(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-527225
(P2004-527225A)
(43)公表日　平成16年9月9日(2004.9.9)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	C12Q	1/68	ZNAA	2G045
C12N 15/09	C12Q	1/02		4B024
C12Q 1/02	G01N	33/15	Z	4B063
G01N 33/15	G01N	33/50	Z	
G01N 33/50	G01N	33/53	D	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 159 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-546768(P2002-546768)
(86)(22)出願日　平成13年11月28日(2001.11.28)
(85)翻訳文提出日　平成15年5月28日(2003.5.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/044571
(87)国際公開番号　WO2002/044420
(87)国際公開日　平成14年6月6日(2002.6.6)
(31)優先権主張番号　60/253,487
(32)優先日　平成12年11月28日(2000.11.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　591011502
ワイス
Ｗｙｅｔｈ
アメリカ合衆国０７９４０－０８７４　ニュージャージー州マディソン、ファイブ・ジラルダ・ファームズ
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100116311
弁理士　元山　忠行
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】前立腺癌の診断および治療に有用なＳＭＡＲＣ核酸およびポリペプチドの発現分析

(57)【要約】
本発明は、前立腺癌を検出、特定、予防、および治療するための方法に関する。ＳＭＡＲＣマーカーが提供され、その場合に、ＳＭＡＲＣマーカーの１またはそれ以上の発現のレベルの変化が前立腺癌の存在に関連する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象が前立腺癌に罹患しているかどうかを評価する方法であって、
ａ）対象からのサンプル中のマーカーの発現レベルを得ること、ここでマーカーは１またはそれ以上のＳＭＡＲＣマーカーから成る群から選択される；
ｂ）対照サンプル中のマーカーの発現の正常レベルを得ること；
ｃ）（ａ）と（ｂ）を比較すること、
を含み、対象からのサンプル中のマーカーの発現のレベルと正常レベルの間の有意な差が、対象が前立腺癌に罹患していることを示すものであるところの方法。
【請求項２】
マーカーが転写されたポリヌクレオチドまたはその部分に対応する、請求項１記載の方法。
【請求項３】
サンプルが対象から得られる細胞を含むものである、請求項１記載の方法。
【請求項４】
細胞が前立腺から採取されるものである、請求項３記載の方法
【請求項５】
細胞が血液から採取されるものである、請求項３記載の方法。
【請求項６】
サンプル中のマーカーの発現のレベルが、対象におけるマーカーの発現の正常レベルから、少なくとも係数２だけ差がある、請求項１記載の方法。
【請求項７】
サンプル中のマーカーの発現のレベルが、対象におけるマーカーの発現の正常レベルから、少なくとも係数３だけ差がある、請求項１記載の方法。
【請求項８】
サンプルにおけるマーカーの発現のレベルを、マーカーに対応するタンパク質のサンプル中での存在を検出することにより評価する、請求項１記載の方法。
【請求項９】
タンパク質の存在を、タンパク質に特異的に結合する試薬を用いて検出する、請求項８記載の方法。
【請求項１０】
試薬が、抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
サンプル中のマーカーの発現のレベルを、転写されたポリヌクレオチドまたはその部分のサンプル中での存在を検出することにより評価する、請求項１記載の方法。
【請求項１２】
転写されたポリヌクレオチドがｍＲＮＡである、請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
転写されたポリヌクレオチドがｃＤＮＡである、請求項１１記載の方法。
【請求項１４】
転写されたポリヌクレオチドまたはその部分のサンプル中での存在を検出することが、転写されたポリヌクレオチドまたはその部分を増幅することをさらに含む、請求項１１記載の方法。
【請求項１５】
サンプル中のマーカーの発現のレベルを、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でマーカーまたはその部分とアニールする転写されたポリヌクレオチドまたはその部分のサンプル中での存在を検出することにより評価する、請求項１記載の方法。
【請求項１６】
さらに、

ａ）少なくとも２つのＳＭＡＲＣマーカーのサンプル中での発現のレベルを独立に得ること；
ｂ）前立腺癌に罹患していない対照の対象から得た同じタイプのサンプル中の、少なくとも２つのＳＭＡＲＣマーカーのそれぞれの発現の正常レベルを得ること；
ｃ）（ａ）と（ｂ）を比較すること、
を含み、１以上のマーカーの発現のレベルが、マーカーの発現の対応する正常レベルに対して有意に変化していることが、対象が前立腺癌に罹患していることを示すものであるところの、請求項１記載の方法。
【請求項１７】
対象における前立腺癌の進行をモニターする方法であって、
ａ）第１の適当な時点で対象サンプルにおいてマーカーの発現を検出すること、ここでマーカーは、１またはそれ以上のＳＭＡＲＣマーカーまたはその組合せから成る群から選択される；
ｂ）その後の適当な時点でステップ（ａ）を反復すること；および、
ｃ）ステップ（ａ）と（ｂ）において検出された発現のレベルを比較し、それより、対象における前立腺癌の進行をモニターすること、
を含む方法。
【請求項１８】
マーカーが転写されたポリヌクレオチドまたはその部分に対応する、請求項１７記載の方法。
【請求項１９】
サンプルが対象から得られる細胞を含むものである、請求項１７記載の方法。
【請求項２０】
細胞が、前立腺から採取されるものである、請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
細胞が、血液から採取されるものである、請求項１９記載の方法。
【請求項２２】
対象において前立腺癌を阻害する治療の有効性を評価する方法であって、
ａ）治療の少なくとも一部を対象に提供する前に対象から得た第１サンプルにおけるＳＭＡＲＣＤ３の発現を得ること；
ｂ）治療後に対象から得た第２サンプルにおけるＳＭＡＲＣＤ３の発現を得ること；
ｃ）（ａ）と（ｂ）を比較すること、
を含み、第２サンプルにおけるマーカーの発現の、第１サンプルに対して有意に高まったレベルが、治療が対象において前立腺癌を阻害するのに有効であることを示すところの方法。
【請求項２３】
試験化合物が細胞において前立腺癌を誘発する潜在的能力を評価する方法であって、
ａ）試験化合物の存在および不在下に細胞の別個の部分標本を維持すること；および、
ｂ）部分標本のそれぞれにおけるＳＭＡＲＣＤ３の発現を比較すること、
を含み、試験化合物の存在下に維持した部分標本におけるマーカーの発現の、試験化合物の不在下に維持した部分標本に対して有意に低下したレベルが、試験化合物が細胞において前立腺癌を誘発する潜在的能力を有することを示すところの方法。
【請求項２４】
前立腺癌を進行させる危険のある対象において前立腺癌を阻害する方法であって、対象の細胞におけるＳＭＡＲＣＤ３マーカーの発現を阻害することを含む方法。
【請求項２５】
前立腺癌を治療するのに有用な化合物を同定する方法であって、
ａ）試験化合物の存在下における細胞中のＳＭＡＲＣＤ３マーカーの発現レベルを測定すること；および、
ｂ）ステップ（ａ）において測定された発現を、試験化合物の不在下での細胞におけるＳ

ＭＡＲＣＤ３マーカーの発現と比較すること、
を含み、試験化合物の存在下でのマーカーの発現レベルが、試験化合物の不在下でのその発現レベルよりも高い場合に、試験化合物が前立腺癌を治療するのに有用であるところの方法。
【請求項２６】
発現レベルを、マーカーのｍＲＮＡのレベルを測定することにより決定する、請求項２５記載の方法。
【請求項２７】
発現レベルを、マーカーのタンパク質のレベルを測定することにより決定する、請求項２５記載の方法。
【請求項２８】
前立腺癌を治療するのに有用な化合物を同定するための方法であって、
ａ）ＳＭＡＲＤＣＤ３マーカーの活性を測定すること；および、
ｂ）ステップ（ａ）で測定された活性を、試験化合物の不在下でのマーカーの活性のレベルと比較すること
を含み、試験化合物の存在下でのＳＭＡＲＣＤ３マーカーの活性が試験化合物の不在下でのその活性よりも高い場合に、化合物が前立腺癌を治療するのに有用であるところの方法。
【請求項２９】
細胞が前立腺癌細胞である、請求項２８記載の方法。
【請求項３０】
前立腺癌を治療する必要のある患者に、ＳＭＡＲＣＤ３マーカーの発現を増す化合物を投与することを含む、患者において前立腺癌を治療する方法。
【請求項３１】
化合物がＳＭＡＲＣＤ３ｍＲＮＡの発現を増すものである、請求項３０記載の方法。
【請求項３２】
化合物がＳＭＡＲＣＤ３マーカータンパク質の発現を低下させるものである、請求項３１記載の方法。
【請求項３３】
前立腺癌に罹患している対象におけるアンドロゲン除去治療の有効性を決定する方法であって、
ａ）適当な第１時点で、ＳＭＡＲＣＤ３マーカーの発現レベルを対象において検出すること；
ｂ）対象がアンドロゲン除去治療を開始した後のその後の適当な時点で、ステップ（ａ）を反復すること；および、
ｃ）ステップ（ａ）と（ｂ）において検出されたマーカーの発現のレベルを比較すること、
を含み、発現レベルの増加が、アンドロゲン除去治療が低下効力を有するものであることを示すところの方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０００年１１月２８日に出願された、「前立腺癌の診断および治療に有用なＳＭＡＲＣ核酸およびポリペプチドの発現分析」という標題の合衆国仮特許出願第６０/２５３,４８７号の利益を主張する。前記出願の教示するところは、本明細書中に引用により組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
前立腺癌は、癌に関連する死亡の２番目に最も一般的な原因であり、そして本年だけでも推定３７，０００人を死亡させる。雄の哺乳動物においてもっぱら見出される前立腺はい

くつかの調節性ペプチドを産生する。前立腺は、基質細胞および上皮細胞からなり、後者の群は、円柱状の分泌細胞および基底の非－分泌細胞からなる。これらの基底細胞ならびに基質細胞の増殖により、一の一般的な前立腺疾患である良性の前立腺増殖（ＢＰＨ）が引き起こされる。他の一般的な前立腺疾患は、致命的な病態生理学的前立腺癌の最も一般的なものである前立腺癌（ＣａＰ）である。前立腺癌には、前立腺の周辺領域における上皮細胞の悪性の形質転換が関与している。前立腺癌および良性の前立腺増殖は、年とったヒトの男性において高発症率を有する２つの一般的な前立腺疾患である。５５歳を越す４人の男性当たり約１人が、いくつかの形態または他の形態の前立腺疾患に罹患している。

【０００３】

今日まで、正常、良性、および癌の前立腺により合成および分泌される種々の物質が、種々の前立腺疾患の病因の理解を得るためのおよび前立腺疾患の診断における腫瘍マーカーとして用いられている。正常な前立腺により分泌される３つの主なタンパク質またはペプチドは、前立腺酸ホスファターゼ（ＰＡＰ）、前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）、およびヒト精子血漿インヒビン（ＨＳＰＩ）としても知られる前立腺インヒビン（ＰＩＰ）である。ＰＳＡおよびＰＡＰは共に前立腺疾患の検出における腫瘍マーカーとして研究されているが、両者は良性の前立腺増殖（ＢＰＭ）を有する前立腺において高まったレベルを示すので、いずれのマーカーも特異的ではなく、それゆえ使用が制限されている。

【０００４】

利用可能な知識はあるものの、前立腺癌疾患の基礎である遺伝学的基礎およびその進行に関わっている可能性のあるアンドロゲン調節性遺伝子についてはほとんど知られていない。アンドロゲンは前立腺癌の生理において腫瘍な役割をはたすことが知られているが、ホルモン調節の完全な複雑さについては完全には解明されておらず、そしてもっとアンドロゲンに関連するプロセスは解明されている。これらのプロセスの多くは、解明されないでいる、前立腺癌に関連するいくつかの分子が関与している。加えて、該疾患の病因に未だ関係づけられていないいくつかの公知の分子が存在する可能性がある。従って、前立腺疾患に関連している未公知のタンパク質およびそれらをコードしている遺伝子を同定する必要がある。前立腺癌の病因に未だ関連づけられていない公知の分子、特に前立腺癌の診断、予防、および治療のための標的として役立ち得るものを同定する必要もある。

【０００５】

本発明は、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞（例えば、ＬＮＣａＰ細胞系統）におけるアンドロゲン誘導性の多くの遺伝子の発見に部分的に基くものである。これらの遺伝子は、前立腺疾患の検出、診断、および予測に適したマーカーとして役立つ。本発明により、前立腺癌の検出および診断のための方法およびスクリーニングアッセイが提供される。第１のスクリーニングアッセイは、前立腺癌に関係する遺伝子の発現レベルの変化を検出するものである。特に、本発明により、前立腺疾患の検出、診断および予測のための遺伝子マーカーとしての、クロマチン（ＳＭＡＲＣ）例えば、ＳＭＡＲＣＤ３およびＳＭＲＣＤ１などのＳＷＩ／ＳＮＦ関連マトリックス関連アクチン依存性レギュレーターの使用が提供される。クロマチンは、発生中に活発に再構成される。クロマチンの再構成により、遺伝子の転写活性が進行すると考えられる。ＳＷＩ/ＳＮＦ複合体がクロマチンと相互作用し、そして、転写活性因子の機能を促進する(Peterson et al., (1995) Trends Biochem. Sci. 20: 143-146を参照されたい）。哺乳動物のＳＷＩ／ＳＮＦ－様複合体は、ＢＲＧ１結合因子（ＢＡＦ）と呼ばれる９－１２個までのタンパク質サブユニットから成る複合形態で存在する。本発明により、アンドロゲンの存在下でアップ－レギュレートされる（増加したｍＲＮＡおよびタンパク質発現/活性化/アゴナイズ）、またはダウンレギュレートされる（低下したｍＲＮＡおよびタンパク質発現/抑制化/アンタゴナイズ）ＳＭＡＲＣマーカーの使用が提供される。特に、本発明により、アンドロゲンの存在下でアップレギュレートされることが見出されたＳＭＡＲＣＤ３が提供される。

【０００６】

本発明の一の具体例により、対象からのサンプル中のマーカーの発現のレベルを対照サンプル中のマーカーの発現の正常レベルと比較することにより（ここでマーカーは、制限さ

れるものではなくＳＭＡＲＣＤ３を含むＳＭＡＲＣポリヌクレオチドの群から選択される）、対象が前立腺癌を患っているかどうかを評価する方法が提供されるが、ここで、対象からのサンプル中のマーカーの発現のレベルと正常レベルの間の有意な差が、対象が前立腺癌を患っていることを示す。一具体例において、マーカーは、転写されるポリヌクレオチド、またはその部分に対応し、この場合当該ポリヌクレオチドはマーカーを含む。一具体例において、サンプル中のマーカーの発現レベルは、前立腺癌を患っていない対象におけるマーカーの発現の正常レベルと少なくとも係数２だけ差があり、およびより他の具体例においては、発現レベルは少なくとも係数３だけ差がある。他の具体例において、マーカーはまた、非前立腺癌細胞において顕著には発現されない。

【０００７】

他の具体例において、サンプルは、対象から得た細胞を含む。他の具体例において、サンプルにおけるマーカーの発現のレベルを、マーカーに対応するタンパク質のサンプルにおける存在を検出することにより評価する。一具体例においては、タンパク質の存在を、タンパク質に特異的に結合する試薬を用いて検出する。他の具体例においては、試薬は抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントを含む試薬のグループから選択される。他の具体例において、サンプル中のマーカーの発現のレベルは、転写されたポリヌクレオチドまたはその部分のサンプル中での存在を検出することにより評価するが、ここで転写されたポリヌクレオチドはマーカーを含む。一具体例では、転写されたポリヌクレオチドはｍＲＮＡまたはｃＤＮＡである。他の具体例において、検出のステップには、転写されるポリヌクレオチドを増幅することが含まれる。

【０００８】

さらに他の好ましい具体例において、サンプル中のマーカーの発現のレベルを、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でマーカーとアニールする、またはポリヌクレオチドの部分、この場合、該ポリヌクレオチドはマーカーを含む、とアニールする転写されたポリヌクレオチドの、サンプル中での存在を検出することにより評価する。他の好ましい具体例において、サンプル中でのＳＭＡＲＣを含んでいるマーカーから独立に選択される複数のマーカーのそれぞれの発現のレベルを、前立腺癌を患っていない対照対象から得た同じタイプのサンプル中の複数のマーカーのそれぞれの発現の正常レベルと比較し、ここで、マーカーの１つ以上の発現のレベルが、対応するマーカーの発現の正常レベルと比較して有意に変化している場合、これは対象が前立腺癌を患っていることの指標となる。一具体例において、複数には、２またはそれ以上のマーカーが含まれる。

【０００９】

別の具体例において、本発明により、対象における前立腺癌の進行をモニターするための方法であって、第１の適当な時点でマーカー（マーカーは、制限するものでなく、ＳＭＡＲＣＤ３を含むＳＭＡＲＣを含んでいる１またはそれ以上のマーカーを含んでいる群から選択される）の発現を検出すること、この検出ステップをその後の適当な時点で反復すること、および２つの検出ステップにて検出される発現のレベルを比較すること、およびこの情報を用いて対象における前立腺癌の進行をモニターすることを含む方法が提供される。一の具体例において、マーカーは、ＳＭＡＲＣを含む１またはそれ以上のマーカーを含む群から選択される。他の具体例において、マーカーは転写されるポリヌクレオチドまたはその部分、この場合、ポリヌクレオチドはマーカーを含む、に対応する。他の具体例において、サンプルは対象から得た細胞を含む。一の具体例において、細胞は皮膚または血液組織から回収する。

【００１０】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための試験化合物の効力を評価する方法であって、試験化合物の存在下に暴露された、またはそこに維持された対象から得た第１サンプルにおけるマーカー（マーカーは、制限するものでなくＳＭＡＲＣＤ３を含んでいるＳＭＡＲＣを含む１またはそれ以上のマーカーを含む群から選択される）の発現を、対象から得た第２サンプル（第２サンプルは試験化合物に暴露していない）におけるマーカーの発現と比較することを含む方法であって、第１サンプルにおけ

るマーカーの発現の第２サンプルにおけるものと比較した有意に低いレベルが、試験化合物が対象において前立腺癌を阻害することに関して有効であることを示すものである方法が提供される。一具体例において、第１および第２サンプルは、対象から得た単一のサンプルの部分である。他の具体例において、第１および第２サンプルは、対象から得た貯蔵サンプルの部分である。

【００１１】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための治療の有効性を評価する方法であって、対象に治療の少なくとも一部を提供する前に対象から得た第１サンプルにおけるマーカーの発現を、治療の部分の提供後に対象から得た第２サンプルにおけるマーカーの発現と比較することを含む方法であって（マーカーは、ＳＭＡＲＣを含む１またはそれ以上のマーカーを含む群から選択される）、第２サンプルにおけるマーカーの第１サンプルに対して有意に低い発現のレベルが、治療が対象において前立腺癌を阻害するのに有効である指標である方法が提供される。

【００１２】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための治療の有効性を評価する方法であって、対象に治療の少なくとも一部を提供する前に対象から得た第１サンプルにおけるマーカーの発現を、治療の部分の提供後に対象から得た第２サンプルにおけるマーカーの発現と比較することを含む方法であって（マーカーは、ＳＭＡＲＣを含む１またはそれ以上のマーカーを含む群から選択される）、第２サンプルにおけるマーカーの第１サンプルに対して有意に高まったレベルが、治療が対象において前立腺癌を阻害するのに有効である指標である方法が提供される。

【００１３】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための組成物を選択する方法であって、対象からの細胞を含んでいるサンプルを得ること、サンプルの部分標本を複数の試験組成物の存在下に分けて維持すること、部分標本のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較すること（ここでマーカーは、ＳＭＡＲＣを含むマーカーを含む群から選択される）、および、試験組成物を含んでいる部分標本におけるマーカーの発現の、他の試験組成物と比較してより低いレベルを誘導する試験組成物の一つを選択することを含む方法が提供される。

【００１４】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための組成物を選択する方法であって、対象からの細胞を含んでいるサンプルを得ること、サンプルの部分標本を複数の試験組成物の存在下に分けて維持すること、部分標本のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較すること（ここで、マーカーはＳＭＡＲＣを含むマーカーを含む群から選択される）、試験組成物を含んでいる部分標本におけるマーカーの発現の、他の試験組成物と比較してより高まったレベルを誘導する試験組成物の一つを選択することを含む方法が提供される。

【００１５】

他の具体例において、本発明により、対象において前立腺癌を阻害する方法であって、対象からの細胞を含んでいるサンプルを得ること、サンプルの部分標本を複数の試験組成物の存在下に分けて維持すること、部分標本のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較すること（ここでマーカーは、ＳＭＡＲＣを含むマーカーを含む群から選択される）、およびその試験組成物を含んでいる部分標本におけるマーカーの発現の、他の試験組成物と比較してより低いレベルを誘導する試験組成物の少なくとも一つを対象に投与することを含む方法が提供される。

【００１６】

他の具体例において、本発明により、細胞において前立腺癌を誘発する試験化合物の潜在的能力を評価する方法であって、細胞の部分標本を試験組成物の存在下および不在下に分けて維持すること、および部分標本のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較すること（ここで、マーカーは、ＳＭＡＲＣを含むマーカーを含む群から選択される）を含む方法で

あって、試験化合物の存在下に維持した部分標本において、試験化合物の不在下に維持した部分標本に対して有意に高まったマーカー発現レベルが、試験化合物が細胞において前立腺癌を誘発する潜在能力を有することの指標である方法が提供される。

【００１７】

他の具体例において、本発明により、細胞において前立腺癌を誘発する試験化合物の潜在的能力を評価する方法であって、細胞の部分標本を試験組成物の存在下および不在下に分けて維持すること、および部分標本のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較すること（ここで、マーカーは、ＳＭＡＲＣを含むマーカーを含む群から選択される）を含む方法であって、試験化合物の存在下に維持した部分標本において、試験化合物の不在下に維持した部分標本に対して有意に低下したマーカー発現レベルが、試験化合物が細胞において前立腺癌を誘発する潜在能力を有することの指標である方法が提供される。

【００１８】

他の具体例において、本発明により、前立腺癌を患っている対象を治療する方法であって、ＳＭＡＲＣを含むマーカーから選択されるマーカーに対応するタンパク質を、前立腺癌に罹患している対象の細胞に提供することを含む方法が提供される。一態様において、タンパク質は、タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを含むベクターを細胞に提供することにより、細胞へ提供される。

【００１９】

他の具体例において、本発明により、前立腺癌に罹患している対象を、ＳＭＡＲＣを含むマーカーから選択されるマーカーに対応するポリヌクレオチドに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドで治療する方法が提供される。

他の具体例において、本発明により、前立腺癌を進行させる危険のある対象において前立腺癌を阻害する方法であって、ＳＭＡＲＣを含むマーカーから選択されるマーカーをに対応する遺伝子の発現を阻害することを含む方法が提供される。

【００２０】

他の具体例において、本発明により、前立腺癌を進行させる危険のある対象において前立腺癌を阻害する方法であって、ＳＭＡＲＣを含むマーカーから選択されるマーカーに対応する遺伝子の発現を高めることを含む方法が提供される。

本発明の他の態様および利点は、以下の詳細な記載および請求の範囲から明らかであろう。

【００２１】

図面の簡単な記載

図１Ａは、投与量依存様式で、天然アンドロゲンＤＨＴにより刺激されるＬＮＣａＰ細胞の増殖を示すグラフである。

【００２２】

図１Ｂは、ＤＨＴ投与に対するＰＳＡの産生を示すグラフである。

図２は、本発明によるハイブリダイゼーションおよび分析のための方法を示すフローダイアグラムである。

【００２３】

（発明の詳細な記載）

本発明は、対象における、選択されたマーカーの発現と前立腺癌の存在との間の新たに発見された関連に関するものである。単独および組み合わせにおけるこれらのマーカーの発現の相対レベルは、対象における前立腺癌に関する素因を示すものであり、および／または対象における前立腺癌の存在および存在の可能性を診断するものであることが見出された。本発明により、サンプルまたは対象における前立腺癌の存在または不在を検出するための方法に用いられるＳＭＡＲＣポリヌクレオチド配列を含むマーカー、およびサンプルまたは対象における前立腺癌の発症を予測する方法が提供される。種々のＳＭＡＲＣ遺伝子が解明されており、および本発明に適用できる。(例えば、本明細書中に出典明示によりその全教示を組み込む、Ring, HZ, et al., Genomics, 51(1): 140-143, 1998; Muchardt, C and M. Yaniv, Semin Cell Dev Biol. (Review), 10(2): 189-195, 1999;およびWa

llberg, AE, et al., Mol. Cell. Biol., 20(6): 2004-2013を参照されたい。）本発明のマーカーは、ＳＭＡＲＣ特異的ポリヌクレオチド配列が、完全にマーカーポリヌクレオチドの一部であるポリヌクレオチド配列を含む。それゆえ、本発明は、ＳＭＡＲＣヌクレオチド配列に関するのみならず、その中にＳＭＡＲＣヌクレオチド配列、例えばＳＭＡＲＣＤ３を有する他のポリヌクレオチドを包含する。本発明により、本発明のマーカーを用いて前立腺癌を治療し得る方法も提供される。

【００２４】

本発明は少なくとも部分的には、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞からのサンプルにおいて差異的に発現されるＳＭＡＲＣポリヌクレオチド配列を含む遺伝子マーカーの同定に基く。６８００の公知遺伝子のパネルを、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞における発現に関して調べた（実施例１を参照されたい）。疾患を患っている組織と正常組織の間で統計学的に有意な（ｐ＜０．０５）差を有するこれらの遺伝子を同定した。この差異的発現は、発現の低下または発現の増加のいずれかとして認められた。アンドロゲン依存性前立腺癌細胞におけるこれらの選択された遺伝子の発現を、実施例１に記載するようにGeneChip分析により評価した。ＳＭＡＲＣ、特にＳＭＡＲＣＤ３は、ＬＮＣａＰ前立腺癌細胞においてアンドロゲンよりダウンレギュレートされた。

【００２５】

内部対照として、前立腺癌に関与していることが当該分野で公知の前立腺特異的抗原（ＰＳＡ)遺伝子を、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞をスクリーニングするのに含めた。ＰＳＡはアンドロゲン依存性前立腺癌細胞における発現を有意に増すことが見出された。

【００２６】

従って、本発明はＳＭＡＲＣ遺伝子（例えば、異種構造核ＲＮＡ（ｈｎＲＮＡ）を生じる全長のＤＮＡ、または対応するｍＲＮＡ転写産物に相補的なｃＤＮＡ）、およびコードされたポリペプチドの、進行性の前立腺癌の存在または危険性に関するマーカーとしての使用に関する。これらのマーカーは疾患の程度および／または重篤度を関連づけるのに有用である。マーカーのパネルはキットにおけるまたは固体支持体上での使用のために簡便に並べることができる。マーカーは、前立腺癌の治療に、または癌の治療の効力を評価するのにも有用であり得る。加えて、マーカーは、マーカーの発現および疾患状態を調節する化合物または薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイに用いることもできる。

【００２７】

一態様において、本発明により、その量および活性が前立腺癌の存在に関連するマーカーが提供される。本発明のマーカーは核酸分子（例えば、ＤＮＡ，ｃＤＮＡ、またはＲＮＡ）またはポリペプチドであってよい。これらのマーカーは、非前立腺癌組織と比較して、前立腺癌組織における量または活性に関して増加するか低下するかのいずれかである。これらの遺伝子または遺伝子フラグメント（即ち、ＳＭＡＲＣの一部をコードしているポリヌクレオチド配列、該部分は特定のＳＭＡＲＣ、例えばＳＭＡＲＣＤ３の全ヌクレオチド配列の８５～９５％、または７０～８５％、または６０～７０％、または４５～６０％、または３５～６０％、または２０か～３５％であり得る）に対する増加もしくは低下したｍＲＮＡの存在、およびまた、これらの遺伝子（または遺伝子フラグメント）のタンパク質産物の増加または低下したレベルは、前立腺癌のマーカーとして役立つ。好ましくは、本発明のマーカーの増加および低下したレベルは、適当な対照サンプル（例えば、前立腺癌に罹患していないサンプル）と比較して統計学的に有意な等級の増加か、または低下である。一の具体例において、マーカーは対照サンプルに対して少なくとも２－、３－、４－、５－、６－、７－、８－、９－、または１０－倍またはそれ以上増加しているか低下している。同様に、当業者は、好ましい検出法は、生じる検出値が当該方法の最小検出値を超すものである方法であることを認識するであろう。

【００２８】

本発明のＲＮＡまたはタンパク質マーカーの相対量の測定は、当業者に公知のいずれかの方法によるものであってよい（Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd , ed., Cold Spring Harbor Laboratory , Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, およびCurrent protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照されたい。）。ＲＮＡ検出に関する典型的な方法には、標識されたプローブ（例えば、相補的な核酸分子）のハイブリダイゼーションおよびプローブの検出（例えば、ノーザンブロッティング）が後に続く細胞または組織サンプルからのＲＮＡの抽出が含まれる。タンパク質検出に関する典型的な方法には、タンパク質サンプルに対する標的タンパク質に特異的な標識されたプローブ（例えば抗体）のハイブリダイゼーションおよびプローブの検出が後に続く細胞または組織サンプルからのタンパク質の抽出が含まれる。標識群は、ラジオアイソトープ、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。特異的タンパク質および核酸分子の検出は、当業者に周知の多くの他の方法の中で、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、直接配列決定、または定量ＰＣＲ（核酸分子の場合）により評価されてもよい。

【００２９】

所定の具体例において、ＳＭＡＲＣの遺伝子（またはそのフラグメント）自体（例えば、ＤＮＡまたはｃＤＮＡ）を前立腺癌のマーカーとして供してよい。例えば、遺伝子に対応する核酸の、遺伝子の全部または部分の欠失などによる不在は疾患と関連し得る。同様に、ＳＭＡＲＣ遺伝子に対応する核酸の、遺伝子の重複などによる増加も疾患に関連し得る。

【００３０】

本発明のマーカー遺伝子の全部または部分のコピーの存在または数の検出は、当該分野で公知のいずれかの方法を用いて行ってよい。典型的には、細胞または組織サンプルからのトータルのＤＮＡを抽出し、標識したプローブ（例えば相補的ＤＮＡ分子）とハイブリダイズさせ、ついでプローブを検出するサザン分析によりＤＮＡまたはｃＤＮＡの存在および／または量を評価するのが簡便である。標識群は、ラジオアイソトープ、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。ＤＮＡの検出および／または定量の他の有用な方法には、当該分野の専門家には公知のように、直接配列決定、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、および定量ＰＣＲが含まれる。

【００３１】

本発明はまた、前記前記の分子と構造上異なる（例えば、変化した核酸またはアミノ酸配列を有する）が、前記の分子と同じ特性（例えばコードされたアミノ酸配列または非必須アミノ酸残基のみ変化したもの）を有する核酸およびタンパク質分子も包含される。そのような分子には対立変種が含まれ、およびサブセクションＩにより詳細に記載する。

【００３２】

他の態様において、本発明により、その量または活性が前立腺癌の重篤度に関連するマーカーが提供される。これらのマーカーは、前立腺癌の重毒度の程度にポジティブまたはネガティブのいずれかにて関連して、前立腺癌組織において量または活性が増加または低下する。さらに他の態様において、本発明により、その量または活性が患者において前立腺癌を進行させる危険性と関連するマーカーが提供される。これらのマーカーは、対象における前立腺癌の進行の見込みと直接関連して、活性または量が増加または低下する。

【００３３】

各マーカーは個々に、本発明の範囲内ではあるが、分析の信頼度を増すために、本発明の方法および組成物における使用のための２またはそれ以上のマーカーの組み合わせを提供すると見なされてよい。例えば、第１パネルのマーカーは、それぞれ非前立腺癌組織と比較して、前立腺癌組織において量または活性の増加を示し得、一方、第２パネルのマーカーは、非前立腺癌組織と比較して前立腺癌組織において量または活性の低下を示し得る。同様に、マーカーの異なるパネルは、異なる組織からのマーカーから成り得、または前立腺癌疾患の異なる成分を示し得る。

【００３４】

本発明のマーカーが固体支持体上に簡便に提供されてよいことも当業者には認識される。例えば、ｍＲＮＡなどのポリヌクレオチドはアレイ（例えば、ハイブリダイゼーション分

析のためのGeneChipアレイ）へと、樹脂（カラムクロマトグラフィーのためのカラムに包むことができる樹脂）へと、またはマトリックス（例えば、ノーザンブロット分析のためのニトロセルロースマトリックス）へと結合させてよい。マーカーに対して相補的な分子を、共有または非共有いずれかにて固定することにより、サンプル中の各マーカーの存在または活性の別個の分析が可能となる。アレイにて、例えばマーカーのパネルの各メンバーに相補的なポリヌクレオチドはそれぞれアレイ上の異なる公知の位置へと別個に結合されてよい。アレイは、例えば、対象からの前立腺細胞サンプルから抽出したポリヌクレオチドとハイブリダイズさせてよい。サンプルからのポリヌクレオチドのアレイ上のいずれかの位置のアレイとのハイブリダイゼーションは検出することができ、そしてこうして、サンプル中のマーカーの存在または量を確認することができる。好ましい具体例では、「GeneChip」アレイを用いる(Affymetrix)。同様に、ウェスタン分析を、対象からのタンパク質サンプルにハイブリダイズした異なるポリペプチドマーカーに特異的な固定した抗体上で行ってよい。

【００３５】

全マーカータンパク質または核酸分子を支持体に結合させる必要がないこと、検出の目的のために（例えばハイブリダイゼーションのために）十分な長さのマーカーの一部、例えば長さにして７、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、１００またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸部分が検出目的に関して十分であり得ることが当業者には明らかであろう。

【００３６】

本発明の核酸およびタンパク質マーカーは、対象の組織または細胞から単離されてよい。好ましい具体例において、組織は前立腺細胞または組織である。しかし、体液（例えば、血液、尿、胆汁、血清、リンパ液、唾液、粘液、および膿）を含む他の組織サンプルおよび他の組織サンプルも、本発明のマーカーが単離されてよい源または本発明のマーカーの存在、活性、および／または量を評価してよい源として供してもよい。マーカー自体の１またはそれ以上を含んでいる組織サンプルを本発明の方法に用いてよく、および当業者は、そのようなサンプルが簡便に得られ、貯蔵され、および／または保存され得る方法を認識するであろう。

【００３７】

本発明以前にいくつかのマーカー、例えばＰＳＡが、前立腺癌と関連していることが公知であった。これらのマーカーは、本発明のマーカーと一緒には含まれない。しかし、これらのマーカーは、本発明の方法、パネル、およびキットにおいて本発明のマーカーと組み合わせて簡便に用いられてよい。

【００３８】

他の態様において、本発明により、患者が前立腺癌に罹患しているかどうかを評価するのに有用な抗体を産生する単離ハイブリドーマを作製する方法が提供される。この方法において、本発明のマーカーに対応するタンパク質を（例えば、発現される細胞からの精製により、またはタンパク質をコードしている核酸の転写および翻訳によりインビボまたはインビトロで公知の方法を用いて）単離する。脊椎動物、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、またはヒツジなどの哺乳動物を、単離されたタンパク質またはタンパク質フラグメントを用いて免疫化する。脊椎動物は、少なくともさらに１回、単離タンパク質またはタンパク質フラグメントで、脊椎動物が該タンパク質またはタンパク質フラグメントに対して強い免疫反応を示すように、任意に（および好ましくは）免疫化されてよい。脾臓細胞を免疫化した脊椎動物から単離し、そして当該分野で周知の種々の方法のいずれかを用いて免疫化した細胞株と融合させてハイブリドーマを形成する。この方法で作製されたハイブリドーマを次いで、常套法を用いてスクリーニングし、タンパク質またはタンパク質フラグメントと特異的に結合する抗体を産生する１またはそれ以上のハイブリドーマを同定する。本発明は、この方法により作製されたハイブリドーマおよびそのようなハイブリドーマを用いて作製された抗体をも含む。

