。イオン化のためには、多数のマトリックス/波長組み合わせ（MALDI）又は溶媒組み合わせ（ESI）を使用することができる。適した他の質量分析法は、例えば、高速原子衝突（FAB）質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化（SELDI）質量分析、同位元素コード化アフィニティタグ（ICAT）質量分析又はアフィニティ質量分析法である。

40

【0065】

さらに、適した免疫学的方法は、中でも、酵素結合免疫アッセイ（ELISA）、サンドイッチ、直接、間接又は競合ELISAアッセイ、酵素結合免疫スポットアッセイ（ELISPOT）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、フローサイトメトリーアッセイ（FACS = 蛍光標識細胞分取）、免疫組織化学、ウェスタンブロット、蛍光共鳴エネルギー

50

転移 (F R E T) アッセイ、例えば、本発明のペプチドに特異的な抗体、抗体断片、レセプター、リガンド又は他の結合剤を使用するタンパク質 - チップアッセイである。

【 0 0 6 6 】

中でも、ノーザン又はサザンブロットハイブリダイゼーション、核酸ドット - 又はスロット - ブロットハイブリダイゼーション、インサイツハイブリダイゼーション、核酸チップアッセイ (例えば、問題とする核酸を特異的に捕捉する R N A 、 D N A 又は他の核酸を使用する) 、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 、逆転写酵素 P C R (R T - P C R) 、リアルタイム P C R (t a q - m a n P C R) を、本発明の核酸を検出するための分子生物学方法として使用することができる。

【 0 0 6 7 】

核磁気共鳴 (N M R) 、蛍光光度分析、比色分析、放射分析、発光分析又は他の分光分析法、高速液体クロマトグラフィー、キャピラリークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、プラズモン共鳴 (B I A C O R E) 、 1 次元又は 2 次元ゲル電気泳動などのようなさらなる方法を、本発明のペプチド又は核酸を検出するために使用することができる。

。

【 0 0 6 8 】

試験キット

本発明のさらなる側面は、本発明のペプチド又は核酸又は断片又は誘導体又はそれらの多形形態の絶対濃度又は相対濃度を決定するための、又は存在又は不存在を決定するための試験キットである。試験キットは、機能性ステロイドシグナリング経路、好ましくは機能性エストラジオールシグナリング経路を有する細胞の不存在又は存在を診断するために使用することができる。試験キットはさらに、癌の発生を予測するため又は癌の状態のグレードを予測するため、及び / 又は前記癌についての療法の成功を予測する及び / 又はモニターするため、及び / 又は前記癌の再発を予測する及び / 又はモニターするために使用することができる。好ましくは、当該技術分野で知られている他の診断試験により診断が可能になる前に、前記癌を早期に診断及び / 又は予測するため、好ましくは、本試験キットを使用することができる。本試験キットは、限定されるわけではないが、全血、血液細胞 (白血球、B細胞、T細胞、単球、マクロファージ、赤血球及び血小板のような) 、血清、血漿、血液濾過物、乳頭吸引液、尿、リンパ液、リンパ節組織、大便、脳脊髄液、結腸又は直腸からの組織、又は他の組織及び器官 (例えば、癌細胞含有組織) 、ならびにそれらの組み合わせを含む個体からのいずれかのサンプルを分析するために使用することができる。試験は、一つ又は一つ以上の個体のプールされたサンプルで行うことができる。サンプルは、前処理されたサンプルであることができ、サンプルは、例えば、クロマトグラフィー、濾過、沈殿、液体抽出又は他の抽出法、免疫沈降などにより分画されている。続いて個々の又は、一つ又は一つより多くのサンプルに由来する二つ又はそれより多くの合わされた分画を分析することができる。試験は一回又は数回、好ましくは数回、P T A 、 P T A ペプチド、P T A 核酸又は P T A 断片、又はそれらの多形形態の量変化についての時間経過を分析する期間にわたって行うことができる。試験は、限定されるわけではないが、本特許出願の別の所に記載されているサンプルの分析法を含む、当該技術分野で知られている多様なタイプの試験キットで行うことができる。試験キットは、P T A 、 P T A 断片、P T A 核酸、P T A 結合剤、P T A 特異的抗体又は断片、それらの誘導体又は多形形態、又はそれらの組み合わせのような物質を含んでなることができる。前記物質は、ラベル化形態で、又はそれらのラベル化が可能な形態で、又はそれらの検出及び / 又は定量を容易にする形態でキット中に存在することができる。

【 0 0 6 9 】

P T A 、 P T A 断片、P T A 核酸及び / 又は断片、それらの誘導体又は多形形態は、標品として、又は試験されるべきサンプル中に存在する抗体へ結合できる捕捉剤として使用することが可能であり、又は試験されるべきサンプル中に存在する同一の又は類似のリガンドと結合剤の結合に競合する結合剤のラベル化リガンドとして使用することができる。

【 0 0 7 0 】

10

20

30

40

50

キットは、前記 P T A、P T A 断片又は P T A 核酸に特異的に結合する、又はハイブリダイズする剤を含んでなることができる。さらに、本発明の試験キットは、試験キットをどのように使用するか、サンプルをどのように調製するか、どのような種類のサンプルを使用するか、結果をどのように分析する及び説明するかなどについての説明書を含んでなることができる。特に、本試験キットは、損なわれたステロイドシグナリング、好ましくはエストラジオール又はプロゲステロンシグナリング経路を有する癌細胞、好ましくはそのような損なわれたシグナリング経路を有する乳癌又は結腸細胞の存在又は不存在を決定するために本キットをどのように使用するかどうかの説明書を含んでなることができる。試験キットのための説明書は、文書であることができ、図、フィルム、オーディオ、コンピューター - マルチメディア又はキットをどのように使用するかを説明するのに適したいずれかの他の様式として提供される。

10

【 0 0 7 1 】

同定されたマーカーの新規使用

同定されたペプチドのいくつかは、従来の技術で知られている P T A 断片 (T A 1、T A 1 1) であったが、P T A 断片であるペプチド又は N 末端メチオニン残基を有する又は有しない完全 P T A は、癌細胞を有する個体の層別化、即ち、前記癌細胞が抗内分泌又は抗エストラジオール療法に対して感受性であるかどうかを決定するために適したマーカーとしては、これまで記述されていない。

【 0 0 7 2 】

図 1 2 は、癌の層別化について P T A 断片を使用した本明細書で記載された研究の結果の表を示しており、基礎をなす理論及び前記 P T A 断片の提案された使用を示している。本明細書で示された結果に基づくと、エストラジオールレセプター (E R) 及び P T A 断片 (例えば、図に示された P T A 2 - 2 8) の決定の組み合わせは、癌細胞を有している個体を 4 つの異なった疾患状態、状態 A、B、C 及び D に層別化することを可能にする。状態 A は E R の存在 (+) 及び P T A 断片の不存在 (-) により特徴付けられ、状態 B は E R の存在 (+) 及び P T A 断片の存在 (+) により特徴付けられ、状態 C は E R の不存在 (-) 及び P T A 断片の存在 (+) により特徴付けられ、状態 D は E R の不存在 (-) 及び P T A 断片の不存在 (-) により特徴付けられる。異なった疾患状態は癌細胞の分化特性の進行的消失を反映し、それは癌細胞の進行的脱分化を意味している。癌細胞の脱分化は、一般に、状態 A での 0 % から状態 D での 7 5 % へ増加している再発のパーセンテージで示されるように、より悪い予後を生じ、疾患の治療の機会を得るためには結果的により攻撃的な癌治療を必要とする。疾患状態 A の患者は、比較的温和な癌療法で治療することができるが、一方、疾患状態 D の患者はより低い治療の成功率を改善するために攻撃的な癌療法で治療しなければならず、より攻撃的な癌療法は同時により有害な副作用も有している。一方、攻撃的な癌療法は疾患状態 A の患者には適用されず、なぜならこれらの患者はとにかく癌療法について良好な成功率を有しており、それ故、このグループにおける攻撃的な癌療法の増大した副作用は許容できないからである。我々は、エストラジオールレセプター (E R) の存在又は不存在及び P T A 断片の存在又は不存在に関する患者のサンプルの異なった表現型を説明するであろう理論を有している。疾患状態 A においては、エストラジオールレセプターは発現されており、そのシグナリング経路は完全に機能的である。中でも、このことは、サイトゾルから核への完全プロチモシンアルファ (P T A) タンパク質の輸送を生じる。基質 P T A を有するプロテアーゼレグマインはサイトゾルに位置しており、サイトゾルから核への P T A の輸送は、レグマイン仲介タンパク質分解から P T A を保護し、P T A 断片がない又はより少ないことを生じている (状態 A)。状態 A から B への癌細胞の転移は、機能的エストラジオールシグナリングの消失により起こされているであろうが、免疫組織学により我々が確認したように、細胞表面には未だにエストラジオールレセプターが存在している。このエストラジオールシグナリング不全の結果として、P T A はもはやサイトゾルから核へ輸送されず、それ故サイトゾルに残され、レグマインによるタンパク質分解を受ける。その結果、レグマインにより P T A 断片が発生する。癌細胞の次の段階、段階 C は、エストラジオールレセプターの発現の消失により表現さ