【００３９】

本発明により、対象における前立腺癌または前立腺癌を進行させる危険性に関する方法が提供される。これらの方法には、対象からサンプル（例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル）を単離すること、前立腺癌を有しないことが公知の対象由来の第２サンプルに対してサンプルにおける本発明の１またはそれ以上のマーカーの存在、量、および／または活性を検出することが含まれる。２つのサンプルにおけるマーカーのレベルを比較し、そして、試験サンプルにおける１またはそれ以上のマーカーの有意な増加または低下が、対象における前立腺癌の存在または存在の危険性を示す。

【００４０】

本発明により、対象における前立腺癌の重篤度を評価する方法も提供される。これらの方法には、対象からサンプル（例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル）を単離すること、前立腺癌を有しないことが公知の対象由来の第２サンプルに対してサンプルにおける本発明の１またはそれ以上のマーカーの存在、量、および／または活性を検出することが含まれる。２つのサンプルにおけるマーカーのレベルを比較し、そして、試験サンプルにおける１またはそれ以上のマーカーの有意な増加または低下が、対象における前立腺癌の重篤度合いに関連する。

【００４１】

本発明により、対象において治療する（即ち、前立腺癌を阻害する）方法も提供される。これらの方法には、対象からサンプル（例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル）を単離すること、前立腺癌を有しないことが公知の対象由来の第２サンプルに対してサンプルにおける本発明の１またはそれ以上のマーカーの存在、量、および／または活性を検出することが含まれる。２つのサンプルにおけるマーカーのレベルを比較し、そして、試験サンプルにおける１またはそれ以上のマーカーの対照サンプルに対する有意な増加または低下を観察する。発現または活性が有意に低下するマーカーに関しては、その発現されるマーカータンパク質を患者に投与してよく、または、低下したマーカーに対応するｍＲＮＡまたはＤＮＡを誘導することにより処置して、それにより対象におけるマーカータンパク質のレベルを増す（その特定のマーカーが治療に役立つと判断される場合）。逆に、発現または活性が有意に増加し、疾患の病因に関与していることが示されているマーカーに関しては、増加したマーカーに対するｍＲＮＡまたはＤＮＡアンチセンスを投与してよく(即ち、遺伝子治療による）、またはマーカータンパク質に特異的な抗体を投与してよく、それにより対象におけるマーカータンパク質のレベルを低下させる。この方法にて、対象は前立腺癌を処置され得る。

【００４２】

本発明により、関与する特定のマーカーが疾患プロセスまたはその予防に関与していると仮定して、対象における進行前立腺癌を予防する方法も提供される。これらの方法には、発現または活性が有意に低下するマーカーに関して、対象におけるマーカータンパク質のレベルをそれにより増すための、そのマーカータンパク質の投与、または低下したマーカーに対応するｍＲＮＡまたはＤＮＡの誘導（例えば、遺伝子治療による）が含まれる。発現または活性が有意に増加するマーカーに関しては、それにより対象におけるマーカータンパク質のレベルを低下させるために、増加したマーカーに対するｍＲＮＡまたはＤＮＡアンチセンスを対象に投与してよく(例えば、遺伝子治療による）、またはマーカータンパク質に特異的な抗体を投与してよい。この方法にて、対象における進行性前立腺癌を予防し得る。

【００４３】

本発明により、対象において疑われる前立腺癌症状の治療または療法を評価する方法も提供される。これらの方法には、治療または療法を現に受けている前立腺癌に罹患している対象由来のサンプル（例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル）を単離すること、癌のための治療または療法を全く受けていない前立腺癌に罹患している対象由来の第２サンプルに対して、およびまた、前立腺癌に罹患していない対象由来の第３サンプルに対して、第１サンプルにおける本発明の１またはそれ以上のマーカーの存在、量、および／または活性を検出することが含まれる。３つのサンプルにおけるマーカーのレ

ベルを比較し、そして他のサンプルに対する第１サンプルにおける１またはそれ以上のマーカーの有意な増加または低下を観察し、次いで、前立腺癌の存在または存在の危険性、または重篤度と関連付ける。前立腺癌を評価することにより、前立腺癌を治療する能力がさらに測定される。

【００４４】

本発明により、対象におけるアンドロゲン－依存性前立腺癌を診断する方法も提供される。該方法には、前立腺癌に罹患している対象由来のサンプル（例えば、前立腺癌細胞または血液細胞を含んでいるサンプル）を単離すること、ＳＭＡＲＣヌクレオチド配列から成る群から選択されるマーカーの、アンドロゲンの存在下および不在下での発現のレベルを測定すること、およびアンドロゲンの存在および不在下でのマーカーの発現の差を比較することが含まれる。前立腺癌細胞は、アンドロゲンの不在下と比較してアンドロゲンの存在下でマーカーの発現が増加する場合、アンドロゲン依存性である。

【００４５】

本発明により、前立腺癌に罹患している対象におけるアンドロゲン除去治療の効力を決定する方法も提供される。該方法には、対象サンプルにおいて第１の適当な時点でＳＭＡＲＣヌクレオチド配列から成る群から選択されるマーカーの発現レベルを検出すること、および対象がアンドロゲン除去処置を開始した後の、その後の適当な時点でマーカーの発現レベルを検出することが含まれる。第１および第２の時点で検出されるマーカーの発現のレベルを比較する。発現レベルの低下はアンドロゲン除去治療が低下効力を有することを示す。

【００４６】

本発明により、前立腺癌の治療のための医薬組成物も提供される。これらの組成物には、（例えば、非前立腺癌細胞サンプルに対して前立腺癌細胞サンプルにおける量または活性が低下するマーカーに関して）本発明のマーカータンパク質および／または核酸が含まれてよく、そして以下に記載するように処方することができる。別法として、これらの組成物には、（例えば、非前立腺癌細胞サンプルに対して前立腺癌細胞サンプルにおける量または活性が増加するマーカーに関して）本発明のマーカータンパク質に特異的に結合する抗体および／または本発明のマーカー核酸に相補的なアンチセンス核酸分子が含まれてよく、そして本明細書中に記載するように処方することができる。

【００４７】

本発明により、サンプル（例えば、前立腺癌の危険性のある対象由来のサンプル）における前立腺癌の存在を評価するためのキットであって、ＳＭＡＲＣを含むマーカーから成る群から選択されるマーカーに対応するタンパク質に特異的に結合する抗体を含むキットも提供される。

【００４８】

本発明により、対象（例えば、前立腺癌の危険性のある対象）由来のサンプルにおいて前立腺癌の存在を評価するためのキットであって、ＳＭＡＲＣを含むマーカーから成る群から選択されるマーカーに対応する転写ポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸プローブを含むキットがさらに提供される。

【００４９】

本発明により、対象において前立腺癌を阻害するための複数の化合物のそれぞれの適性を評価するためのキットがさらに提供される。そのようなキットには、試験されるべき複数の化合物、およびＳＭＡＲＣを含むマーカーの１またはそれ以上から成る群から選択されるマーカーの発現を評価するための試薬が含まれる。

【００５０】

本発明の前記組成物および方法に対する変更は、常套法に従い、当該分野の専門家には容易に理解されるであろうし、および本発明により包含されることになる。

本発明の理解を容易にするために、多くの用語および語句を以下に定義する。

【００５１】

本明細書中に用いられるように、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」な

る用語は交換して用いることができ、そして、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはその類似体いずれか、あらゆる長さのヌクレオチドの重合形態を含む。ポリヌクレオチドはいずれの三次元構造をとってもよく、そして、公知または非公知のいずれの機能をなしてもよい。以下は、ポリヌクレオチドの無制限の例である。遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、あらゆる配列の単離ＤＮＡ、あらゆる配列の単離ＲＮＡ、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、変更されたヌクレオチド、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体から成ってよい。存在する場合には、核酸構造に対する変更は、重合体の会合の前後になされてよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断されてよい。重合化後に、標識成分との結合によるなどしてポリヌクレオチドはさらに変更されてよい。該用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を含む。他が特記されない限り、または所望されない限り、ポリヌクレオチドである本発明のいずれの具体例も、二本鎖形態、および二本鎖形態を生じることが公知のもしくは予想される２つの相補的な一本鎖形態のそれぞれが包含される。

【００５２】

ポリヌクレオチドは、４つのヌクレオチド塩基：アデニン（Ａ）；シトシン（Ｃ）；グアニン（Ｇ）；チミン（Ｔ）；およびポリヌクレオチドがＲＮＡの場合のグアニンに代わるウラシル（Ｕ）の特異的な配列から成る。ここで、「ポリヌクレオチド配列」なる用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表記のことである。このアルファベット表記は、中央処理装置を有するコンピューター中のデータベースに入力することができ、そして、機能性遺伝子および相同性検索などの生物学的情報のために用いることができる。

【００５３】

「遺伝子」には、転写および翻訳された後の特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる少なくとも一つのオープンリーディングフレームを含んでいるポリヌクレオチドが含まれる。本明細書中に開示するポリヌクレオチド配列のいずれかを用いて、それらが関連する遺伝子のより大きなフラグメントまたは完全長のコーディング配列を同定してよい。より大きなフラグメント配列を単離する方法が当該分野の専門家に公知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

【００５４】

「遺伝子産物」には、遺伝子が転写および翻訳されるときに作製されるアミノ酸（例えば、ペプチドまたはポリペプチド）が含まれる。

ポリヌクレオチドの操作に関する内容において用いられる場合の「プローブ」には、目的のサンプル中に存在する標的を、標的とハイブリダイズすることにより検出するための試薬として提供されるオリゴヌクレオチドが含まれる。たいてい、プローブは、標識、またはハイブリダイゼーション反応の前後に標識が結合することができる手段から成る。適当な標識には、制限されるものではないが、ラジオアイソトープ、蛍光色素、化学ルミネセンス化合物、色素、および酵素を含むタンパク質が含まれる。

【００５５】

「プライマー」には、一般に、標的とハイブリダイズすることにより目的のサンプル中に存在する標的または「鋳型」に結合し、そしてその後、標的に相補的なポリヌクレオチドの重合化を進める、遊離３’－ＯＨ基を一般に有する短いポリヌクレオチドが含まれる。「ポリメラーゼ鎖反応」（「ＰＣＲ」）は、複製コピーが標的のポリヌクレオチドから成るところの、「上流」および「下流」プライマーから成る「プライマーの対」もしくは「プライマーのセット」、およびＤＮＡポリメラーゼ、典型的には熱安定ポリメラーゼ酵素などの重合化触媒を用いる反応である。ＰＣＲのための方法は当該分野で周知であり、および例えば、MacPherson et al., IRL Press at Oxford University Press (1991)において教示されている。ＰＣＲまたは遺伝子クローニングなどの、ポリヌクレオチドの複製コピーを作製する全ての方法を、本明細書中まとめて「複製」と呼ぶ。プライマーは、サザンまたはノーザンブロット分析などのハイブリダイゼーション反応におけるプローブとし

ても用いることができる(Sambrook, J., Fritsh, E. F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照されたい。)。

【００５６】

「ｃＤＮＡ」なる用語には、逆転写酵素などの酵素でｃＤＮＡへと作製される、細胞または生物体に存在するｍＲＮＡ分子である相補的ＤＮＡが含まれる。「ｃＤＮＡライブラリー」には、逆転写酵素を用いてｃＤＮＡに変換され、次いで「ベクター」（外来ＤＮＡの付加後複製し続けることができる他のＤＮＡ分子）へと挿入される、細胞または生物体に存在するｍＲＮＡ分子の集まりが含まれる。ライブライリーのための典型的なベクターには、細菌に感染するバクテリオファージ、ウイルス（例えば、ラムダファージ）が含まれる。ライブラリーは次いで、目的の特定のｃＤＮＡ（およびつまりｍＲＮＡ）に関してプローブすることができる。

【００５７】

「遺伝子送達媒体」には、宿主細胞に１またはそれ以上のポリヌクレオチドを挿入することができる分子が含まれる。遺伝子送達媒体の例は、リポソーム、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含む生物学的適合性ポリマー；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖類；リポ多糖類；人工ウイルスエンベロープ；金属粒子；および細菌、バキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスおよびウイルスベクター、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクター、および種々の真核および原核生物宿主における複製および／または発現に関して開示されている、当該分野で典型的に用いられる他の組換え媒体である。遺伝子送達媒体は、挿入されたポリヌクレオチドの複製、遺伝子治療、ならびに単にポリペプチドおよびタンパク質の発現のために用いられてよい。

【００５８】

「ベクター」には、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞へ、および／または宿主細胞の間に送達する自己複製核酸分子が含まれる。この用語には、核酸分子の細胞への挿入に主として機能するベクター、核酸の複製に主に機能する複製ベクター、およびＤＮＡまたはＲＮＡの転写および／または翻訳に機能する発現ベクターが含まれることを意図する。前記の機能の１つ以上を提供するベクターも意図する。

【００５９】

「宿主細胞」には、ベクターのための、もしくは外来核酸分子、ポリヌクレオチド、および／またはタンパク質の挿入のためのレシピエントであり得る、またはレシピエントであったあらゆる個々の細胞または培養細胞が含まれることを意図する。単細胞の子孫が含まれることも意図する。子孫はもとの親細胞に対して、自然の、偶発的な、または意図的な変異のために、（形態学的に、または遺伝子もしくは全相補ＤＮＡにおいて）必ずしも完全に同一でなくてよい。細胞は真核細胞のものもしくは原核細胞のものであってよく、および制限されるものではないが、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞、および哺乳動物細胞、例えばネズミ、ラット、サル、またはヒトの細胞が含まれる。

【００６０】

「遺伝子的に変更された」なる用語には、細胞の遺伝子型または表現型を変更する外来遺伝子または核酸配列を含んでいるおよび／または発現している細胞またはその子孫が含まれる。この用語には、細胞の内在性ヌクレオチドに対するいずれかの添加、欠失、または破壊が含まれる。

【００６１】

本明細書に用いられる「発現」なる用語には、ポリヌクレオチドをｍＲＮＡへ転写し、そしてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へと翻訳する方法が含まれる。ポリヌクレオチドがゲノムＤＮＡから誘導される場合に、適当な真核生物の宿主が選択されるなら、発現にはｍＲＮＡのスプライシングが含まれてよい。発現に必要とされる調節エレメントには、ＲＮＡポリメラーゼに結合するプロモーター配列、およびリボソームの結合のための転写開始配列が含まれる。例えば、細菌発現ベクターには、ｌａｃプロモータなどのプロモーター、および翻訳開始のためのシャイン・ダルガルノ配列および開始コドンＡＵ

Ｇが含まれる(Sambrook, J.,Fritsh, E. F.,およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。同様に真核生物発現ベクターには、ＲＮＡポリメラーゼＩＩのための異種もしくは同種プロモーター、下流ポリアデニル化シグナル、短いコドンＡＵＧ、およびリボソームの脱離のための終止コドンが含まれる。そのようなベクターは、市場入手することができるか、当該分野の専門家に周知の方法、例えばベクターを構築するために以下に記載する方法にて、記載される配列により、または組み立てることができる。

【００６２】

遺伝子に対して用いられる「差異的に発現された」には、遺伝子から転写されるｍＲＮＡまたは遺伝子によりコードされるタンパク質産物の差異的な発現が含まれる。差異的に発現された遺伝子は、正常または対照細胞の発現レベルと比較して過剰発現されるか、または発現が不足していてよい。一態様において、対照サンプルにおいて検出される発現レベルよりも、２．５倍、好ましくは５倍、または好ましくは１０倍高いか、または低い差が含まれる。「差異的に発現された」なる用語には、対照細胞中にてサイレントである場合に発現される、または対照細胞において発現される場合に発現されない、細胞または組織におけるヌクレオチド配列も含まれる。

【００６３】

「ポリペプチド」には、２またはそれ以上のサブユニットのアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチドミメティクスから成る化合物が含まれる。サブユニットはペプチド結合により結合していてよい。他の具体例において、サブユニットは、例えば、エステル、エーテルなどの他の結合により結合していてよい。本明細書中に用いられるように、「アミノ酸」なる用語には、グリシン含む天然および/または非天然または合成アミノ酸、およびＤまたはＬ両光学異性体、およびアミノ酸類似体ならびにペプチドミメティクスのいずれかが含まれる。３またはそれ以上のアミノ酸のペプチドが一般にオリゴペプチドと呼ばれる。３またはそれ以上のアミノ酸から成るペプチド鎖を、ポリペプチドまたはタンパク質と呼ぶ。

【００６４】

「ハイブリダイゼーション」には、１またはそれ以上のポリヌクレオチドを反応させて、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化された複合体を形成する反応が含まれる。水素結合は、ワトソン－クリック塩基対形成、フーグスティーン型結合により、またはいずれかの他の配列特異的様式にて起こり得る。複合体は、二本鎖構造を形成している２本鎖、多重鎖複合体を形成している３またはそれ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイジング鎖、またはこれらのいずれかの組み合わせを含んでよい。ハイブリダイゼーション反応は、より拡張型のプロセスにおいては、ＰＣＲ反応の開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素分解などステップを含んでよい。

【００６５】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーには、いずれかの２つの核酸分子が互いにハイブリダイズする困難性が含まれる。ストリンジェント条件下で互いに対して少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％同一の核酸分子は互いにハイブリダイズを維持し、一方、低パーセント同一性の分子はハイブリダイズを維持することはできない。高いストリンジェントハイブリダイゼーション条件の無制限の例は、６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中約４５℃にてのハイブリダイゼーションの後、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中５０℃にて、好ましくは５５℃にて、より好ましくは６０℃にて、およびいっそう好ましくは６℃にて１回またはそれ以上洗浄を行うことである。

【００６６】

ハイブリダイゼーションが２つの一本鎖ポリヌクレオチドの間で逆平行の配置で生じる場合、反応は「アニーリング」と呼ばれ、そしてこれらのポリヌクレオチドは「相補的」と記載される。二本鎖ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが第１のポリヌクレオ

チドの鎖の一つと第２のものとの間で生じ得る場合、他方のポリヌクレオチドに対して「相補」または「相同」であり得る。「相補性」または「相同性」（１つのポリヌクレオチドが他方に対して相補的である程度）は、一般に認められている塩基対形成の法則に従い、互いに結合する水素結合することが期待される反対側の鎖中の塩基の割合に関して定量できる。

【００６７】

「抗体」には、抗原上に存在するエピトープに結合することができる免疫グロブリン分子が含まれる。本明細書中に用いられるように、該用語は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体などの完全な免疫グロブリン分子のみならず、抗イディオタイプ抗体、変異体、フラグメント、融合タンパク質、二重特異性抗体、ヒト化タンパク質、および必要とされる特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子変更体が含まれる。

【００６８】

本明細書中、「前立腺癌」（ＣａＰ）なる用語は、男性において一般に発生する用語に関して、当業者に認識される使用を意味する。「前立腺癌」なる用語は,前立腺の触診可能な腫瘍の発生、およびまた、前立腺における顕微鏡にて検出可能な腫瘍性細胞または形質転換細胞の両方を意味する。後者の場合、当該細胞学的に検出可能な前立腺癌は、患者も医者も癌細胞の存在を検出できない点において無症候性であり得る。癌細胞は７０歳または８０歳まで生きている男性の前立腺において一般に見出されるが、これらの男性の全てが前立腺癌を進行させるわけではない。前立腺癌が前立腺と離れた遠位の部位に転移する現象においては、疾患は転移性癌（ＭＣ）と記載し、臓器でおさまっている前立腺癌からこの症状を区別する。ＣａＰによる死亡は、離れた部位、通常中軸骨格への前立腺癌の転移による分散により起こる。

【００６９】

本明細書中に用いられるように、「マーカー」なる用語には、前立腺癌に罹患した対象においてまたは前立腺癌に関与する細胞において、存在するかもしくは存在しない、または量もしくは活性が増加もしくは低下したポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子が含まれる。マーカーの量または活性の相対的変化は、前立腺癌の発生または発生の危険性と関連する。

【００７０】

本明細書中に用いられるように、「マーカーのパネル」なる用語には、各メンバーの量または活性が前立腺癌の発生または発生の危険性と関連している、マーカー群が含まれる。所定の具体例においては、マーカーのパネルには、前立腺癌に罹患した対象または前立腺癌に関与する、細胞において量または活性が増加または低下するマーカーのみ含まれてよい。他の具体例において、マーカーのパネルには、前立腺癌の発生または発生の危険性に関連する特定の組織タイプに存在するマーカーのみが含まれてよい。

本発明の種々の態様を、以下のサブセクションにより詳細に記載する。

【００７１】

Ｉ．単離核酸分子

本発明の一態様は、それ自体が本発明の遺伝子マーカー（例えば、ｍＲＮＡ）であるか、または本発明のポリペプチドマーカーをコードする単離核酸分子またはそのフラグメントに関する。本発明の他の態様は、サンプル中の本発明のマーカーをコードしている核酸分子を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして用いるのに十分な核酸フラグメントならびに本発明のマーカーをコードする核酸分子の増幅または変異のためのＰＣＲプライマーとして用いるためのヌクレオチドフラグメントに関する。本明細書中に用いる「核酸分子」なる用語には、ＤＮＡ分子（例えばｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）およびＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）およびヌクレオチド類似体を用いて作製されるＤＮＡまたはＲＮＡの類似体が含まれることを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。

【００７２】

「単離核酸分子」なる用語には、天然の核酸源中に存在する他の核酸分子から分離される

核酸分子が含まれる。例えば、ゲノムＤＮＡに関して、「単離された」なる用語には、ゲノムＤＮＡが本来関連している染色体から分離される核酸分子が含まれる。好ましくは、「単離された」核酸分子は、核酸が由来する生物体のゲノムＤＮＡ中の核酸に本来隣接している配列（即ち、核酸の５’および３’末端に位置する配列）から分離される。例えば、種々の具体例において、本発明の単離されたマーカー核酸分子、または本発明のポリペプチドマーカーをコードしている核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムＤＮＡ中の核酸分子に本来隣接する約５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ、０．５ｋｂ、または０．１ｋｂ未満のヌクレオチド配列を含むことができる。さらに、「単離された」核酸分子、例えばｃＤＮＡ分子は、組換え法により作製される場合、他の細胞物質または培養培地から実質上遊離し得、または化学的に合成された場合、ケミカルプレカーサーまたは他の化学物質から実質上遊離し得る。

【００７３】

本発明の核酸分子、例えば、ＳＭＡＲＣ遺伝子の一つのヌクレオチド配列を有する核酸分子にまたはその部分は、本明細書中に提供される常套の分子生物学的技術および配列情報を用いて単離することができる。ＳＭＡＲＣ遺伝子の一つの核酸配列の全部または部分をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、本発明のマーカー遺伝子または本発明のポリペプチドマーカーをコードしている核酸分子を、常套のハイブリダイゼーション法およびクローニング法（例えば、Aambrook, J., Fritsh, E.F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されている）を用いて単離することができる。

【００７４】

本発明の核酸は、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、またはそれとは別にゲノムＤＮＡを鋳型および適当なオリゴヌクレオチドプライマーとして用い、常套のＰＣＲ増幅法に従い増幅することができる。そのように増幅された核酸は、適当なベクター中にクローニングすることができ、そして、ＤＮＡ配列分析により特定することができる。さらに、マーカーヌクレオチド配列に対応しているオリゴヌクレオチドまたは本発明のマーカーをコードしているヌクレオチド配列は、常套法により、例えば自動ＤＮＡ合成装置を用いて調製することができる。

【００７５】

他の好ましい具体例において、本発明の単離核酸分子には、本発明のマーカー、即ち、ＳＭＡＲＣポリヌクレオチド配列またはその部分に相補的な核酸分子が含まれる。そのようなヌクレオチド配列に相補的な核酸分子は、該ヌクレオチド配列にハイブリダイズしてそれにより安定な二本鎖を形成することができるほどにヌクレオチド配列に対して十分相補的なものである。

【００７６】

本発明の核酸分子はさらに、本発明のマーカー核酸の核酸配列の部分、本発明のマーカーポリペプチドをコードしている遺伝子、例えば、プローブまたはプライマーとして用いられることができるフラグメントのみから成ることができる。プローブ／プライマーは、典型的には、実質上精製されたオリゴヌクレオチドを含む。該オリゴヌクレオチドは典型的には、ストリンジェント条件下で、マーカー核酸または本発明のマーカーポリペプチドをコードしている核酸の少なくとも約７または１５、好ましくは約２０または２５、より好ましくは約５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、４００またはそれ以上の連続したヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域が含まれる。

【００７７】

本発明のマーカー遺伝子またはマーカーポリペプチドをコードしている核酸分子のヌクレオチド配列に基くプローブを用いて、本発明のマーカー遺伝子および／またはマーカーポリペプチドに対応する転写産物またはゲノム配列を検出することができる。好ましい具体例において、プローブはそれに結合した標識群を含み、例えば、標識群はラジオアイソト

ープ、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。そのようなプローブを、本発明のマーカーポリペプチドを誤発現する（例えば、過剰発現または発現不足）、または本発明のマーカー遺伝子のより多くのもしくはもっと少ないコピーを有する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として用いることができる。例えば、対象由来の細胞のサンプル中のマーカーポリペプチドをコードしている核酸のレベルを検出してよく、マーカーポリペプチドをコードしているｍＲＮＡ転写産物の量を測定してよく、または本発明のマーカー遺伝子の変異または欠失の存在を評価してよい。

【００７８】

本発明はさらに、遺伝子コードの縮重のためにＳＭＡＲＣ遺伝子の核酸配列とは異なり、そしてＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされるタンパク質と同じタンパク質をコードする核酸分子を包含する。

【００７９】

ＳＭＡＲＣ遺伝子のヌクレオチド配列に加えて、ＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に変化を生じるＤＮＡ配列多形が個体群（例えばヒト個体群）の中に存在し得ることが当業者には認識されるであろう。ＳＭＲＡＣ遺伝子におけるそのような遺伝子多形は、天然対立変種により個体群中の個体間に存在し得る。対立変種は、所定の遺伝子座に二者択一的に生じる遺伝子の群の一つである。加えて、遺伝子の全発現レベルに（例えば調節または破壊により）影響し得るＲＮＡ発現レベルに影響するＤＮＡの多形も存在し得る。本明細書中に用いられるように、「対立変種」なる用語には、所定の座で生じる核酸配列、または該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが含まれる。本明細書中に用いられるように、「遺伝子」および「組換え遺伝子」なる用語は、本発明のマーカーポリペプチドをコードしているオープンリーディングフレームを含む核酸分子を意味する。

【００８０】

本発明のマーカー遺伝子またはマーカータンパク質をコードしている遺伝子の天然の対立変種および相同物に対応する核酸分子は、ＳＭＡＲＣ遺伝子に対するその相同性に基いて、本明細書に開示するｃＤＮＡまたはその部分をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、常套のハイブリダイゼーション法に従い、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で単離することができる。本発明のマーカー遺伝子の天然対立変種および相同物に対応する核酸分子は、本発明のマーカー遺伝子またはマーカータンパク質をコードしている遺伝子と同じ染色体または座に対するマッピングによっても単離することができる。

【００８１】

他の具体例において、本発明の単離核酸分子は、長さにして少なくとも１５、２０、２５、３０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、またはそれ以上のヌクレオチドであり、マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子の核酸配列に対応している核酸分子に対してストリンジェント条件下でハイブリダイズする。本明細書中に用いられる「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」なる用語は、互いに少なくとも６０％相同なヌクレオチド配列が互いに典型的にハイブリダイズしたまま留まる、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する条件を記載することを意図する。好ましくは、該条件は互いに対して約少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、いっそうより好ましくは少なくとも約８５％または９０％相同な配列が、互いに典型的にハイブリダイズしたまま留まるような条件である。そのようなストリンジェント条件は当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の好ましい、無制限の例は、６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中約６５℃にてのハイブリダイゼーションの後、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中５０℃にて、好ましくは

５５℃にて、よりいっそう好ましくは６０℃にて、およびいっそうより好ましくは６５℃にての１回またはそれ以上の洗浄を行うことである。好ましくは、ＳＭＡＲＣの遺伝子の一つの配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズする本発明の単離核酸分子。本明細書中に用いられるように、「天然に生じる」核酸分子には、天然に生じるヌクレオチド配列（例えば、天然のタンパク質をコードする）を有するＲＮＡまたはＤＮＡ分子が含まれる。

【００８２】

個体群中に存在し得る、本発明のマーカー遺伝子およびマーカータンパク質をコードしている遺伝子の天然に生じる対立変種に加えて、当業者は、本発明のマーカー遺伝子またはマーカータンパク質をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列に変異を誘導し、それによりこれらのタンパク質の機能活性を変更することなくコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させることができることをさらに認識するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換を導くヌクレオチドの置換をなすことができる。「非－必須」アミノ酸残基は、生物活性を変更することなくタンパク質の野生型配列から変更され得た残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は生物活性に必要である。例えば、遺伝子の対立変種または相同物の間（例えば、異なる種由来の遺伝子の相同物間）に保存されているアミノ酸残基は特に変化に従わないことが予想される。

【００８３】

従って、本発明の更なる態様は、活性に必須でないアミノ酸分子の変化を含む本発明のマーカータンパク質をコードしている核酸分子に関する。そのようなタンパク質は、ＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされるマーカータンパク質からアミノ酸配列が異なっているが、生物活性は保持する。一の具体例において、タンパク質は、本発明のマーカータンパク質に対して少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％またはそれ以上の相同性を含む。

【００８４】

本発明のマーカータンパク質に相同なタンパク質相同物をコードしている単離核酸分子は、１またはそれ以上のアミノ酸置、付加、または欠失がコードされるタンパク質に導入されるように、マーカータンパク質をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列に１またはそれ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を誘導することにより作製することができる。変異は、部位指向性突然変異誘発およびＰＣＲによる突然変異誘発などの常套法により、本発明のＳＭＡＲＣ遺伝子に導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換を、１またはそれ以上の予測される非必須アミノ酸残基にてなす。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（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）、ベーター分枝側鎖（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含まれる。別法として、変異は本発明の遺伝子のコーディング配列の全部または部分に沿って、飽和突然変異によるなどして無作為に導入することができ、そして、生じた変異体を生物学的活性に関してスクリーニングして、活性を保持する変異体を同定することができる。突然変異誘発の後で、コードされるタンパク質を組換え発現させることができ、そしてタンパク質の活性を測定することができる。

【００８５】

本発明の別の態様は、本発明のマーカー遺伝子およびマーカータンパク質をコードしている遺伝子に対してアンチセンスである単離核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードしている「センス」核酸に相補的な、例えば、二本鎖のｃＤＮＡ分子のコーディング鎖に相補的もしくはｍＲＮＡ配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。従

って、アンチセンス核酸はセンス核酸に対して水素結合することができる。アンチセンス核酸は、ＳＭＡＲＣ遺伝子の全コーディング鎖、またはその部分のみに対して相補的であり得る。一具体例において、アンチセンス核酸分子は、本発明のヌクレオチド配列のコーディング鎖の「コーディング領域」に対してアンチセンスである。「コーディング領域」なる用語は、アミノ酸へと翻訳されるコドンを含んでいるヌクレオチド配列の領域を含む。他の具体例において、アンチセンス核酸分子は、本発明のヌクレオチド配列のコーディング鎖の「非コーディング領域」に対してアンチセンスである。「非コーディング領域」なる用語には、アミノ酸に翻訳されない、コーディング領域に隣接する５’および３’配列が含まれる（即ち、５’および３’非翻訳領域とも呼ばれる）。

【００８６】

本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンおよびクリックの塩基対形成の法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は本発明の遺伝子に対応するｍＲＮＡの全コーディング領域に相補的であり得るが、より好ましくは、コーディングまたは非コーディング領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さにして約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の方法を用いて化学合成および酵素ライゲーション反応を用いて構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に生じるヌクレオチドを用いて、または分子の生物学的安定性を増すためもしくはアンチセンスおよびセンス核酸の間に形成される二本鎖の物理的安定性を増すために設計された種々の変更ヌクレオチドを用いて化学的に合成することができ、例えばチオリン酸誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を作製するのに用いることができる変更ヌクレオオチドの例には、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、ベーター－Ｄ－ガラクトシルキューオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、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、ベーター－Ｄ－マンノシルキューオシン、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）、ウィブトキソシン(wybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、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、および２,６－ジアミノプリンが含まれる。別に、アンチセンス核酸は、核酸をアンチセンスの方向でサブクローンした発現ベクターを用いて生物学的に作製することができる（すなわち、挿入された核酸から転写されたＲＮＡは、以下のサブセクションにさらに記載するように目的の標的核酸に対してアンチセンスの方向である）。

【００８７】

本発明のアンチセンス核酸分子は、それらが本発明のマーカータンパク質をコードしている細胞内ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイズするかまたはそれに結合し、それによって、例えば転写および／または翻訳を阻害することによりタンパク質の発現を阻害するように、典型的に対象へ投与され、またはインサイチュで作製される。ハイブリダイゼーションは、安定な二本鎖を形成するための常套のヌクレオチド相補性によるものであり得、または例えば、ＤＮＡ二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用によるものであり得る。本発明のアンチセン

ス核酸分子の投与の経路の例には、組織部位（例えば、皮膚）における直接の注射が含まれる。別法として、アンチセンス核酸分子は、標的選択細胞に対して変更して、次いで全身に投与することができる。例えば、全身投与のためには、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞の表面において発現されるレセプターまたは抗原に特異的に結合するように、例えば細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に対してアンチセンス核酸分子を結合させることにより変更することができる。アンチセンス核酸分子は、本明細書中に開示するベクターを用いて細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子を強いｐｏｌＩＩまたはｐｏｌＩＩＩプロモーターの対照下に置いたベクター構築物が好ましい。

【００８８】

さらに他の具体例においては、本発明のアンチセンス核酸分子はα－アノマー核酸分子である。α－アノマー核酸分子は、通常のβユニットとは違って鎖が互いに平行に走っている、相補的ＲＮＡと特徴的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids. Res. 15: 6625-6641)。アンチセンス核酸分子は、２’－ｏ－メチルリボヌクレオチド(Inoue et al. (1987) REBS Lett. 215: 327-330)またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡ類似体(Inoue et al. (1987)FEBS Lett. 215: 327-330)をも含み得る。

【００８９】

さらに他の具体例において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それらが相補的な領域を有するところの一本鎖核酸、例えばｍＲＮＡなどを分解することができる、リボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡ分子である。つまり、リボザイム(例えば、ハンマーヘッド型リボザイム(Haselhoff and Gerlach (1988) Nature 334: 585-591に開示されている））を用いて、本発明の遺伝子のｍＲＮＡ転写産物を触媒分解して、それによりこのｍＲＮＡの翻訳を阻害することができる。マーカータンパク質をコードしている核酸に対して特異性を有するリボザイムを、本明細書中に開示する本発明の遺伝子のヌクレオチド配列に基いて設計することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、マーカータンパク質をコードしているｍＲＮＡにおける分解されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なテトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体を構築することができる。例えば、Cech et al. 米国特許第4,987,071号およびCech et al.米国特許第5,116,742を参照されたい。別法として、本発明の遺伝子から転写されたｍＲＮＡを用いて、ＲＮＡ分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡを選択することができる。例えば、Bartel. D. and Szostak, J. W. (1993) Science 261: 1411-1418を参照されたい。

【００９０】

別法として、ＳＭＡＲＣ遺伝子の発現は、これらの遺伝子の調節領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチドをターゲッティングし、標的細胞において遺伝子の転写を妨げる3重らせん構造を形成することにより阻害することができる。一般的には、Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, C. et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36;およびMaher, L. J. (1992) Bioassays 14(12): 807-15を参照されたい。

【００９１】

さらに別の態様では、本発明の核酸分子を塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で変更して、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改良することができる。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格を変更して、ペプチド核酸を作製することができる(Hyrup B. et al. (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23を参照されたい）。本明細書に用いられる「ペプチド核酸」または「ＰＮＡｓ」なる用語は、デオキシリボースリン酸骨格がプソイドペプチド骨格により置換され、および４つの天然の核酸塩基のみ保持されている核酸ミメティクス、例えばＤＮＡミメティクスを意味する。ＰＮＡの中性骨格は、低イオン強度の条件下で、ＤＮＡおよびＲＮＡへの特異的ハイブリダイゼーションを許容することが示されている。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Hyrup B. et al. (1996) 既出; Perry-O'Keefe et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 146