20

30

40

50

れ及びその結果としてこの段階では、レグマイン活性により P T A 断片が発生する。最後の段階、段階 D においては、癌の特定のタイプについて文献に記載されているように (Wang et al., 2004, Cancer Res., 64:64-74) 癌細胞は遺伝子情報の一片 (例えば、L O H 1 4 q 3 2 . 1) を消失する。L O H 1 4 q 3 2 . 1 は、中でも、レグマインについての遺伝子をコードする。結果として、P T A はサイトゾルに残り、核へ輸送されないが、もはやレグマインは存在していないので、レグマイン仲介タンパク質分解を受けず、それ故、この非常に後期の癌状態の間はもはや P T A 断片は発生しない。提案された機構は、なぜ P T A 断片が中間癌状態 B 及び C の間にのみ存在し (又は増加した量で存在し)、初期状態 A 又は最終状態 D では存在しないかを説明している。

実施例

下記の実施例は、本発明を例示することを意図しているが、本発明の範囲をいかにようにも限定することは意味していない。

【 0 0 7 3 】

実施例 1 : 原発性ヒト乳癌組織サンプルの収集及びサンプル調製

原発性ヒト乳癌組織はバイオプシ又は腫瘍組織の手術的除去の間に集めた。この研究のための原発性ヒト組織の使用は、Medizinische Hochschule Hannover, Germany の倫理委員会により承認され、すべての患者から、この研究における彼らの組織の使用についての文書による承認を得た。エストラジオールレセプター存在又は不存在の免疫組織学決定後に残された腫瘍組織の 2 0 μ m スライスを、さらに使用するまで - 8 0 で保存した。秤量により組織サンプルの定量化後、組織サンプルを抽出緩衝液 (6 M グアニジン - 塩酸塩、5 0 m M グリシン、H C I を使用して p H を 2 . 6 に調整) 中で 1 0 分、サーモミキサー中、9 9 及び 1 1 0 0 r p m でインキュベートした。抽出緩衝液中の組織の「濃度」は、2 0 m g / m L であった。1 8 0 0 0 x g で 1 5 分、室温で遠心分離後、上清を採取し、限外濾過し、さらに加工するまで - 8 0 で保存した。限外濾過カートリッジ (Microcon (登録商標)YM-50,cut-off50 000,order # 42416, Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) を 4 0 0 μ L の水を用い、室温にて 1 2 5 0 0 x g で 1 分の遠心分離によりすすぎ、カートリッジ当たり 4 0 0 μ L までの組織を加えた。1 2 5 0 0 x g で 1 時間、室温で遠心分離後、濾液を集め、さらに加工するまで - 8 0 で保存した。保持物はさらなる分析には使用しなかった。

【 0 0 7 4 】

実施例 2 : 原発性ヒト乳癌組織サンプルを使用するウェスタンブロッティング

- 8 0 で保存した原発性ヒト乳癌組織サンプルを溶解緩衝液 (5 0 m M H E P E S 、 0 . 1 % T w e e n - 2 0 、 2 0 m M K C I 、 1 m M ジチオスレイトール) と混合し、超音波装置を使用してホモゲナイズした。遠心分離後、ペレットを廃棄し、上清を新しいチューブに集めた。組織細胞溶解物のタンパク質濃度を、当該技術分野で公知の通常のタンパク質決定アッセイ (ブラッドフォード (B r a d f o r d) アッセイ) を使用して決定した。組織細胞溶解物を濃縮サンプル緩衝液で希釈して 1 0 μ l の総容量中、1 5 μ g タンパク質の最終濃度とした。サンプルを 9 5 で 5 分加熱した後、サンプルをプレキャスト S D S - ポリアクリルアミド勾配ゲル (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany, 注文番号 161-1178) を使用して分離した。サンプル中に存在するタンパク質及びペプチドを 2 5 m A の電流で 4 5 分分離した後、続いて当該技術分野で知られている標準セミドライブロット法を使用して Nytran SuPerCharge 膜 (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, Germany) に移した。トリス / グリシン / メタノールを含有する移行緩衝液を使用し、製造元の指示に従い、移行を 7 5 m A 電流、1 時間行った。使用されたタンパク質分子量マーカーは PageRuler (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany, 注文番号 #SM0671) であった。タンパク質移行後、5 % (容量当たりの重量) 脱脂粉乳含有リン酸塩緩衝液 (P B S) を使用して、一夜膜をブロックした。膜を 3 回、1 0 分間洗浄し (各々 P B S を使用して) 、抗 P T A 抗体 (抗プロチモシンアルファ (N T) (2 F 1 1) 抗体 (注文番号 ALX804-486-C100 Alexis Deutschland GmbH, Grunberg, Germany) を使用して室温で 1 . 5 時間インキュベートし、3 回、1 0 分間洗浄し (各々 P B S を使用して) 、1

10

20

30

40

50

：5000希釈二次抗体（西洋ワサビペルオキシダーゼラベル化ヤギ抗マウス抗体）と室温で1.5時間インキュベートし、最後にPBSで3回、10分洗浄した。結合抗体の検出は、膜を検出溶液（トリス-HCl、ルミノール、クマリン、 H_2O_2 ）と10分インキュベートし、続いてCCDカメラを使用して写真に撮った。使用された抗体（製造元に従って）は、ヒトPTAのアミノ酸1～31を含むエピトープを認識する。

【0075】

実施例3：腫瘍細胞の増殖、マウス内への注射及びサンプル採取

ヒト結腸直腸癌細胞株HCT-116は、ATCC, Manassas, VA, USA, 注文番号CCL-247、から得た。腫瘍細胞を、10%ウシ胎児血清及び2mM L-グルタミンを補充したRPMI 1640培地中、37℃、5%CO₂、で培養した。すべての組織培養培地及び補充物はGibco BRL, Gaithersburg, MD, USA から得た。付着腫瘍細胞の細胞継代は、1週間に2回、1:10の比で細胞培養物を分割することにより実施した。注射の日（0時点）、当該技術分野で知られているようにトリプシン/エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を使用して細胞を培養フラスコから採取し、培養培地に移し、一度洗浄し、リン酸緩衝液（PBS）に再懸濁した。PBSでの追加の洗浄工程の後、最終濃度をmL当たり15000000生存細胞に調節した。腫瘍細胞懸濁液を、細胞凝集を避けるように注意深く混合し、氷上に保ち、針を付けずに1.0mLシリンジ内に吸引した。200μLの細胞懸濁液（3,000,000細胞を含有）を、0.45x25mmのサイズの針を使用し、マウスの右横腹側面内の皮下に注射した。総計で60匹のマウスに腫瘍細胞を注射した。40匹の追加の動物は、対照として働き、PBSのみを注射した。腫瘍を有する動物を、腫瘍細胞注射後、第7、13又は34日目に殺した。各々20匹の動物の対照群は7及び34日目に殺した。示された時点で、心臓穿刺によりEDTA-血液を得た。EDTA血漿は当該技術分野で知られているように調製し、個々の動物からのサンプルは、血液吸引30分以内に-80℃で保存した。移植された原発性HCT-116-腫瘍の重量及び容積を切開時に決定した。腫瘍容積は、センチメートルで測定された長さ及び平均幅の二乗を掛けることにより計算し、腫瘍容積はミリリットル（mL）として得られた。個々の腫瘍を秤量し、そして容積を決定したらすぐに液体窒素中で凍結し、さらに加工するまで-80℃で保存した。

【0076】

実施例4：マウス血漿を使用するサンプル調製

分析に先立って、当該技術分野で知られているように、トリクロロ酢酸（TCA）沈殿により、血漿サンプルのタンパク質ロードの減少を達成した。0.5mLの血漿サンプルを1mLの冷やした蒸留水に加えた。タンパク質沈殿のため、0.5mLのTCA（20%（v/v）TCA濃度）を加え、チューブを30秒激しく混合した。氷上で30分インキュベートした後、サンプルを18,000gで30分、4℃にて遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、さらに加工するまで-80℃で保存した。375μL-等量の血漿を、クロマトグラフィー実施につき使用した。

【0077】

実施例5：SCIDマウスから単離されたHCT-116腫瘍を使用するサンプル調製

サンプル塊は秤量により決定した。4mgの腫瘍組織サンプルの湿潤塊に、80μLの200mM酢酸を加えた後、サンプルを10分煮沸した。典型的には、20～50mgの腫瘍組織を出発物質として使用した。続いて、HClの30%保存溶液を使用してサンプルのpHをpH2～pH3に調整し、最後にTFAの0.1%保存溶液を使用して1.5mLにサンプルを希釈した。4℃にて、18,000xgで10分遠心分離後、上清を採取し、さらに加工するまで-80℃で保存した。4mgの腫瘍組織に相当する細胞抽出物を、クロマトグラフィー実施につき使用した。

【0078】

実施例6：インビトロで培養した細胞を使用するサンプル調製

トリプシン/EDTA及びゴムポリスマンの使用により組織培養プレートから細胞を除去し、600gで5分、室温で遠心分離し、PBSで2回洗浄した。ペプチド抽出のため

には、50,000～400,000細胞の湿潤塊標準化サンプルを使用した。200 μ Lの200 mM酢酸を加えた後、サンプルを10分煮沸した。続いて、HClの30%保存溶液を使用してサンプルのpHをpH2～pH3に調整し、最後にTFAの0.1%保存溶液を使用して1.5 mLにサンプルを希釈した。4にて、18,000 $\times$ gで10分遠心分離後、上清を採取し、さらに加工するまで-80で保存した。50,000～400,000細胞に相当する細胞抽出物を、クロマトグラフィー実施につき使用した。

【0079】

実施例7：ヒト血漿の収集及び調製

62歳の平均年齢を有し、種々の癌段階の19人の男性結腸癌患者からの血漿サンプルを、抗凝固剤としてEDTAを使用し、当該技術分野で知られている標準法により集めた。収集チューブを2000 g及び4で10分遠心分離した。血漿サンプルは、さらに加工するまで-80で保存した。クロマトグラフィーに先だって、これら19血漿サンプルの4 mLのプールを、当該技術分野で知られているトリクロロ酢酸(TCA)沈殿にかけた。詳述すると、500 μ Lの血漿を1 mLの冷やした蒸留水に加えた。タンパク質沈殿は、500 μ Lの氷冷20%TCA(v/v)を加え、チューブを30秒激しく混合することにより実施した。氷上で30分インキュベートした後、チューブを18,000 gで30分、4にて遠心分離した。上清をさらなる分析に使用した。TCA沈殿は、高分子量タンパク質を除去するため、及びペプチド及び低分子量タンパク質を濃縮するために行った。続いて、TCA沈殿の上清を実施例6に記載したように96分画に分離した。第一の分画化(実施例6に従って)の分画42の3.6 mL血漿等価物を使用した第二の分画化は、2 $\times$ 250 mmのサイズのJupiter C18逆相カラム(Phenomenex, Ashaffenburg, Germany)を使用して行った。クロマトグラフィーは、マイクロフローセルを備えたHP1100HPLC(両方ともAgilent Technologies, Boblingen, Germanyから供給された)を使用して33で行った。緩衝液Aは0.06%(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)及び99.94%(v/v)蒸留水であり及び緩衝液Bは0.05%(v/v)TFA、80%(v/v)アセトニトリル及び19.95%(v/v)蒸留水であった。クロマトグラフィー条件は以下のである：

- ・最初の1分間は5%緩衝液B；
- ・次の2分間は5から15%緩衝液Bへの直線濃度勾配；
- ・次の42分間は15から40%緩衝液Bへの直線濃度勾配；
- ・次の4分間は40から100%緩衝液Bへの直線濃度勾配；
- ・次の4分間は100%緩衝液B；
- ・次の1.5分間は100から50%緩衝液Bへの直線濃度勾配；
- ・次の3分間は50から100%緩衝液Bへの直線濃度勾配；
- ・及び最後に、最後の2.5分は100から50%緩衝液Bへの直線濃度勾配。

流速は100 μ L/分であり、そして96分画(各々 μ Lを含有する)を、5から100%緩衝液Bへの間に集めた。

【0080】

実施例8：サンプルの液体クロマトグラフィー

実施された分離法は逆相クロマトグラフィーであった。種々のRPクロマトグラフィー樹脂及び緩衝液は等しく適していた。約4 mm $\times$ 250 mmのサイズを有するC18逆相クロマトグラフィーカラムを使用したペプチド及び/又はタンパク質の分離は以下のように実施した。好ましくは、Source RPC、4, 6 $\times$ 150 mm (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany)が使用された。緩衝液Aは、0.06%容量/容量(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)及び99.94%(v/v)蒸留水であり、及び緩衝液Bは、0.05%(v/v)TFA、80%(v/v)アセトニトリル及び19.95%(v/v)蒸留水であった。クロマトグラフィーは、マイクロフローセルを備えたHP1100HPLC(両方ともAgilent Technologies, Boblingen, Germanyから供給された)を使用して33で行った。サンプルのpHは、30%(v/v)HClの保存溶液を使用してpHをpH2～pH3に調整し、続いてサンプルをトリフルオ

ロ酢酸の 0.05% (v/v) 保存溶液を使用して 1.5 mL に希釈した。クロマトグラフィーに先だって、サンプルを 4 及び 18000 g で 10 分遠心分離し、最後に、375 µL 血漿、50000 ~ 400000 インビトロ培養細胞、腫瘍組織の 4 mg 湿潤重量又は 1.5 mL 細胞培養上清を表している、1.5 mL のサンプルをクロマトグラフィーカラムにロードした。緩衝液 A 及び B はクロマトグラフィーの間、種々の比で混合され、緩衝液 B のパーセンテージのみが述べられている。緩衝液 A のパーセンテージは 100% 引く % 緩衝液 B (v/v) である。クロマトグラフィー条件は以下のようである：

- ・最初の 1 分間は 5% 緩衝液 B；
- ・次の 44 分間は 5 から 50% 緩衝液 B への直線濃度勾配；
- ・次の 4 分間は 50 から 100% 緩衝液 B への直線濃度勾配；
- ・次の 4 分間は 100% 緩衝液 B。

流速は 500 µL / 分であり、そして 96 分画（各々 0.5 mL を含有する）を、5 から 100% 緩衝液 B への濃度勾配の間に集めた。

【0081】

実施例 9：サンプルの質量分析

質量分析のため、ペプチドの典型的陽性イオンスペクトルを MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間）質量分析計で生み出した。適した MALDI-TOF 質量分析計は、中でも、PerSeptive Biosystems, Framingham, USA (Voyager-DE, Voyager-DE PRO 又は Voyager-DE STR) 又は Bruker Daltonik, Bremen, Germany (BIFLEX) により製造されているものである。ペプチドに適した典型的マトリックス物質は、3, 5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸、アルファ - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸及び 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸のような有機酸を含んでなるマトリックス物質である。MALDI サンプル調製のため、マトリックスとしてアルファ - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸及びコマトリックスとして 0.1% TFA 含有アセトニトリルに溶解された、6 - デスオキシ - 1 - ガラクトースを使用した。質量分析キャリアプレート上にスポットされた、7.5 µL 血漿又は 1000 ~ 5000 のインビトロ培養細胞又は 80 µg の腫瘍組織又は 30 µL の細胞培養上清に相当する、逆相クロマトグラフィーにより得られた凍結乾燥等価物を、ペプチド及び / 又はタンパク質を測定するために使用した。分画化され、凍結乾燥されたサンプルを 15 µL のマトリックス溶液に溶解した。例えば、10 g / L の α - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸及び 10 g / L の L (-) フコースを含有するこのマトリックス溶液を、容量 (v/v) で 49 : 49 : 1 : 1 の比のアセトニトリル、水、トリフルオロ酢酸 (TFA) 及びアセトンから成る溶媒混合物に溶解した。0.3 µL のこのサンプル溶液を MALDI キャリアプレートに移し、乾燥させたサンプルを PerSeptive Biosystems からの Voyager-DE STR MALDI 質量分析計で分析した。測定は、delayed extraction (商標) を伴うリニアモードで行った。MALDI-TOF 質量分析計は、ペプチドが質量分析計の動的測定範囲内である（それ故検出器飽和が避けられる）濃度で存在するとすれば、ペプチド、例えば、本発明のペプチドを定量することに用いることができる。個々のペプチド及び / 又はタンパク質を定量する MALDI 質量分析計の能力は、50 ~ 800 pmol の既知の濃度の、ニューロテンシンのようなペプチドを、血漿サンプルのような複雑な生物学的サンプルへ添加することにより確認した。続いてこれらのサンプルを逆相クロマトグラフィーにより分離し、添加したペプチドを含有する分画を、実施例に記載したように質量分析計で分析した。例えば、ニューロテンシンペプチドの MALDI 質量分析シグナル強度と血漿サンプルに添加したニューロテンシンペプチドの量の間には直線的相関があり、MALDI 質量分析は、血漿のような複雑なサンプル中のペプチドを定量的に決定するために適していることを示している（図 1）。