70-675に開示されている常套の固相ペプチド合成プロトコールを用いて行うことができる。

【００９２】

ＰＮＡは治療および診断における適用に用いることができる。例えば、ＰＮＡは、例えば転写または翻訳停止を誘導することもしくは複製を阻害することによる遺伝子発現の配列特異的変更のための、アンチセンスまたはアンチ遺伝子試薬として用いることができる。ＳＭＡＲＣの核酸分子のＰＮＡは、遺伝子における単一塩基対変異の分析（例えばＰＮＡ指向性ＰＣＲクランピングによる）において；他の酵素（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ(Hyrup B. (1996) 既出）と組み合わせて用いられる場合の「人工制限酵素」として；またはＤＮＡの配列決定またはハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして（Hyrup B. (1996) 既出; Perry-O'Keefe 既出)用いることもできる。

【００９３】

他の具体例において、ＰＮＡは（例えば、その安定性または細胞の取り込みを高めるために）、ＰＮＡへ脂肪親和性基または他のヘルパー基を結合することにより、ＰＮＡ-ＤＮＡキメラの形成により、またはリポソームまたは当該分野で公知の他の薬物送達法の使用により変更することができる。例えば、ＰＮＡおよびＤＮＡの有利な特性を組み合わせてよい本発明の核酸分子のＰＮＡ-ＤＮＡキメラを作製することができる。そのようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素（例えばＲＮＡｓｅＨおよびＤＮＡポリメラーゼ）がＤＮＡ部分と相互作用することを許容し、一方、ＰＮＡ部分は高い結合アフィニティおよび特異性を提供する。ＰＮＡ-ＤＮＡキメラは、塩基のスタッキング、核酸塩基間の結合の数、および配向に関して選択される適当な長さのリンカーを用いて結合させることができる(Hyrup B. (1996) 既出）。ＰＮＡ-ＤＮＡキメラの合成は、Hyrup B. (1996) 既出およびFinn P. J. et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24(17): 3357-63に記載されるように行うことができる。例えば、ＤＮＡ鎖は常套のホスホールアミダイトカップリング化学反応を用いて固体支持体上にて合成することができ、および変更されたヌクレオシド類似体、例えば、５’-（４-メトキシトリチル）アミノ-５’-デオキシ-チミジンホスホールアミダイトをＰＮＡおよびＤＮＡ５’末端間に用いることができる(Mag, M. et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17: 5973-88)。ＰＮＡモノマーを次いで段階を追って結合させて、５’ＰＮＡセグメントおよび３’ＤＮＡセグメントを有するキメラ分子を作製する（Finn P. J. et al. (1996)既出）。別法として、キメラ分子は、５’ＤＮＡセグメントおよび３’ＰＮＡセグメントを用いて合成することができる(Peterser, K.H. et al. (1975) Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124)。

【００９４】

他の具体例では、オリゴヌクレオチドには、（例えばインビボで宿主細胞レセプターを標的するための）ペプチドなどの他の付随基、または細胞膜(Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556; Lemaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652; PCT公開第WO88/09810を参照されたい）または血液-脳関門（例えば、PCT公開第WO89/10134を参照されたい）を横切る輸送を促進する試薬が含まれてよい。加えて、オリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーション－誘発分裂試薬(例えば、Krol et al. (1988) Bio-Techniques 6: 958-976を参照されたい。)または挿入試薬(例えば、Zon(1988) Pharm. Res. 5: 539-549を参照されたい。）を用いて変更することができる。この目的のために、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誘発架橋剤、転移剤、またはハイブリダイゼーション－誘発分裂試薬など）に結合させてよい。最終的に、オリゴヌクレオチドは、標識が他の試薬（例えば、酵素標識のための基質）の添加により検出され、またはヌクレオチドのハイブリダイゼーションの際、すぐに検出されるように（例えば、放射能活性標識または蛍光標識（例えば、米国特許第5,876,930に開示される分子ビーコン））、検出できるように標識されてよい。

【００９５】

ＩＩ.単離タンパク質および抗体

本発明の一態様は、単離マーカータンパク質およびその生物学的に活性な部分、ならびに

抗-マーカータンパク質抗体を増大させるための免疫原としての使用に適したポリペプチドフラグメントに関する。一具体例において、天然のマーカータンパク質を、常套のタンパク質精製法を用いて適当な精製スキームにより細胞または組織源から単離することができる。他の具体例では、マーカータンパク質は、組換えＤＮＡ法により作製する。組換え発現に代えて、マーカータンパク質またはポリペプチドは、常套のペプチド合成法を用いて化学的に合成することができる。

【００９６】

「単離された」または「精製された」タンパク質または生物学的に活性なその部分は、マーカータンパク質が由来する細胞または組織源からの細胞物質または他の混在タンパク質を実質上含まず、または化学的に合成された場合、ケミカルプレカーサーまたは他の化学物質を実質上含まない。「細胞物質を実質上含まない」には、タンパク質が単離もしくは組換え作製された細胞の細胞内成分からタンパク質が分離されているところのマーカータンパク質調製物が含まれる。一具体例において、「実質上細胞物質を含まない」なる用語には、少なくとも約３０％（乾燥重量にて）の非マーカータンパク質（本明細書中、「混在タンパク質」とも呼ぶ）、より好ましくは約２０％未満の非マーカータンパク質、さらにいっそう好ましくは約１０％未満の非マーカータンパク質、およびより好ましくは約５％未満の非マーカータンパク質を有するマーカータンパク質調製物が含まれる。マーカータンパク質または生物学的に活性なその部分が組換え作製される場合、好ましくは培養培地を含まず、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の約２０％未満、より好ましくは約１０％未満、および最も好ましくは約５％未満を示す。

【００９７】

「実質上ケミカルプレカーサーまたは他の化学物質を含まない」なる用語には、タンパク質が、タンパク質の合成に関与するケミカルプレカーサーまたは他の化学物質から単離されているマーカータンパク質調製物が含まれる。一具体例において、「実質上ケミカルプレカーサーまたは他の化学物質を含まない」なる用語には、約３０％未満（乾燥重量にて）のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質、より好ましくは約２０％未満のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質、いっそうより好ましくは約１０％未満のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質、および最も好ましくは約５％未満のケミカルプレカーサーまたは非タンパク質性化学物質を有するタンパク質調製物が含まれる。

【００９８】

本明細書に用いられるように、マーカータンパク質の「生物学的に活性な部分」には、マーカータンパク質のアミノ酸配列に対して十分相同なもしくはそれから誘導されたアミノ酸配列であって、全長のマーカータンパク質よりも少数のアミノ酸を含み、およびマーカータンパク質の少なくとも一活性を示すアミノ酸配列から成るマーカータンパク質のフラグメントが含まれる。典型的には、生物学的に活性な部分は、マーカータンパク質の少なくとも一活性を有するドメインまたはモチーフから成る。マーカータンパク質の生物学的に活性な部分は、長さにして例えば、１０、２５、５０、１００、２００、またはそれ以上のアミノ酸であるポリペプチドであり得る。マーカータンパク質の生物学的に活性な部分は、マーカータンパク質媒介性の活性を調節する試薬を開発するための標的として用いることができる。

【００９９】

好ましい具体例において、マーカータンパク質はＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされる。他の具体例において、マーカータンパク質はＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされるマーカータンパク質と実質上相同であり、およびマーカータンパク質の機能活性を保持するが、天然の対立変種または突然変異誘発のためにアミノ酸配列が異なっている（前記のサブセクションＩで詳細に記載のごとく）。従って、他の具体例において、マーカータンパク質は、ＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、またはそれ以上相同なアミノ酸配列を含むタンパク質である。

【０１００】
２つのアミノ酸配列または２つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、配列を最適の比較のために並べる（例えば、最適の整列のために第１および第２のアミノ酸配列または核酸配列中にギャップを導入し、そして非相同配列を比較効果のために無視することができる）。好ましい具体例において、比較のために並べられる引用配列の長さは、引用配列の長さの少なくとも３０％、好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、いっそうより好ましくは少なくとも６０％、およびさらにいっそう好ましくは少なくとも７０％、８０％、または９０％である。対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを次いで比較する。第１配列中の位置が第２配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占有されている場合、分子はその位置で同一である（本明細書中に用いられるように、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と同意義である）。２つの配列間のパーセント同一性は、配列が共有する同じ位置の数に関して相関関係にあるものであり、２つの配列の最適の整列のために導入されるのが必要なギャップの数および各ギャップの長さを考慮する。

【０１０１】
配列の比較および２つの配列間のパーセント同一性の決定は、数理的なアルゴリズムを用いて行うことができる。好ましい具体例において、２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ＧＣＧスフトウェアパッケージ(http://www.gcg.comより入手可能)中のＧＡＰプログラムに組み込まれているNeedleman-Wunsch(J. Mol. Biol. (48): 444-453(1970))アルゴリズムを用いて、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、および１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップ重量(gap weight)および１、２、３、４、５、または６の長さ重量(length weight)を用いて決定した。さらに他の好ましい具体例では、２つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ＧＣＧスフトウェアパッケージ（http://www.gcg.comにて入手可能）中のＧＡＰアルゴリズムを用いて、NWSgapdna.CMPマトリックスおよび４０、５０、６０、７０、または８０のギャップ重量および１、２、３、４、５、または６の長さ重量を用いて決定する。他の具体例では、２つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン２．０）に組み込まれているE.Meyers-W.Miller(CABIOS, 4: 11-17(1989))のアルゴリズムを用いて、PAM120重量残基表(weight residue table)、１２のギャップ長ペナルティおよび４のギャップペナルティを用いて決定する。

【０１０２】
本発明の核酸およびタンパク質配列は、例えば他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定するために、公のデータベースに対して検索を行うための「質問配列」としてさらに用いることができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTおよびXBLASTアルゴリズム（バージョン２．０）を用いて行うことができる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア＝１００、単語長(wordlength)＝１２を用いて行い、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア＝５０、単語長＝３を用いて行い、本発明のマーカータンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためのギャップ整列を得るために、Gapped BLASTをAltschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402に記載されているように用いることができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを用いる場合、個々のプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを用いることができる。http://www.ncbi.nlm.hih.govを参照されたい。

【０１０３】
本発明により、キメラまたは融合マーカータンパク質も提供される。本明細書中に用いるように、マーカー「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非-マーカーポリペプチドに作用的に結合したマーカーペプチドを含む。「マーカーポリペプチド」には、ＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれるが、

「非-マーカーポリペプチド」には、マーカータンパク質と実質上相同でないタンパク質、例えばマーカータンパク質と異なる、および同一もしくは異なる生物体から誘導されるタンパク質に対応しているアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。マーカー融合タンパク質において、ポリペプチドはマーカータンパク質の全部または一部に対応し得る。好ましい具体例において、マーカー融合タンパク質は、マーカータンパク質の少なくとも一つの生物学的に活性な部分から成る。融合タンパク質において、「作用的に結合した」なる用語は、マーカーポリペプチドおよび非マーカーポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すことを意図する。非マーカーポリペプチドは、マーカーポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合することができる。

【０１０４】

例えば、一具体例において、融合タンパク質は、マーカー配列がＧＳＴ配列のＣ末端に融合したＧＳＴ-マーカー融合タンパク質である。そのような融合タンパク質は、組換えマーカータンパク質の精製を容易にすることができる。

【０１０５】

他の具体例において、融合タンパク質は、そのＮ末端に異種構造シグナル配列を含んでいるマーカータンパク質である。所定の宿主細胞（例えば、哺乳動物の宿主細胞）において、異種構造シグナル配列の使用によりマーカータンパク質の発現および／または分泌を増すことができる。そのようなシグナル配列は当該分野で周知である。

【０１０６】

本発明のマーカー融合タンパク質は、本明細書に記載されているように、医薬組成物中に組み込むことができ、およびインビボで対象に投与することができる。マーカー融合タンパク質を用いて、マーカータンパク質基質の生物学的利用能に影響を及ぼすことができる。マーカー融合タンパク質の使用は、例えば、（ｉ）マーカータンパク質をコードしている遺伝子の異常な変更または変異；（ｉｉ）マーカータンパク質をコードしている遺伝子の誤調節；および（ｉｉｉ）マーカータンパク質の異常な翻訳後の変更により引き起こされる疾患（例えば前立腺癌）の処置のために、治療的に有用であり得る。

【０１０７】

さらに、本発明のマーカー融合タンパク質を免疫原として用いて、対象において抗－マーカータンパク質抗体を産生すること、マーカータンパク質リガンドを精製すること、およびスクリーニングアッセイにおいてマーカータンパク質のマーカータンパク質基質との相互作用を阻害する分子を同定することができる。

【０１０８】

好ましくは、本発明のマーカーキメラもしくは融合タンパク質は、常套の組換えＤＮＡ法により作製される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードしているＤＮＡフラグメントを常套法に従い、例えばライゲーションのためのブラント末端または付着末端、適当な末端を提供するための制限酵素消化、適当な付着末端の付着、望ましくない連結を防ぐためのアルカリホスファターゼ処理および酵素によるライゲーションを用いることにより、インフレームで連結する。他の具体例においては、融合遺伝子は、自動ＤＮＡ合成装置を含む常套法により合成することができる。別法として、後にアニールおよび再増幅される２つの連続する遺伝子フラグメント間に相補的張出部分を生じるアンカープライマーを用いて遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅を行い、キメラ遺伝子配列を作製することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & SOns: 1992を参照されたい。）。さらに、融合部分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をすでにコードする多くの発現ベクターが市場入手可能である。マーカータンパク質をコードしている核酸を、融合部分がマーカータンパク質にインフレームで結合するように、そのような発現ベクターにクローニングすることができる。

【０１０９】

シグナル配列を用いて、目的の分泌タンパク質または他のタンパク質の分泌および単離を容易にすることができる。シグナル配列は典型的には、分泌の間に１またはそれ以上の切断現象にて成熟タンパク質から一般的に切断される疎水性アミノ酸のコアにより特徴づけ

られる。そのようなシグナルペプチドは、分泌経路を経る際の成熟タンパク質からのシグナル配列の切断を許容するプロセシング部位を含む。つまり、本発明は、シグナル配列を有する前記ポリペプチド、ならびにシグナル配列がタンパク質分解により切断されたポリペプチド（即ち、切断産物）に関する。一具体例において、シグナル配列をコードしている核酸配列を、通常は分泌されないかまたはそれ以外には単離するのが困難なタンパク質などの目的のタンパク質に対して、発現ベクターにおいて作用的に結合させることができる。シグナル配列は、発現ベクターを形質転換する真核生物の宿主からのタンパク質などのタンパク質の分泌を指向し、そしてシグナル配列はその後または同時に切断される。タンパク質は次いで、当業者に認識される方法により細胞体媒質から容易に精製することができる。別法として、シグナル配列は、例えばＧＳＴドメインを有する精製を容易にする配列を用いて、目的のタンパク質に結合させることができる。

【０１１０】

本発明はさらに、マーカータンパク質に対してアゴニスト（ミメティクス）として、またはアンタゴニストとして機能する、本発明のマーカータンパク質の変種に関する。マーカータンパク質の変種は、マーカータンパク質の突然変異誘発、例えば不連続の点突然変異または先端の切断により作製することができる。マーカータンパク質のアゴニストは、マーカータンパク質の天然に生じる形態の実質上同一のまたはサブセットの生物学的活性を保持し得る。マーカータンパク質のアンタゴニストは、例えばマーカータンパク質の活性を競合的に変更することにより、マーカータンパク質の天然に生じる形態の活性の１またはそれ以上を阻害することができる。つまり、機能が制限された変種を用いる処置により、特定の生物効果を引き出すことができる。一具体例において、タンパク質の天然に生じる形態の生物学的活性のサブセットを有する変種での対象の処置は、マーカータンパク質の天然に生じる形態での処置に対して、対象における副作用が少ない。

【０１１１】

マーカータンパク質アゴニスト（ミメティクス）またはマーカータンパク質アンタゴニストいずれかとして機能するマーカータンパク質の変種は、マーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性に関するマーカータンパク質の変異体、例えば先端切断変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定することができる。一具体例において、マーカータンパク質の変種の多様なライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発により作製され、そして多様な遺伝子ライブラリーによりコードされる。マーカータンパク質の変種の多様なライブラリーは、例えば、潜在的なマーカータンパク質配列の縮重セットが別個のポリペプチドとして、または別に、本明細書中のマーカータンパク質配列のセットを含んでいる大きな融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイのために）発現され得るように、遺伝子配列中に合成オリゴヌクレオチド混合物を酵素ライゲートすることにより作製することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列からの潜在的なマーカータンパク質変種のライブラリーを作製するために用いることができる種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動ＤＮＡ合成装置にて行うことができ、そして、合成遺伝子を次いで適当な発現ベクターにライゲートする。遺伝子の縮重セットの使用により、潜在的なマーカータンパク質配列の所望のセットをコードしている配列の全てを１の混合物中に提供することが可能となる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である(例えば、Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al. (1984) Science 198: 1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477を参照されたい)。

【０１１２】

加えて、本発明のマーカータンパク質に対応しているタンパク質コーディング配列のフラグメントのライブラリーを用いて、マーカータンパク質の変種のスクリーニングおよびその後の選択のためのマーカータンパク質フラグメントの多様な群を作製することができる。一具体例において、コーディング配列のフラグメントのライブラリーは、ニッキングが分子当たり約１回だけ起こる条件下でヌクレアーゼを用いてマーカータンパク質コーディ

ング配列の二本鎖ＰＣＲフラグメントを処理すること、二本鎖ＤＮＡを変性すること、ＤＮＡを復元して、異なるニック産物からのセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖ＤＮＡを形成すること、Ｓ１ヌクレアーゼを用いた処理により、復元された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および生じたフラグメントのライブラリーを発現ベクターにライゲートすることにより作製することができる。この方法により、Ｎ－末端、Ｃ－末端、およびマーカータンパク質の種々のサイズの内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

【０１１３】

点突然変異および先端切断により作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、および選択された特性を有する遺伝子産物に関してｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの方法が当該分野で公知である。高処理量分析に適用できる、巨大な遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広範に用いられる方法には、複製可能な発現ベクターに遺伝子ライブラリーをクローニングすること、生じたベクターのライブラリーで適当な細胞を形質転換すること、および、所望の活性の検出により産物を検出した遺伝子をコードしているベクターの単離が容易となる条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることが含まれる。ライブラリーにおける機能変異の頻度を高める新規な方法である繰り返しアンサンブル突然変異誘発(recursive ensemble mutagenesis)(ＲＥＭ）をマーカー変種を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて用いることができる(Arkin and Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331)。

【０１１４】

単離されたマーカータンパク質またはその部分もしくはフラグメントを免疫原として用いて、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための常套法を用いて、マーカータンパク質に結合する抗体を作製することができる。全長のマーカータンパク質を用いることができ、または別法として、本発明により、免疫原としての使用のためのこれらのタンパク質の抗原性ペプチドフラグメントが提供される。マーカータンパク質の抗原性ペプチドは、ＳＭＡＲＣ遺伝子によりコードされるアミノ酸配列の少なくとも８アミノ酸残基を含み、および該ペプチドに対して作製された抗体がマーカータンパク質と特異的な免疫複合体を形成するように、マーカータンパク質のエピトープを包含する。好ましくは、抗原性ペプチドは少なくとも１０アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも１５アミノ酸残基、よりいっそう好ましくは少なくとも２０アミノ酸残基、および最も好ましくは少なくとも３０アミノ酸残基から成る。

【０１１５】

抗原性ペプチドにより包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面上に位置づけられるマーカータンパク質の領域、例えば親水性領域ならびに高い抗原性を有する領域である。

【０１１６】

マーカータンパク質免疫原を典型的に用いて、適当な対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）を該免疫原で免疫価することにより抗体を調製する。適当な免疫原調製物は、例えば、組換え発現されたマーカータンパク質または化学合成されたマーカーポリペプチドを含み得る。調製物は、フロイントの完全または不完全アジュバントなどのアジュバント、または同様の免疫刺激剤をさらに含み得る。適当な対象の免疫原性マーカータンパク質調製物での免疫化により、ポリクローナル抗マーカータンパク質抗体反応が誘導される。

【０１１７】

従って、本発明の別の態様は、抗－マーカータンパク質抗体に関する。本明細書中に用いる「抗体」なる用語には、イムノグロブリン分子、およびイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、マーカータンパク質などの抗原と特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子が含まれる。イムノグロブリン分子の免疫学的に活性な

部分の例には、抗体をペプシンなどの酵素で処理することにより生じ得るＦ（ａｂ）およびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが含まれる。本発明により、マーカータンパク質に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が提供される。本明細書中に用いる「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」なる用語には、特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の一種のみを含む抗体分子群が含まれる。モノクローナル抗体組成物は、従って、典型的には、それが免疫反応するところの特定のマーカータンパク質に対して単一の結合アフィニティを示す。

【０１１８】

ポリクローナル抗－マーカータンパク質抗体は、適当な対象を本発明のマーカータンパク質で免疫化することにより、前記のように調製することができる。免疫化された対象における抗－マーカータンパク質抗体の力価は、固定されたマーカータンパク質を用いて酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を用いるなどの常套法により、時間中モニターすることができる。所望により、マーカータンパク質に対して指向される抗体分子は哺乳動物から（例えば、血液、または腫瘍組織サンプルから）単離することができ、およびさらに、タンパク質Ａクロマトグラフィーなどの周知の方法により精製して、ＩｇＧフラクションを得ることができる。免疫化後の適当な時間において、例えば抗－マーカータンパク質抗体力価が最も高い時点で、抗体産生細胞を対象から得、およびそれを用いてKohler and Milstein(1975)(Nature256:495-497)により初めに記載されたハイブリドーマ法（Brown et al. (1981) J. Immunol. 127: 539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255: 4980-83; Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2927-31; およびYeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29: 269-75も参照されたい。）、より近年のヒトＢ細胞ハイブリドーマ法（Kozbor et al.(1983) Immunol Today 4: 72)、ＥＢＶ－ハイブリドーマ法(Cole et al. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)、またはトリオーマ法などの常套法によりモノクローナル抗体を調製することができる。

【０１１９】

モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製するための方法は周知である(一般的には、R.H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E.A. lerner (1981) Yale J. Biol. med., 54: 387-402; M.L. Gefter et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3: 231-36を参照されたい。）。簡単には、永久細胞株（典型的には、骨髄腫）を、前記のようにマーカータンパク質免疫原で免疫化した哺乳動物からのリンパ球（典型的には脾臓細胞）と融合し、そして生じたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、本発明のマーカータンパク質に結合するモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを同定する。

【０１２０】

リンパ球と永久細胞株を融合するのに用いられる多くの周知の方法のいずれかを、抗マーカータンパク質モノクローナル抗体を作製するために適用することができる(例えば、G. Galfre et al. (1977) Nature 266: 55052; Gefter et al. Somatic Cell Genet. 上に既出; Lerners, Yale J. Biol. Med., 上に既出; Kenneth, Monoclonal Antibodies, 上に既出を参照されたい。）。さらに、当業者は、これもまた有用であるそのような方法の多くの変更があることを認識するであろう。典型的には、永久細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）はリンパ球と同じ哺乳動物種から得る。例えば、ネズミのハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫化したマウスからのリンパ球をマウス永久細胞株と融合させることにより作製することができる。

【０１２１】

好ましい永久細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含んでいる培養培地（「ＨＡＴ」培地）に対して感受性のあるマウス骨髄腫細胞株である。多くの骨髄腫細胞株のいずれか、例えば、Ｐ３-ＮＳ１/１-Ａｇ４-１、Ｐ３-ｘ６３-Ａｇ８．６５３、またはＳｐ２/Ｏ-Ａｇ１４骨髄腫株を常套法に従い融合パートナーとして用いることができる。これらの骨髄腫株は、ＡＴＣＣから入手可能である。典型的には、ＨＡＴ-感受

性マウス骨髄腫細胞をポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）を用いてマウスの脾臓細胞に融合する。融合から生じたハイブリドーマ細胞を次いで、非融合および非再生性融合骨髄腫細胞を殺すＨＡＴ培地を用いて選択する（非融合脾臓細胞は、それらは形質転換されないので数日後に死亡する）。本発明のモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を、マーカータンパク質に結合する抗体に対してハイブリドーマ培養上清を常套のＥＬＩＳＡアッセイを用いてスクリーニングすることにより、検出する。

【０１２２】

モノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマを調製することに代えて、モノクローナル抗-マーカータンパク質抗体は、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をマーカータンパク質でスクリーニングし、それによりマーカータンパク質に結合する免疫グロブリンライブラリーのメンバーを単離することにより、同定および単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするためのキットが市場入手可能である（例えば、ファルマシア組換えファージ抗体システム、カタログ番号２７-９４００-０１；および、ストラタジーンSurfZAP(登録商標)ファージディスプレイキット、カタログ番号240612)。加えて、抗体ディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするのに特に適用しやすい方法および試薬の例は、例えば、Ladner et al. 米国特許第5,223,409号；Kang et al. PCT国際公開WO92/18619; Dower et al. PCT国際公開WO91/17271; Winter et al. PCT国際公開WO92/20791; Markland et al. PCT国際公開WO92/15679; Breitling et al. PCT国際公開WO93/01288; McCafferty et al. PCT国際公開WO92/01047; Garrard et al. PCT国際公開WO92/09690; Ladner et al PCT国際公開WO90/02809; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; Clarkson et al. (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc. Acad Res. 19: 4133-4137; Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982; およびMcGafferty et al. Nature (1990) 348: 552-554に見出すことができる。

【０１２３】

さらに、組換え抗-マーカータンパク質抗体、例えば、ヒトおよび非ヒト部分を含んでいるキメラおよびヒト化モノクローナル抗体などであって、常套の組換えＤＮＡ法を用いて作製することができるものは、本発明の範囲内にある。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えＤＮＡ法により、例えば、Robinson et al. 国際出願PCT/US86/02269; Akira, et al. 欧州特許出願184,187; Taniguchi, M., 欧州特許出願173,494；Neuberger et al.PCT国際公開WO86/01533; Cabilly et al. 米国特許第4,816,567; Cabilly et al. 欧州特許出願125,023; 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: 3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nixhimura et al. (1987) Canc. Res. 47: 999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314: 446-449; およびShaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559); Morrison, S.L. (1985) Science 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) Bio Techniques 4: 214; Winter 米国特許5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321: 552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239: 1534; Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141: 4053-4060に開示されている方法を用いて産生することができる。

【０１２４】

完全ヒト抗体が、ヒトの対象の治療的処置のために特に望ましい。そのような抗体は、内在性の免疫グロブリン重および軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重および軽鎖遺伝子は発現することができるトランスジェニックマウスを用いて産生することができる。トランスジェニックマウスは選択される抗原、例えば、本発明のマーカーに対応しているポリペプチドの全部または部分などで、通常の方法で免疫化する。抗原に対して指向

されるモノクローナル抗体は、常套のハイブリドーマ法を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスにより包含されるヒト免疫グロブリントランス遺伝子はＢ細胞の分化の間に配置転換し、次いでクラススイッチング(class switching)および体細胞変異を受ける。つまり、このような方法を用いて、治療上有効なＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＩｇＥ抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの方法の概説に関しては、Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13: 65-93を参照されたい。）。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの方法およびそのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な考察に関しては、米国特許5,625,126;米国特許5,633,425;米国特許5,569,825;米国特許5,661,016;および米国特許5,545,806を参照されたい。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) などの会社が、本明細書に記載するものと同様の方法を用いて、選択される抗原に対して指向されるヒト抗体を提供するのを請け負うことができる。

【０１２５】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる方法を用いて作製することができる。このアプローチにおいては、選択された非-ヒトモノクローナル抗体、例えば、ネズミ抗体を用いて、同じエピトープを認識している完全ヒト抗体の選択を誘導する(Jespers et al., 1994, Bio/technology 12: 899-903)。

【０１２６】

抗-マーカータンパク質抗体（例えば、モノクローナル抗体）を用いて、アフィニティクロマトグラフィーまたは免疫沈降法などの常套法により、本発明のマーカータンパク質を単離することができる。抗マーカータンパク質抗体により、細胞からの天然のマーカータンパク質および宿主細胞中で発現された組換え産生されたマーカータンパク質の精製を促すことができる。さらに、抗マーカータンパク質抗体を用いて、マーカータンパク質の発現の豊富さおよびパターンを評価するために（細胞溶解物または細胞上清中で）マーカータンパク質を検出することができる。抗マーカータンパク質抗体を診断において用いて、臨床試験法の一部として組織中のタンパク質レベルをモニターすること、例えば、所定の治療管理の有効性を決定することができる。検出は、検出可能な物質に対して抗体をカップリングすること（即ち、物理的に結合することにより）促進することができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射能活性物質が含まれる。適当な酵素の例には、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-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含まれ、適当な補欠分子団の例には、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ヒオチンが含まれ、適当な蛍光物質の例には、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、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが含まれ、発光物質の例には、ルミノールが含まれ、生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびアクオリンが含まれ、および適当な放射能活性物質の例には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、または^{3}Ｈが含まれる。

【０１２７】

ＩＩＩ．組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の他の態様は、本発明のマーカータンパク質（またはその部分）をコードしている核酸を含んでいるベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中に用いられる、「ベクター」なる用語には、それが結合している他の核酸を輸送することができる核酸分子が含まれる。ベクターの一タイプは、追加のＤＮＡセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖ＤＮＡループを含む「プラスミド」である。ベクターの他のタイプは、追加のＤＮＡセグメントをウイルスゲノムにライゲートすることができるウイルスベクターである。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自律的に複製することができる（例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非-エピソーム哺乳動物ベクター）は宿主細胞への導入に際して宿主細胞のゲノムに統合し、そしてそれにより宿主ゲノムと共に複製される

。さらに、所定のベクターは、それらが作用的に結合するところの遺伝子の発現を指向することができる。そのようなベクターは本明細書中「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えＤＮＡ法において有用な発現ベクターはプラスミドの形態であることが多い。本明細書において、プラスミドはベクターの最も一般的に用いられる形態であるので、「プラスミド」および「ベクター」は互いに交換して用いることができる。しかし、本発明は、同等の機能を果たすそのような他の形態の発現ベクター、例えばウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルスなど）を含むことを意図する。

【０１２８】

本発明の組換え発現ベクターには、宿主細胞での核酸の発現に適した形態の本発明の核酸が含まれ、これは、組換え発現ベクターが、発現のために用いられる宿主細胞に基いて選択される１またはそれ以上の調節配列であって、発現されるべき核酸配列に作用的に結合するものを含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作用的に結合する」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を（例えば、インビトロ転写／翻訳システムにおいて、またはベクターが宿主細胞へ導入された場合、宿主細胞において）許容する方法で調節配列に結合することを意味するものとする。「調節配列」なる用語には、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が含まれるものとする。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology; Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に開示されている。調節配列には、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構造発現を指向するもの、および所定の宿主細胞でのみヌクレオチド配列の発現を指向するもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現のレベルなどの要因に依存し得ることが当業者には認識されるであろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入して、それにより、本明細書に開示するような核酸によりコードされる、融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチド（例えば、マーカータンパク質、マーカータンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を産生することができる。

【０１２９】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞におけるマーカータンパク質の発現のための設計することができる。例えば、マーカータンパク質は、イー．コリ(E. coli)などの細菌細胞、昆虫細胞において（バキュロウイルス発現ベクターを用いて）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現させることができる。適当な宿主細胞は、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)にさらに論じられている。別法として、組換え発現ベクターは、例えばＴ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを用いてインビトロで転写および翻訳させることができる。

【０１３０】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質の発現を指向している構造性もしくは誘導性プロモーターを含んでいるベクターを用いて、イー．コリにて最も頻繁に行われる。融合ベクターは、その中にコードされるタンパク質に対して、大抵組換えタンパク質のアミノ末端に対して多くのアミノ酸を付加する。そのような融合タンパク質は典型的には３つの目的を果たす：１）組換えタンパク質の発現を増加させること、２）組換えタンパク質の溶解度を増すこと、および３４）アフィニティ精製においてリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製において役立つこと。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解切断部位を融合部分と組換えタンパク質の結合部に導入して、融合タンパク質の精製の後で融合部分から組換えタンパク質を分離することを可能にする。そのような酵素およびその同種の認識配列には、ファクターＸａ、トロンビンおよびエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはタンパク質Ａを標的組換えタンパク質に融合するｐＧＥＸ(Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B.