【0082】

実施例 10：ペプチド同定

異なって発現されたペプチドの検出は、減法ペプチドディスプレイマップ及び相関分析の計算により達成した。腫瘍を有しないマウスの血漿と比較して、腫瘍を有するマウスからの血漿のペプチドディスプレイマップで大量に現れる選択されたペプチド、又はマウス

10

20

30

40

50

で増殖した H T C - 1 1 6 結腸癌腫瘍で現れる、又はインビトロ培養 H T C - 1 1 6 結腸癌細胞の細胞週出物で現れる、又はエストラジオール陽性乳癌サンプルと比較してエストラジオール陰性からの原発性乳癌試料で異なった量で存在するペプチドを E S I - q T O F シークエンシング (PE Applied Biosystems, Framingham, USA) により分析した。当業者には既知の様式で、特異的 m/z (質量/電荷) 値に基づいて、質量分析計中でペプチドイオンを選択した。これらの選択されたイオンは次ぎに衝突ガス (例えば、ヘリウム又は窒素) で衝突エネルギー (20 - 40 eV) を供給することにより断片化し、生じたペプチド又はタンパク質の断片を質量分析計中の積分分析ユニットで検出し、そして相当する m/z 値を決定した (タンデム質量分析計の原理)。ペプチドの断片化挙動は、ペプチドの明確な同定を可能にする。例えば、質量分析を四重極 - T O F (飛行時間) シークエンシング (Q S t a r - P u l s a r モデル) により、又は E S I - q T O F シークエンシング (両方とも、PE Applied Biosystems, Framingham, USA より) により行うことができる。生じたペプチド断片スペクトルは、生成物イオンスキャンモードの *n a n o S p r a y* を使用して検出した (スプレー電圧 950 V、衝突エネルギー 20 ~ 40 eV)。サンプル当たり 200 までのスキャンを蓄積した。電荷状態デコンボリューションは *B i o A n a l y s t* プログラムパッケージ (PE Applied Biosystems) の *B a y e s i a n* 再構築ツールを使用して実行し、デアイソトピング (*d e i s o t o p i n g*) は *V o y a g e r 5 . 1* ソフトウェア (PE Applied Biosystems) により達成した。質量スペクトルは *M A S C O T* ジェネリックファイルフォーマットで保存し、*M A S C O T 1 9* データベース検索エンジン (Matrix Science, London, UK) へ提出した。検索したデータベースは *S w i s s P r o t* (Version 39.6, www.expasy.ch) 及び *M S D B* (Version 010721, EBI, Europe) であった。加えて、このペプチドシークエンシング法は、タンパク質及びペプチドの生物学的活性の調節にしばしば関与するリン酸化又はアセチル化のようなアミノ酸修飾の同定も可能にする。

10

20

【0083】

組織標本の単一 H P L A 分画の *M A L D I - P S D - M S* 測定も、*V o y a g e r T o F* 質量分析計 (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) を使用して実施した。

実施例 11: データ分析

実施例 7 又は 8 で記載したような分画化に続いて、各分画を実施例 9 に記載したように *M A L D I* 質量分析により個々に分析し、各サンプルについて 96 の質量スペクトルを生じた。これら 96 の質量スペクトルをいわゆるペプチドディスプレイに電子的に合併した。これらペプチドディスプレイの x 軸は分子量を示し、y 軸は分画番号を示し、そしてグレースケール色強度は質量分析シグナル強度を表す。ペプチドディスプレイのデータはバックグラウンドノイズについて調整することにより再加工することができ、異常値は分析から除くことができる。ペプチドディスプレイ間の相違を、電子的にお互いに差し引くことにより、及び / 又はシグナルの相関分析により計算した。相関分析については、特定の閾値より上のすべてのシグナルを、同一の特定のシグナル強度の閾値より上のいずれかの他のシグナルに対する相関について試験した。異なった (相対的) 濃度のペプチド及び / 又はタンパク質の検出は、比較すべきサンプルからの質量分析データ (シグナル強度) との比較、即ち、移植されたヒト結腸癌細胞株 H C T - 1 1 6 を有する、又は移植された細胞株を有しないマウスからの *S C I D* マウス血漿、又はエストラジオールレセプター陽性乳癌細胞からの組織抽出物と比較されたエストラジオールレセプター陰性乳癌細胞から調製された原発性ヒト乳癌組織抽出物、により行われた。加えて、ペプチドディスプレイを、結腸癌細胞株 H C T - 1 1 6 のインビトロ培養細胞から、及び *S C I D* マウスから単離された H C T - 1 1 6 腫瘍組織から発生させた。ペプチドディスプレイは約 1000 ~ 2300 の非重複性ペプチド及び / 又はタンパク質シグナルを与えた。異種移植片 (移植されたヒト H C T - 1 1 6 結腸腫瘍細胞株) に明瞭に由来する多様なペプチド及び / 又はタンパク質シグナルが *S C I D* マウスの血漿中で同定された。これらのペプチド及び / 又はタンパク質は、異種移植片移植 *S C I D* マウスの血漿に検出されたが、腫瘍細胞の代わりに *P B S* を注射した対称マウスでは検出されなかった。加えて、これら多様なペプチドの

30

40

50

いくつかは、インビトロ培養 HCT - 116 細胞、及び SCID マウスから単離された HCT - 116 腫瘍組織においても同定された。エストラジオール陽性及び陰性原発性乳癌組織の比較もペプチドシグナルにいくらかの相違を与えた。両方の実験組み立てから、プロチモシンアルファ (PTA) の N 末端に由来する特定のペプチドの同定を生じ、これら PTA ペプチドのいくつかは両方のシステムで同定された。

【0084】

実施例 12 : PTA - RNA の単離及び RT - PCR RNA 抽出及び RT - PCR を使用する半定量的決定

原発性ヒト乳癌及び健康な近隣組織を、バイオプシ又は腫瘍組織の手術的除去の間に集めた。この研究における原発性ヒト組織の使用は、Medizinische Hochschule Hannover, Germany の倫理委員会により承認され、すべての患者から、この研究における彼らの組織の使用についての文書による承認を得た。

【0085】

3 から 5 の乳組織の 10 μ m 切片をパラフィンブロックから切り出し、1.5 ml 反応チューブ内に移した。切片を、4 mol/L グアニジンイソチオシアネート、30 mmol/L トリス HCl (pH 7.6)、2% サルコシル、0.1 mol/L ベータ - メルカプトエタノール及び 5 mg プロテイナーゼ K を含有する溶液中、サーモシェーカー (Eppendorf, Germany) を激しく攪拌し、55 で一夜インキュベートした。消化されないパラフィンを分離後、遠心分離及び有機抽出 (フェノール/クロロホルム) により、少なくとも 20 で 24 時間、RNA 坦体としてイソプロパノール及びグルコーゲンで水性相から全 RNA を沈殿させた。その後、RNA 濃度を分光光度的に測定した (Beckmann, USA)。DNA 夾雑を減じるための DNase 処理後、全 RNA (1 μ g) を、20 μ l の容量で製造元のプロトコルに従い、250 ng のランダムヘキサマー (Amersham Pharmacia) 及び 200 単位の Superscript II RNase - 逆転写酵素 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) を使用して、相補 DNA (cDNA) に転写した。リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT - PCR) を ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で実施した。PTA 及びハウスキーピング遺伝子ベータグルコニダーゼ (b - GUS) についての PCR プライマーを、Primer Express ソフトウェア バージョン 1.0 (Applied Biosystems) を使用して設計した。PTA mRNA 転写体レベルの定量は、蛍光ラベルとして SYBR - Green を使用して実施した。ハウスキーピング遺伝子ベータグルコニダーゼは、転写レベルを規格化するための基準として使用した。各 PCR 反応の最終容量は 25 μ l、1x Platinum (商標) - Taq 反応緩衝液、1 μ mol/L ROX (インビトロゲン)、200 μ mol/L の各 dATP、dCTP、dTTP、dGTP、0.625 U Platinum (商標) - Taq (インビトロゲン)、400 nmol/L の各プライマーを含有、及び 2 μ l の 1:10000 希釈 SYBR - Green (Molecular Probes, Invitrogen) であり、MgCl₂ 濃度は PTA について 1, 5 mM 及び b - GUS について 2, 5 mM であった。反応混合物は 95 で 5 分、前加熱し、95 で 30 秒を 45 サイクル、60 で 30 秒及び 72 で 30 秒が続いた。測定されたデルタ CT 値 [CT (標的) - CT (参照)] を ER+ 及び ER- サンプル間で比較した。使用されたプライマーは、PTA について

PTA フォワードプライマー GAGGCAGAAAATGGAAGAGACG 配列番号 16

PTA リバースプライマー CTCATTGTCAGCTCCTGC (配列番号 17) であり、

及び b - GUS について :

b - GUS フォワードプライマー CTCATTTGGAATTTTGCCGATT、(配列番号 18)

b - GUS リバースプライマー CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA、(配列番号 19)

であった。

【0086】

リアルタイム RT - PR は、PTA mRNA のコード領域のヌクレオチド 76 ~ 153 を表している PTA mRNA の内部断片の増幅を生じた。

この実験の結果は、ハウスキーピング遺伝子 b - G U S と比較して、エストラジオールレセプター陽性及び陰性癌細胞間で P T A m R N A には著しい相違がないことを示している (図 1 1 を参照されたい) 。

【 0 0 8 7 】

実施例 1 3 : エストラジオールレセプター、プロゲステロンレセプター及びレグマインの組織切片の免疫組織学

腫瘍組織包埋パラフィンの 2 μ m 切片をキシレンで脱ワックスし、計量的アルコールで再水和し、エピトープ修復を電子レンジで実施した (2 0 分 ; 1 0 0 、 1 0 m M クエン酸ナトリウム、p H 6 . 0) 。切片を Tecan Genesis Autostainer (ThermoShandon, Frankfurt a. M., Germany; Tecan, Deisenhofen, Germany) 中、S h a n d o n カバープレートを使用して染色した。組織ペルオキシダーゼ活性を、3 % 過酸化水素と 8 分のインキュベーションによりブロックした。エストラジオールレセプターのための一次抗体 (抗体 6F11, Novacastra Laboratories Ltd, Newcastle, Great Britain) を 1 : 2 0 に希釈した : レグマイン抗体は R&D Systems, Minneapolis, MN, USA から購入し、1 : 2 5 に希釈した。検出のためには、触媒シグナル増幅技術 (CSA, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) を使用した。新規フクシンが色素源として働き、ヘマラウンは対比染色として働いた。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 8 】

【 図 1 】 5 0 ~ 8 0 0 p m o l のニューロテンシンを血漿サンプル内に導入し、続いて逆相クロマトグラフィー (R P - クロマトグラフィー) により分離し、ニューロテンシンを含有する分画を実施例に記載したように質量分析法により分析した。ニューロテンシンの M A L D I 質量分析シグナル強度 (y - 軸) と、血漿サンプルに加えられたニューロテンシンペプチドの量 (x - 軸) 間に直線関係があり : M A L D I 質量分析は、血漿のような複雑なサンプル中のペプチドを定量的に決定するのに適していることを示している。

【 図 2 】 エストラジオールレセプター陽性 (E R +) 及び陰性 (E R -) 乳癌腫瘍サンプル中で測定された P T A 2 - 2 9 (= T A 1) 及び P T A 2 - 3 6 (= T A 1 1) の M A L D I シグナル強度の B o x - w h i s k e r プロット。y 軸は、任意単位でのペプチドの M A L D I シグナル強度を示している。

【 0 0 8 9 】

図中のボックス、即ち、カラムは、各々の M A L D I シグナル強度の 5 0 % が観察される M A L D I シグナル強度の範囲を含んでいる。ボックスから始まっている線及び上方及び下方の指示 (ウィスカー) は、各々の場合において、最も高いシグナル強度 (上部 4 分の 1) を示す、2 5 % の測定が観察される範囲を示しており、最も低いシグナル強度 (下部 4 分の 1) を示す、2 5 % の測定が観察される範囲を示している。カラム中の実線は中央値を示し、カラム中の波線は平均値を示している。両方のペプチド、P T A 2 - 2 9 及び P T A 2 - 3 6 とともに、エストラジオールレセプター陰性乳癌腫瘍サンプルにおいて、増加した量で存在する。

【 図 3 】 図は、原発性ヒト乳癌腫瘍組織の R P - クロマトグラフィーにより得られた個々の分画の質量スペクトルを「ゲル様」ビューで示している (M A L D I - シグナル強度をグレースケールカラーに変換した) 。y 軸は M A L D I シグナル強度を表し、x 軸はダルトンでの分子量を表している。図下部の矢印及び上部の矢印はシーケンシング後、N 末端アセチルセリン残基を有し、ヒトプロチモシンアルファ (P T A) のアミノ酸残基 2 ~ 2 9 に対応する (= T A 1 、図 9 を参照されたい、配列番号 1 1) 、P T A の断片として同定された問題のペプチドを表しているピークを示している。N - 末端アセチル修飾のないこのペプチドの理論的モノアイソトピック質量は、3 0 6 5 . 5 ダルトンであり、N 末端修飾は 4 2 ダルトンが加わり、3 1 0 7 . 5 ダルトンの N 末端アセチル化ペプチドの理論的質量を生じ、それは実験的に決定された 3 1 0 8 ダルトンの質量と完全に一致した。このシグナルはエストラジオールレセプター陰性 (E R -) 乳癌腫瘍のサンプル中に存在したが、エストラジオールレセプター陽性 (E R +) 乳癌腫瘍では、不存在か又は非常に低かった。図中に示されているように、4 つのデータセットを異なった数の E R + 及び E

R - 腫瘍サンプルで測定した。データセット 1 及び 2 : 28ER+ 及び 28ER-、データセット 3 : 8ER+ 及び 8ER-、データセット 4 : 18ER+ 及び 20ER-。

【図 4】図 4 は、エストラジオールレセプター陰性乳癌腫瘍 (ER-) からの、及びエストラジオールレセプター陽性乳癌腫瘍 (ER+) からの組織サンプルのウェスタンブロットを示している。抗体はプロチモシンアルファ (PTA) の N 末端のエピトープを認識し、及び結果的に完全 PTA、ならびに PTA 2 - 29 又は PTA 2 - 36 のような PTA 断片を認識する。エストラジオール陰性癌サンプル (ER-) のみに、PTA 断片が検出され、一方、両方のサンプルで完全 PTA (約 10 kDa) がほとんど等しい量で存在していた。

【図 5】図 5 は SCID マウスにおける、HCT - 116 腫瘍細胞の増殖時間 (x 軸) の関数としての腫瘍重量 (y 軸) を示している。HCT 116 は、エストラジオール刺激では増殖しないヒト結腸癌細胞株である (Biochem Biophys Res Commun., 2000, 270:425-31)。腫瘍重量はグラムで示されており、腫瘍の増殖時間は日数で与えられている。腫瘍細胞注射後、第 14 日目又は第 34 日目に測定された個々の腫瘍の測定値は、黒丸で示されている。時間に対する腫瘍重量の相関 r は 0.90 であった。

【図 6】この図は、PTA のアミノ酸残基 2 ~ 37 (図 9、配列番号 1 を参照されたい) に相当する PTA 断片のピークの MALDI シグナル強度に対する、個々のマウスの腫瘍の湿潤重量を示している。x 及び y は対数フォーマットであり、y 軸は任意単位での MALDI シグナル強度を表しており、一方、x 軸は腫瘍重量を表している。MALDI シグナル強度対腫瘍重量の相関係数 r は、 $r = 0.97$ であった。