およびJohnson, K.S. (1988) Gene 67: 31-40)、ｐＭＡＬ(New England Biolabs, Beverly, MA)およびｐＲＩＴ５(Pharmacia, Piscataway NJ)が含まれる。

【０１３１】

精製される融合タンパク質は、マーカー活性アッセイにおいて（例えば、以下に詳細に記載する直接アッセイまたは競合アッセイなど）、または例えばマーカータンパク質に特異的な抗体を作製するのに用いることができる。

適当な誘導性非－融合イー．コリ発現ベクターの例には、ｐＴｒｃ（Amann et al., (1988) Gene 69: 301-315)およびｐＥＴ１１ｄ（Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990)60-89)が含まれる。ｐＴｒｃベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドｔｒｐ－ｌａｃ融合プロモーターからの宿主ＲＮＡポリメラーゼ転写に依存する。ｐＥＴ１１ｄベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現されるウイルスＲＮＡポリメラーゼ（Ｔ７ｇｎ１）により媒介されるＴ７ｇｎ１０－ｌａｃ融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、宿主株ＢＬ２１（ＤＥ３）またはＨＭＳ１７４（ＤＥ３）により、ｌａｃＵＶ５プロモーターの転写対照下にＴ７ｇｎ１遺伝子を含んでいる内在性プロファージから供給される。

【０１３２】

イー．コリ中での組換えタンパク質の発現を最大にする一つの方法は、組換えタンパク質をタンパク質分解により分解する能力を損なわせた宿主細菌中でタンパク質を発現させることである(Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128)。他の方法は、各アミノ酸の個々のコドンがイー．コリ中で選択的に利用されるものとなるように、発現ベクターに挿入されるべき核酸の核酸配列を変更することである(Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118）。本発明の核酸配列のそのような変更は常套のＤＮＡ合成法により行うことができる。

【０１３３】

他の具体例において、マーカータンパク質発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母エス．セレビジエ(S.cerevisiae)における発現のためのベクターの例には、ｐＹｅｐＳｅｃ１(Baldari, et al., (1987) Embo J. 6: 229-234)、ｐＭＦａ(Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943)、ｐＪＲＹ８８(Schultz et al., (1987) Gene 54: 113-123)、ｐＹＥＳ２(Invitrogen Corporation, San Diego, CA)、およびｐｉｃＺ(InVitrogen Corp, San Diego, CA)が含まれる。

【０１３４】

別法として、本発明のマーカータンパク質を、バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞中で発現させることができる。培養昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中でのタンパク質の発現に利用できるバキュロウイルスベクターには、ｐＡｃシリーズ（Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165)およびｐＶＬシリーズ(Lucklow and Summers (1989) Virology 170: 31-39)が含まれる。

【０１３５】

さらに他の具体例では、本発現の核酸は、哺乳動物の発現ベクターを用いて哺乳動物中で発現させる。哺乳動物発現ベクターの例には、ｐＣＤＭ８(Seed, B. (1987) Nature 329: 840)およびｐＭＴ２ＰＣ(Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195)が含まれる。哺乳動物細胞中で用いられる場合、発現ベクターのコントロール機能がウイルス調節エレメントによりしばしば提供される。例えば、一般に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス４０から誘導される。原核生物細胞および真核生物細胞のための他の適当な発現系に関しては、Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989のチャプター１６および１７を参照されたい。

【０１３６】

他の具体例において、組換え哺乳動物発現ベクターが、特定の細胞タイプにおいて好ましく核酸の発現を指向することができる（例えば、組織特異的調節エレメントを用いて核酸を発現させる。）。組織特異的調節エレメントは当該分野で公知である。適当な組織特異的プロモーターの無制限の例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert et al (1987) Genes Dev. 1: 268-277)、リンパ球特異的プロモーター(Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275)、特にＴ細胞レセプターのプロモーター(Winoto and Baltimore (1989) EMBO J. 8: 729-733)および免疫グロブリン(Banerji et al. (1983) Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33: 741-748)、神経特異的プロモーター（例えば、神経繊維プロモーター；Byrne and Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA86: 5473-5477)、膵臓特異的プロモーター(Edlund et al. (1985) Science 230: 912-916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター;米国特許第4,873,316および欧州出願公開第264,166）が含まれる。発生段階で調節されるプロモーター、例えばネズミのｈｏｘプロモーター(Kessel and Gruss (1990) Science 249: 374-379)およびαフェトプロテインプロモーター(Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537-546)も包含される。

【０１３７】

本発明により、アンチセンス配向で発現ベクターにクローン化された本発明のＤＮＡ分子を含んでいる組換え発現ベクターがさらに提供される。つまり、ＤＮＡ分子は、ＳＭＡＲＣ遺伝子に対応しているｍＲＮＡに対してアンチセンスであるＲＮＡ分子の（ＤＮＡ分子の転写による）発現を許容する方法で調節配列に作用的に結合する。種々の細胞タイプにおけるアンチセンスＲＮＡ分子の持続的な発現を指向する、アンチセンス配向でクローン化された核酸に作用的に結合する調節配列アンチセンスＲＮＡを選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または減毒化されたウイルスの形態であり得、そこで、核酸は、その活性をベクターを導入する細胞タイプにより決定することができる高い効率の調節領域の調節下に産生される。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節に関する考察に関しては、Weintraub, H. et al., 遺伝子分析のための分子的手段としてのアンチセンスＲＮＡ、レビュー－Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986を参照されたい。

【０１３８】

本発明の別の態様は、組換え発現ベクター内の例えばＳＭＡＲＣなどの本発明の核酸分子、またはそれが宿主細胞のゲノムの特定の部位に相同的に結合するのを許容する配列を含んでいる本発明の核酸分子が導入されるところの宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」なる用語は本明細書中、交換して用いられる。そのような用語が特定対象細胞のみならず、そのような細胞の継代または潜在的な継代をも意味することが理解される。所定の変更が、変異または環境による影響のために後の世代に生じる可能性があり、そのような継代は実際親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書中に用いられる用語の範囲内に含まれる。

【０１３９】

宿主細胞はいずれかの原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、本発明のマーカータンパク質は、イー．コリなどの細菌細胞、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）またはＣＯＳ細胞）中で発現させることができる。他の適当な宿主細胞が当該分野の専門家に公知である。

【０１４０】

ベクターＤＮＡは、常套の形質転換法またはトランスフェクション法により原核生物細胞または真核生物細胞に導入することができる。本明細書中に用いる「形質転換」および「トランスフェクション」なる用語は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈降、ＤＥＡＥデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポーレーションを含む、外来核酸（例えばＤＮＡ）を宿主細胞に導入するための当該分野で認識される種々の方法を意味するものとする。宿主細胞を形質転換するもしくはトランスフェクションするための適当な方法は、Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Lab

oratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)および他の研究室マニュアルに見出すことができる。

【０１４１】

哺乳動物細胞の適当なトランスフェクションに関して、用いられる発現ベクターおよびトランスフェクション法により、細胞群の一部のみが外来ＤＮＡをそのゲノムに統合し得ることが公知である。これらの統合物を同定および選択するために、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する抵抗性）をコードする遺伝子が、目的の遺伝子と共に宿主細胞へ一般的に導入される。好ましい選択可能なマーカーには、薬物、例えばＧ４１８、ヒグロマイシン、およびメトトレキサートなどに対する抵抗性を付与するものが含まれる。選択可能なマーカーをコードしている核酸は、マーカータンパク質をコードしているものと同じベクターにて宿主細胞に導入することができ、または別個のベクターにて導入することができる。導入された核酸で安定に形質転換された細胞は、薬物選択により同定することができる（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を導入した細胞は、他の細胞が死ぬ場合でも生存する）。

【０１４２】

本発明の宿主細胞、例えば原核生物宿主培養細胞または真核生物宿主培養細胞を用いて、マーカータンパク質を産生させる（即ち、発現させる）ことができる。従って、本発明により、本発明の宿主細胞を用いてマーカータンパク質を産生するための方法がさらに提供される。一具体例において、該方法は（マーカータンパク質をコードしている組換え発現ベクターが導入された）本発明の宿主細胞を、本発明のマーカータンパク質が産生されるよう、適当な培地中で培養することを含む。他の具体例において、該方法は、培地または宿主細胞からマーカータンパク質を単離することをさらに含む。

【０１４３】

本発明の宿主細胞を用いて、非ヒトトランスジェニック動物を作製することもできる。例えば、一具体例において、本発明の宿主細胞は、マーカータンパク質コーディング配列が導入された受精卵母細胞または胎児幹細胞である。そのような宿主細胞を次いで用いて、本発明のマーカータンパク質をコードしている外来配列がそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物、または本発明のマーカータンパク質をコードしている外来配列が変更された相同組換え動物を作製することができる。そのような動物は、マーカータンパク質の機能および／または活性を研究するのに、およびマーカータンパク質の活性のモジュレーターを同定および／または評価するのに有用である。本明細書に用いられる「トランスジェニック動物」は、動物の細胞の１またはそれ以上がトランス遺伝子を含むところの非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラットもしくはマウスなどの齧歯動物である。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。トランス遺伝子は、トランスジェニック動物を発生させる細胞のゲノムへ統合され、および成熟した動物のゲノムに残っているゲノムに統合され、それによりトランスジェニック動物の１またはそれ以上の細胞タイプまたは組織中でコードされた遺伝子産物の発現を指向する外来ＤＮＡである。本明細書中に用いられるように、「相同組換え動物」は、内在ＳＭＡＲＣ遺伝子が、内在遺伝子および動物の細胞、例えば動物の発生前の動物の胎児細胞に導入された外来ＤＮＡ分子の間の相同組換えにより変更されている非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスである。

【０１４４】

本発明のトランスジェニック動物は、マーカーをコードしている核酸を例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルスインフェクションにより受精卵母細胞の雄性生殖核に導入し、そして擬似妊娠させた雌のフォスター動物にて卵母細胞を発生させることにより作製することができる。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルをトランス遺伝子に含めて、トランス遺伝子の発現効力を増すこともできる。組織特異的調節配列を、特定細胞に対してマーカータンパク質の発現を指向するためにトランス遺伝子に作用的に結合

させることができる。胎児の操作およびマイクロインジェクションによりトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物を作製するための方法は当該分野で常套のものとなっており、例えば、共にLeder et al.による米国特許第4,736,866および4,870,009、Wagner et alによる米国特許第4,873,191およびHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo,(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)に開示されている。同様の方法が他のトランスジェニック動物の産生のために用いられる。トランスジェニック創設動物(transgenic founder animal)は、そのゲノム中の本発明のトランス遺伝子の存在および／または動物の組織または細胞における本発明の遺伝子に対応しているｍＲＮＡの発現に基いて同定することができる。トランスジェニック創設動物を次いで用いて、トランス遺伝子を含んでいる更なる動物を繁殖させることができる。さらに、マーカータンパク質をコードしているトランス遺伝子を含んでいるトランスジェニック動物を、他のトランス遺伝子を含んでいる他のトランスジェニック動物にさらに交配させることができる。

【０１４５】

相同組換え動物を作製するために、遺伝子を変化させる、例えば機能的に破壊する欠失、付加または置換が導入された、本発明の遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製する。遺伝子はヒトの遺伝子であり得るが、より好ましくはヒトＳＭＡＲＣの非ヒト相同物である。例えば、マウスの遺伝子を用いて、相同組換え核酸分子、例えばマウスのゲノムにおける本発明の内在遺伝子を変更するのに適したベクターを構築することができる。好ましい具体例において、相同組換えに際して、本発明の内在遺伝子が機能的に破壊される（すなわち、もはや機能タンパク質をコードしない；「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる）ように相同組換核酸分子を設計する。別法として、相同組換え核酸分子は、相同組換えに際して、内在遺伝子が変異または変更されるが、機能タンパク質はなおコードするように設計することができる（例えば、上流の調節領域を変更して、それにより内在マーカータンパク質の発現を変更することができる。）。相同組換え核酸分子においては、本発明の遺伝子の変更された部分にその５’および３’末端にて本発明の遺伝子の追加的核酸配列が隣接して、相同組換え核酸分子により保持される外来遺伝子と、細胞、例えば胎児幹細胞中の内在遺伝子の間で相同組換えが起こるのを可能とする。追加の隣接核酸配列は、内在遺伝子との相同組換えを成功させるのに十分な長さである。典型的には、種々のキロベースの隣接ＤＮＡ（５’および３’両末端における）を相同組換え核酸分子に含める（例えば、相同組換えベクターの記載に関しては、Thomas, K.R. and Capecchi, M. R. (1987) Cell 51: 503を参照されたい。）。相同組換え核酸分子は、例えば胎児幹細胞株などの細胞中に（例えば、エレクトロポーレーションにより）導入し、次いで導入された遺伝子が内在遺伝子と相同組換えした細胞を選択する(例えば、Li, E. et al. (1992) Cell 69: 915を参照されたい）。選択された細胞を次いで動物（例えばマウス）の胚盤胞に注射し、集合キメラを作製することができる(例えば、Bradley, A. in Teratocaricinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed.(IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152を参照されたい。）。キメラ胎児を次いで適当な擬似妊娠させた雌のフォスター動物に移植し、次いで胎児を出産させることができる。その生殖細胞中に相同組換えＤＮＡを有している子孫を用いて、動物の全細胞がトランス遺伝子の生殖細胞による伝達により相同組換えされたＤＮＡを含んでいる動物を繁殖させることができる。相同組換え核酸分子、例えばベクター、または相同組換え動物を構築するための方法は、Bradley, A. (1991) Current Opinioin in Biotechnology 2: 823-829、およびLe Mouellec et alによるPCT国際公開WO90/11354、Smithies et alによるWO91/01140；Zijlstra et alによるWO92/0968;およびBerns et alによるWO93/04169にさらに記載されている。

【０１４６】

他の具体例において、トランス遺伝子の調節性の発現を可能とする選択されたシステムを含むトランスジェニック非ヒト動物を産生することができる。そのようなシステムの一つの例は、バクテリオファージＰ１のcre/loxPリコンビナーゼシステムである。cre/loxPリコンビナーゼシステムに関する記載に関しては、例えば、Lakso et al. (1992) Proc. Na

tl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236を参照されたい。リコンビナーゼシステムの他の例は、サッカロマイセスセレビジエのＦＬＰリコンビナーゼシステムである(O'Gorman et al. (1991) Science 251: 1351-1355)。cre/loxPリコンビナーゼシステムを用いてトランス遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードしているトランス遺伝子を含んでいる動物が所望される。そのような動物は、「ダブル」トランスジェニック動物の構築により、例えば、選択されたタンパク質をコードしているトランス遺伝子を含んでいるものと、レコンビナーゼをコードしているトランス遺伝子を含んでいる他方との２のトランスジェニック動物を交配することにより提供することができる。

【０１４７】

本明細書中に開示する非ヒトトランスジェニック動物のクローンを、Wilmut, I. et al. (1997) Nature 385: 810-813およびPCT国際公開第WO97/07668およびWO97/07669に開示されている方法に従い作製することもできる。簡単には、トランスジェニック動物由来の細胞、例えば体細胞を単離し、そして増殖サイクルを誘発するよう誘導し、そしてG_0相へ入らせることができる。静止期の細胞を次いで、例えば電気パルスの使用により、静止期の細胞を単離した同種の動物由来の摘出卵母細胞に融合することができる。再構築された卵母細胞を、桑実胚または胚盤胞へと発生するように培養し、そして次いで擬似妊娠させた雌のフォスター動物に移す。この雌のフォスター動物の子孫は、細胞、例えば体細胞を単離したところの動物のクローンである。

【０１４８】

ＩＶ．医薬組成物

本発明の核酸分子、即ち、本発明のＳＭＡＲＣポリヌクレオチド、マーカータンパク質のフラグメントおよびマーカータンパク質の抗体（本明細書中、「活性化合物」とも呼ぶ）は、投与に適した医薬組成物中に組み込むことができる。そのような組成物は典型的には、核酸分子、タンパク質、または抗体および医薬上許容されるキャリアからなる。本明細書中に用いる「医薬上許容されるキャリア」なる用語には、医薬投与に用いることができるいずれかおよび全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等浸透剤および吸収遅延剤などを含むものとする。医薬活性物質のためのそのような媒質および剤の使用は当該分野で周知である。いずれかの常套の媒質または剤が活性化合物と不適合である場合を除き、組成物におけるその使用が意図される。補助的活性化合物も組成物に組み込むことができる。

【０１４９】

本発明には、本発明のマーカーに対応しているポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するための医薬組成物を調製するための方法が含まれる。そのような方法には、本発明のマーカーに対応しているポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節する剤と共に、医薬上許容されるキャリアを処方することが含まれる。そのような組成物は、追加の活性剤をさらに含むことができる。つまり、本発明には、本発明のマーカーに対応しているポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節する剤および１またはそれ以上の追加の活性化合物と共に医薬上許容されるキャリアを処方することにより、医薬組成物を調製する方法がさらに含まれる。

【０１５０】

本発明により、（ａ）マーカーに結合する、または（ｂ）マーカーの活性に調節（例えば、刺激または阻害）効果を有する、またはより詳細には、（ｃ）マーカーのその天然の基質（例えば、ペプチド、タンパク質、ホルモン、補因子、または核酸）の１またはそれ以上との相互作用に調節効果を有する、または（ｄ）マーカーの発現に調節効果を有するモジュレーター、即ち、候補物質または試験化合物または剤（例えば、ペプチド、ペプチドミメティクス、ペプトイド、小分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる）も提供される。そのようなアッセイは典型的には、マーカーと１またはそれ以上のアッセイ成分との間の反応から成る。他の成分は試験化合物自体、または試験化合物とマーカーの天然結合パートナーとの組み合わせのいず

れかであってよい。

【０１５１】

本発明の試験化合物は、天然および/または合成化合物のシステマティックライブラリーを含むいずれかの利用可能な源から得てよい。試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプトイドライブラリー（ペプチドの機能を有するが、酵素による分解に対しては抵抗性があるが、生物活性は保持する新規非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー；Zuckermannn et al., 1994, J. Med. Chem. 37: 2678-85を参照されたい）；場所に関してアドレス可能な(spatially addressable)パラレル固相もしくは液相ライブラリー；デコンボリューションを要する合成ライブラリー法；「１-ビーズ１-化合物」ライブラリー法；およびアフィニティクロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を含む当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くの方法のいずれかにより得てもよい。生物学的ライブラリー法およびペプトイドライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、他の４つの方法はペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小分子ライブラリーに対して適用できる(Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145)。

【０１５２】

本発明の医薬組成物は、投与のその意図される経路と適合し得るように処方される。投与の経路の例には、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所）、粘膜経由、および直腸投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下適用に用いられる溶液または懸濁液には以下の成分を含めることができる：注射用の水、塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗細菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミネートテトラ酢酸などのキレート化剤；アセテート、シトレート、またはフォスフェートなどのバッファー、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの緊張調整剤。ｐＨは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または複合投与バイアルに封入することができる。

【０１５３】

注射可能な使用に適した医薬組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）または、滅菌注射可能溶液または分散剤の即席調製のための分散剤および滅菌粉末が含まれる。静脈内投与に関して、適当なキャリアには、生理的塩水、静菌水、Cremophor EL(登録商標)(BASF, Parsippany, NJ)またはリン酸緩衝塩水（ＰＢＳ）が含まれる。全ての場合に、組成物は無菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度まで液体であるべきである。それは製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の混入活性から保護されなければならない。キャリアは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、および適当なその混合物を含んでいる溶媒または分散剤であり得る。適当な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用により、分散剤の場合に所望の粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の活性の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどの種々の抗細菌剤および抗真菌剤により達成することができる。多くの場合に、例えば、砂糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含めることが好ましい。注射可能組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの剤を組成物中に含めることにより成し遂げることができる。

【０１５４】

滅菌注射可能溶液は、活性化合物（例えば、マーカータンパク質のフラグメントまたは抗マーカータンパク質抗体）を所望の量で適当な溶媒中に、前記の成分の１または組み合わせと共に混合し、所望によりその後フィルターによる滅菌を行うことにより調製することができる。一般には、分散剤は、活性化合物を、塩基性分散媒質、および前記からの所望の他の成分を含む滅菌ビヒクルに混合することにより調製する。滅菌注射可能溶液の調製

のための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、前もって滅菌濾過した溶液から活性成分およびいずれかの追加の所望の成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥である。

【０１５５】

経口組成物には一般に、不活性希釈剤または食用キャリアが含まれる。それらは、ゼラチンカプセルに封入することができ、または錠剤へと圧縮することができる。経口治療投与のために、活性化合物は賦形剤と混合することができ、そして錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で用いることができる。経口組成物は、液体キャリア中の化合物を口に入れ、ガラガラ音をたて、そして吐き出すもしくは飲み込むところのうがい薬としての使用のための液体キャリアを用いて調製することもできる。医薬上用いることができる結合剤、および／またはアジュバント物質を組成物の部分として含めることができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは以下の成分または同様の性質の化合物のいずれかを含むことができる；ミクロクリスタリンセルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；スターチまたはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、プライモゲル(Primogel)、またはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロート(Sterotes)などの潤滑剤；コロイド状シリコンジオキシドなどの滑剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ調味料などの風味剤。

【０１５６】

吸入による投与に関しては、組成物は、適当な推進剤、例えば二酸化炭素などのガス含む圧縮容器またはディスペンサーまたは噴霧器からエアゾルスプレーの形態で送達される。

【０１５７】

全身投与は、粘膜経由または経皮手段によってもなし得る。粘膜経由または経皮投与のためには、浸透されるべきバリアに適した浸透剤を処方に用いる。そのような浸透剤が一般に公知であり、および例えば、粘膜経由投与に関しては、洗浄剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。粘膜経由投与は、鼻腔スプレーまたは坐薬の使用により行うことができる。経皮投与に関しては、活性化合物を当該分野で一般的に公知の軟膏、塗り薬、ゲル、またはクリームに処方する。

【０１５８】

化合物は、直腸送達のための（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの常套の坐薬基剤を用いた）坐薬または停留浣腸の形態で調製することもできる。

【０１５９】

一具体例において、活性化合物は、化合物を体からの早期の排泄から保護するキャリア、例えばインプラントおよびマイクロカプセル封入送達システムを含む調節性放出処方などを用いて調製する。生物分解可能な、生物使用可能なポリマー、例えばエチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などを用いることができる。そのような処方の調製法は当該分野の専門家に明らかであろう。材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceutials, Incから市場入手可能であり得る。リポソーム懸濁液（感染細胞に標的されるリポソームをウイルス抗原に対するモノクローナル抗体と共に含んでいる）を医薬上許容されるキャリアとして用いることもできる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811に開示されるような当該分野の専門家に公知の方法に従い調製することができる。

【０１６０】

投与の簡便および投与量の均一化のために、投与単位にて経口もしくは非経口組成物を調製するのが特に好都合である。本明細書中に用いられる投与単位製剤には、治療されるべき対象のための単位投与製剤として適した物理的に別個の単位が含まれ、各単位は、所望の医薬キャリアと組み合わせて所望の治療効果を生じるよう算定された予め決定された量の活性化合物を含む。本発明の投与単位製剤に関する詳細は、活性化合物独自の特性および達成される特定の治療効果、および個人の治療のためにそのような活性化合物を配合することに関する当該分野に本来的に存在する制限によりおよびそれらに直接依存して、決定される。

【０１６１】
そのような化合物の毒性および治療効果は、培養細胞または実験動物において、例えばＬＤ５０（集団の５０％に対して致命的な投与量）およびＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効な投与量）を測定することに関する常套の医薬法により決定することができる。毒性および治療的有効量間の投与量の比率は、治療的指標であり、比ＬＤ５０/ＥＤ５０として表現することができる。大きな治療指標を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いてもよいが、非感染細胞に対して引き起こし得るダメージを最小限に押さえ、そしてそれにより副作用を減じるために、そのような化合物を冒された組織の部位へ標的する送達システムを設計するのには注意を要する。
【０１６２】
培養細胞アッセイおよび動物試験から得られたデータを、ヒトにおける使用のために所定の範囲の投与量を処方するのに用いることができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、ほとんど毒性を有さない、もしくは無毒性のＥＤ５０を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いられる投与製剤および用いられる投与経路に依存して、この範囲内で変化してよい。本発明の方法に用いられるいずれの化合物に関しても、治療有効投与量は、培養細胞アッセイからまず見積もることができる。投与量は、培養細胞中で決定されるようなＩＣ５０（即ち、症状の最大の阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するべく動物モデルにおいて処方されてよい。そのような情報を用いて、ヒトにおいて有用な投与量をより精密に決定することができる。血漿におけるレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定されてよい。
【０１６３】
本発明の核酸分子は、ベクターに挿入することができ、および遺伝子治療ベクターとして用いることができる。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照されたい）または定位注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057を参照されたい）により対象に送達することができる。遺伝子治療ベクターの医薬調製物には、許容される希釈剤中の遺伝子治療ベクターを含めることができ、または遺伝子送達ビヒクルを包埋する緩徐放出マトリックスを含めることができる。別法として、完全な遺伝子送達ベクター、例えばレトロウイルスベクターを組換え細胞からそのまま産生することができ、医薬調製物には、遺伝子送達システムを産生する１またはそれ以上の細胞を含めることができる。
医薬組成物は、容器、パックまたはディスペンサー中に、投与の指示書と共に含めることができる。
【０１６４】
Ｖ．コンピューター読み取り可能媒体およびアレイ
本発明のマーカーを含んでいるコンピューター読み取り可能媒体も提供される。本明細書に用いられる、「コンピューター読み取り可能媒体」には、コンピューターにより直接読み取られ得るおよび評価され得る媒体が含まれる。そのような媒体には、制限されるものではないが、フロッピーディスク、ハードディスク貯蔵媒体、および磁気性テープなどの磁気性貯蔵媒体；ＣＤ-ＲＯＭなどの光学貯蔵媒体；ＲＡＭおよびＲＯＭなどの電子貯蔵媒体；および磁気/光学貯蔵媒体などのこれらのカテゴリーのハイブリッドが含まれる。
当業者は、どのようにすれば、現在公知のコンピューター読み取り可能媒体のいずれかを用いて、本発明のマーカーをその上に記録させたコンピューター読み取り可能媒体を含む製品を作製することができるかを、容易に認識するであろう。
【０１６５】
本明細書中、「記録される」には、コンピューター読み取り可能媒体上に情報を貯蔵するためのプロセスが含まれる。当業者は、コンピューター読み取り可能媒体上に情報を記録するための現在公知の方法のいずれかを適用して、本発明のマーカーを含んでいる製品を容易に作製することができる。
【０１６６】
種々のデータ処理プログラムおよびフォーマットを用いて、コンピューター読み取り可能

媒体上に本発明のマーカー情報を貯蔵することができる。例えば、マーカーに対応している核酸配列はワード処理テキストファイルにて表すことができ、WordPerfectおよびMicro Soft Wordなどの市場入手可能なソフトウェアにフォーマットすることができ、またはASCIIファイルの形態で表すことができ、DB2、Sybase、Oracleなどのデータベースアプリケーションに貯蔵することができる。いかなる数のデータ処理構成フォーマット（例えば、テキストファイルまたはデータベース）をも、本発明のマーカーをその上に記録させたコンピューター読み取り可能媒体を得るために採用してよい。

【０１６７】

本発明のマーカーをコンピューター読み取り可能形態にて提供することにより、種々の目的のためにマーカー配列情報に常規的にアクセスすることが可能となる。例えば、当業者は、コンピュータ読み取り可能形態にて本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を用いて、データ貯蔵手段内に保存された配列情報と、標的配列または標的構造モチーフを比較することができる。検索手段を用いて、特定の標的配列または標的モチーフに適合する本発明の配列のフラグメントまたは領域が同定される。

【０１６８】

本発明は、本発明のマーカーを含むアレイをさらに含む。アレイを用いて、アレイ中の１またはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすることができる。一具体例において、アレイを用いて組織における遺伝子発現をアッセイして、アレイにおける遺伝子の組織特異性を確認することができる。この方法で、約８６００までの遺伝子を発現に関して同時にアッセイすることができる。これにより、１またはそれ以上の組織において特異的に発現される遺伝子の一群を示している特性を明らかにすることが可能となる。

【０１６９】

そのような質的測定に加えて、本発明により遺伝子発現の定量が可能となる。つまり、組織特異性のみならず、組織中の遺伝子の一群の発現のレベルも確認できる。つまり、遺伝子をその組織発現自体およびその組織における発現のレベルに基いてグループ分けすることができる。これは、例えば、組織間または組織中の遺伝子発現の関連性を確認するのに有用である。つまり、一組織を混乱させることができ、そして第２の組織における遺伝子発現における効果を測定することができる。この内容において、一細胞タイプの他の細胞タイプにおける生物学的刺激に応じた効果を測定することができる。そのような刺激は、例えば、遺伝子発現のレベルでの細胞-細胞相互作用の効果を知るのに有用である。１の細胞タイプを治療するが、他の細胞タイプにおいては望ましくない効果を有する試薬が治療的に投与される場合、本発明により、望ましくない効果の分子基準を決定するためのアッセイが提供され、そしてそれゆえ、妨害剤(counteracting agent)を同時投与する、もしくは望ましくない作用を治療する機会が提供される。同様に、単細胞タイプ内でも、望ましくない生物学的効果を分子レベルで決定することができる。つまり、標的遺伝子以外の発現における試薬の効果を確認し、そして妨害することができる。

【０１７０】

他の具体例において、アレイを用いてアレイ中の１またはそれ以上の遺伝子の発現の時間経過をモニターすることができる。これは、本明細書中に開示するような、例えば発生および分化、疾患の進行、細胞形質転換および老化などのインビトロプロセス、例えば痛みおよび食欲などの自律神経および神経プロセス、および例えば学習または記憶などの認識機能などの種々の生物学的状況において見出され得る。

【０１７１】

アレイは、同一細胞または異なる細胞における他の遺伝子の発現における遺伝子発現の効果を確認するのにも有用である。これにより、例えば、最終的なもしくは下流の標的を調節することができない場合に、治療的介入のための代替分子標的の選択が提供される。

アレイは、正常細胞および病的細胞における１またはそれ以上の遺伝子のディファレンシャル発現パターンを確認するのにも有用である。これにより、診断または治療的介入のための分子標的として役立ち得る遺伝子の一群が提供される。

【０１７２】

ＶＩ．診断医薬

本発明は、診断アッセイ、予防アッセイ、薬理遺伝学、および臨床試験をモニターすることを予防（診断）目的のために用いて、それにより個人を予防的に治療するところの診断医薬の分野にも関する。従って、本発明の一態様は、マーカータンパク質および／または核酸発現ならびにマーカータンパク質の活性を、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の内容物において測定して、それにより、個人が病気または疾患に罹患しているかどうかもしくは増加もしくは低下したマーカータンパク質の発現もしくは活性に伴う疾患を進行させる危険があるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。本発明により、個人が、マーカータンパク質、核酸の発現または活性に伴う疾患を進行させる危険性があるかどうかを決定するための予防（または診断）アッセイも提供される。例えば、マーカー遺伝子のコピーの数を生物学的サンプル中でアッセイすることができる。そのようなアッセイを予防または診断目的のために用いて、それにより、マーカータンパク質、核酸の発現または活性により特徴づけられるもしくはそれに伴う疾患（例えば、前立腺癌）の発症前に個人を予防的に治療することができる。

【０１７３】

本発明の他の態様は、臨床試験におけるマーカーの発現または活性における試薬（例えば、薬物、化合物）の影響をモニターすることを含む。

これらおよび他の試薬を、以下のセクションにさらに詳細に記載する。

【０１７４】

１．診断アッセイ

生物学的サンプル中の本発明のマーカータンパク質または核酸の存在または不在を検出するための典型的な方法は、試験対象から生物学的サンプルを得ること、および生物学的サンプルを、タンパク質またはマーカータンパク質をコードする核酸化合物（例えば、ｍＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ）を検出することができる化合物または試薬と接触させて、生物学的サンプル中のマーカータンパク質または核酸の存在を検出することが含まれる。本発明のマーカー遺伝子またはタンパク質に対応しているｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡを検出するのに好ましい試薬は、本発明のｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡにハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブである。本発明の診断アッセイにおける使用に適したプローブは、本明細書中に記載する。

【０１７５】

マーカータンパク質を検出するのに好ましい試薬は、マーカータンパク質に結合することができる抗体、好ましくは検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルまたはより好ましくはモノクローナルであり得る。完全抗体、またはそのフラグメント（例えば、Ｆａｂ、またはＦ（ａｂ’）$_2$）を用いることができる。プローブまたは抗体に関して「標識された」なる用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に（例えば物理的結合により）結合させることによりプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識された他の試薬との反応性により、プローブまたは抗体を間接的に標識することが含まれるものとする。間接標識の例には、蛍光標識された二次抗体を用いる一次抗体の、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出できるビオチンを用いたＤＮＡプローブの末端標識化の検出が含まれる。「生物学的サンプル」なる用語には、対象から単離された組織、細胞、および生物学的液体物、ならびに対象内に存在する組織、細胞、および液体物が含まれるものとする。つまり、本発明の検出法を用いて、生物学的サンプル中のマーカーｍＲＮＡ、タンパク質、またはゲノムＤＮＡをインビトロならびにインビボで検出することができる。例えば、マーカーｍＲＮＡの検出のためのインビトロ法には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。マーカータンパク質の検出のためのインビトロ法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、免疫沈降法、および免疫蛍光法が含まれる。マーカーゲノムＤＮＡの検出のためのインビトロ法には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、マーカータンパク質の検出のためのインビボ法には、対象に標識された抗マーカー抗体を導入することが含まれる。例えば、抗体を放射能活性マーカーで標識すること

ができ、対象におけるその存在および位置を常套の画像処理法により検出することができる。

【０１７６】

一具体例において、生物学的サンプルは、試験対象からのタンパク質分子を含む。別法として、生物学的サンプルは、試験対象からのｍＲＮＡ分子および試験対象からのゲノムＤＮＡ分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、対象から常套法により単離された血清サンプルである。

【０１７７】

他の具体例において、該方法は、対照の対象から対照生物学的サンプル（例えば、非前立腺癌細胞サンプル）を得ること、マーカータンパク質、ｍＲＮＡ，またはゲノムＤＮＡを検出することができ、その結果マーカータンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在を生物学的サンプル中で検出することができる化合物または試薬と対照サンプルを接触させること、およびマーカータンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの対照サンプル中の存在を、マーカータンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの試験サンプル中の存在と比較することをさらに含む。

【０１７８】

本発明は、生物学的サンプルにおけるマーカーの存在を検出するためのキットも包含する。さらにキットには、生物学的サンプル中でマーカータンパク質またはｍＲＮＡを検出することができる標識された化合物または試薬；サンプル中のマーカーの量を測定するための手段；およびサンプル中のマーカーの量を標準と比較するための手段を含めることができる。化合物または試薬は適当な容器中に封入することができる。キットは、キットを用いてマーカータンパク質または核酸を検出するための指示書をさらに含むことができる。

【０１７９】

２．予防アッセイ

本明細書中に記載する診断法をさらに用いて、異常なマーカーの発現または活性に伴う病気または疾患を有するもしくはそれを進行させる危険のある対象を同定することができる。本明細書中に用いられる、「異常」なる用語には、野生型のマーカー発現または活性からはずれるマーカーの発現または活性が含まれる。異常な発現または活性には、増加もしくは低下した発現または活性、ならびに野生型の発生段階における発現パターンまたは亜細胞発現パターンに従わない発現または活性が含まれる。例えば、異常なマーカー発現または活性は、マーカー遺伝子の変異により、マーカー遺伝子を発現不足となるもしくは過剰発現される場合、およびそのような変異により、非機能性のマーカータンパク質または野生型の様式で機能しないタンパク質、例えば、マーカーリガンドと反応しないタンパク質もしくは非マーカータンパク質リガンドと相互作用するタンパク質が生じる場合が含まれるものとする。

【０１８０】

本明細書に開示される、前記の診断アッセイまたは後述するアッセイなどのアッセイを用いて、マーカータンパク質の活性または核酸発現の誤調節に伴う疾患、例えば前立腺癌を有するもしくは進行させる危険性のある対象を同定することができる。別法として、該予防アッセイを用いて、マーカータンパク質の活性または核酸発現の誤調節に伴う疾患、例えば前立腺癌を有するもしくは進行させる危険性のある対象を同定することができる。つまり、本発明により、異常なマーカー発現または活性に伴う病気または疾患を同定するための方法であって、試験サンプルを対象から得、そしてマーカータンパク質または核酸（例えば、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡ）を検出し、マーカータンパク質または核酸の存在が、異常なマーカーの発現または活性に伴う病気または疾患を有するもしくはそれを進行させる危険性のある対象を診断するものであるところの方法が提供される。本明細書中に用いるように、「試験サンプル」には、目的の対象から得られた生物学的サンプルが含まれる。例えば、試験サンプルは、生物学的液体物（例えば、血液）、細胞サンプル、または組織（例えば、皮膚）であり得る。

【０１８１】

さらに、本明細書中に開示する予防アッセイを用いて、対象に試薬（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティクス、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬物候補など）を投与して、増加もしくは低下したマーカーの発現もしくは活性に伴う病気または疾患を治療することができるかどうかを決定することができる。例えば、そのような方法を用いて、対象が、前立腺癌などの疾患のための試薬で効果的に治療され得るかどうかを決定することができる。つまり、本発明により、増加もしくは低下したマーカーの発現または活性に伴う疾患のための試薬で対象を効果的に治療することができるかどうかを決定するための方法であって、試験サンプルを得、そしてマーカータンパク質または核酸の発現または活性を検出するところの方法（例えば、マーカータンパク質または核酸の発現または活性の存在度が、増加もしくは低下したマーカーの発現または活性に伴う疾患を治療するための試薬を投与することができる対象を診断するものとなる）が提供される。

【０１８２】

本発明の方法をさらに用いて、マーカー遺伝子における遺伝子の変化を検出し、それにより、変化した遺伝子を有する対象が、マーカータンパク質の活性または核酸発現における誤調節により特徴づけられる疾患、前立腺癌などの危険性があるかどうかを決定することができる。好ましい具体例において、該方法は、対象からの細胞のサンプル中の、マーカータンパク質をコードしている遺伝子の完全性に影響を与えている少なくとも一つの変化により特徴づけられる遺伝子変化の存在または不在、またはマーカー遺伝子の誤発現を検出することが含まれる。例えば、そのような遺伝子変化は、１）マーカー遺伝子からの１またはそれ以上のヌクレオチドの欠失；２）マーカー遺伝子に対する１またはそれ以上のヌクレオチドの付加；３）マーカー遺伝子の１またはそれ以上のヌクレオチドの置換；４）マーカー遺伝子の染色体上での転位；５）マーカー遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写のレベルの変化；６）マーカー遺伝子の、例えばゲノムＤＮＡのメチル化パターンなどの異常な変更、；７）マーカー遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写産物の非野生型のスプライシングパターンの存在；８）マーカータンパク質の非野生型レベル；９）マーカー遺伝子の対立遺伝子の喪失；および１０）マーカータンパク質の不適当な翻訳後の変更の存在を確認することにより検出することができる。本明細書中に記載するように、マーカー遺伝子の変化を検出するために用いることができる当該分野で公知の多数のアッセイが存在する。好ましい生物学的サンプルは、対象から常套手段により単離された組織または血液サンプルである。