【図 7】ヒト HCT - 116 結腸癌細胞を注射して 34 日後に得られた SCID - マウス血漿の RP - クロマトグラフィーにより得られた個々の分画の質量スペクトルを「ゲル様」ビューで示している (MALDI - シグナル強度をグレースケールカラーに変換した)。y 軸は MALDI シグナル強度を表し、x 軸はダルトンでの分子量を表している。図下部の 2 つの矢印は問題とする 2 つのペプチドを表しているピークを示している (理論的モノアイソトピック質量は 3788 及び 3845 ダルトンであり；実験的質量は 3790 及び 3846 ダルトンであった)、それはシ - クエンシング後、ヒトプロチモシンアルファ (PTA) のアミノ酸残基 2 ~ 36 及び 2 ~ 37 に対応する (配列については図 9 を参照されたい、配列番号 12 及び 1)、PTA の断片として同定されたペプチドを表しているピークを示している。これらのシグナルは HCT - 116 腫瘍を有する SCID マウス及びインビトロ培養 HCT - 116 腫瘍細胞のサンプル中では存在したが、HCT - 116 腫瘍を有しない SCID マウスの血漿サンプル中では存在しないか又は非常に低かった。以下のサンプルの MALDI シグナル強度が以下の順序で示されている：14 の個々に測定された HCT - 116 腫瘍を有しない SCID マウスの血漿サンプル；9 の個々に測定された HCT - 116 腫瘍を有する SCID マウスの血漿サンプル；8 の個々に測定された SCID マウスから単離された腫瘍組織から調製された HCT - 116 細胞抽出物のサンプル及び 1 つのインビトロ培養 HCT - 116 細胞から調製された HCT - 116 細胞抽出物のサンプル。

【図 8】MALDI シグナル強度と同定された PTA 断片を相関付けるさらなるペプチドの分析。乳腫瘍サンプルから得られたすべての測定された MALDI 質量シグナル強度と同定された PTA 断片 PTA 2 - 29 の MALDI シグナル強度との相関を分析した。 $r = 0.997$ の相関係数 (非常に高い相関) を有するペプチドをさらなる分析のために選択した。相関するペプチドの質量及び分画を、これらの相関するペプチドが他の PTA 断片であるかどうかを予測するため、特殊化されたコンピュータソフトウェア及びアルゴリズムにより分析した (EP 1553515 A1、出願番号：EP 04000170.3、WO 2005/069187 A2)。この方法を使用して以下の PTA 断片が同定された：PTA 2 - 36、PTA 2 - 37 及び PTA 4 - 36。PTA 2 - 36 及び 2 - 37 配列の質量及び分画番号は、それらの生物体で増殖するヒト結腸癌腫瘍 (細胞株 HCT - 116) を有する SCID マウスからの血漿から同定されたように、PTA 2 - 36 及び PTA 2 - 37 の対応するデータに一致した。

10

20

30

40

50

【図 9】ヒトプロチモシンアルファ (PTA = 配列番号 14) と種々の PTA 断片のアミノ酸の配列アラインメント。左から右へ：配列、配列に関するコメント、及び配列に対応する配列番号、が示されている。配列番号 14 は PTA の完全アミノ酸に対応する。インビボ PTA は通常、その N 末端メチオニン残基なしで存在する、配列番号 13。完全 PTA 配列の上に PTA 配列の既知の多形が示されており、それらはヒト多形 (括弧で囲まれている) 又はマウス、ラット、ブタ、ウシの PTA 配列と比較したヒト PTA 配列の多形である。「-」は欠失した又は失われたアミノ酸残基である。もし一つ以上のアミノ酸又は「-」又はそれらの組み合わせがその間にスペースなしで書かれていたら、これらの多形は同時に一つ以上のアミノ酸残基に影響している単一多形である。一つより多くの多形の組み合わせが可能である。完全 PTA 配列 (配列番号 14) の直ぐ下に、プロテアーゼレグマインの 3 つの切断部位「^」が示されており、それはアミノ酸 29 / 30 間、36 / 37 間 (文献で既知である) 及び本明細書で示されたデータに基づいて予測された 44 / 45 位の新規レグマイン部位で PTA を切断する。完全 PTA 配列の下に、すでに既知である (配列番号 11 及び 12)、本明細書に示された研究で同定された (観察された) (配列番号 1、2、3、4、11、12)、観察された配列及び他の情報に基づいて予測される (配列番号 5 ~ 7) 及び仮定上のペプチド (配列番号 8 ~ 10) を表す、PTA 断片も示されている。「*」は N - 末端セリンがアセチル化されていると同定 / 予測されたものを示しており、「観察された 2x」は、このペプチドが乳癌及び結腸癌サンプルで同定されていることを示している。ブレースホルダー r1 ~ r6 は、PTA の配列の一部を表している。r1 は PTA のアミノ酸 1 - 8 に対応する 0 ~ 8 アミノ酸を表しており、r2 は PTA のアミノ酸 17 - 28 に対応する 0 ~ 12 アミノ酸を表しており、r3 は PTA のアミノ酸 1 - 22 に対応する 0 ~ 22 アミノ酸を表しており、r4 は PTA のアミノ酸 31 - 35 に対応する 0 ~ 4 アミノ酸を表しており、r5 は PTA のアミノ酸 1 - 29 に対応する 1 ~ 29 アミノ酸を表しており、及び r6 は PTA のアミノ酸 38 - 52 に対応する 0 ~ 15 アミノ酸を表している。r1 ~ r6 は、r1 ~ r6 に対応する PTA の配列を有する配列番号 8 ~ 10 で配列を伸長させる。

【図 10】安定性を証明するため、及び PTA 断片が血漿中で定量的に測定可能であることを証明するため、以下の実験を実施した。血漿中、PTA - 2 ~ 37 (PTA のアミノ酸残基 2 ~ 27 を表している) の 10 及び 800 pmol / L の最終濃度を生じる PTA - 2 ~ 37 の種々の希釈液を調製し、逆相クロマトグラフィー及び続いて質量分析にかけた。示されているのは、分画 44 の 2200 ~ 3600 ダルトンの範囲の分子量であり、3845 ダルトンの分子量 (m / z) (矢印参照) を有する PTA 断片 PTA 2 - 37 を含んでなる。質量分析シグナル強度は、濃度依存性様式で明白に上昇する。

【図 11】図 11 はエストロジオールレセプター - 陰性 (ER-) 及びエストロジオールレセプター - 陽性 (ER+) ヒト乳癌組織サンプルから単離された PTA mRNA の半定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を示している。RT-PCR シグナルの規格化のため、その発現が細胞のエストロゲンレセプター状態により通常影響されないベータ - グルココニダーゼ (b - GUS)、ハウスキーピング遺伝子のシグナルを測定した。示されているのは、ER- 及び ER+ 乳癌組織サンプルに由来する RNA サンプルで測定された相対 RT-PCR シグナル (PTA の RT-PCR のシグナル / b - GUS の RT-PCR のシグナル) である。

【図 12】図 12 は本発明の新規発見及びこれらの発見を説明している対応する理論をスキーム的に要約している。エストロジオールレセプター (ER) 及びプロチモシンアルファ (PTA) 断片の存在又は不存在 (又は量) に基づいて、癌サンプルを 4 つの異なった段階、段階 A ~ D に分類することが可能であり、その段階は連続的 (段階 A から段階 D へ) により悪い予後を有し、より攻撃的な癌治療法を必要とする。前記 PTA 断片の発生の原因となると提案されている、追加のメタデータ、プロテアーゼレグマインの発現データ、プロゲステロンレセプター (PR) について陽性のサンプルのパーセンテージ、及び癌療法後に再発を患う癌患者のパーセンテージが示されている。表の一番上は、基礎となる理論に従った事象、一つの癌段階から次の段階転移仲介：段階 A から B への転移は ER

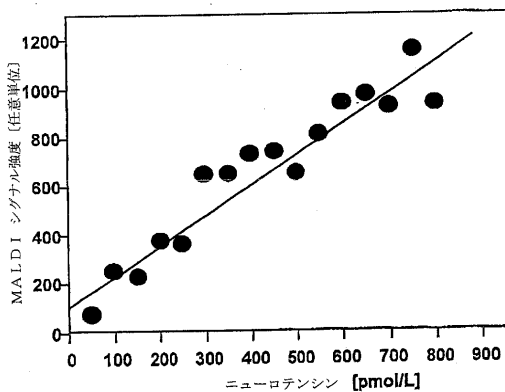
レセプターの機能の消失を示すことができ、ERレセプターはまだ癌細胞で発現されている、BからCへの転移は、ERの発現の消失を示し、そしてCからDへの最終転移はLOH 14q32.1の遺伝子消失を示し、その座位は、中でも、プロテアーゼ、レグマインをコードし、そのプロテアーゼは我々により、PTA断片の発生及びPTA断片の原因であると考えられている。列「実施された抗ER療法」は、現在まで、癌細胞の表現型に基づいて、抗内分泌癌療法で治療される患者を示し、そして最後に、列「推奨される抗ER療法」は、本発明の新規発見に基づいている。