【０１８３】

所定の具体例において、変化の検出には、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）、アンカーＰＣＲまたはＲＡＣＥ ＰＣＲなどにおける（例えば、米国特許第4,683,195号および4,683,202号を参照されたい）、または別法として、ライゲーション鎖反応（ＬＣＲ）における（例えば、Landegran et al. (1988) Science 241: 1077-1080; and Nakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 360-364を参照されたい）プローブ／プライマーの使用、ここで後者はマーカー遺伝子の点変異を検出するのに特に有用であり得る(Abravaya et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23: 675-682を参照されたい）、が含まれる。この方法は、対象から細胞のサンプルを回収すること、核酸（例えば、ゲノム、ｍＲＮＡまたはその両方）をサンプルの細胞から単離すること、マーカー遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じる条件下でマーカー遺伝子に特異的にハイブリダイズする１またはそれ以上のプライマーと核酸サンプルを接触させること、および増幅産物の存在または不在を検出すること、または増幅産物のサイズを検出すること、および対照サンプルに対して長さを比較することから成るステップを含み得る。ＰＣＲおよび／またはＬＣＲが、予備的な増幅ステップとして、本明細書に記載する変異を検出するために用いられる方法のいずれかと組み合わせて用いることが望まれてよい。

【０１８４】

別の増幅法には、自律性配列複製(Guatelli, J.C. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. A Sci. USA 87: 1874-1878)、転写増幅システム(Kwoh, D. Y. et al., (1989) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Ｑ－ベータレプリカーゼ（Lizardi, P.M. et al. (1988) Bio-Technology 6: 1197)、またはいずれかの他の核酸増幅法の後で、当該分野の専門家に周知の方法を用いて、増幅された分子の検出を行うことが含まれる。これらの検出スキームは、そのような分子が非常に少数しか存在しない場合に、核酸分子を検出するのに特に有用である。

【０１８５】

別の具体例において、サンプル細胞からのマーカー遺伝子の変異は、制限酵素切断パターンの変化により同定することができる。例えば、サンプルおよび対照ＤＮＡを単離し、増幅し（任意）、１またはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、そしてフラグメントの長さのサイズをゲル電気泳動により決定し、そして比較する。サンプルおよび対照ＤＮＡの間のフラグメントの長さのサイズの差が、サンプルＤＮＡにおける変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの使用（例えば、米国特許第5,498,531を参照されたい）を用いて、リボザイム切断部位の発生または喪失により特定の変異の存在をスコアすることができる。

【０１８６】

他の具体例において、マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子における遺伝子変異は、サンプルと対照の核酸、例えばＤＮＡまたはＲＮＡを、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含んでいる高密度アレイにハイブリダイズさせることにより同定することができる(Cronin, M.T. et al. (1996) Human Mutation 7: 244-255; Kozal, M. J. et al. (1966) Nature Medicine 2: 753-759)。例えば、マーカーにおける遺伝子変異は、Cronin et al. 既出に記載されるような光により作製された(light generated)ＤＮＡプローブを含んでいる二次元アレイにて同定することができる。簡単には、プローブの第１のハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよび対照中の長いＤＮＡを探査して、連続して部分的に重なっているプローブの線状アレイを作製することにより配列間の塩基の変化を同定することができる。このステップにより、点変異の同定が可能となる。このステップの後、検出される全変種または変異に相補的な、もっと小さな、特定化されたプローブを用いることにより、特定の変異を特徴付けることを可能とする第２のハイブリダイゼーションアレイにより行う。各変異アレイは、野生型遺伝子に相補的なものと変異遺伝子に相補的な他方との、パラレルなプローブセットからなる。

【０１８７】

さらに他の具体例では、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを用いてマーカー遺伝子を直接配列決定し、そして、対応している野生型（対照）配列とサンプルマーカーの配列を比較することにより、変異を検出することができる。配列決定反応の例には、Maxam and Gilbert((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560)またはSanger((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)により開発された方法に基くものが含まれる。マス　スペクトロメトリーによる配列決定を含む(例えば、PCT国際公開第WO94/16101; Cohen et al. (1996) Adv. Chromatogr. 36: 127-162; およびGriffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159)、種々の自動配列決定法のいずれかを診断アッセイを行う場合に用いることができることも意図される((1995) Biotechniques 19: 448)。

【０１８８】

マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子における変異を検出する他の方法には、切断試薬からの保護を用いて、ＲＮＡ／ＲＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡのヘテロ二本鎖のミスマッチ塩基を検出する方法が含まれる(Myers et al. (1985) Science 230: 1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野における方法は、野生型マーカー配列を含んでいる（標識された）ＲＮＡまたはＤＮＡを、組織サンプルから得た変異の可能性のあるＲＮＡまたはＤＮＡとハイブリダイズさせることにより形成されるヘテロ二本鎖を提供することにより始まる。二本鎖分子を、対照およびサンプル鎖の間の塩基対のミスマッチのために存在する二本鎖の一本鎖領域を切断する試薬で処理する。例えば、ＲＮＡ／ＤＮＡ二本鎖はＲＮａｓｅで処理することができ、および、ＤＮＡ／ＤＮＡ

ハイブリッドはＳ１ヌクレアーゼで処理して、ミスマッチしている領域を酵素消化する。他の具体例において、ミスマッチ領域を消化するために、ＤＮＡ／ＤＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡ二本鎖をヒドロキシルアミンまたはオスミウムテトロキシドで、およびピペリジンで処理することができる。ミスマッチ領域の消化後、生じた物質を次いで、変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離し、変異の部位を決定する。例えば、Cotton et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85: 4397; Saleeba et al. (1992) Methes Enzymol 217: 286-295を参照されたい。好ましい具体例では、対照ＤＮＡまたはＲＮＡを検出のために標識することができる。

【０１８９】

さらに他の具体例では、ミスマッチ切断反応は、二本鎖ＤＮＡ中のミスマッチ塩基対を認識する１またはそれ以上のタンパク質（いわゆる「ＤＮＡミスマッチ修復酵素」）を、細胞のサンプルから得たマーカーｃＤＮＡ中の点変異を検出およびマッピングするために規定されたシステムにおいて用いるものである。例えば、イー．コリのｍｕｔＹ酵素はＧ／ＡミスマッチにてＡを切断し、そして、ヒーラー細胞からのチミジンＤＮＡグリコシラーゼは、Ｇ／ＴミスマッチにてＴを切断する(Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15: 1657-1662)。典型的な具体例に従い、マーカー配列、例えば野生型マーカー配列に基くプローブを、試験細胞からのｃＤＮＡまたは他のＤＮＡ産物にハイブリダイズさせる。二本鎖をＤＮＡミスマッチ修復酵素で処理して、そして、切断産物が存在する場合はそれを電気泳動プロトコルなどから検出することができる。例えば、米国特許第5,459,039号を参照されたい。

【０１９０】

他の具体例において、電位泳動の移動度の変化を用いて、マーカー遺伝子または本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子における変異を検出する。例えば、一本鎖立体構造多型（ＳＳＣＰ）を用いて、変異体および野生型核酸の間の電気泳動の移動度の差を検出してよい(Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA: 86: 2766, Cotton (1993) Mutat. Res. 285: 125-144; およびHayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79も参照されたい）。サンプルおよび対照のマーカー核酸の一本鎖ＤＮＡフラグメントは変性し、そして復元する。一本鎖核酸の二次構造は、配列により変化し、結果的に生じる塩基泳動の移動度の変化により、一つの塩基の変化さえも検出することができる。ＤＮＡフラグメントは、標識プローブで標識されてよく、または検出されてよい。アッセイの感度を、ＲＮＡ（ＤＮＡよりもむしろ）を用いることにより高めてよく、この場合、二次構造は配列の変化に対してより感受性となる。好ましい具体例において、対象たる方法は、電気泳動の移動度の変化に基いて、二本鎖のヘテロ二本鎖分子を分離するヘテロ二本鎖分析を用いる(Keen et al. (1991) Trends Genet 7:5)。

【０１９１】

さらに他の具体例において、変性剤の勾配を含んでいるポリアクリルアミドゲル中の変異体または野生型フラグメントの移動を、変性勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）を用いてアッセイする(Myers et al. (1985) Nature 313: 495)。ＤＧＧＥを分析の方法として用いる場合、ＤＮＡを、それが完全には変性しないことを確実にするために、例えば約４０ｂｐの高融点のＧＣに富むＤＮＡのＧＣクランプをＰＣＲにより添加することにより、変更する。さらなる具体例において、変性剤の勾配の代わりに温度勾配を用いて、対照とサンプルＤＮＡの移動度の差を同定する(Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265: 12753)。

【０１９２】

点変異を検出するための他の方法の例には、制限されるものではないが、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー拡張が含まれる。例えば、公知の変異が中央に位置しているオリゴヌクレオチドプライマーを調製し、そして次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的ＤＮＡにハイブリダイズさせてよい(Saiki et al. (1986) Nature 324: 163); Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:6230)。そのような対立遺伝子

特異的オリゴヌクレオチドをＰＣＲにより増幅された標的ＤＮＡまたは多くの異なる変異体にハイブリダイズさせ、その場合、オリゴヌクレオチドはハイブリダイジング膜に結合させ、そして、標識した標的ＤＮＡとハイブリダイズさせる。

【０１９３】

別法として、選択的ＰＣＲ増幅に基く対立遺伝子特異的増幅法を、本発明と組み合わせて用いてよい。特定の増幅のためのプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、（増幅がディファレンシャルハイブリダイゼーションに基づくように）分子の中央に目的の変異を有してよく(Gibbs et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17: 2437-2448)、または一プライマーの３’末端に目的の変異を有していてよく、この場合は、適当な条件下でミスマッチによりポリメラーゼの伸長が妨げられ得もしくは減じられ得る(Prossner (1993) Tibtech 11: 238)。加えて、変異の領域に新規な制限部位を誘導して、切断に基く検出を得ることが望まれ得る(Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。所定の具体例において、増幅は、増幅のためのＴａｑリガーゼを用いて行われてもよいことが認識される(Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189)。そのような場合、ライゲーションは５’配列の３’末端において完全なマッチが存在する場合にのみ起こり、増幅の存在または不在を調べることにより、特定の部位における公知の変異の存在を検出することが可能となる。

【０１９４】

本明細書に開示する方法は、例えば、本明細書中に開示する少なくとも一つのプローブ核酸または抗体試薬を含んでいる予め封入された診断キットであって、例えば、マーカー遺伝子が関与している疾患または病気の症状またはファミリーヒストリーを示している対象を診断するために臨床場面において通常用いられ得るものを利用することにより、行ってよい。

さらに、マーカーを発現するあらゆる細胞タイプまたは組織を、本明細書に開示する予防アッセイに用いてよい。

【０１９５】

３．臨床試験中の効果のモニタリング

マーカータンパク質の発現または活性における試薬（例えば、薬物）の影響（例えば、前立腺癌の調節）をモニターすることは、基礎的な薬物スクリーニングのみならず、臨床試験においても適用することができる。例えば、本明細書に開示するスクリーニングアッセイにより決定される試薬の、マーカー遺伝子の発現、タンパク質レベルを増すもしくはマーカーの活性をアップレギュレートする効力を、低下したマーカー遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートされたマーカー活性を示している対象の臨床試験においてモニターすることができる。別法として、スクリーニングアッセイにより決定される試薬の、マーカー遺伝子の発現、タンパク質レベルを低下させるもしくはマーカーの活性をダウンレギュレートさせる効力を、増加したマーカー遺伝子の発現、タンパク質レベルまたはアップレギュレートしたマーカー活性を示している対象の臨床試験においてモニターすることができる。そのような臨床試験において、マーカー遺伝子、および好ましくは例えばマーカーに関連する疾患（例えば前立腺癌）に関与している他の遺伝子の発現または活性を、「リードアウト」または特定細胞の表現型のマーカーとして用いることができる。

【０１９６】

例えば、および制限するものでなく、マーカーの活性を調節する試薬（例えば、化合物、薬物または小分子）（例えば、本明細書中に記載するスクリーニングアッセイにおいて同定される）での処理により細胞内で調節される、マーカー遺伝子および本発明のマーカータンパク質をコードしている遺伝子を含んでいる遺伝子を同定することができる。つまり、マーカーに関連する疾患（例えば、前立腺癌）における試薬の影響を例えば臨床試験で試験するために、細胞を単離し、そしてＲＮＡを調製し、マーカーおよびマーカー関連疾患に関与する他の遺伝子の発現レベルをそれぞれ分析することができる。遺伝子発現のレベル（例えば遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載するようなノーザンブロット分

析またはＲＰ－ＰＣＲにより、または別法として、産生されたタンパク質の量を測定することにより、本明細書に記載する方法の一つにより、またはマーカーまたは他の遺伝子の活性レベルを測定することにより定量することができる。この方法において、遺伝子発現パターンを、試薬に対する細胞の生理的反応を示すマーカーとして用いることができる。従って、この反応状態を、試薬で個人を治療する前および治療する間の種々の時点で測定してよい。

【０１９７】

好ましい具体例において、本発明により、試薬（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティクス、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または本明細書中に開示するスクリーニングアッセイにより同定される他の薬物候補）での対象の治療の有効性をモニターする方法であって、（ｉ）試薬の投与前に対象から投与前サンプルを得ること；（ｉｉ）マーカータンパク質、ｍＲＮＡ，またはゲノムＤＮＡの、投与前サンプル中での発現のレベルを検出すること；（ｉｉｉ）対象から、１またはそれ以上の投与後サンプルを得ること；（ｉｖ）マーカータンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの投与後サンプルにおける発現または活性のレベルを検出すること；（ｖ）マーカータンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの前投与サンプル中での発現または活性のレベルを、投与後サンプルまたはサンプル（複数）中のマーカータンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡと比較すること；および、（ｖｉ）それに応じて、対象への試薬の投与を変更することから成るステップを含む方法が提供される。例えば、試薬の投与の増加が、検出されるよりも高いレベルへマーカーの発現または活性を増すのに、即ち、試薬の有効性を増すのに所望されてよい。別法として、試薬の投与の削減が、検出されるよりも低いレベルへマーカーの発現または活性を低下させるのに、即ち、試薬の有効性を低下させるのに所望されてよい。従って、そのような具体例において、観察できる表現型の反応がない場合でも、マーカーの発現または活性を試薬の有効性の指標として用いることができる。

【０１９８】

４．治療の方法：

本発明により、異常なマーカーの発現または活性に伴う疾患の危険性のある（または罹患しやすい）またはそれらを有する対象を治療する、予防的および治療的方法が提供される。予防的および治療的治療法の両方に関して、そのような治療は薬理遺伝学の分野から得られる知識に基いて、特に調整または変更されてよい。本明細書中に用いる「薬理遺伝学」には、遺伝子配列決定、統計遺伝学、および臨床開発段階の、および市場における薬物に対する遺伝子発現の分析などの遺伝子技術の適用が含まれる。より詳細には、該用語は、どのようにして対象の遺伝子により薬物に対するその反応が決定されるか（例えば、対象の「薬物反応表現型」、または「薬物反応遺伝子型」）に関する研究を意味する。つまり、本発明の別の態様により、本発明のマーカー分子または個人の薬物反応の遺伝子型に基づくマーカーモジュレーターのいずれかで、個人の予防的または治療的処置を調整するための方法が提供される。薬理遺伝学により、臨床医または主治医は、治療から最も利益を得るであろう対象に対して予防的または治療的処置を標的し、そして、毒性薬物に関連する副作用を受けるであろう対象の治療は避けることができる。

【０１９９】

５．予防法

一態様において、本発明により、増加または低下したマーカーの発現または活性に伴う病気または症状（例えば、前立腺癌）を対象において、対象にマーカータンパク質、またはマーカータンパク質の発現もしくは少なくとも一つのマーカータンパク質の活性を調節する試薬を投与することにより、予防する方法が提供される。増加もしくは低下したマーカーの発現または活性により引き起こされるもしくは起因する疾患の危険性がある対象を、例えば、本明細書中に記載する診断または予防アッセイのいずれかまたはその組み合わせにより同定することができる。予防薬の投与を、病気または疾患が予防されるように、または別に、その進行が遅延するように、ディファレンシャルなマーカータンパク質発現の特徴を有する症状が現れる前に行うことができる。マーカーの異常性のタイプ（例えば、

発現レベルの増加または低下）に依存して、例えば、マーカータンパク質、マーカータンパク質アゴニスト、またはマーカータンパク質アンタゴニスト試薬を、対象を治療するのに用いることができる。適当な試薬は、本明細書中に記載するスクリーニングアッセイに基いて決定することができる。

【０２００】

６．治療法

本発明の他の態様は、治療目的のためにマーカータンパク質の発現または活性を調節する方法に関する。従って、典型的な具体例において、本発明の調節法は、細胞を、マーカータンパク質、または該細胞に伴うマーカータンパク質活性の活性の１またはそれ以上を調節する試薬と接触させることを含む。マーカータンパク質の活性を調節する試薬は、本明細書中に記載するような試薬、例えば、核酸またはタンパク質、マーカータンパク質の天然に生じる標的分子（例えばマーカータンパク質基質）、マーカータンパク質抗体、マーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト、マーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニストのペプチドミメティクス、または他の小分子であり得る。一具体例において、試薬は１またはそれ以上のマーカータンパク質活性を刺激する。そのような刺激剤の例には、活性マーカータンパク質、および細胞中に誘導されているマーカータンパク質をコードしている核酸分子が含まれる。他の具体例において、試薬は１またはそれ以上のマーカータンパク質の活性を阻害する。そのような阻害剤の例には、アンチセンスマーカータンパク質核酸分子、抗－マーカータンパク質抗体、およびマーカータンパク質インヒビターが含まれる。これらの調節法は、インビトロで（例えば、細胞を試薬と共に培養することにより）または別法としてインビボで（例えば、試薬を対象に投与することにより）行うことができる。そのようにして、本発明により、マーカータンパク質または核酸分子の異常な発現または活性により特徴づけられる病気または疾患に罹患している個人を治療する方法が提供される。一具体例において、該方法は、試薬（例えば、本明細書に開示されるスクリーニングアッセイにより同定される試薬）またはマーカータンパク質の発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）試薬の組み合わせを投与することを含む。他の具体例において、該方法は、マーカータンパク質または核酸分子を治療として投与して、低下した、もしくは異常なマーカータンパク質の発現または活性を補うことを含む。

【０２０１】

マーカータンパク質の活性の刺激は、マーカータンパク質が異常にダウンレギュレートしている場合、および／または増加したマーカータンパク質の活性が有利な効果を持つと考えられる場合に望ましい。例えば、マーカータンパク質の活性の刺激は、マーカータンパク質がダウンレギュレートされる場合および／または増加したマーカータンパク質の活性が有利な効果を持つと考えられる場合に望ましい。同様にマーカータンパク質の活性の阻害は、マーカータンパク質が異常にアップレギュレートしている場合および／または低下したマーカータンパク質の活性が有利な効果を持つと考えられる場合に望ましい。

【０２０２】

７．薬理遺伝学

本発明のマーカータンパク質および核酸分子ならびに試薬、または本明細書に開示するスクリーニングアッセイにより同定されるような、マーカータンパク質の活性（例えばマーカー遺伝子の発現）に刺激または阻害効果を持つモジュレーターを個人に投与して、異常なマーカータンパク質活性に伴うマーカー関連疾患（例えば、前立腺癌）を（予防的または治療的に）治療することができる。そのような治療と組み合わせて、薬理遺伝学（即ち、個人の遺伝子タイプと外来化合物または薬物に対するその個人の反応の間の関連性に関する研究）を考慮してよい。治療の代謝における差が、薬理学的に活性な薬物の投与量と血液濃度の間の関連性を変化させることにより、重度の毒性と治療の失敗を導く可能性がある。従って、主治医または臨床医は、マーカー分子を投与するかマーカーモジュレーターを投与するかを決定するのに、ならびに、マーカー分子またはマーカーモジュレーターでの治療の投与量および／または治療管理を調整するのに、関連する薬理学的研究におい

て得られた知識を用いることを考慮し得る。

【０２０３】

薬理遺伝学は、罹患した人において変化した薬物の性質および異常な活性による、薬物に対する反応における臨床上明らかな遺伝的変化を扱う。例えば、Eichelbaum, M. et al. (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11): 983-985 およびLinde, M.W. et al. (1997) Clin. Chem. 43(2): 254-266を参照されたい。一般に、薬理遺伝学的症状に関して２つのタイプを分別することができる。薬物が体に作用する方法を変化させている単一のファクター（変化した薬物活性）として遺伝する遺伝的症状または体が薬物に作用する方法を変化させている単一のファクター（変化した薬物代謝）として遺伝する遺伝的症状。これらの薬理遺伝学的疾患は、まれな遺伝子欠損として、または天然に生じる多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ欠損（Ｇ６ＰＤ）は、主な臨床合併症が酸化剤（抗－マラリア、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）の摂取後およびソラマメ消費後の出血である、一般的な遺伝性酵素症である。

【０２０４】

薬物反応を予測する遺伝子を同定するための、「ゲノムの全域に渡る関連性」として知られる一つの薬理遺伝学的方法は、既に公知の遺伝子関連マーカーから成るヒトゲノムの高分解能マップ（例えば、それぞれ２つの変種を有する、ヒトのゲノムにおける６０,０００－１００,０００の多型もしくは可変部位から成る「複対立」遺伝子マーカーマップ）に主に基く。そのような高分解能の遺伝子マップを、統計学的に有意な数の、フェーズＩＩ／ＩＩＩ薬物試験に参加している対象のそれぞれのゲノムのマップと比較して、特に認められる薬物反応または副作用に関連するマーカーを同定することができる。別法として、そのような高分解能マップは、ヒトゲノムにおける数千万の公知の単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）の組み合わせから作製することができる。本明細書に用いられる、「ＳＮＰ」は、ＤＮＡの伸張中の単一のヌクレオチド塩基に生じる共通の変化である。例えば、ＳＮＡはＤＮＡの約１０００塩基当たりに１つ生じ得る。ＳＮＰは、疾患のプロセスに関与している可能性があるが、大部分は疾患に関連していない可能性がある。そのようなＳＮＰの発生に基く遺伝子マップを用いて、個人を、その個々のゲノムにおけるＳＮＰの特定のパターンによって、遺伝的カテゴリーにグループ分けすることができる。そのような方法にて、そのような遺伝的に類似する個人の間で共通する可能性のある特性を考慮して、遺伝的に類似する個人から成るグループに対して投与管理を調整することができる。

【０２０５】

別法として、「候補遺伝子法」と名づけられる方法を用いて、薬物反応を予測する遺伝子を同定することができる。この方法に従い、薬物標的をコードする遺伝子が公知である場合（例えば、本発明のマーカータンパク質）、その遺伝子の全共通の変種を集団においてかなり容易に同定することができ、および他に対する遺伝子の１バージョンを有することが特定の薬物反応に関連しているかどうかを決定することができる。

【０２０６】

典型的な具体例として、薬物代謝酵素の活性が、薬物活性の強さおよび持続の両方の主要な決定要因である。薬物代謝酵素（例えば、Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２（ＮＡＴ２）およびシトクロームＰ４５０酵素ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９）の遺伝子多型の発見により、薬物の通常および安全投与量を摂取した後に、なぜ幾人かの患者は期待される薬物効果を得ず、または激化した薬物反応および重篤な毒性を示すのかということに関する説明が提供された。これらの多型は集団において２つの表現型、強い代謝能力を有する人（ＥＭ）および弱い代謝能力を有する人（ＰＭ）にて表現される。ＰＭの優勢は、異なる集団の間で異なる。例えば、ＣＹＰ２Ｄ６をコードしている遺伝子は高度に多型であり、すべて機能的ＣＹＰ２Ｄ６の不在に通じるいくつかの変異がＰＭにおいて同定されている。ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の弱い代謝能力を有する人は、通常の投与量を受けた場合に激化した薬物反応および副作用をかなりの頻度で経験した。代謝産物が活性な治療部分である場合、そのＣＹＰ２Ｄ６により形成される代謝産物モルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛効果に関して立証されているように、ＰＭは治療反応を示さない

。他の極端な例は、いわゆる、常套の投与量に対して反応しないいわゆる超迅速代謝能力を有する人である。近年、超迅速代謝能力を有する人の分子的基礎が、ＣＹＰ２Ｄ６遺伝子の増幅によるものであることが確認された。

【０２０７】

別法として、「遺伝子発現特性化」と呼ばれる方法を用いて、薬物反応を予測する遺伝子を同定することができる。例えば、薬物（例えば、マーカー分子または本発明のマーカーモジュレーター）を投与した動物の遺伝子発現により、毒性に関連する遺伝子経路が活性化されたかどうかの指標が提供され得る。

【０２０８】

前記薬理遺伝学的手段の１以上から得られる情報を用いて、個人の予防もしくは治療的処置のための適当な投与量および治療管理を決定することができる。投与または薬物選択に適用する場合、この知識は、マーカー分子または本明細書に開示される典型的なスクリーニングアッセイの一つで同定されるモジュレーターなどのマーカーモジュレーターで対象を治療する場合に、有害な反応または治療の失敗を避けることができ、そしてすなわち、治療または予防効果を高めることができる。

【０２０９】

本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、これらは制限するものとして解釈されるべきではない。本明細書中の全引用文献、特許文献および公開された特許出願の内容は、本明細書中に出典明示により組み込む。

【０２１０】

実施例

実施例１：マーカーｃＤＮＡの同定および特定

（ｉ）方法および材料

（ａ）培養細胞

ヒト前立腺癌細胞株ＬＮＣａＰ、ＤＵ－１４５、ＰＣ－３、およびＴｓｕ－ｐｒｌをＡＴＣＣから得た。ＬＮＣａＰ癌細胞は空気中５％CO_2の湿った雰囲気中、１０％の子牛血清（Life Technologies, Inc, Rockville, MD)、３ｍＭのＬ－グルタミン、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンおよび１００ユニット／ｍｌのペニシリンを補充したＲＰＭＩ１６４０培地中に維持した。他の株は、３ｍＭのＬ－グルタミン、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、１００ユニット／ｍｌのペニシリンおよび１０％のＦＣＳを含んでいるＤＭＥＤ中、５％のCO_2の湿った雰囲気中に維持した。ステロイドの効果を試験するために、細胞を５％のＦＣＳを含んでいるＲＰＭＩ１６４０培地中デキストランコートされたチャーコール(Hyclone, Logan Utah)と共に、処置前２４時間培養した。細胞を１０ｎＭのＤＨＴの不在または存在下に、０、２、４、６、１２、２４、４８、および７２時間増殖させた。それらを各時点で回収および凍結した。２００μｌの培地を各フラスコからＰＳＡアッセイのために回収した。

【０２１１】

（ｂ）細胞増殖アッセイ

ＬＮＣａＰ細胞の増殖におけるＤＨＴの効果を確認するために、３０００細胞／ウェルにて細胞を９６ウェルのプレートに、ＤＨＴでの処置前２４時間播種した。７２時間後、ＭＴＴを各ウェルに添加し、そして３７℃にて４時間インキュベートした。インキュベーションの終わりに上清を除去し、１００μｌのＤＭＳＯを各ウェルに添加して、細胞を溶解させた。プレートを次いで、プレートリーダーにおいて５７０ｎＭにて読んだ。

【０２１２】

（ｃ）ＰＳＡ ＥＬＩＳＡ

ＰＳＡの定量を、ＥＬＩＳＡを用いて行った。簡単には、９６ウェルのＮｕｎｃプレートを１００μｌのヤギ抗－ＰＳＡ（１μｇ／ｍｌ、Scripps lablratory, San Diego, CA)で一晩４℃にて覆った。プレートを水で３回洗浄し、１００μｌのブロッキングバッファー（ＰＢＳ、０．０５％のトゥイーン２０、1μＭのＥＤＴＡ、０．２５％のＢＳＡおよび０．０５％のNaN_3）と共に１時間室温にてインキュベートした。プレートを３回水で

洗浄し、そして、マウス抗－ヒトＰＳＡおよびＥｕ標識抗－マウスＩｇＧの１：１混合物と共にインキュベートした（１０ｎｇ／抗体 各々／ウェル １[1] ／２時間室温にて）。プレートを次いで４回水で洗浄した。１００μｌのDelfia 増強(Enhancement)溶液(PerkinElmer Wallac Inc (Norton, OH))をプレートに添加し、Victorリーダーを製造業者の指示に従い用いて読んだ。

【０２１３】

（ｄ）ＲＮＡの抽出および精製

全ＲＮＡを、Qiagen Rneasy Midiキットを製造業者の忠告に従い用いてＬＮＣａＰ細胞から単離した。ポリＡ（＋）選択のために、Promega PolyA Tractキットを製造業者の方法に従い用いた。簡単には、ＬＮＣａＰ細胞を遠心分離により集め、ＲＮＡを、バッファーおよびQiagenキットから推奨された方法を用いて単離した。ＲＮＡ抽出の後、全サンプルを－８０℃にて凍結した。ポリＡ（＋）ＲＮＡの１μｇを、GibcoBRL cDNA合成キットを用いる二本鎖ｃＤＮＡの合成のための鋳型として、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを組み込んでいるｄＴプライマーと共に用いた（プライミングのために７０℃にて１０分、Superscript II RTでの第１鎖合成のために３７℃にて６５分、その後、イー.コリリガーゼ、イー.コリポリメラーゼ、およびＲＮＡｓｅＨでの第２鎖合成のために１５．８℃にて１５０分）。二本鎖ｃＤＮＡは、De Angelis et alにより開示される方法を用いて、Perseptives 常磁性(paramagnetic)ビーズを用いて固相可逆固定(SPRI)により精製した（De Angelis et al. (1995) Nuc. Acid Res. 23: 4742-4743を参照されたい）。約５０ｎｇの二本鎖ｃＤＮＡをインビトロでの転写のための鋳型として用いて、標識されたｃＲＮＡを作製した（１６時間３７℃にて、Epicenter T7 RNAポリメラーゼ、Enzo Laboratories bio-11-CTP、bio-11-UTP)。ｃＲＮＡを常磁気性ビーズ(Bangs Laboratories)を用いてＳＰＲＩにより精製し、次いで全モル濃度を２６０の吸収から測定した。ハイブリダイゼーション前、１０μｇの標識ｃＲＮＡを、平均約５０塩基長へと無作為に、９４℃にて４０ｍＭトリス－酢酸ｐＨ８．１、１００ｍＭ酢酸カリウム、および３０ｍＭ酢酸マグネシウム中３５分間加熱することにより断片化した。

【０２１４】

細胞内ＲＮＡから直接作製される材料に関し、細胞質ＲＮＡを細胞から、Fabaloro et alの方法により抽出し((1980) Methods Enzymol. 65: 718-749)、そしてポリ（Ａ）ＲＮＡをオリゴｄＴ選択ステップ（Promega PolyA tract mRNA Isolation System IV, Madison, WI)を用いて単離した。

【０２１５】

（ｅ）チップハイブリダイゼーションおよび分析

Affimetrix Genechip(登録商標)法を用いて、ＬＮＣａＰ細胞中での天然アンドロゲンＤＨＴに応じた約６０００全長のヒト遺伝子の発現をモニターした。図２は、サンプルの精製、ハイブリダイゼーション、および分析のために用いた一般スキームを示す。ハイブリダイゼーションカクテルは、１０μｇの断片化したｃＲＮＡ、ＢＳＡ含有２×ＭＥＳバッファー、ニシン精子ＤＮＡ，内部対照のための対照原核生物転写産物、およびビオチン化対照オリゴ９４８（チップの質の対照のため）を用いて作製した。ＤＥＰＣ－水を２００μｌの容積まで添加した。ハイブリダイゼーション前、ハイブリダイゼーションカクテルを９９℃へと１０分間加熱し、次いで３７℃にてさらに１０分間加熱し、その後、Ｈｕ６８００ＦＬアレイ（Affymetrix GeneChips(登録商標))に加えた。Ｈｕ６８００Ｆｌアレイは、６８００の公知の全長遺伝子、遺伝子当たり２０のプローブ対にて約２５０,０００２５－merのオリゴヌクレオチドプローブから成る。アレイハイブリダイゼーションは、一晩４５℃、５０ｒｐｍにて行った。ハイブリダイゼーション後、アレイを洗浄し、そして、製造業者の推奨および方法を用いて染色した(Affymetrix Expression Analysis Technical Manual)。非－ストリンジェント洗浄バッファー（２０×ＳＳＰＥ、１．０ｍｌの１０％トゥイーン２０、および水）を２０℃にて、およびストリンジェント洗浄バッファー（２０×ＳＳＰＥ、5Ｍ ＮａＣｌ、１０％トゥイーン２０、および水）を５０℃にて、洗浄ステップのために用いた。アレイを次いで、ストレプトアビジン結合フィコエリ

トリン（SAPE,Molecular Probes)で染色した後、ビオチン化抗－ストレプトアビジンにより染色し、そして、シグナル増幅のために２５℃にてＳＡＰＥの第２ラウンドを行った。各染色ステップは１０分間行った。全アレイを次いで、HP Genearray Scannerを用いてスキャンし、次いで生じた蛍光の放出を集め、次いでAffymetrix Genechipソフトウェアを用いて定量した。ソフトウェア内で、各アレイ上の全プローブに関するシグナル強度を、スキャンした画像から算定し、次いで適当なプローブアレイアルゴリズムを適用して、各遺伝子の発現レベル（平均差）を決定した。全遺伝子の平均差を、対照転写産物における標準スパイクに基いて（１００万当たりの分子にて）ｍＲＮＡの見積もり頻度へと変換した。

【０２１６】

（ｆ）データのフィルタリングおよび統計値

初期データを、GeneChip(登録商標）により「存在」と指示される全遺伝子をフィルタリングすることにより減じた。２－ウェイANOVAを次いで、統計学的コンピューティングパッケージＳ－プラスにてこれらの遺伝子のそれぞれに関して複製データに関して行った。発現レベルに関して、２つの実験係数（治療および時間）の潜在的効果および両係数の相互作用を分散モデルの分析において評価し、そして、主な効果に関するｐ－値（$P_{治療}$、$P_{時間}$）および相互作用に関するｐ－値（$P_{相互作用}$）を得た。治療係数および／または相互作用に関して統計学的に有意な（ｐ－値＜＝０．０５）これらの遺伝子のみをふさわしいもの(the time being)と見なした。まず、ベースライン、およびこのｐ－値標準を超した７０５遺伝子の実験的複製ｍＲＮＡ頻度に関して、平均を取った。各遺伝子から得られた平均頻度を次いで、ゼロの平均と１の標準偏差を有するべく全サンプルに関して標準化した。Kohonen et alにより開発され（セルフ－オーガナイジングマップ(Self-Organizing Maps)、Second Extended Edition edition, Vol. 30. Nes York, 1997)、ＭＡＴＬＡＢツールボックスを用いて作製されたもとのセルフ－オーガナイジングマップ（ＳＯＭ）アルゴリズムの変更バージョンを次いで、標準化した発現値に当てはめて、６×６マトリックスの３６クラスターを作製した(Tamayo et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA .96: 2907-2912)。GenecardsおよびSwiss-Protなどのいくつかの公のデータベースを遺伝子の注釈のために用いた（例えば、Rebhan et al. GeneCard: 遺伝子、タンパク質、および疾患に関する百科辞典、Weizmann Institute of Science, Bioinformatics unit and Genome Center (Rehovot, Israel), 1997. World Wide Web URL: http://bioinfo.weizmann.ac.il/card,およびAppel et al. (1994) 生物学者のための情報修正ツールの新規作製：ExPASy WWW サーバーの例。Trends Biochem. Sci. 19: 258-260 World Wide Web URL: http://www.expasy.ch/sprot/を参照されたい）。

【０２１７】

（ｇ）定量ＴａｑｍａｎＲＴ－ＰＣＲ

GeneChip実験に用いた同じ全ＲＮＡサンプルを、Taqman(登録商標)EZ RT-PCRキット(PE Applied Biosystems)を用いて分析し、遺伝子発現の変化を確認した。全ＲＮＡサンプルを、５０ｎｇ／μｌの濃度へと希釈し、５０ｎｇの全部を各反応のために用いた。ＰＳＡおよびＳＭＡＲＣ１８およびＳＭＡＲＣ９６のためのプライマーおよび蛍光プローブを、Primer Express ソフトウェアを用いて設計し、プライマー選択のための製造業者の忠告に基き選択した。用いたプライマーは、１００ｎＭ濃度であり、以下のようであった。（ａ）ＰＳＡ－Ｆ（前方プライマー）CGTGGCCAACCCCTGA（配列番号１）、ＰＳＡ－Ｒ（逆プライマー）CTTGGCCTGGTCATTTCCAA（配列番号２）、およびＰＳＡ－Ｐ（プローブ）CACCCCTATCAACCCCCTATTGTAGTAAACTTGGA（配列番号３）。ＳＭＡＲＣ１およびＳＭＡＲＣ３に関しては、プライマーはGenbank受入番号U66617およびU66619からそれぞれ入手可能なＳＭＡＲＣ１およびＳＭＡＲＣ３の配列に基いて設計することができる。

【０２１８】

製造業者が補充したＲＰ－ＰＣＲ成分の試薬混合物[（５×TaqMan EZバッファー、酢酸マンガン（２５ｍＭ）、ｄＡＴＰ（１０ｍＭ）、ｄＣＴＰ（１０ｍＭ）、ｄＧＴＰ（１０ｍＭ）、およびｄＵＴＰ（２０ｍＭ）、ｒＴｔｈ ＤＮＡポリメラーゼ（２．５Ｕ／μｌ）

、ＡｍｐＥｒａｓｅ ＵＮＧ(1U/μｌ）、プライマー（最終濃度１μＭ）およびＲＮＡ（５０ｎｇ）]を用いて、製造業者の推奨に従いサンプルを調製した。加えて、標準曲線の作製およびその後のサンプルＲＮＡの定量のために、ＧＡＰＤＨ対照サンプルを調製した。ＧＡＰＤＨのためのプライマーおよびプローブはキットに含まれた（ＧＡＰＤＨ前方および逆プライマー１０μＭ、ＧＡＰＤＨプローブ５μＭ）。β－アクチンも標準曲線の作製のために用いて、そして５×１０^{6}コピー～５×１０^{1}コピーの範囲の両遺伝子のために希釈物を作製した。アッセイを、Perkin-Elmer/Applied Biosystems 7700Prismにて行い、そしてＰＣＲサイクリングパラメータを製造業者の推奨に基き選択した。サンプルのＲＮＡをＧＡＰＤＨに対して正規化し、そしてβ－アクチンを定量した。

（ｈ）ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析のために、ＬＮＣａＰ細胞を、培地を含んでいるチャーコールを除去した血清中１×１０^{6}細胞／ウェルにて６‐ウェルのプレートに撒いた。細胞をついで適当な量のアンドロゲン、例えば、１０ｎＭのＤＨＴで処理し、ついで、指定時間にて回収した。細胞を、４００ｍＭのＮａＣｌを含んでいるＭＰＥＲ試薬(Pierce, Rockford, IL)中に回収した。タンパク質をBradford法（Bradford(1976) Anal. Bioch. 72: 248-254）により定量した。例えば３０μｇのタンパク質を１２％のＳＤＳ‐ＰＡＧＥゲル上で電気泳動し、そして、Bio Radトランスファー装置を用いてＰＶＤＦ膜へ移した。ＰＶＤＦ膜をＴＢＳＴ（０．１％のトゥイーン２０を含むＴＢＳ）中、３％ミルクと共に１５分間インキュベートした後、第１抗体、例えばウサギ抗－ＳＭＡＲＣ抗体（抗－ＳＭＡＲＣ１または抗ＳＭＡＲＣ３抗体）を添加した。一晩インキュベートした後、ＰＶＤＦ膜を３回ＴＢＳＴで洗浄し、ついで２次抗体、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（Transduction Labs）と結合した抗－ウサギ－ＩｇＧと共に１時間インキュベートした。ＰＶＤＦ膜を次いで３回、ＴＢＳＴで洗浄し、そしてタンパク質を、増強した化学ルミネセンス検出システム(Pierce)を用いることにより検出した。

（ｉ）組織マイクロアレイの構築および分析

充実性腫瘍におけるＳＭＡＲＣ、例えばＳＭＡＲＣ１またはＳＭＡＲＣ３の役割を評価するために、組織マイクロアレイ分析を、多様なヒト正常（即ち、対照サンプル）および前立腺疾患標本(Clinomics, Inc.)において行った。１０％の中性緩衝処理したホルマリンに固定した後、組織を選択し、整えて、次いでプロセシングカセット中に置いた。カセットを次いでShandon Hypercenter(登録商標)組織プロセッサー上のプロセシングバスケット中に入れ、その中で、組織をバッファーのシリーズに、１６時間のプロセシングサイクルに渡って（１０％中性緩衝処理ホルマリン、７０％、９５％、１００％エタノール、キシレン、および溶融パラフィン包埋媒質）暴露した。全ステップは、５８℃でなければならないパラフィンステップを除いて４０℃にて真空下で行った。プロセシングの後、組織をカセットから取り出して、パラフィンブロック中に包埋した。生じたブロックを５μｍに切断し、そしてスライドガラス上にのせた。スライドを５８℃にて染色前の３０分間加熱した。抗体α－ＳＭＡＲＣ（例えば、抗ＳＭＡＲＣ１または抗ＳＭＡＲＣ３）を、適当な希釈、例えば１：１５０の希釈へと、ＤＡＫＯ（登録商標）抗体希釈を用いてタイターした。試験標本の染色を、ＨＩＥＲをｐＨ６．０クエン酸バッファー中で用いて、前処理なしで行った。組織を次いでVentana ES(登録商標)自動免疫組織学的染色器を用いて、標準的な間接免疫ペルオキシダーゼプロトコルを用いて、３，３’‐ジアミノベンズイジンをクロマゲンとして用いて染色した。免疫組織学的染色の格付けは、腫瘍および正常組織両方の上皮成分の細胞質染色の強度に基づく。染色の強度を、１＋～４＋スケールを用いてスコアし、１＋はかすかな染色を示し、４＋は強い染色（暗褐色の染色を示している）を示す。０のスコアは染色がないことを示す。

（ｊ）ＣＯＳ細胞の一時的なトランスフェクション

ＳＭＡＲＣ（例えば、ＳＭＡＲＣ１および／またはＳＭＡＲＣ３）の、アンドロゲンレセプター（ＡＲ）の転写活性における効果を決定するために、ＣＯＳ‐１細胞を、ＳＭＡＲＣ１またはＳＭＡＲＣ３をコードしている発現ベクターとともにアンドロゲンレセプター反応エレメントを含んでいるレポーター構築物で一時的にトランスフェクトした。ＣＯＳ

－１細胞は、６－ウェルのプレートに、１０％のチャーコールを除去した子牛血清を含んでいる２ｍｌのフェノレッド－フリーＤＭＥＭ中ウェル当たり２×１０^{5}細胞の密度で撒いた。翌朝、培地を２ｍｌのＤＭＥＭで置きかえた。１００μｌのＤＭＥＭ中指定量のＤＮＡを６μｌのＰＬＵＳ試薬（Gibco）と混合し、室温にてインキュベートし、一方、４μｌのリポフェクトアミンを１００μｌのＤＭＥＭと混合した。３０分のインキュベーションの後、２つの混合物を合わせ、各ウェルに滴下した。ＤＮＡと共に４時間インキュベートした後、１０％のチャーコールを除去した子牛血清を含んでいる２ｍｌのフェノールレッドフリーＤＭＥＭを添加し、細胞を指定の化学物質で、さらに２４時間処理した後、回収した。

（ｋ）ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼの活性を、PromegaのSteady-Gloルシフェラーゼアッセイシステムを用いて測定した。簡単には、処置の２４時間後、細胞を１ｍｌのＰＢＳ中でのスクラッピングにより回収した。トータル１００μｌのＰＢＳ中各サンプルからの５μｇを１００μｌのStable-Glo試薬（Promega）と混合し、そして、ルミネセンスをルミノメーター(Wallac, 1450 MicroBeth Counter)にて５分後に測定した。

（ｉｉ）結果

ＤＨＴはＬＮＣａＰ細胞の増殖およびＰＳＡの産生を刺激する。

ＬＮＣａＰ細胞は、それらがアンドロゲンに対する反応性を維持するがゆえに、腫瘍モデルとして広く用いられている(Horoszewicz et al. (1983). Cancer Res 43: 1809-1818)。例えば、その増殖能力、分化した分泌機能を発現する能力、および脂質の合成および蓄積などのプロセスを調節する能力、全てはアンドロゲン反応性を維持する。本培養条件においてＬＮＣａＰを用いてアンドロゲン調節性遺伝子を試験することができるかどうかを確認するために、ＬＮＣａＰのアンドロゲン処理に対する反応を、セクション（ａ－ｃ）に記載する方法を用いて試験した。細胞の増殖およびＰＳＡの産生を試験した。

図１Ａは、ＬＮＣａＰ細胞の増殖が、投与量依存様式で天然のアンドロゲンＤＨＴにより刺激されたことを示す。１０ｎＭのＤＨＴを、その強い成長刺激作用のために、残りの実験のために選択した。ＰＳＡは、広く用いられる前立腺マーカーであり、それゆえ、マイクロアレイ実験の前に、本試験において試験した。ＤＨＴ処置に反応して、ＰＳＡの産生は投与量依存様式で増加した（図１Ｂ）。ＰＳＡシグナルを１２時間で検出し、次いで最大レベルを約４８時間で認めた。これらの結果により、ＬＮＣａＰがＤＨＴに反応性があることが立証された。

【０２１９】

Genechipハイブリダイゼーションおよび分析

Affimetrix Genechp(登録商標)を用いて、ＬＮＣａＰ細胞中での天然のアンドロゲンＤＨＴに応じた約６０００の全長のヒト遺伝子の発現をモニターした。図２は、サンプル調製、ハイブリダイゼーション、および分析に用いた一般スキームを示し、ハイブリダイゼーションの詳細は、セクション（ｅ）に記載する。信用できるデータを得るために、トータルのＲＮＡを、ＤＨＴで、セクション（ｄ）に記載するように０、２、４、６、１２、２４、４８、および７２時間処置したもしくは処置しなかったＬＮＣａＰ細胞から、対で調製した。ｃＲＮＡを調製し、Affymetrixチップに対して、ここでも対でハイブリダイズさせた。それゆえ、３０サンプルのトータルに関する生物学的複製物のセットを、再現性を確保するために各実験に関して作製した。少なくとも１時点においてベースラインまたは実験のいずれかにおいて、およびいずれかの複製物において「存在」と指示されたこれらの遺伝子のみが、最初のデータ削減フィルターにパスした。チップ上に表された約６０００の遺伝子の中から、４４９１がこの最初のフィルターにパスした（７５％）。

【０２２０】

複製物の統計学的分析

再現性を評価するために、各時点での２つの複製物の平均頻度に対する偏差係数（ＣＶ）を比較した。結果は、全遺伝子を通じて、ＣＶが２５と３５％の間で変化することを示した（データは示していない）。実験設計に基づき、偏差の２－ウェイ分析（ＡＮＯＶＡ）

を用いて、～４５００遺伝子の発現変化の統計学的有意性を決定した。９５％の有意なレベルに基づく結果は、２００の遺伝子がアンドロゲン治療単独により有意であり、４３１の遺伝子がアンドロゲン治療と時間の相互作用のために有意であり、および７４の遺伝子が、治療係数と相互作用の両方のために有意であったことを示す。アンドロゲン調節性遺伝子のみを同定し、時間のみにより有意に調節された２４２の遺伝子は考慮しなかった。

【０２２１】

セルフ－オーガナイジングマップを用いる発現特性の迅速分類

迅速分類のために、および候補遺伝子の潜在的な機能を理解するために、アンドロゲンおよび／またはアンドロゲンと時間の間の相互作用により調節されることが見出された７０５の遺伝子のＡＮＯＶＡ分析による発現特性を、c and Tamayo et al.(既出)により開発されたセルフ－オーガナイジングマップ（ＳＯＭ）アルゴリズムの適合を用いてクラスター化し、各遺伝子のｍＲＮＡ頻度を治療／時間サブグループ内で平均し、そして、全サブグループに対して平均した頻度を、平均した頻度の平均がゼロおよび、１に等しい標準偏差に対して定められるように標準化した。各遺伝子に関して標準化したｍＲＮＡの頻度に基づき、６×６マトリックスの３６のクラスターを作製し、視覚化した。

【０２２２】

アンドロゲン調節遺伝子の同定

迅速分類のため、および候補遺伝子の潜在的機能を理解するために、アンドロゲンおよび／またはアンドロゲンと時間の間の相互作用により調節されることがみいだされた７０５の遺伝子の発現特性を、Kohonen and Tamayo et al(既出)により開発されたセルフ－オーガナイジングマップ（ＳＯＭ）アルゴリズムの適合を用いてクラスター化した。結果は、クラスター（１，１）が、アンドロゲン治療に際して同様の誘導性発現パターンを示す遺伝子を含み、クラスター（６，６）が、アンドロゲン処置に際して抑制性発現パターンを示す遺伝子を含むことを示した。アンドロゲンに反応して誘導される遺伝子はクラスター（１，１）に共にクラスター化され、および最も広く用いられる前立腺癌に関する診断マーカーである前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）を含んだ。癌が存在する場合、高まったＰＳＡレベルがしばしば検出された。アンドロゲン処理に反応して、ＰＳＡの発現（$P_{治療}$＝０．０００、$P_{時間}$＝０．８６８２、$P_{相互作用}$＝０．３２８２）は１２時間で対照に対して３倍増加し、そして約４倍を誘導した場合、その高い発現を７２時間維持した。

【０２２３】

これに対して、ＳＭＡＲＣＤ３の発現レベルは、アンドロゲンによりダウンレギュレートされた。発現レベルの２倍の低下がアンドロゲン処置の２４時間後に認められ、発現レベルの４倍の低下が処置の４８時間後に認められ、発現レベルの６倍の低下が処置後７２時間で認められた。

【０２２４】

実施例２：前立腺癌の治療に有用な化合物のスクリーニング

ＳＭＡＲＣ１またはＳＭＡＲＣ３のｃＤＮＡおよびタンパク質配列は、それぞれ受入番号Ｕ６６６１７およびＵ６６６１９にて、公のデータベースGenbankにて入手可能である。公開文献および配列データベースにより、当業者に、以下のスクリーニングアッセイに有用なトランスフェクトされた細胞系統を調製するのに必要とされる遺伝子が提供される。

【０２２５】

前立腺癌の治療に潜在的に有用な試験化合物は、テトラサイクリンの存在下で(Tet-onシステム、Clontechより入手可能)ＳＭＡＲＣ１またはＳＭＡＲＣ３を発現することができるベクターで安定的にトランスフェクトされた前立腺癌細胞（例えばＬＮＣａＰ細胞）中で、ＳＭＡＲＣ１またはＳＭＡＲＣ３を発現させることにより同定することができる。トランスフェクトされたＬＮＣａＰ細胞は、適当な条件下（例えば、１０％；子牛血清（ＦＣＳ）、３ｍＭのＬ-グルタミン、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、および１００ユニット／ｍｌのペニシリンを追加したＲＰＭＩ‐１６４０培地中Ｔ１７５培養フラスコ中にて）培養することができる。ステロイドの効果を試験するために、細胞をデキストランでコートされたチャーコール（ＣＴ‐ＦＣＳ）で前処理した５％のＦＣＳを含んでい

るＲＰＭＩ１６４０培地中で２日間培養することができる。細胞を、テトラサイクリンと共にまたはテトラサイクリンなしで試験化合物の存在下にインキュベートし、そして細胞の増殖速度を測定することができる。Ｔｅｔで処置された細胞において、Ｔｅｔで処理しなかった細胞に対して差異的阻害活性を示す化合物が前立腺癌の治療のための潜在的な治療化合物である。

【０２２６】

実施例３：ＳＭＡＲＣマーカーの検出

ＳＭＡＲＣマーカー、例えば、ＳＭＡＲＣ３の細胞の増殖における役割および腫瘍の阻害における効果を評価するために、例えばＳＭＡＲＣ３発現ベクターまたは空のベクターで感染した細胞の増殖速度を測定する。変化した増殖により、ＳＭＡＲＣの腫瘍細胞の増殖の調節における役割を確認し、そして、ＳＭＡＲＣの治療上の価値が確認される。ＳＭＡＲＣマーカーの存在および発現レベルは、Sambrook et al., (1989)既出に記載されているような常套の分子生物学的方法を用いて評価することができる。

【０２２７】

ＲＮＡ種の検出および定量のために、ＳＭＡＲＣマーカーに対応している核酸を単離および増幅することができる。ＳＭＡＲＣ１およびＳＭＡＲＣ３核酸に特異的にハイブリダイズするプライマーの対を、それぞれ、Genebank受入番号Ｕ６６６１７およびＵ６６６１９から入手可能なこれらのマーカーのヌクレオチド配列に基づき設計することができる。プライマーは、選択的ハイブリダイゼーションを許容する条件下で単離核酸と接触させることができる。一度ハイブリダイズしたら、核酸：プライマー複合体を、ＰＣＲ増幅を用いる鋳型依存性の核酸合成を促進する１またはそれ以上の酵素と接触させることができる。増幅産物は、例えば、ゲル電気泳動およびＵＶ光下にエチジウムブロマイドを用いる視覚化により検出することができる。別法として、増幅産物を、放射能または蛍光測定標識されたヌクレオチドで完全に標識することができる場合、増幅産物を次いでｘ－線フィルムに暴露し、または適当な誘導スペクトル下で視覚化した後、分離することができる。

【０２２８】

ＳＭＡＲＣマーカーの存在および発現レベルを検出するための他の方法には、ＳＭＡＲＣマーカータンパク質をＥＬＩＳＡ免疫検出アッセイにより検出することが含まれる。例えば、抗－ＳＭＡＲＣ抗体を用いることにより、細胞サンプル中で発現されたＳＭＡＲＣマーカーの存在を検出する。抗－ＳＭＡＲＣ抗体をタンパク質アフィニティを示している選択された表面、例えばポリスチレンマイクロタイタープレート中のウェルなどの上に固定することができる。ついで、ＳＭＡＲＣマーカーを含んでいる可能性のある細胞サンプルをウェルに添加することができる。結合させ、および洗浄して、非特異的結合免疫複合体を除去した後、結合した抗体を検出してよい。検出は、検出可能な標識が結合するＳＭＡＲＣマーカータンパク質の異なる領域に特異的な２次抗体の添加により達成することができる。

【０２２９】

実施例４：充実性腫瘍におけるＳＭＡＲＣマーカーの検出

ＳＭＡＲＣ、例えばＳＭＡＲＣ１またはＳＭＡＲＣ３が腫瘍の増殖の異なる段階で発効するかどうかを決定するために、充実性腫瘍を、Gleasonスコアリングシステムを用いてスコアした（例えば、本明細書中に出典明示により組み込まれるBostwick (1994) Amer. J. Clin. Path. 102: S38-56を参照されたい）。ＲＮＡを正常な前立腺および、Gleasonグレードを有する前立腺腫瘍から単離した。トータルのＲＮＡを、これらの異なる腫瘍におけるＳＭＡＲＣの発現のレベルに関して、実施例１に記載するように、affymetrixマイクロアレイを用いて試験した。

【０２３０】

同等の内容について

当該分野の専門家は、常規の実験をさらに行うことなく、本明細書中に開示する特定の具体例に対する多くの同等の内容を認識するであろうし、または確認することができるであろう。そのような同等の内容は添付の請求の範囲により包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【０２３１】

【図１】図１Ａは、投与量依存様式で、天然アンドロゲンＤＨＴにより刺激されるＬＮＣａＰ細胞の増殖を示すグラフである。図１Ｂは、ＤＨＴ投与に対するＰＳＡの産生を示すグラフである。

【図２】図２は、本発明によるハイブリダイゼーションおよび分析のための方法を示すフローダイアグラムである。

【図１】

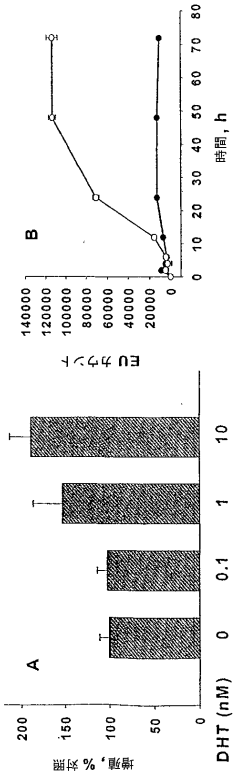


Figure 1

【図２】

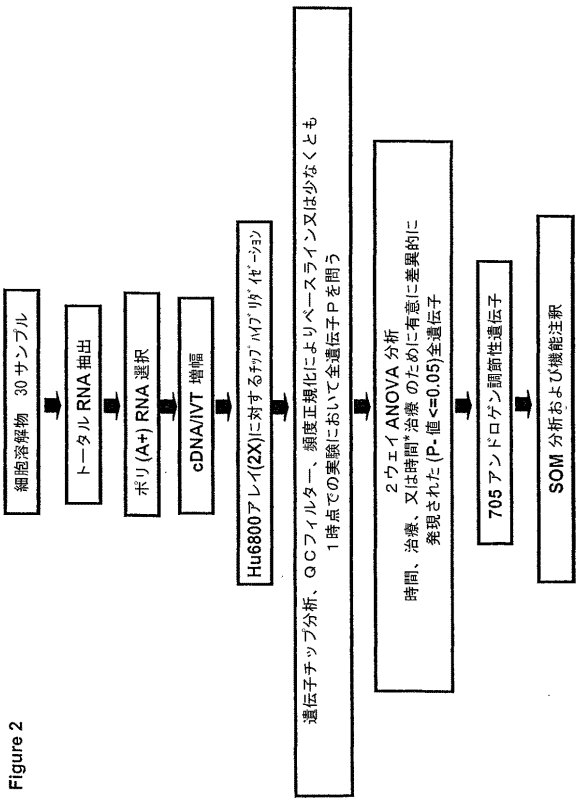


Figure 2

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/44420 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US01/44571

(22) International Filing Date:
28 November 2001 (28.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/253,487 28 November 2000 (28.11.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/253,487 (CON)
Filed on 28 November 2000 (28.11.2000)

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION** [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GILLIS, Kimberly, A.** [US/US]; 203 Humphrey Street, Swampscott, MA 01907 (US). **ZHANG, Yixiau** [US/US]; 115 Villa Road, Pearl River, NY 10965 (US).

(74) Agent: **ENGELLENNER, Thomas, J.**; Nutter McClennen & Fish, LLP, One International Place, Boston, MA 02110-2699 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

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

WO 02/44420 A2

(54) Title: EXPRESSION ANALYSIS OF SMARC NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES USEFUL IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROSTATE CANCER

(57) Abstract: The invention relates to compositions, kits, and methods for detecting, characterizing, preventing, and treating prostate cancer. SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) markers are provided, wherein changes in the levels of expression of one or more of the SMARC markers is correlated with the presence of prostate cancer.

EXPRESSION ANALYSIS OF SMARC NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES USEFUL IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROSTATE CANCER

Related Application

This application claims the benefit of United States Provisional Patent Application Serial No. 60/253,487, filed November 28, 2000, entitled "Expression Analysis of SMARC Nucleic Acids and Polypeptides Useful in the Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer". The teachings of the foregoing application is incorporated herein by reference.

Background of the Invention

Prostate cancer is the second most common cause of cancer related death and will kill an estimated 37,000 people this year alone. The prostate gland, which is found exclusively in male mammals, produces several regulatory peptides. The prostate gland comprises stromal and epithelium cells, the latter group consisting of columnar secretory cells and basal non-secretory cells. A proliferation of these basal cells, as well as stromal cells gives rise to benign prostatic hyperplasia (BPH) which is one common prostate disease. Another common prostate disease is prostatic adenocarcinoma (CaP), the most common of the fatal pathophysiological prostate cancers. Prostatic adenocarcinoma involves a malignant transformation of epithelial cells in the peripheral region of the prostate gland. Prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia are two common prostate diseases which have a high rate of incidence in the aging human male population. Approximately one out of every four males above the age of 55 suffers from a prostate disease of some form or another.

To date, various substances that are synthesized and secreted by normal, benign and cancerous prostates are used as tumor markers to gain an understanding of the pathogenesis of the various prostate diseases and in the diagnosis of prostate disease. The three predominant proteins or peptides secreted by a normal prostate gland are Prostatic Acid Phosphatase (PAP), Prostate Specific Antigen (PSA) and prostatic inhibin (PIP) also known as human seminal plasma inhibin (HSPI). Both PSA and PAP have been studied as tumor markers in the detection of prostate disease but since both exhibit

elevated levels in prostates having benign prostatic hyperplasia (BPM) neither marker is specific and therefore are of limited use.

Despite the available knowledge, little is known about the genetic basis underlying prostate cancer disease and the androgen-regulated genes that may be involved with its progression. Although androgens have been known to play a major role in the biology of prostate cancer, the full complexity of the hormonal regulation has not been completely covered and more androgen-related processes are being elucidated. Many of these processes involve several molecules associated with prostate cancer that remain elusive. In addition, there may be several known molecules that have not yet been associated with the pathogenesis of the disease. Accordingly, a need exists for identifying unknown molecules that may be involved in prostate cancer and the genes encoding them. A need also exists for identifying known molecules that have not yet been implicated in the pathogenesis of prostate cancer, particularly those that can serve as targets for the diagnosis, prevention, and treatment of prostate cancer.

Summary of the Invention

The invention is based, in part, on the discovery of a number of genes which are androgen-inducible in androgen-dependent prostate cancer cells (*e.g.*, LNCaP cells). These genes serve as markers suitable for detection, diagnosis and prognosis of prostate disorders. This invention provides methods and screening assays for the detection and diagnosis of prostate cancer. The primary screening assays detect an alteration in the expression level of genes associated with prostate cancer. In particular, this invention provides for the use of SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin (SMARC), e.g., SMARCD3 and SMARCD1, as genetic markers for this detection, diagnosis and prognosis of prostate disorders. Chromatin is actively remodeled during development. Chromatin remodeling appears to precede the transcriptional activation of the gene. The SWI/SNF complex interacts with chromatin and facilitates the function of the transcriptional activators (*See* Peterson *et al.*, (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20: 143-146). Mammalian SWI/SNF -like complexes exist in multiple forms composed of up to 9-12 protein subunits that are referred to as BRG1 associated factors (BAFs). The invention provides for use of SMARC markers that are up-regulated (increased mRNA and protein expression/activated/agonized) or down-

regulated (decreased mRNA and protein expression/suppressed/antagonized) in the presence of androgen. In particular, the invention provides for SMARCD3, which was found to be up-regulated in the presence of androgen.

One embodiment of the invention provides a method of assessing whether a subject is afflicted with prostate cancer, by comparing the level of expression of a marker in a sample from a subject, where the marker is selected from the group of SMARC polynucleotides, including but not limited to SMARCD3, to the normal level of expression of the marker in a control sample, where a significant difference between the level of expression of the marker in the sample from the subject and the normal level is an indication that the subject is afflicted with prostate cancer. In one embodiment, the marker corresponds to a transcribed polynucleotide or portion thereof, where the polynucleotide includes the marker. In one embodiment, the level of expression of the marker in the sample differs from the normal level of expression of the marker in a subject not afflicted with prostate cancer by a factor of at least two, and in another embodiment, the expression levels differ by a factor of at least three. In another embodiment, the marker is not significantly expressed in non-prostate cancer cells.

In another embodiment, the sample includes cells obtained from the subject. In another embodiment, the level of expression of the marker in the sample is assessed by detecting the presence in the sample of a protein corresponding to the marker. In one embodiment, the presence of the protein is detected using a reagent which specifically binds with the protein. In another embodiment, the reagent is selected from the group of reagents including an antibody, an antibody derivative, and an antibody fragment. In another embodiment, the level of expression of the marker in the sample is assessed by detecting the presence in the sample of a transcribed polynucleotide or portion thereof, where the transcribed polynucleotide includes the marker. In one embodiment, the transcribed polynucleotide is a mRNA or a cDNA. In another embodiment, the step of detecting further comprises amplifying the transcribed polynucleotide.

In yet another embodiment, the level of expression of the marker in the sample is assessed by detecting the presence in the sample of a transcribed polynucleotide which anneals with the marker or anneals with a portion of a polynucleotide under stringent hybridization conditions, where the polynucleotide includes the marker. In another embodiment, the level of expression in the sample of each of a plurality of markers

independently selected from markers comprising SMARC is compared with the normal level of expression of each of the plurality of markers in samples of the same type obtained form control subjects not afflicted with prostate cancer, where the level of expression of more than one of the markers is significantly altered, relative to the corresponding normal levels of expression of the markers, is an indication that the subject is affflicted with prostate cancer. In one embodiment, the plurality includes two or more of the markers.

In another embodiment, the invention provides a method for monitoring the progression of prostate cancer in a subject, including detecting in a subject sample at a first point in time the expression of a marker, where the marker is selected from the group including one or more markers comprising SMARC, including but not limited to SMARCD3, repeating this detection step at a subsequent point in time, and comparing the level of expression detected in the two detection steps, and monitoring the progression of prostate cancer in the subject using this information. In one embodiment, the marker is selected from the group including one or more markers comprising SMARC. In another embodiment, the marker corresponds to a transcribed polynucleotide or portion thereof, where the polynucleotide includes the marker. In another embodiment, the sample includes cells obtained from the subject. In one embodiment, the cells are collected from skin or blood tissue.

In another embodiment, the invention provides a method of assessing the efficacy of a test compound for inhibiting prostate cancer in a subject, including comparing expression of a marker in a first sample obtained from the subject which is exposed to or maintained in the presence of the test compound, where the marker is selected from the group including one or more markers comprising SMARC, including but not limited to SMARCD3, to expression of the marker in a second sample obtained from the subject, where the second sample is not exposed to the test compound, where a significantly lower level of expression of the marker in the first sample relative to that in the second sample is an indication that the test compound is efficacious for inhibiting prostate cancer in the subject. In one embodiment, the first and second samples are portions of a single sample obtained from the subject. In another embodiment, the first and second samples are portions of pooled samples obtained from the subject.

In another embodiment, the invention provides a method of assessing the efficacy of a therapy for inhibiting prostate cancer in a subject, the method including comparing expression of a marker in the first sample obtained from the subject prior to providing at least a portion of the therapy to the subject, where the marker is selected from the group including one or more markers comprising SMARC, to expression of the marker in a second sample obtained form the subject following provision of the portion of the therapy, where a significantly lower level of expression of the marker in the second sample relative to the first sample is an indication that the therapy is efficacious for inhibiting prostate cancer in the subject.

In another embodiment, the invention provides a method of assessing the efficacy of a therapy for inhibiting prostate cancer in a subject, the method including comparing expression of a marker in the first sample obtained from the subject prior to providing at least a portion of the therapy to the subject, where the marker is selected from the group including one or more markers comprising SMARC, to expression of the marker in a second sample obtained form the subject following provision of the portion of the therapy, where a significantly enhanced level of expression of the marker in the second sample relative to the first sample is an indication that the therapy is efficacious for inhibiting prostate cancer in the subject.

In another embodiment, the invention provides a method of selecting a composition for inhibiting prostate cancer in a subject, the method including obtaining a sample including cells from a subject, separately maintaining aliquots of the sample in the presence of a plurality of test compositions, comparing expression of a marker in each of the aliquots, where the marker is selected from the group including markers comprising SMARC, and selecting one of the test compositions which induces a lower level of expression of the marker in the aliquot containing that test composition, relative to other test compositions.

In another embodiment, the invention provides a method of selecting a composition for inhibiting prostate cancer in a subject, the method including obtaining a sample including cells from a subject, separately maintaining aliquots of the sample in the presence of a plurality of test compositions, comparing expression of a marker in each of the aliquots, where the marker is selected from the group including markers comprising SMARC, and selecting one of the test compositions which induces an

enhanced level of expression of the marker in the aliquot containing that test composition, relative to other test compositions.

In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting prostate cancer in a subject, including obtaining a sample including cells from a subject, separately maintaining aliquots of the sample in the presence of a plurality of test compositions, comparing expression of a marker in each of the aliquots, where the marker is selected from the group including markers comprising SMARC, and administering to the subject at least one of the test compositions which induces a lower level of expression of the marker in the aliquot containing that test composition, relative to other test compositions.

In another embodiment, the invention provides a method of assessing the potential of a test compound to trigger prostate cancer in a cell, including maintaining separate aliquots of cells in the presence and absence of the test compound, and comparing expression of a marker in each of the aliquots, where the marker is selected from the group including markers comprising SMARC, where a significantly enhanced level of expression of the marker in the aliquot maintained in the presence of the test compound, relative to the aliquot maintained in the absence of the test compound, is an indication that the test compound possesses the potential for triggering prostate cancer in a cell.

In another embodiment, the invention provides a method of assessing the potential of a test compound to trigger prostate cancer in a cell, including maintaining separate aliquots of cells in the presence and absence of the test compound, and comparing expression of a marker in each of the aliquots, where the marker is selected from the group including markers comprising SMARC, where a significantly decreased level of expression of the marker in the aliquot maintained in the presence of the test compound, relative to the aliquot maintained in the absence of the test compound, is an indication that the test compound possesses the potential for triggering prostate cancer in a cell.

In another embodiment, the invention provides a method of treating a subject afflicted with prostate cancer, including providing to cells of the subject afflicted with prostate cancer a protein corresponding to a marker selected from markers comprising

SMARC. In one embodiment, the protein is provided to the cells by providing a vector including a polynucleotide encoding the protein to the cells.

In another embodiment, the invention provides a method of treating a subject afflicted with prostate cancer an anti-sense oligonucleotide complementary to a polynucleotide corresponding to a marker selected from markers comprising SMARC.

In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting prostate cancer in a subject at risk for developing prostate cancer, including inhibiting expression of a gene corresponding to a marker selected from markers comprising SMARC.

In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting prostate cancer in a subject at risk for developing prostate cancer, the method comprising enhancing expression of a gene corresponding to a marker selected from markers comprising SMARC.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1A is a graph showing the growth of LNCaP cells stimulated by a natural androgen DHT in a dose-dependent manner.

Fig. 1B is a graph showing PSA production versus DHT dose.

Fig. 2 is a flow diagram illustrating a hybridization and analysis methodology according to the invention.

Detailed Description of the Invention

The invention relates, in part, to newly discovered correlation between the expression of selected markers and the presence of prostate cancer in a subject. The relative levels of expression of these markers, both alone and in combination, have been found to be indicative of a predisposition in the subject to prostate cancer and/or diagnostic of the presence or potential presence of prostate cancer in a subject. The present invention provides markers comprising SMARC polynucleotide sequences which are employed in methods for detecting the presence or absence of prostate cancer

in a sample or subject, and methods of predicting the incidence of prostate cancer in a sample or subject. Various SMARC genes have been elucidated and are applicable to the instant invention. (See, for example, Ring, HZ, et al., *Genomics*, 51 (1):140-143, 1998; Muchardt, C and M. Yaniv, *Semin Cell Dev Biol. (Review)*, 10 (2):189-195, 1999; and Wallberg, AE, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 20 (6):2004-2013, the entire teachings of which are incorporated herein by reference). The markers of the present invention comprise a polynucleotide sequence in which a SMARC specific polynucleotide sequence is integrally apart of the marker polynucleotide. Therefore, this invention pertains not only to a SMARC nucleotide sequence alone, but embraces other polynucleotide sequences which have a SMARC nucleotide sequence within them, for example, SMARCD3. The invention also provides methods by which prostate cancer may be treated, using the markers of the invention.