【0090】

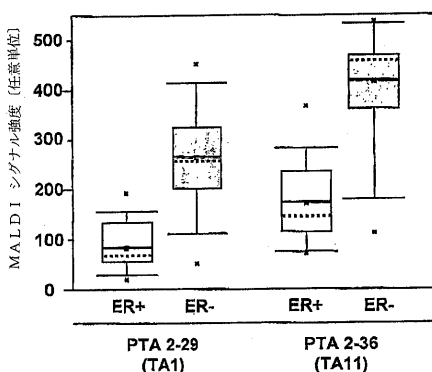
再発のパーセンテージは段階Aについては最初の癌の診断後3.7年、段階Bについては3.0年、段階Cについては3.4年、及び段階Dについては最初の癌の診断後4.3年と計算された。

10

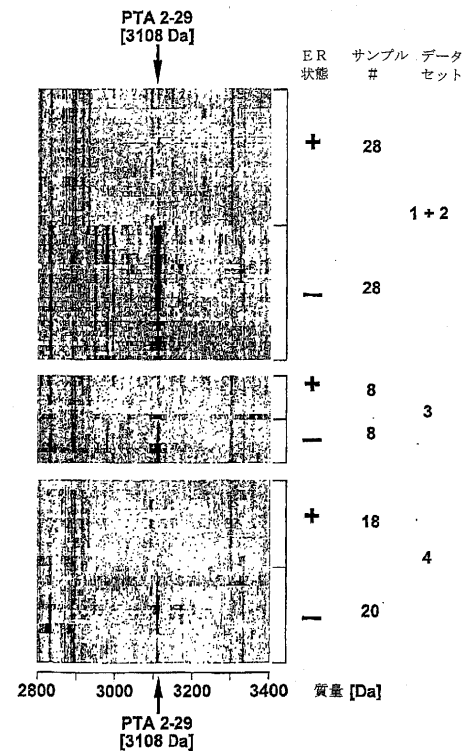
【図1】



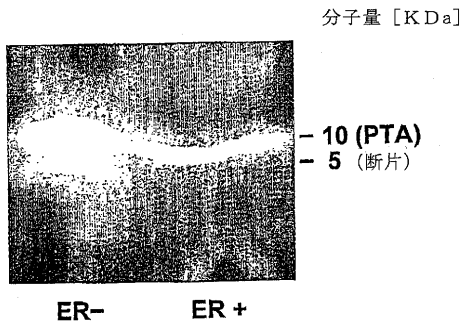
【図2】



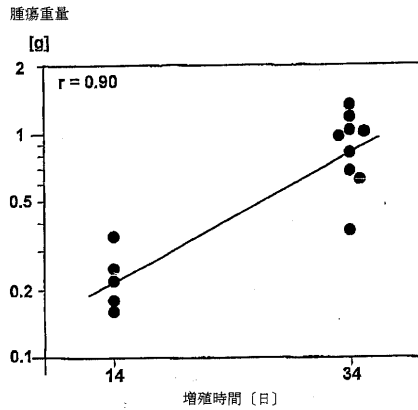
【図3】



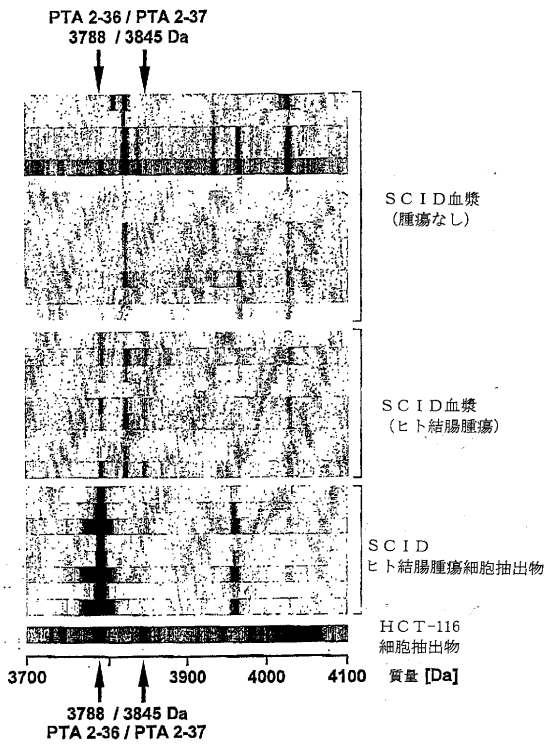
【図 4】



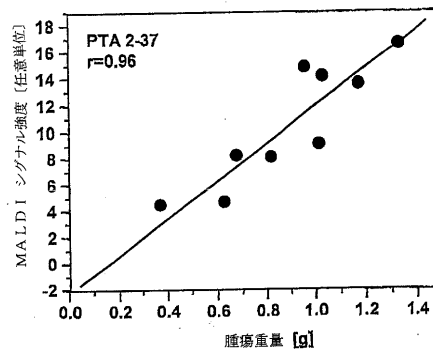
【図 5】



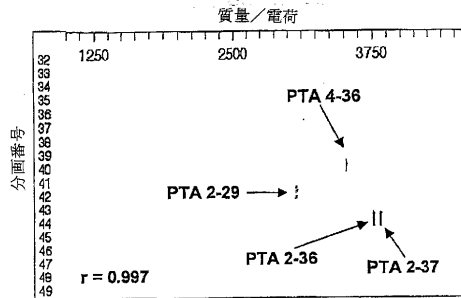
【図 7】



【図 6】



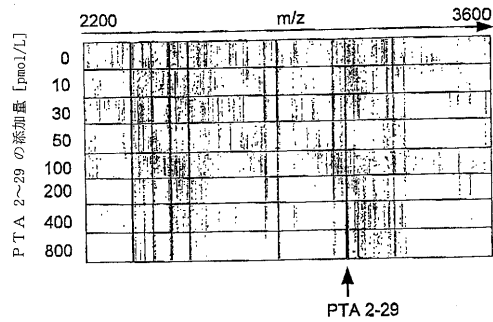
【図 8】



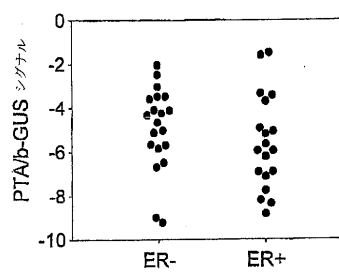
【 図 9 】

[illegible]

【 図 1 0 】

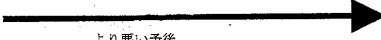


【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

理論	ERの機能の消失		ERの発現の消失		LOH 14q32.1の消失 (レグマインの消失)	
	A	B	C	D		
癌状態						
個体 (n)	32	7	37	4		
ER	+	+	-	-		
P T A-断片	S -	+	+	-		
レグマイン	+	+	+	- ?		
PR	79 %	42 %	0 %	0 %		
再発 (3~4 年後)	0 %	0 %	19 %	75 %		
抗ER療法						
実行された 抗ER療法	+	+	-	-		
推奨された 抗ER療法	+	-	-	-		