The present invention is based, at least in part, on the identification of genetic markers comprising a SMARC polynucleotide sequence which are differentially expressed in samples from androgen-dependent prostate cancer cells. A panel of 6800 known genes was screened for expression in androgen dependent prostate cancer cells (*see* Example 1). Those genes with statistically significant ($p<0.05$) differences between the diseased and normal tissues were identified. This differential expression was observed either as a decrease in expression, or an increase in expression. The expression of these selected genes in androgen-dependent prostate cancer cells was assessed by GeneChip analysis, as described in Example 1. SMARC, specifically SMARCD3 expression levels were down regulated by androgen in LNCaP prostate cancer cells.

As an internal control, the prostate specific antigen (PSA) gene, known in the art to be implicated in prostate cancer, was included to screen androgen-dependent prostate cancer cells. PSA was found to be significantly increased in expression in androgen dependent prostate cancer cells.

Accordingly, the present invention pertains to the use of SMARC genes (*e.g.*, full-length DNA which gives rise to a heterogenous nuclear RNA (hnRNA), or cDNA which is complementary to the corresponding mRNA transcripts) and the encoded polypeptides as markers for the presence or risk of development prostate cancer. These markers are useful to correlate the extent and/or severity of disease. Panels of the

markers can be conveniently arrayed for use in kits or on solid supports. The markers can also be useful in the treatment of prostate cancer, or in assessing the efficacy of a treatment for cancer. In addition, the markers can also be used in screening assays to identify compound or agents that modify the expression of the markers and the disease state.

In one aspect, the invention provides markers whose quantity or activity is correlated with the presence of prostate cancer. The markers of the invention may be nucleic acid molecules (*e.g.*, DNA, cDNA, or RNA) or polypeptides. These markers are either increased or decreased in quantity or activity in prostate cancer tissue as compared to non-prostate cancer tissue. Both the presence of increased or decreased mRNA for these genes or gene fragments (i.e., polynucleotide sequences coding for a portion of SMARC, said portion can be between 85 to 95%, or 70 to 85%, or 60 to 70%, or 45 to 60%, or 35 to 60%, or 20 to 35% of the entire nucleotide sequence for a particular SMARC, *e.g.*, SMARCD3), and also increased or decreased levels of the protein products of these genes (or gene fragment) serve as markers of prostate cancer. Preferably, increased and decreased levels of the markers of the invention are increases and decreases of a magnitude that is statistically significant as compared to appropriate control samples (*e.g.*, samples not affected with prostate cancer). In one embodiment, the marker is increased or decreased relative to control samples by at least 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, or 10-fold or more. Similarly, one skilled in the art will be cognizant of the fact that a preferred detection methodology is one in which the resulting detection values are above the minimum detection limit of the methodology.

Measurement of the relative amount of an RNA or protein marker of the invention may be by any method known in the art (see, *e.g.*, Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992, the entire teachings of which are herein incorporated in their entirety by reference). Typical methodologies for RNA detection include RNA extraction from a cell or tissue sample, followed by hybridization of a labeled probe (*e.g.*, a complementary nucleic acid molecule) specific for the target RNA to the extracted RNA, and detection of the probe (*e.g.*, Northern blotting). Typical methodologies for

protein detection include protein extraction from a cell or tissue sample, followed by hybridization of a labeled probe (*e.g.*, an antibody) specific for the target protein (or polypeptide) of the protein sample, and detection of the probe itself using a secondary probe, which is usually labeled, specific for the first probe. The label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Detection of specific protein and nucleic acid molecules may also be assessed by gel electrophoresis, column chromatography, direct sequencing, or quantitative PCR (in the case of nucleic acid molecules) among many other techniques well known to those skilled in the art.

In certain embodiments, the gene (or fragment thereof) itself (*e.g.*, the DNA or cDNA) of SMARC may serve as a marker for prostate cancer. For example, the absence of nucleic acids corresponding to a gene, such as by deletion of all or part of the gene, may be correlated with disease. Similarly, an increase of nucleic acid corresponding to one or more of the SMARC genes, such as by duplication of the gene, may also be correlated with disease.

Detection of the presence or number of copies of all or a part of a marker gene of the invention may be performed using any method known in the art. Typically, it is convenient to assess the presence and/or quantity of a DNA or cDNA by Southern analysis, in which total DNA from a cell or tissue sample is extracted and is hybridized with a labeled probe (*e.g.*, a complementary DNA molecule) followed by the detection of the probe . The label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Other useful methods of DNA detection and/or quantification include direct sequencing, gel electrophoresis, column chromatography, and quantitative PCR, as is known by one skilled in the art.

The invention also encompasses nucleic acid and protein molecules which are structurally different from the molecules described above (*e.g.*, which have a slightly altered nucleic acid or amino acid sequence), but which have the same properties as the molecules above (*e.g.*, encoded amino acid sequence, or which are changed only in nonessential amino acid residues). Such molecules include allelic variants, and are described in greater detail in subsection I.

In another aspect, the invention provides markers whose quantity or activity is correlated with the severity of prostate cancer. These markers are either increased or decreased in quantity or activity in prostate cancer tissue in a fashion that is either

positively or negatively correlated with the degree of severity of prostate cancer. In yet another aspect, the invention provides markers whose quantity or activity is correlated with a risk in a subject for developing prostate cancer. These markers are either increased or decreased in activity or quantity in direct correlation to the likelihood of the development of prostate cancer in a subject.

Each marker may be considered individually, although it is within the scope of the invention to provide combinations of two or more markers for use in the methods and compositions of the invention to increase the confidence of the analysis. For example, the markers of a first panel may each exhibit an increase in quantity or activity in prostate cancer tissue as compared to non-prostate cancer tissue, whereas the markers of a second panel may each exhibit a decrease in quantity or activity in prostate cancer tissue as compared to non-prostate cancer tissue. Similarly, different panels of markers may be composed of markers from different tissues, or may represent different components of a prostate cancer disease.

It will also be appreciated by one skilled in the art that the panels of markers of the invention may conveniently be provided on solid supports. For example, polynucleotides, such as mRNA, may be coupled to an array (*e.g.*, a GeneChip array for hybridization analysis), to a resin (*e.g.*, a resin which can be packed into a column for column chromatography), or a matrix (*e.g.*, a nitrocellulose matrix for northern blot analysis). The immobilization of molecules complementary to the marker(s), either covalently or noncovalently, permits a discrete analysis of the presence or activity of each marker in a sample. In an array, polynucleotides complementary to each member of a panel of markers may individually be attached to different, known locations on the array. The array may be hybridized with, for example, polynucleotides extracted from a skin cell sample from a subject. The hybridization of polynucleotides from the sample with the array at any location on the array can be detected, and thus the presence or quantity of the marker in the sample can be ascertained. In one embodiment, a "GeneChip" array is employed (Affymetrix). Similarly, Western analyses may be performed on immobilized antibodies specific for different polypeptide markers hybridized to a protein sample from a subject.

It will also be apparent to one skilled in the art that the entire marker protein or nucleic acid molecule need not be conjugated to the support; a portion of the marker of sufficient length for detection purposes (*e.g.*, for hybridization), for example, a portion of the marker which is 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100 or more nucleotides or amino acids in length may be sufficient for detection purposes.

The nucleic acid and protein markers of the invention may be isolated from any tissue or cell of a subject. In one embodiment, the tissue is prostate cells or tissue. However, it will be apparent to one skilled in the art that other tissue samples, including bodily fluids (*e.g.*, urine, bile, serum, lymph, saliva, mucus and pus) and other tissue samples may also serve as sources from which the markers of the invention may be isolated, or in which the presence, activity, and/or quantity of the markers of the invention may be assessed. The tissue samples containing one or more of the markers themselves may be useful in the methods of the invention, and one skilled in the art will be cognizant of the methods by which such samples may be conveniently obtained, stored, and/or preserved.

Several markers were known prior to the invention to be associated with prostate cancer, *e.g.*, PSA. These markers are not included with the markers of the invention. However, these markers may be conveniently be used in combination with the markers of the invention in the methods, panels, and kits of the invention.

In another aspect, the invention provides methods of making an isolated hybridoma which produces an antibody useful for assessing whether a patient is afflicted with prostate cancer. In this method, a protein corresponding to a marker of the invention is isolated (*e.g.*, by purification from a cell in which it is expressed or by transcription and translation of a nucleic acid encoding the protein in vivo or in vitro using known methods. A vertebrate, preferably a mammal such as a mouse, rat, rabbit, or sheep, is immunized using the isolated protein or protein fragment. The vertebrate may optionally (and preferably) be immunized at least one additional time with the isolated protein or protein fragment, so that the vertebrate exhibits a robust immune response to the protein or protein fragment. Splenocytes are isolated form the immunized vertebrate and fused with an immortalized cell line to form hybridomas, using any of a variety of methods well known in the art. Hybridomas formed in this manner are then screened using standard methods to identify one or more hybridomas

which produce an antibody which specifically binds with the protein or protein fragment. The invention also includes hybridomas made by this method and antibodies made using such hybridomas.

The invention provides methods of prostate cancer, or risk of developing prostate cancer in a subject. These methods involve isolating a sample from a subject (*e.g.*, a sample containing prostate cancer cells or blood cells), detecting the presence, quantity, and/or activity of one or more markers of the invention in the sample relative to a second sample from a subject known not to have prostate cancer. The levels of markers in the two samples are compared, and a significant increase or decrease in one or more markers in the test sample indicates the presence or risk of presence prostate cancer in the subject.

The invention also provides methods of assessing the severity of prostate cancer in a subject. These methods involve isolating a sample from a subject (*e.g.*, a sample containing prostate cancer cells or blood cells), detecting the presence, quantity, and/or activity of one or more markers of the invention in the sample relative to a second sample from a subject known not to have prostate cancer. The levels of markers in the two samples are compared, and a significant increase or decrease in one or more markers in the test sample is correlated with the degree of severity of prostate cancer in the subject.

The invention also provides methods of treating (*e.g.*, inhibiting prostate cancer in a subject. These methods involve isolating a sample from a subject (*e.g.*, a sample containing prostate cancer cells or blood cells), detecting the presence, quantity, and/or activity of one or more markers of the invention in the sample relative to a second sample from a subject known not to have prostate cancer. The levels of markers in the two samples are compared, and significant increases or decreases in one or more markers in the test sample relative to the control sample are observed. For markers that are significantly decreased in expression or activity, the subject may be administered that expressed marker protein, or may be treated by the introduction of mRNA or DNA corresponding to the decreased marker (*e.g.*, by gene therapy), to thereby increase the levels of the marker protein in the subject if that specific marker is determined to be therapeutic. Conversely, for markers that are significantly increased in expression or activity and shown to be involved in the etiology of the disease, the subject may be

administered mRNA or DNA anti-sense to the increased marker (*e.g.*, by gene therapy), or may be administered antibodies specific for the marker protein, to thereby decrease the levels of the marker protein in the subject. In this manner, the subject may be treated for prostate cancer.

The invention also provides methods of preventing the development prostate cancer in a subject, assuming that the particular marker involved is involved in the disease process or prevention thereof. These methods involve, for markers that are significantly decreased in expression or activity, the administration of that marker protein, or the introduction of mRNA or DNA corresponding to the decreased marker (*e.g.*, by gene therapy), to thereby increase the levels of the marker protein in the subject. For markers that are significantly increased in expression or activity, the subject may be administered mRNA or DNA anti-sense to the increased marker (*e.g.*, by gene therapy), or may be administered antibodies specific for the marker protein, to thereby decrease the levels of the marker protein in the subject. In this manner, the development prostate cancer in a subject may be prevented.

The invention also provides methods of assessing a treatment or therapy for prostate cancer suspected in a subject. These methods involve isolating a sample from a subject (*e.g.*, a sample containing prostate cancer cells or blood cells) suffering from prostate cancer who is currently undergoing a treatment or therapy, detecting the presence, quantity, and/or activity of one or more markers of the invention in the first sample relative to a second sample from a subject afflicted prostate cancer who is not undergoing any such treatment or therapy for the cancer, and also relative to a third sample from a subject unafflicted by prostate cancer. The levels of markers in the three samples are compared, and significant increases or decreases in one or more markers in the first sample relative to the other samples are observed and correlated with the presence, risk of presence, or severity prostate cancer. By assessing prostate cancer, the ability to treat prostate cancer is also determined.

The invention also provides methods for diagnosing androgen-dependent prostate cancer in a subject. The method involves isolating a sample from a subject (*e.g.*, a sample containing prostate cancer cells or blood cells) who is suffering from prostate cancer, measuring the level of expression of a marker selected from the group consisting of SMARC nucleotide sequences in the presence and absence of androgen

and comparing the difference in expression of the markers in the presence and absence of androgen. The prostate cancer cells are androgen dependent if the expression of the marker is increased in the presence of androgen compared to the absence of androgen.

The invention also provides methods for determining the efficacy of androgen withdrawal treatment in a subject afflicted with prostate cancer. The method involves detecting in a subject sample at a first point in time, the expression level of a marker selected from the group consisting of SMARC nucleotide sequences; and detecting the expression level of a marker at a subsequent point in time occurring after the subject begins androgen withdrawal treatment. The level of expression of markers detected at the first and second time points is compared. A decrease in the level of expression indicates that the androgen withdrawal treatment has decreased efficacy.

The invention also provides pharmaceutical compositions for the treatment of prostate cancer. These compositions may include a marker protein and/or nucleic acid of the invention (*e.g.*, for those markers which are decreased in quantity or activity in prostate cancer cell sample versus non-prostate cancer cell sample), and can be formulated as described herein. Alternatively, these compositions may include an antibody which specifically binds to a marker protein of the invention and/or an anti-sense nucleic acid molecule which is complementary to a marker nucleic acid of the invention (*e.g.*, for those markers which are increased in quantity or activity in a prostate cancer cell sample versus non-prostate cancer cell sample), and can be formulated as described herein.

The invention also provides kits for assessing the presence of prostate cancer in a sample (*e.g.*, a sample from a subject at risk for prostate cancer), the kit comprising an antibody, wherein the antibody specifically binds with a protein corresponding to a marker selected from the group consisting of markers comprising SMARC .

The invention further provides kits for assessing the presence of prostate cancer in a sample from a subject (*e.g.*, a subject at risk for prostate cancer), the kit comprising a nucleic acid probe wherein the probe specifically binds with a transcribed polynucleotide corresponding to a marker selected from the group consisting of markers comprising SMARC.

The invention further provides kits for assessing the suitability of each of a plurality of compounds for inhibiting prostate cancer in a subject. Such kits include a plurality of compounds to be tested, and a reagent for assessing expression of a marker selected from the group consisting of one or more of markers comprising SMARC.

Modifications to the above-described compositions and methods of the invention, according to standard techniques, will be readily apparent to one skilled in the art and are meant to be encompassed by the invention.

To facilitate an understanding of the present invention, a number of terms and phrases are defined below:

As used herein, the terms "polynucleotide" and "oligonucleotide" are used interchangeably, and include polymeric forms of nucleotides of any length, either deoxyribonucleotides or ribonucleotides, or analogs thereof. Polynucleotides may have any three-dimensional structure, and may perform any function, known or unknown. The following are non-limiting examples of polynucleotides: a gene or gene fragment, exons, introns, messenger RNA (mRNA), transfer RNA, ribosomal RNA, ribozymes, cDNA, recombinant polynucleotides, branched polynucleotides, plasmids, vectors, isolated DNA of any sequence, isolated RNA of any sequence, nucleic acid probes, and primers. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and nucleotide analogs. If present, modifications to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after polymerization, such as by conjugation with a labeling component. The term also includes both double- and single-stranded molecules. Unless otherwise specified or required, any embodiment of this invention that is a polynucleotide encompasses both the double-stranded form and each of two complementary single-stranded forms known or predicted to make up the double-stranded form.

A polynucleotide is composed of a specific sequence of four nucleotide bases: adenine (A); cytosine (C); guanine (G); thymine (T); and uracil (U) for guanine when the polynucleotide is RNA. This, the term "polynucleotide sequence" is the alphabetical representation of a polynucleotide molecule. This alphabetical representation can be inputted into databases in a computer having a central processing unit and used for bioinformatics applications such as functional genomics and homology searching.

A "gene" includes a polynucleotide containing at least one open reading frame that is capable of encoding a particular polypeptide or protein after being transcribed and translated. Any of the polynucleotide sequences described herein may be used to identify larger fragments or full-length coding sequences of the gene with which they are associated. Methods of isolating larger fragment sequences are known to those of skill in the art, some of which are described herein.

A "gene product" includes an amino acid (*e.g.*, peptide or polypeptide) generated when a gene is transcribed and then translated.

A "probe" when used in the context of polynucleotide manipulation includes an oligonucleotide that is provided as a reagent to detect a target present in a sample of interest by hybridizing with the target. Usually, a probe will comprise a label or a means by which a label can be attached, either before or subsequent to the hybridization reaction. Suitable labels include, but are not limited to radioisotopes, fluorochromes, chemiluminescent compounds, dyes, and proteins, including enzymes.

A "primer" includes a short polynucleotide, generally with a free 3'-OH group that binds to a target or "template" present in a sample of interest by hybridizing with the target, and thereafter promoting polymerization of a polynucleotide complementary to the target. A "polymerase chain reaction" ("PCR") is a reaction in which replicate copies are made of a target polynucleotide using a "pair of primers" or "set of primers" consisting of "upstream" and a "downstream" primer, and a catalyst of polymerization, such as a DNA polymerase, and typically a thermally-stable polymerase enzyme. Methods for PCR are well known in the art, and are taught, for example, in MacPherson et al. , IRL Press at Oxford University Press (1991)). All processes of producing replicate copies of a polynucleotide, such as PCR or gene cloning, are collectively referred to herein as "replication". A primer can also be used as a probe in hybridization reactions, such as Southern or Northern blot analyses (see, *e.g.*, Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

The term "cDNAs" includes complementary DNA, that is mRNA molecules present in a cell or organism made into cDNA with an enzyme such as reverse transcriptase. A "cDNA library" includes a collection of mRNA molecules present in a

cell or organism, converted into cDNA molecules with the enzyme reverse transcriptase, then inserted into "vectors" (other DNA molecules that can continue to replicate after addition of foreign DNA). Exemplary vectors for libraries include bacteriophage, viruses that infect bacteria (*e.g.*, lambda phage). The library can then be probed for the specific cDNA (and thus mRNA) of interest.

A "gene delivery vehicle" includes a molecule that is capable of inserting one or more polynucleotides into a host cell. Examples of gene delivery vehicles are liposomes, biocompatible polymers, including natural polymers and synthetic polymers; lipoproteins; polypeptides; polysaccharides; lipopolysaccharides; artificial viral envelopes; metal particles; and bacteria, viruses and viral vectors, such as baculovirus, adenovirus, and retrovirus, bacteriophage, cosmid, plasmid, fungal vector and other recombination vehicles typically used in the art which have been described for replication and/or expression in a variety of eukaryotic and prokaryotic hosts. The gene delivery vehicles may be used for replication of the inserted polynucleotide, gene therapy as well as for simply polypeptide and protein expression.

A "vector" includes a self-replicating nucleic acid molecule that transfers an inserted polynucleotide into and/or between host cells. The term is intended to include vectors that function primarily for insertion of a nucleic acid molecule into a cell, replication vectors that function primarily for the replication of nucleic acid and expression vectors that function for transcription and/or translation of the DNA or RNA. Also intended are vectors that provide more than one of the above function.

A "host cell" is intended to include any individual cell or cell culture which can be or has been a recipient for vectors or for the incorporation of exogenous nucleic acid molecules, polynucleotides and/or proteins. It also is intended to include progeny of a single cell. The progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic or total DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. The cells may be prokaryotic or eukaryotic, and include but are not limited to bacterial cells, yeast cells, insect cells, animal cells, and mammalian cells, *e.g.*, murine, rat, simian or human cells.

The term "genetically modified" includes a cell containing and/or expressing a foreign gene or nucleic acid sequence which in turn modifies the genotype or phenotype of the cell or its progeny. This term includes any addition, deletion, or disruption to a cell's endogenous nucleotides.

As used herein, "expression" includes the process by which polynucleotides are transcribed into mRNA and translated into peptides, polypeptides, or proteins. If the polynucleotide is derived from genomic DNA, expression may include splicing of the mRNA, if an appropriate eukaryotic host is selected. Regulatory elements required for expression include promoter sequences to bind RNA polymerase and transcription initiation sequences for ribosome binding. For example, a bacterial expression vector includes a promoter such as the lac promoter and for transcription initiation the Shine-Dalgarno sequence and the start codon AUG (Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Similarly, a eukaryotic expression vector includes a heterologous or homologous promoter for RNA polymerase II, a downstream polyadenylation signal, the start codon AUG, and a termination codon for detachment of the ribosome. Such vectors can be obtained commercially or assembled by the sequences described in methods well known in the art, for example, the methods described below for constructing vectors in general.

"Differentially expressed", as applied to a gene, includes the differential production of mRNA transcribed from a gene or a protein product encoded by the gene. A differentially expressed gene may be overexpressed or underexpressed as compared to the expression level of a normal or control cell. In one aspect, it includes a differential that is 2.5 times, preferably 5 times or preferably 10 times higher or lower than the expression level detected in a control sample. The term "differentially expressed" also includes nucleotide sequences in a cell or tissue which are expressed where silent in a control cell or not expressed where expressed in a control cell.

The term "polypeptide" includes a compound of two or more subunit amino acids, amino acid analogs, or peptidomimetics. The subunits may be linked by peptide bonds. In another embodiment, the subunit may be linked by other bonds, *e.g.*, ester, ether, etc. As used herein the term "amino acid" includes either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including glycine and both the D or L optical isomers, and

amino acid analogs and peptidomimetics. A peptide of three or more amino acids is commonly referred to as an oligopeptide. Peptide chains of greater than three or more amino acids are referred to as a polypeptide or a protein.

"Hybridization" includes a reaction in which one or more polynucleotides react to form a complex that is stabilized via hydrogen bonding between the bases of the nucleotide residues. The hydrogen bonding may occur by Watson-Crick base pairing, Hoogstein binding, or in any other sequence-specific manner. The complex may comprise two strands forming a duplex structure, three or more strands forming a multi-stranded complex, a single self-hybridizing strand, or any combination of these. A hybridization reaction may constitute a step in a more extensive process, such as the initiation of a PCR reaction, or the enzymatic cleavage of a polynucleotide by a ribozyme.

Hybridization reactions can be performed under conditions of different "stringency". The stringency of a hybridization reaction includes the difficulty with which any two nucleic acid molecules will hybridize to one another. Under stringent conditions, nucleic acid molecules at least 60%, 65%, 70%, 75% identical to each other remain hybridized to each other, whereas molecules with low percent identity cannot remain hybridized. A preferred, non-limiting example of highly stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2 X SSC, 0.1% SDS at 50°C, preferably at 55°C, more preferably at 60°C, and even more preferably at 65°C.

When hybridization occurs in an antiparallel configuration between two single-stranded polynucleotides, the reaction is called "annealing" and those polynucleotides are described as "complementary". A double-stranded polynucleotide can be "complementary" or "homologous" to another polynucleotide, if hybridization can occur between one of the strands of the first polynucleotide and the second. "Complementarity" or "homology" (the degree that one polynucleotide is complementary with another) is quantifiable in terms of the proportion of bases in opposing strands that are expected to hydrogen bond with each other, according to generally accepted base-pairing rules.

An "antibody" includes an immunoglobulin molecule capable of binding an epitope present on an antigen. As used herein, the term encompasses not only intact

immunoglobulin molecules such as monoclonal and polyclonal antibodies, but also anti-idotypic antibodies, mutants, fragments, fusion proteins, bi-specific antibodies, humanized proteins, and modifications of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity.

As used herein, the term "prostate cancer" (CaP) refers to the art recognized use of the term which commonly appears in men. The term "prostate cancer" refers to both the appearance of a palpable tumor of the prostate, and also to microscopically detectable neoplastic or transformed cells in the prostate gland. In the latter case, the said cytologically-detectable prostate cancer may be asymptomatic, in that neither the patient nor the medical practitioner detects the presence of the cancer cells. Cancer cells are generally found in the prostates of men who live into their seventies or eighties, however not all of these men develop prostate cancer. In the event that prostate cancer metastasizes to additional sites distal to the prostate, the condition is described as metastatic cancer (MC), to distinguish this condition from organ-confined prostate cancer. CaP fatality results from metastatic dissemination of prostatic adenocarcinoma cells to distant sites, usually in the axial skeleton.

As used herein, the term "marker" includes a polynucleotide or polypeptide molecule which is present or absent, or increased or decreased in quantity or activity in subjects afflicted with prostate cancer, or in cells involved in prostate cancer. The relative change in quantity or activity of the marker is correlated with the incidence or risk of incidence of prostate cancer.

As used herein, the term "panel of markers" includes a group of markers, the quantity or activity of each member of which is correlated with the incidence or risk of incidence of prostate cancer. In certain embodiments, a panel of markers may include only those markers which are either increased or decreased in quantity or activity in subjects afflicted with or cells involved in prostate cancer. In other embodiments, a panel of markers may include only those markers present in a specific tissue type which are correlated with the incidence or risk of incidence of prostate cancer.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections:

I. Isolated Nucleic Acid Molecules

One aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules that either themselves are the genetic markers (*e.g.*, mRNA) of the invention, or which encode the polypeptide markers of the invention, or fragments thereof. Another aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify the nucleic acid molecules encoding the markers of the invention in a sample, as well as nucleotide fragments for use as PCR primers for the amplification or mutation of the nucleic acid molecules which encode the markers of the invention. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (*e.g.*, cDNA or genomic DNA) and RNA molecules (*e.g.*, mRNA) and analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

The term "isolated nucleic acid molecule" includes nucleic acid molecules which are separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid. For example, with regards to genomic DNA, the term "isolated" includes nucleic acid molecules which are separated from the chromosome with which the genomic DNA is naturally associated. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (*i.e.*, sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated marker nucleic acid molecule of the invention, or nucleic acid molecule encoding a polypeptide marker of the invention, can contain less than about 5 kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

A nucleic acid molecule of the present invention, *e.g.*, a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of one of the SMARC genes, or a portion thereof, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. Using all or portion of the nucleic acid sequence of one of the SMARC genes as a hybridization probe, a marker gene of the invention or a nucleic acid

molecule encoding a polypeptide marker of the invention can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (*e.g.*, as described in Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

A nucleic acid of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or alternatively, genomic DNA, as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. The nucleic acid so amplified can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. Furthermore, oligonucleotides corresponding to marker nucleotide sequences, or nucleotide sequences encoding a marker of the invention can be prepared by standard synthetic techniques, *e.g.*, using an automated DNA synthesizer.

In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention comprises a nucleic acid molecule which is a complement of the nucleotide sequence of a marker of the invention *i.e.,* a SMARC polynucleotide, or a portion thereof. A nucleic acid molecule which is complementary to such a nucleotide sequence is one which is sufficiently complementary to the nucleotide sequence such that it can hybridize to the nucleotide sequence, thereby forming a stable duplex.

The nucleic acid molecule of the invention, moreover, can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of a marker nucleic acid of the invention, or a gene encoding a marker polypeptide of the invention, for example, a fragment which can be used as a probe or primer. The probe/primer typically comprises substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 7 or 15, preferably about 20 or 25, more preferably about 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400 or more consecutive nucleotides of a marker nucleic acid, or a nucleic acid encoding a marker polypeptide of the invention.

Probes based on the nucleotide sequence of a marker gene or of a nucleic acid molecule encoding a marker polypeptide of the invention can be used to detect transcripts or genomic sequences corresponding to the marker gene(s) and/or marker polypeptide(s) of the invention. In preferred embodiments, the probe comprises a label group attached thereto, *e.g.*, the label group can be a radioisotope, a fluorescent

compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissue which misexpress (*e.g.*, over- or under-express) a marker polypeptide of the invention, or which have greater or fewer copies of a marker gene of the invention. For example, a level of a marker polypeptide-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject may be detected, the amount of mRNA transcript of a gene encoding a marker polypeptide may be determined, or the presence of mutations or deletions of a marker gene of the invention may be assessed.

The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleic acid sequences of the SMARC genes due to degeneracy of the genetic code and which thus encode the same proteins as those encoded by the SMARC genes.

In addition to the nucleotide sequences of the SMARC genes it will be appreciated by those skilled in the art that DNA sequence polymorphisms that lead to changes in the amino acid sequences of the proteins encoded by the SMARC genes may exist within a population (*e.g.*, the human population). Such genetic polymorphism in the SMARC genes may exist among individuals within a population due to natural allelic variation. An allele is one of a group of genes which occur alternatively at a given genetic locus. In addition it will be appreciated that DNA polymorphisms that affect RNA expression levels can also exist that may affect the overall expression level of that gene (*e.g.*, by affecting regulation or degradation). As used herein, the phrase "allelic variant" includes a nucleotide sequence which occurs at a given locus or to a polypeptide encoded by the nucleotide sequence. As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules which include an open reading frame encoding a marker polypeptide of the invention.

Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants and homologues of the marker genes, or genes encoding the marker proteins of the invention can be isolated based on their homology to the SMARC genes, using the cDNAs disclosed herein, or a portion thereof, as a hybridization probe according to standard hybridization techniques under stringent hybridization conditions. Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants and homologues of the marker genes of the invention can further be isolated by mapping to the same chromosome or locus as the marker genes or genes encoding the marker proteins of the invention.

In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention is at least 15, 20, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 or more nucleotides in length and hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid molecule corresponding to a nucleotide sequence of a marker gene or gene encoding a marker protein of the invention. As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridization and washing under which nucleotide sequences at least 60% homologous to each other typically remain hybridized to each other. Preferably, the conditions are such that sequences at least about 70%, more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85% or 90% homologous to each other typically remain hybridized to each other. Such stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. A preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2 X SSC, 0.1% SDS at 50°C, preferably at 55°C, more preferably at 60°C, and even more preferably at 65°C. Preferably, an isolated nucleic acid molecule of the invention that hybridizes under stringent conditions to the sequence of one of the genes for SMARC. As used herein, a "naturally-occurring" nucleic acid molecule includes an RNA or DNA molecule having a nucleotide sequence that occurs in nature (*e.g.*, encodes a natural protein).

In addition to naturally-occurring allelic variants of the marker gene and gene encoding a marker protein of the invention sequences that may exist in the population, the skilled artisan will further appreciate that changes can be introduced by mutation into the nucleotide sequences of the marker genes or genes encoding the marker proteins of the invention, thereby leading to changes in the amino acid sequence of the encoded proteins, without altering the functional activity of these proteins. For example, nucleotide substitutions leading to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues can be made. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of a protein without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among allelic variants or homologs of a

gene (*e.g.*, among homologs of a gene from different species) are predicted to be particularly unamenable to alteration.

Accordingly, another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules encoding a marker protein of the invention that contain changes in amino acid residues that are not essential for activity. Such proteins differ in amino acid sequence from the marker proteins encoded by the SMARC genes, yet retain biological activity. In one embodiment, the protein comprises an amino acid sequence at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or more homologous to a marker protein of the invention.

An isolated nucleic acid molecule encoding a protein homologous to a marker protein of the invention can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of the gene encoding the marker protein, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein. Mutations can be introduced into the SMARC genes of the invention by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of a coding sequence of a gene of the invention, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis, the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined.

Another aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules which are antisense to the marker genes and genes encoding marker proteins of the invention. An "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence which is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein, *e.g.*, complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. Accordingly, an antisense nucleic acid can hydrogen bond to a sense nucleic acid. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire coding strand of SMARC genes, or to only a portion thereof. In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence of the invention. The term "coding region" includes the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid. In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence of the invention. The term "noncoding region" includes 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (*i.e.*, also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Anti-sense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick base pairing. The anti-sense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of an mRNA corresponding to a gene of the invention, but more preferably is an oligonucleotide which is anti-sense to only a portion of the coding or noncoding region. An anti-sense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An anti-sense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an anti-sense nucleic acid (*e.g.*, an anti-sense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the anti-sense and sense nucleic acids, *e.g.*, phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used. Examples of modified nucleotides which can be used to generate the anti-sense nucleic acid include 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-

galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5- oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the anti-sense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an anti-sense orientation (*i.e.*, RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an anti-sense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

The anti-sense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject or generated *in situ* such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a marker protein of the invention to thereby inhibit expression of the protein, *e.g.*, by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an anti-sense nucleic acid molecule which binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of anti-sense nucleic acid molecules of the invention include direct injection at a tissue site (*e.g.*, in skin). Alternatively, anti-sense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For example, for systemic administration, anti-sense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, *e.g.*, by linking the anti-sense nucleic acid molecules to peptides or antibodies which bind to cell surface receptors or antigens. The anti-sense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient intracellular concentrations of the anti-sense molecules, vector constructs in which the anti-sense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

In yet another embodiment, the anti-sense nucleic acid molecule of the invention is an α-anomeric nucleic acid molecule. An α-anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual β-units, the strands run parallel to each other (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids. Res.* 15:6625-6641). The anti-sense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

In still another embodiment, an anti-sense nucleic acid of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity which are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (*e.g.*, hammerhead ribozymes (described in Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) can be used to catalytically cleave mRNA transcripts of the genes of the invention to thereby inhibit translation of this mRNA. A ribozyme having specificity for a marker protein-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a gene of the invention, disclosed herein. For example, a derivative of a *Tetrahymena* L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a marker protein-encoding mRNA. See, *e.g.*, Cech *et al.* U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech *et al.* U.S. Patent No. 5,116,742. Alternatively, mRNA transcribed from a gene of the invention can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, *e.g.*, Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternatively, expression of SMARC genes can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of these genes (*e.g.*, the promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the gene in target cells. See generally, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher, L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

In yet another embodiment, the nucleic acid molecules of the present invention can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, *e.g.*, the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acid molecules can be modified to

generate peptide nucleic acids (see Hyrup B. *et al.* (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4 (1): 5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics, *e.g.*, DNA mimics, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup B. *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675.

PNAs can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as anti-sense or anti-gene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of the nucleic acid molecules of SMARC can also be used in the analysis of single base pair mutations in a gene, (*e.g.*, by PNA-directed PCR clamping); as 'artificial restriction enzymes' when used in combination with other enzymes, (*e.g.*, S1 nucleases (Hyrup B. (1996) *supra*)); or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup B. *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *supra*).

In another embodiment, PNAs can be modified, (*e.g.*, to enhance their stability or cellular uptake), by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of the nucleic acid molecules of the invention can be generated which may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA recognition enzymes, (*e.g.*, RNAse H and DNA polymerases), to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup B. (1996) *supra*). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup B. (1996) *supra* and Finn P.J. *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63. For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry and modified nucleoside analogs, *e.g.*, 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used as a between the PNA and the 5' end of DNA

(Mag, M. *et al.* (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment (Finn P.J. *et al.* (1996) *supra*). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment (Peterser, K.H. *et al.* (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-11124).

In other embodiments, the oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, *e.g.*, Letsinger *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, *e.g.*, PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage agents (See, *e.g.*, Krol *et al.* (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976) or intercalating agents. (See, *e.g.*, Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, (*e.g.*, a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent). Finally, the oligonucleotide may be detectably labeled, either such that the label is detected by the addition of another reagent (*e.g.*, a substrate for an enzymatic label), or is detectable immediately upon hybridization of the nucleotide (*e.g.*, a radioactive label or a fluorescent label (*e.g.*, a molecular beacon, as described in U.S. Patent 5,876,930.

II. Isolated Proteins and Antibodies

One aspect of the invention pertains to isolated marker proteins, and biologically active portions thereof, as well as polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-marker protein antibodies. In one embodiment, native marker proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, marker proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a marker protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

An "isolated" or "purified" protein or biologically active portion thereof is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the marker protein is derived, or substantially free from

chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of marker protein in which the protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. In one embodiment, the language "substantially free of cellular material" includes preparations of marker protein having less than about 30% (by dry weight) of non-marker protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), more preferably less than about 20% of non-marker protein, still more preferably less than about 10% of non-marker protein, and most preferably less than about 5% non-marker protein. When the marker protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, *i.e.*, culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the protein preparation.