より悪い予後
より攻撃的な療法が必要とされる

【配列表】

2008522601000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. G01N33/574 A61P35/00	C07K14/575	C07K16/26 C12N15/00 C12N5/00
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) G01N C12K C12N		
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, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online] 8 February 2002 (2002-02-08), "Alpha prothymosin ovarian tumour marker protein, SEQ ID NO:2." XP002329741 retrieved from EBI accession no. GSP:ABB50257 Database accession no. ABB50257 the whole document	16-19
X	----- DATABASE Geneseq [Online] 8 March 1996 (1996-03-08), "Thymosin alpha-1 peptide analogue #1." XP002328545 retrieved from EBI accession no. GSP:AAR76895 Database accession no. AAR76895 the whole document ----- -/-	16-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 March 2006		Date of mailing of the international search report 29. 06. 2006
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 Boiangiu, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/013244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 1 November 1996 (1996-11-01), "Prothymosin alpha." XP002328546 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q15203 Database accession no. Q15203 the whole document -----	16-19
X	DATABASE Geneseq [Online] 22 August 2002 (2002-08-22), "Human ovarian antigen HPDPY83, SEQ ID NO:4017." XP002328542 retrieved from EBI accession no. GSP:ABP42885 Database accession no. ABP42885 the whole document -----	16-19
X	DATABASE UniProt [Online] 1 November 1996 (1996-11-01), "Prothymosin-alpha (Fragment)." XP002328547 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q63452 Database accession no. Q63452 the whole document -----	16-19
X	DATABASE USPTO Proteins [Online] 18 December 2003 (2003-12-18), "Sequence 7527 from patent US 6639063." XP002370421 retrieved from EBI accession no. USPOP:AAR74982 Database accession no. AAR74982 the whole document -----	16-19
X	DATABASE Geneseq [Online] 8 March 1996 (1996-03-08), "Thymosin alpha-1 peptide analogue #3." XP002370422 retrieved from EBI accession no. GSP:AAR76897 Database accession no. AAR76897 the whole document -----	16-19
X	DATABASE Geneseq [Online] 8 March 1996 (1996-03-08), "Thymosin alpha-1 peptide analogue #10." XP002328543 retrieved from EBI accession no. GSP:AAR76904 Database accession no. AAR76904 the whole document -----	16-19
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online] 28 November 1991 (1991-11-28), "Thymosin-alpha-11." XP002328544 retrieved from EBI accession no. GSP:AAP50187 Database accession no. AAP50187 the whole document -----	16-19
X	DATABASE Geneseq [Online] 9 October 2001 (2001-10-09), "Peptide #1754 encoded by probe for measuring breast gene expression." XP002328549 retrieved from EBI accession no. GSP:AAM03072 Database accession no. AAM03072 the whole document -----	16-19
X	DATABASE UniProt [Online] 1 March 2004 (2004-03-01), "Prothymosin alpha (Fragments)." XP002328548 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q7M2Z5 Database accession no. Q7M2Z5 the whole document -----	16-19
X	DATABASE Geneseq [Online] 21 October 2004 (2004-10-21), "Rat nerve cell death inhibitor prothymosin alpha 1 peptide, SEQ ID 4." XP002370425 retrieved from EBI accession no. GSP:ADQ91116 Database accession no. ADQ91116 the whole document -----	17
X	DATABASE Geneseq [Online] 21 October 2004 (2004-10-21), "Mouse nerve cell death inhibitor prothymosin alpha 1 protein #2." XP002370442 retrieved from EBI accession no. GSP:ADQ91149 Database accession no. ADQ91149 the whole document -----	16-19
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online] 29 June 2001 (2001-06-29), "Amino acid sequence of a human polypeptide designated PTMA-4." XP002370443 retrieved from EBI accession no. GSP:AAB67861 Database accession no. AAB67861 the whole document	16-19
A	MARTINI PAOLO G V ET AL: "Regulation of prothymosin alpha gene expression by estrogen in estrogen receptor-containing breast cancer cells via upstream half-palindromic estrogen response element motifs" ENDOCRINOLOGY, vol. 142, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 3493-3501, XP002328539 ISSN: 0013-7227 page 3493, right-hand column, paragraph 1 - left-hand column, paragraph 1 page 3496; figure 3 page 3497; figure 4 page 3499, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 page 3499, paragraph 5 page 3500; figure 8	1-5,7-25
A	US 5 248 591 A (PUENTE ET AL) 28 September 1993 (1993-09-28) the whole document	1-5,7-25
A	US 2003/224467 A1 (OSBORNE C. KENT ET AL) 4 December 2003 (2003-12-04) paragraphs [0013], [0016], [0022], [0069]; claim 1	1-5,7-25
A	US 2003/064385 A1 (DRESSMAN MARLENE MICHELLE ET AL) 3 April 2003 (2003-04-03) paragraphs [0010], [0014] - [0018], [0022] - [0025], [0029] - [0032]; claim 1	1-5,7-25
A	SARANDESES CONCEPCION S ET AL: "Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha1 and thymosin alpha11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 15, 11 April 2003 (2003-04-11), pages 13286-13293, XP002328541 ISSN: 0021-9258 abstract	8-15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TRAUB FRANK ET AL: "Peptidomic analysis of breast cancer reveals a putative surrogate marker for estrogen receptor-negative carcinomas." LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY. MAR 2006, vol. 86, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 246-253, XP002370419 ISSN: 0023-6837 the whole document -----	1-5,7-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/013244**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:

2. ☐ Claims Nos.:
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:

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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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.:

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.:
1-5 and 16-24 (fully) and 7-15 (partially)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP2005/ 013244

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

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

Invention 2: claim 25

diagnosis of cancer

Invention 1.1: 1-5 and 16-24 (fully) and 7-15 (partially)

method of selecting the anti-cancer therapy by determining the amount of a prothymosin-alpha fragment in a sample

Invention 1.2: 6 (fully) and 7-15 (partially)

method of selecting the anti-cancer by determining the expression level of legumain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/013244

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5248591	A	28-09-1993	NONE	
US 2003224467	A1	04-12-2003	NONE	
US 2003064385	A1	03-04-2003	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>		A
<i>A 6 1 K</i>	<i>45/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>45/00</i>		
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>		
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>		D
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/574</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/574</i>		A

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

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100118902

弁理士 山本 修

(72) 発明者 タンメン, ハラルド

ドイツ連邦共和国 3 0 4 4 9 ハノーヴァー, ヴェーバーシュトラッセ 2 4

(72) 発明者 ピヒ, アンドレアス

ドイツ連邦共和国 3 1 3 0 3 ブルグドルフ, エルツェヴェーク 1 5

(72) 発明者 トラオブ, フランク

ドイツ連邦共和国 3 0 1 6 1 ハノーヴァー, ツェラー・シュトラッセ 1 7

(72) 発明者 ヘス, リュディガー

ドイツ連邦共和国 3 0 6 2 9 ハノーヴァー, ボルネーゼー・シュトラッセ 2

(72) 発明者 ランピング, ノルベルト

ドイツ連邦共和国 3 0 1 7 2 ハノーヴァー, ズィーゲスシュトラッセ 8

(72) 発明者 ショルン, カルル

ドイツ連邦共和国 3 0 6 2 7 ハノーヴァー, ヴァールブルグホフ 2

(72) 発明者 クライペ, ハンス

ドイツ連邦共和国 3 0 9 8 2 パッテンセン, ハーゲンカンブ 3 6

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA12 BA80 CA04 CA20 GA27 HA13 HA15

4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ79 QR08 QR48 QR55 QR62 QS25 QS33

QS34

4C084 AA17 NA05 ZB262

4H045 AA10 AA30 BA10 BA17 BA18 BA19 CA40

专利名称(译)	使用PTA肽对癌症患者进行分层		
公开(公告)号	JP2008522601A	公开(公告)日	2008-07-03
申请号	JP2007544832	申请日	2005-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	迪爱甲酸Vie的比奥罗卡奥恩省门的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	Digirabu - 比奥Vie的罗卡奥恩有限公司		
[标]发明人	タンメンハラルド ピヒアンドレーアス トラオブフランク ヘスリュディガー ランピングノルベルト ショルンカルル クライベハンス		
发明人	タンメン,ハラルド ピヒ,アンドレーアス トラオブ,フランク ヘス,リュディガー ランピング,ノルベルト ショルン,カルル クライベ,ハンス		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 G01N33/57415 G01N33/57434 G01N33/57449 G01N2333/5759 G01N2800/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/GA27 4B024/HA13 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA40		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 山本修		
优先权	2004029171 2004-12-09 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

几种类型的癌细胞都经过专门的治疗，因为它们具有特定的特性，例如类固醇依赖性，特别是雌二醇依赖性生长。乳腺癌和结肠癌细胞通常在某种程度上取决于雌二醇介导的生长信号。因此，特别是通过免疫组织学常规检查乳腺癌患者中雌二醇受体的存在。如果存在雌二醇受体，通常会使用抗雌二醇疗法根除肿瘤并预防再次发作。但是，从某种意义上说，这种疗法是行不通的，因此尽早了解这种疗法是有利的，因此不要因任何错误的疗法而浪费时间。因此，需要一种更好的预测标记物来诊断类固醇依赖性癌细胞，这是本发明提供的。胸腺素α (PTA) 可以在乳腺癌和结肠癌患者的组织样本和血浆中进行测定，并表明雌二醇途径是否起作用，因此抗雌二醇疗法是否可能成功。PTA可以作为通过免疫组织学检测雌二醇受体的替代物，可以是监测癌细胞对抗雌二醇治疗的抗性的标志物，并且具有可以从易于获取的患者样本（例如血清或血浆）中确定的优势。要求保护的是PTA肽和核酸，因此的结合剂，测试试剂盒以及诊断和治疗方法及组合物。