The language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of marker protein in which the protein is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein. In one embodiment, the language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of protein having less than about 30% (by dry weight) of chemical precursors or non-protein chemicals, more preferably less than about 20% chemical precursors or non-protein chemicals, still more preferably less than about 10% chemical precursors or non-protein chemicals, and most preferably less than about 5% chemical precursors or non-protein chemicals.

As used herein, a "biologically active portion" of a marker protein includes a fragment of a marker protein comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequence of the marker protein, which include fewer amino acids than the full length marker proteins, and exhibit at least one activity of a marker protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the marker protein. A biologically active portion of a marker protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100, 200 or more amino acids in length. Biologically active portions of a marker protein can be used as targets for developing agents which modulate a marker protein-mediated activity.

In one embodiment, marker protein is encoded by the SMARC genes. In other embodiments, the marker protein is substantially homologous to a marker protein encoded by the SMARC genes, and retains the functional activity of the marker protein, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail in subsection I above. Accordingly, in another embodiment, the marker protein is a protein which comprises an amino acid sequence at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or more homologous to the amino acid sequence encoded by the SMARC genes.

To determine the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). In one embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, or 90% of the length of the reference sequence. The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In one embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using either a Blossom 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is

determined using the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In another embodiment, the percent identity between two amino acid or nucleotide sequences is determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

The nucleic acid and protein sequences of the present invention can further be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for example, identify other family members or related sequences. Such searches can be performed using the NBLAST and XBLAST programs (version 2.0) of Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to marker protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used. See http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

The invention also provides chimeric or fusion marker proteins. As used herein, a marker "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a marker polypeptide operatively linked to a non-marker polypeptide. An "marker polypeptide" includes a polypeptide having an amino acid sequence encoded by the SMARC genes, whereas a "non-marker polypeptide" includes a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the marker protein, *e.g.*, a protein which is different from marker protein and which is derived from the same or a different organism. Within a marker fusion protein the polypeptide can correspond to all or a portion of a marker protein. In one embodiment, a marker fusion protein comprises at least one biologically active portion of a marker protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the marker polypeptide and the non-marker polypeptide are fused in-frame to each other. The non-

marker polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the marker polypeptide.

For example, in one embodiment, the fusion protein is a GST-marker fusion protein in which the marker sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant marker proteins.

In another embodiment, the fusion protein is a marker protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of marker proteins can be increased through use of a heterologous signal sequence. Such signal sequences are well known in the art. The marker fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*, as described herein. The marker fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a marker protein substrate. Use of marker fusion proteins may be useful therapeutically for the treatment of disorders (*e.g.*, prostate cancer) caused by, for example, (i) aberrant modification or mutation of a gene encoding a markerprotein; (ii) mis-regulation of the marker protein-encoding gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a marker protein.

Moreover, the marker-fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-marker protein antibodies in a subject, to purify marker protein ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of a marker protein with a marker protein substrate.

Preferably, a marker chimeric or fusion protein of the invention is produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, for example by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers which give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments which can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric

gene sequence (see, for example, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (*e.g.*, a GST polypeptide). A marker protein-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the marker protein.

A signal sequence can be used to facilitate secretion and isolation of the secreted protein or other proteins of interest. Signal sequences are typically characterized by a core of hydrophobic amino acids which are generally cleaved from the mature protein during secretion in one or more cleavage events. Such signal peptides contain processing sites that allow cleavage of the signal sequence from the mature proteins as they pass through the secretory pathway. Thus, the invention pertains to the described polypeptides having a signal sequence, as well as to polypeptides from which the signal sequence has been proteolytically cleaved (*i.e.*, the cleavage products). In one embodiment, a nucleic acid sequence encoding a signal sequence can be operatively linked in an expression vector to a protein of interest, such as a protein which is ordinarily not secreted or is otherwise difficult to isolate. The signal sequence directs secretion of the protein, such as from a eukaryotic host into which the expression vector is transformed, and the signal sequence is subsequently or concurrently cleaved. The protein can then be readily purified from the extracellular medium by art recognized methods. Alternatively, the signal sequence can be linked to the protein of interest using a sequence which facilitates purification, such as with a GST domain.

The present invention also pertains to variants of the marker proteins of the invention which function as either agonists (mimetics) or as antagonists to the marker proteins. Variants of the marker proteins can be generated by mutagenesis, *e.g.*, discrete point mutation or truncation of a marker protein. An agonist of the marker proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a marker protein. An antagonist of a marker protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the marker protein by, for example, competitively modulating an activity of a marker protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. In one embodiment, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological

activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the marker protein.

Variants of a marker protein which function as either marker protein agonists (mimetics) or as marker protein antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, *e.g.*, truncation mutants, of a marker protein for marker protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of marker protein variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of marker protein variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential marker protein sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (*e.g.*, for phage display) containing the set of marker protein sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential marker protein variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential marker protein sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, *e.g.*, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

In addition, libraries of fragments of a protein coding sequence corresponding to a marker protein of the invention can be used to generate a variegated population of marker protein fragments for screening and subsequent selection of variants of a marker protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a marker protein coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, an expression

library can be derived which encodes N-terminal, C-terminal and internal fragments of various sizes of the marker protein.

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. The most widely used techniques, which are amenable to high through-put analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify marker variants (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

An isolated marker protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind marker proteins using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. A full-length marker protein can be used or, alternatively, the invention provides antigenic peptide fragments of these proteins for use as immunogens. The antigenic peptide of a marker protein comprises at least 8 amino acid residues of an amino acid sequence encoded by the SMARC gene, and encompasses an epitope of a marker protein such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the marker protein. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of the marker protein that are located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity.

A marker protein immunogen typically is used to prepare antibodies by immunizing a suitable subject, (*e.g.*, rabbit, goat, mouse or other mammal) with the immunogen. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, recombinantly expressed marker protein or a chemically synthesized marker

polypeptide. The preparation can further include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic marker protein preparation induces a polyclonal anti-marker protein antibody response.

Accordingly, another aspect of the invention pertains to anti-marker protein antibodies. The term "antibody" as used herein includes immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain an antigen binding site which specifically binds (immunoreacts with) an antigen, such as a marker protein. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include F(ab) and $F(ab')_2$ fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin. The invention provides polyclonal and monoclonal antibodies that bind to marker proteins. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition", as used herein, includes a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular marker protein with which it immunoreacts.

Polyclonal anti-marker protein antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with a marker protein of the invention. The anti-marker protein antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized marker protein. If desired, the antibody molecules directed against marker proteins can be isolated from the mammal (*e.g.*, from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A chromatography, to obtain the IgG fraction. At an appropriate time after immunization, *e.g.*, when the anti-marker protein antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (see also, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem* .255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), the more recent human B cell hybridoma technique (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol Today* 4:72), the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*

(1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) or trioma techniques.

The technology for producing monoclonal antibody hybridomas is well known (see generally R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with a marker protein immunogen as described above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody that binds to a marker protein of the invention.

Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating an anti-marker protein monoclonal antibody (see, *e.g.*, G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al. Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited *supra*). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also would be useful. Typically, the immortal cell line (*e.g.*, a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line.

Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, *e.g.*, the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the invention are detected by screening the

hybridoma culture supernatants for antibodies that bind to a marker protein, *e.g.*, using a standard ELISA assay.

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-marker protein antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (*e.g.*, an antibody phage display library) with marker protein to thereby isolate immunoglobulin library members that bind to a marker protein. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (*e.g.*, the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.* PCT International Publication WO 92/20791; Markland *et al.* PCT International Publication No. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT International Publication WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT International Publication No. WO 92/09690; Ladner *et al.* PCT International Publication No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty *et al. Nature* (1990) 348:552-554.

Additionally, recombinant anti-marker protein antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in Robinson *et al.* International Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT

International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.* European Patent Application 125,023; 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.* 139:3521-3526; 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, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human subjects. Such antibodies can be produced using transgenic mice which are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chains genes, but which can express human heavy and light chain genes. The transgenic mice are immunized in the normal fashion with a selected antigen, *e.g.*, all or a portion of a polypeptide corresponding to a marker of the invention. Monoclonal antibodies directed against the antigen can be obtained using conventional hybridoma technology. The human immunoglobulin transgenes harbored by the transgenic mice rearrange during B cell differentiation, and subsequently undergo class switching and somatic mutation. Thus, using such a technique, it is possible to produce therapeutically useful IgG, IgA and IgE antibodies. For an overview of this technology for producing human antibodies, see Lonberg and Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). For a detailed discussion of this technology for producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, see, *e.g.*, U.S. Patent 5,625,126; U.S. Patent 5,633,425; U.S. Patent 5,569,825; U.S. Patent 5,661,016; and U.S. Patent 5,545,806. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Freemont, CA), can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, *e.g.*, a murine antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope (Jespers *et al.*, 1994, *Bio/technology* 12:899-903).

An anti-marker protein antibody (*e.g.*, monoclonal antibody) can be used to isolate a marker protein of the invention by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation. An anti-marker protein antibody can facilitate the purification of natural marker proteins from cells and of recombinantly produced marker proteins expressed in host cells. Moreover, an anti-marker protein antibody can be used to detect marker protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the marker protein. Anti-marker protein antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (*i.e.*, physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S or ^{3}H.

III. Recombinant Expression Vectors and Host Cells

Another aspect of the invention pertains to vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a marker protein of the invention (or a portion thereof). As used herein, the term "vector" includes a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which includes a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian

vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, which is operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operatively linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner which allows for expression of the nucleotide sequence (*e.g.*, in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell). The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Regulatory sequences include those which direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cells and those which direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (*e.g.*, tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and the like. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including fusion proteins or peptides,

encoded by nucleic acids as described herein (*e.g.*, marker proteins, mutant forms of marker proteins, fusion proteins, and the like).

The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of marker proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, marker proteins can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors) yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: 1) to increase expression of recombinant protein; 2) to increase the solubility of the recombinant protein; and 3) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

Purified fusion proteins can be utilized in marker activity assays, (*e.g.*, direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific for marker proteins for example.

Examples of suitable inducible non-fusion *E. coli* expression vectors include pTrc (Amann *et al.*, (1988) *Gene* 69:301-315) and pET 11d (Studier *et al.*, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). Target gene expression from the pTrc vector relies on host

RNA polymerase transcription from a hybrid trp-lac fusion promoter. Target gene expression from the pET 11d vector relies on transcription from a T7 gn10-lac fusion promoter mediated by a coexpressed viral RNA polymerase (T7 gn1). This viral polymerase is supplied by host strains BL21(DE3) or HMS174(DE3) from a resident prophage harboring a T7 gn1 gene under the transcriptional control of the lacUV 5 promoter.

One strategy to maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in *E. coli* (Wada *et al.*, (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.

In another embodiment, the marker protein expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast *S. cerevisiae* include pYepSec1 (Baldari, *et al.*, (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), and picZ (InVitrogen Corp, San Diego, CA).

Alternatively, marker proteins of the invention can be expressed in insect cells using baculovirus expression vectors. Baculovirus vectors available for expression of proteins in cultured insect cells (*e.g.*, Sf 9 cells) include the pAc series (Smith *et al.* (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) and the pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

In yet another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) and pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:187-195). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, cytomegalovirus and Simian Virus 40. For other suitable expression systems for both

prokaryotic and eukaryotic cells see chapters 16 and 17 of Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (*e.g.*, tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Tissue-specific regulatory elements are known in the art. Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), lymphoid-specific promoters (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) and immunoglobulins (Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), neuron-specific promoters (*e.g.*, the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund *et al.* (1985) *Science* 230:912-916), and mammary gland-specific promoters (*e.g.*, milk whey promoter; U.S. Patent No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, for example the murine hox promoters (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) and the α-fetoprotein promoter (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an anti-sense orientation. That is, the DNA molecule is operatively linked to a regulatory sequence in a manner which allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule which is anti-sense to mRNA corresponding to a SMARC gene. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the anti-sense orientation can be chosen which direct the continuous expression of the anti-sense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen which direct constitutive, tissue specific or cell type specific expression of anti-sense RNA. The anti-sense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus in which anti-sense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the

activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation of gene expression using anti-sense genes see Weintraub, H. *et al.*, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

Another aspect of the invention pertains to host cells into which a nucleic acid molecule of the invention is introduced, *e.g.*, SMARC within a recombinant expression vector or a nucleic acid molecule of the invention containing sequences which allow it to homologously recombine into a specific site of the host cell's genome. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a marker protein of the invention can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (*e.g.*, DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Suitable methods for transforming or transfecting host cells can be found in Sambrook, *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), and other laboratory manuals.

For stable transfection of mammalian cells, it is known that, depending upon the expression vector and transfection technique used, only a small fraction of cells may integrate the foreign DNA into their genome. In order to identify and select these integrants, a gene that encodes a selectable marker (*e.g.*, resistance to antibiotics) is generally introduced into the host cells along with the gene of interest. Preferred

selectable markers include those which confer resistance to drugs, such as G418, hygromycin and methotrexate. Nucleic acid encoding a selectable marker can be introduced into a host cell on the same vector as that encoding a marker protein or can be introduced on a separate vector. Cells stably transfected with the introduced nucleic acid can be identified by drug selection (*e.g.*, cells that have incorporated the selectable marker gene will survive, while the other cells die).

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (*i.e.*, express) a marker protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing a marker protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of invention (into which a recombinant expression vector encoding a marker protein has been introduced) in a suitable medium such that a marker protein of the invention is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating a marker protein from the medium or the host cell.

The host cells of the invention can also be used to produce non-human transgenic animals. For example, in one embodiment, a host cell of the invention is a fertilized oocyte or an embryonic stem cell into which marker-protein-coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals in which exogenous sequences encoding a marker protein of the invention have been introduced into their genome or homologous recombinant animals in which endogenous sequences encoding the marker proteins of the invention have been altered. Such animals are useful for studying the function and/or activity of a marker protein and for identifying and/or evaluating modulators of marker protein activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, and the like. A transgene is exogenous DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops and which remains in the genome of the mature animal, thereby directing the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal. As used herein, a "homologous recombinant animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a mouse, in which an endogenous SMARC gene has been

altered by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a cell of the animal, *e.g.*, an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal.

A transgenic animal of the invention can be created by introducing a marker-encoding nucleic acid into the male pronuclei of a fertilized oocyte, *e.g.*, by microinjection, retroviral infection, and allowing the oocyte to develop in a pseudopregnant female foster animal. Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operatively linked to a transgene to direct expression of a marker protein to particular cells. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009, both by Leder *et al.*, U.S. Patent No. 4,873,191 by Wagner *et al.* and in Hogan, B., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Similar methods are used for production of other transgenic animals. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of a transgene of the invention in its genome and/or expression of mRNA corresponding to a gene of the invention in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene encoding a marker protein can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

To create a homologous recombinant animal, a vector is prepared which contains at least a portion of a gene of the invention into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, *e.g.*, functionally disrupt, the gene. The gene can be a human gene, but more preferably, is a non-human homologue of a human SMARC. For example, a mouse gene can be used to construct a homologous recombination nucleic acid molecule, *e.g.*, a vector, suitable for altering an endogenous gene of the invention in the mouse genome. In one embodiment, the homologous recombination nucleic acid molecule is designed such that, upon homologous recombination, the endogenous gene of the invention is functionally disrupted (*i.e.*, no longer encodes a functional protein; also referred to as a "knock out" vector).

Alternatively, the homologous recombination nucleic acid molecule can be designed such that, upon homologous recombination, the endogenous gene is mutated or otherwise altered but still encodes functional protein (*e.g.*, the upstream regulatory region can be altered to thereby alter the expression of the endogenous marker protein). In the homologous recombination nucleic acid molecule, the altered portion of the gene of the invention is flanked at its 5' and 3' ends by additional nucleic acid sequence of the gene of the invention to allow for homologous recombination to occur between the exogenous gene carried by the homologous recombination nucleic acid molecule and an endogenous gene in a cell, *e.g.*, an embryonic stem cell. The additional flanking nucleic acid sequence is of sufficient length for successful homologous recombination with the endogenous gene. Typically, several kilobases of flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the homologous recombination nucleic acid molecule (see, *e.g.*, Thomas, K.R. and Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503 for a description of homologous recombination vectors). The homologous recombination nucleic acid molecule is introduced into a cell, *e.g.*, an embryonic stem cell line (*e.g.*, by electroporation) and cells in which the introduced gene has homologously recombined with the endogenous gene are selected (see *e.g.*, Li, E. *et al.* (1992) *Cell* 69:915). The selected cells can then injected into a blastocyst of an animal (*e.g.*, a mouse) to form aggregation chimeras (see *e.g.*, Bradley, A. in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA by germline transmission of the transgene. Methods for constructing homologous recombination nucleic acid molecules, *e.g.*, vectors, or homologous recombinant animals are described further in Bradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829 and in PCT International Publication Nos.: WO 90/11354 by Le Mouellec *et al.*; WO 91/01140 by Smithies *et al.*; WO 92/0968 by Zijlstra *et al.*; and WO 93/04169 by Berns *et al.*

In another embodiment, transgenic non-human animals can be produced which contain selected systems which allow for regulated expression of the transgene. One example of such a system is the *cre/loxP* recombinase system of bacteriophage P1. For

a description of the *cre/loxP* recombinase system, see, *e.g.*, Lakso *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236. Another example of a recombinase system is the FLP recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) *Science* 251:1351-1355. If a *cre/loxP* recombinase system is used to regulate expression of the transgene, animals containing transgenes encoding both the *Cre* recombinase and a selected protein are required. Such animals can be provided through the construction of "double" transgenic animals, *e.g.*, by mating two transgenic animals, one containing a transgene encoding a selected protein and the other containing a transgene encoding a recombinase.

Clones of the non-human transgenic animals described herein can also be produced according to the methods described in Wilmut, I. *et al.* (1997) *Nature* 385:810-813 and PCT International Publication Nos. WO 97/07668 and WO 97/07669. In brief, a cell, *e.g.*, a somatic cell, from the transgenic animal can be isolated and induced to exit the growth cycle and enter G_O phase. The quiescent cell can then be fused, *e.g.*, through the use of electrical pulses, to an enucleated oocyte from an animal of the same species from which the quiescent cell is isolated. The reconstructed oocyte is then cultured such that it develops to morula or blastocyte and then transferred to pseudopregnant female foster animal. The offspring borne of this female foster animal will be a clone of the animal from which the cell, *e.g.*, the somatic cell, is isolated.

IV. Pharmaceutical Compositions

The nucleic acid molecules of the invention *i.e.* SMARC polynucleotides, fragments of marker proteins, and anti-marker protein antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is

contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

The invention includes methods for preparing pharmaceutical compositions for modulating the expression or activity of a polypeptide or nucleic acid corresponding to a marker of the invention. Such methods comprise formulating a pharmaceutically acceptable carrier with an agent which modulates expression or activity of a polypeptide or nucleic acid corresponding to a marker of the invention. Such compositions can further include additional active agents. Thus, the invention further includes methods for preparing a pharmaceutical composition by formulating a pharmaceutically acceptable carrier with an agent which modulates expression or activity of a polypeptide or nucleic acid corresponding to a marker of the invention and one or more additional active compounds.

The invention also provides methods (also referred to herein as "screening assays") for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (*e.g.*, peptides, peptidomimetics, peptoids, small molecules or other drugs) which (a) bind to the marker, or (b) have a modulatory (*e.g.*, stimulatory or inhibitory) effect on the activity of the marker or, more specifically, (c) have a modulatory effect on the interactions of the marker with one or more of its natural substrates (*e.g.*, peptide, protein, hormone, co-factor, or nucleic acid), or (d) have a modulatory effect on the expression of the marker. Such assays typically comprise a reaction between the marker and one or more assay components. The other components may be either the test compound itself, or a combination of test compound and a natural binding partner of the marker.

The test compounds of the present invention may be obtained from any available source, including systematic libraries of natural and/or synthetic compounds. Test compounds may also be obtained by any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; peptoid libraries (libraries of molecules having the functionalities of peptides, but with a novel, non-peptide backbone which are resistant to enzymatic degradation but which nevertheless remain bioactive; see, *e.g.*, Zuckermann *et al.*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678-85); spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and

synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library and peptoid library approaches are limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145).

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyetheylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various

antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (*e.g.*, a fragment of a marker protein or an anti-marker protein antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, *e.g.*, a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein includes physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound

and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD50 (the dose lethal to 50% of the population) and the ED50 (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD50/ED50. Compounds which exhibit large therapeutic indices are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects may be used, care should be taken to design a delivery system that targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED50 with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC50 (*i.e.*, the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (see U.S. Patent 5,328,470) or by stereotactic injection (see *e.g.*, Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, *e.g.*, retroviral vectors, the

pharmaceutical preparation can include one or more cells which produce the gene delivery system.

The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

V. Computer Readable Means and Arrays

Computer readable media comprising a marker(s) of the present invention is also provided. As used herein, "computer readable media" includes a medium that can be read and accessed directly by a computer. Such media include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and magnetic tape; optical storage media such as CD-ROM; electrical storage media such as RAM and ROM; and hybrids of these categories such as magnetic/optical storage media. The skilled artisan will readily appreciate how any of the presently known computer readable mediums can be used to create a manufacture comprising computer readable medium having recorded thereon a marker of the present invention.

As used herein, "recorded" includes a process for storing information on computer readable medium. Those skilled in the art can readily adopt any of the presently known methods for recording information on computer readable medium to generate manufactures comprising the markers of the present invention.

A variety of data processor programs and formats can be used to store the marker information of the present invention on computer readable medium. For example, the nucleic acid sequence corresponding to the markers can be represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and MicroSoft Word, or represented in the form of an ASCII file, stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like. Any number of dataprocessor structuring formats (*e.g.*, text file or database) may be adapted in order to obtain computer readable medium having recorded thereon the markers of the present invention.

By providing the markers of the invention in computer readable form, one can routinely access the marker sequence information for a variety of purposes. For example, one skilled in the art can use the nucleotide or amino acid sequences of the invention in computer readable form to compare a target sequence or target structural

motif with the sequence information stored within the data storage means. Search means are used to identify fragments or regions of the sequences of the invention which match a particular target sequence or target motif.

The invention also includes an array comprising a marker(s) of the present invention. The array can be used to assay expression of one or more genes in the array. In one embodiment, the array can be used to assay gene expression in a tissue to ascertain tissue specificity of genes in the array. In this manner, up to about 8600 genes can be simultaneously assayed for expression. This allows a profile to be developed showing a battery of genes specifically expressed in one or more tissues.

In addition to such qualitative determination, the invention allows the quantitation of gene expression. Thus, not only tissue specificity, but also the level of expression of a battery of genes in the tissue is ascertainable. Thus, genes can be grouped on the basis of their tissue expression *per se* and level of expression in that tissue. This is useful, for example, in ascertaining the relationship of gene expression between or among tissues. Thus, one tissue can be perturbed and the effect on gene expression in a second tissue can be determined. In this context, the effect of one cell type on another cell type in response to a biological stimulus can be determined. Such a determination is useful, for example, to know the effect of cell-cell interaction at the level of gene expression. If an agent is administered therapeutically to treat one cell type but has an undesirable effect on another cell type, the invention provides an assay to determine the molecular basis of the undesirable effect and thus provides the opportunity to co-administer a counteracting agent or otherwise treat the undesired effect. Similarly, even within a single cell type, undesirable biological effects can be determined at the molecular level. Thus, the effects of an agent on expression of other than the target gene can be ascertained and counteracted.

In another embodiment, the array can be used to monitor the time course of expression of one or more genes in the array. This can occur in various biological contexts, as disclosed herein, for example development and differentiation, disease progression, *in vitro* processes, such a cellular transformation and senescence, autonomic neural and neurological processes, such as, for example, pain and appetite, and cognitive functions, such as learning or memory.

The array is also useful for ascertaining the effect of the expression of a gene on the expression of other genes in the same cell or in different cells. This provides, for example, for a selection of alternate molecular targets for therapeutic intervention if the ultimate or downstream target cannot be regulated.

The array is also useful for ascertaining differential expression patterns of one or more genes in normal and diseased cells. This provides a battery of genes that could serve as a molecular target for diagnosis or therapeutic intervention.

VI. Predictive Medicine

The present invention pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, pharmacogenetics and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual prophylactically. Accordingly, one aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining marker protein and/or nucleic acid expression as well as marker protein activity, in the context of a biological sample (*e.g.*, blood, serum, cells, tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a disease or disorder, or is at risk of developing a disorder, associated with increased or decreased marker protein expression or activity. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a disorder associated with marker protein, nucleic acid expression or activity. For example, the number of copies of a marker gene can be assayed in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purposes to thereby phophylactically treat an individual prior to the onset of a disorder (*e.g.*, prostate cancer) characterized by or associated with marker protein, nucleic acid expression or activity.

Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs, compounds) on the expression or activity of marker in clinical trials.

These and other agents are described in further detail in the following sections.

1. Diagnostic Assays

An exemplary method for detecting the presence or absence of marker protein or nucleic acid of the invention in a biological sample involves obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an

agent capable of detecting the protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) that encodes the marker protein such that the presence of the marker protein or nucleic acid is detected in the biological sample. A preferred agent for detecting mRNA or genomic DNA corresponding to a marker gene or protein of the invention is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to a mRNA or genomic DNA of the invention. Suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

A preferred agent for detecting marker protein is an antibody capable of binding to marker protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (*e.g.*, Fab or $F(ab')_2$) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (*i.e.*, physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin. The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect marker mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of marker mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of marker protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of marker genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of marker protein include introducing into a subject a labeled anti-marker antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

In one embodiment, the biological sample contains protein molecules from the test subject. Alternatively, the biological sample can contain mRNA molecules from the test subject or genomic DNA molecules from the test subject. A preferred biological sample is a serum sample isolated by conventional means from a subject.

In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample (*e.g.*, non-prostate cancer cells sample) from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting marker protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of marker protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of marker protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of marker protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

The invention also encompasses kits for detecting the presence of marker in a biological sample. For example, the kit can comprise a labeled compound or agent capable of detecting marker protein or mRNA in a biological sample; means for determining the amount of marker in the sample; and means for comparing the amount of marker in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect marker protein or nucleic acid.

2. Prognostic Assays

The diagnostic methods described herein can furthermore be utilized to identify subjects having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant marker expression or activity. As used herein, the term "aberrant" includes a marker expression or activity which deviates from the wild type marker expression or activity. Aberrant expression or activity includes increased or decreased expression or activity, as well as expression or activity which does not follow the wild type developmental pattern of expression or the subcellular pattern of expression. For example, aberrant marker expression or activity is intended to include the cases in which a mutation in the marker gene causes the marker gene to be under-expressed or over-expressed and situations in which such mutations result in a non-functional marker protein or a protein which does not function in a wild-type fashion, *e.g.*, a protein which does not interact with a marker ligand or one which interacts with a non-marker protein ligand.

The assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be utilized to identify a subject having or at risk of developing a disorder associated with a misregulation in marker protein activity or nucleic acid expression, such as prostate cancer. Alternatively, the prognostic assays can be utilized

to identify a subject having or at risk for developing a disorder associated with a misregulation in marker protein activity or nucleic acid expression, such as prostate cancer. Thus, the present invention provides a method for identifying a disease or disorder associated with aberrant marker expression or activity in which a test sample is obtained from a subject and marker protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA or genomic DNA) is detected, wherein the presence of marker protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant marker expression or activity. As used herein, a "test sample" includes a biological sample obtained from a subject of interest. For example, a test sample can be a biological fluid (*e.g.*, blood), cell sample, or tissue (*e.g.*, skin).

Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered an agent (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate) to treat a disease or disorder associated with increased or decreased marker expression or activity. For example, such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder such as prostate cancer. Thus, the present invention provides methods for determining whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder associated with increased or decreased marker expression or activity in which a test sample is obtained and marker protein or nucleic acid expression or activity is detected (*e.g.*, wherein the abundance of marker protein or nucleic acid expression or activity is diagnostic for a subject that can be administered the agent to treat a disorder associated with increased or decreased marker expression or activity).

The methods of the invention can also be used to detect genetic alterations in a marker gene, thereby determining if a subject with the altered gene is at risk for a disorder characterized by misregulation in marker protein activity or nucleic acid expression, such as prostate cancer. In preferred embodiments, the methods include detecting, in a sample of cells from the subject, the presence or absence of a genetic alteration characterized by at least one of an alteration affecting the integrity of a gene encoding a marker-protein, or the mis-expression of the marker gene. For example, such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of 1) a deletion of one or more nucleotides from a marker gene; 2) an addition of one or more

nucleotides to a marker gene; 3) a substitution of one or more nucleotides of a marker gene, 4) a chromosomal rearrangement of a marker gene; 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a marker gene, 6) aberrant modification of a marker gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, 7) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a marker gene, 8) a non-wild type level of a marker-protein, 9) allelic loss of a marker gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a marker-protein. As described herein, there are a large number of assays known in the art which can be used for detecting alterations in a marker gene. A preferred biological sample is a tissue or blood sample isolated by conventional means from a subject.

In certain embodiments, detection of the alteration involves the use of a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (see, *e.g.*, Landegran *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the marker-gene (see Abravaya *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* .23:675-682). This method can include the steps of collecting a sample of cells from a subject, isolating nucleic acid (*e.g.*, genomic, mRNA or both) from the cells of the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to a marker gene under conditions such that hybridization and amplification of the marker-gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli, J.C. *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh, D.Y. *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi, P.M. *et al.* (1988) *Bio-Technology* 6:1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection

schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

In an alternative embodiment, mutations in a marker gene from a sample cell can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S. Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

In other embodiments, genetic mutations in a marker gene or a gene encoding a marker protein of the invention can be identified by hybridizing a sample and control nucleic acids, *e.g.*, DNA or RNA, to high density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotides probes (Cronin, M.T. *et al.* (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal, M.J. *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). For example, genetic mutations in marker can be identified in two dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described in Cronin, M.T. *et al. supra.* Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization array that allows the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the marker gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample marker with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxam and Gilbert ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560) or Sanger ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). It is also contemplated

that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays ((1995) *Biotechniques* 19:448), including sequencing by mass spectrometry (see, *e.g.*, PCT International Publication No. WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; and Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

Other methods for detecting mutations in the marker gene or gene encoding a marker protein of the invention include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes of formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type marker sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent which cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to basepair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digesting the mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, for example, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. In a preferred embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in marker cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). According to an exemplary embodiment, a probe based on a marker sequence, *e.g.*, a wild-type marker sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme,

and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, for example, U.S. Patent No. 5,459,039.

In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in marker genes or genes encoding a marker protein of the invention. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA*: 86:2766, see also Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; and Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control marker nucleic acids will be denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments may be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5).

In yet another embodiment the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions which permit hybridization only if a perfect match is found (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86:6230). Such allele specific oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different

mutations when the oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

Alternatively, allele specific amplification technology which depends on selective PCR amplification may be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). In addition it may be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189). In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody reagent described herein, which may be conveniently used, *e.g.*, in clinical settings to diagnose subjects exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving a marker gene.

Furthermore, any cell type or tissue in which marker is expressed may be utilized in the prognostic assays described herein.

3. Monitoring of Effects During Clinical Trials

Monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs) on the expression or activity of a marker protein (*e.g.*, the modulation of prostate cancer) can be applied not only in basic drug screening, but also in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent determined by a screening assay as described herein to increase marker gene expression, protein levels, or upregulate marker activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased marker gene expression, protein levels, or downregulated marker activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening

assay to decrease marker gene expression, protein levels, or downregulate marker activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased marker gene expression, protein levels, or upregulated marker activity. In such clinical trials, the expression or activity of a marker gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for example, a marker-associated disorder (*e.g.*, prostate cancer) can be used as a "read out" or markers of the phenotype of a particular cell.

For example, and not by way of limitation, genes, including marker genes and genes encoding a marker protein of the invention, that are modulated in cells by treatment with an agent (*e.g.*, compound, drug or small molecule) which modulates marker activity (*e.g.*, identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents on marker-associated disorders (*e.g.*, prostate cancer), for example, in a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of marker and other genes implicated in the marker-associated disorder, respectively. The levels of gene expression (*e.g.*, a gene expression pattern) can be quantified by northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, or alternatively by measuring the amount of protein produced, by one of the methods as described herein, or by measuring the levels of activity of marker or other genes. In this way, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent. Accordingly, this response state may be determined before, and at various points during treatment of the individual with the agent.

In one embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate identified by the screening assays described herein) including the steps of (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of a marker protein, mRNA, or genomic DNA in the preadministration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the marker protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the marker protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the marker protein, mRNA, or genomic DNA in the post

administration sample or samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of marker to higher levels than detected, *i.e.*, to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of marker to lower levels than detected, *i.e.* to decrease the effectiveness of the agent. According to such an embodiment, marker expression or activity may be used as an indicator of the effectiveness of an agent, even in the absence of an observable phenotypic response.

4. Methods of Treatment:

The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk for (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant marker expression or activity. With regards to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments may be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics. "Pharmacogenomics", as used herein, includes the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene expression analysis to drugs in clinical development and on the market. More specifically, the term refers the study of how a subject's genes determine his or her response to a drug (*e.g.*, a subject's "drug response phenotype", or "drug response genotype".) Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring an individual's prophylactic or therapeutic treatment with either the marker molecules of the present invention or marker modulators according to that individual's drug response genotype. Pharmacogenomics allows a clinician or physician to target prophylactic or therapeutic treatments to subjects who will most benefit from the treatment and to avoid treatment of subjects who will experience toxic drug-related side effects.

5. Prophylactic Methods

In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a disease or condition (*e.g.*, prostate cancer) associated with increased or decreased marker expression or activity, by administering to the subject a marker protein or an agent which modulates marker protein expression or at least one marker protein activity.

Subjects at risk for a disease which is caused or contributed to by increased or decreased marker expression or activity can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the differential marker protein expression, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of marker aberrancy (*e.g.*, increase or decrease in expression level), for example, a marker protein, marker protein agonist or marker protein antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

6. Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods of modulating marker protein expression or activity for therapeutic purposes. Accordingly, in an exemplary embodiment, the modulatory method of the invention involves contacting a cell with a marker protein or agent that modulates one or more of the activities of a marker protein activity associated with the cell. An agent that modulates marker protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring target molecule of a marker protein (*e.g.*, a marker protein substrate), a marker protein antibody, a marker protein agonist or antagonist, a peptidomimetic of a marker protein agonist or antagonist, or other small molecule. In one embodiment, the agent stimulates one or more marker protein activities. Examples of such stimulatory agents include active marker protein and a nucleic acid molecule encoding marker protein that has been introduced into the cell. In another embodiment, the agent inhibits one or more marker protein activities. Examples of such inhibitory agents include anti-sense marker protein nucleic acid molecules, anti-marker protein antibodies, and marker protein inhibitors. These modulatory methods can be performed *in vitro* (*e.g.*, by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (*e.g.*, by administering the agent to a subject). As such, the present invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant expression or activity of a marker protein or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves administering an agent (*e.g.*, an agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (*e.g.*, upregulates or downregulates) marker protein expression or

activity. In another embodiment, the method involves administering a marker protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced or aberrant marker protein expression or activity.

Stimulation of marker protein activity is desirable in situations in which marker protein is abnormally downregulated and/or in which increased marker protein activity is likely to have a beneficial effect. For example, stimulation of marker protein activity is desirable in situations in which a marker is downregulated and/or in which increased marker protein activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of marker protein activity is desirable in situations in which marker protein is abnormally upregulated and/or in which decreased marker protein activity is likely to have a beneficial effect.

7. Pharmacogenomics

The marker protein and nucleic acid molecules of the present invention, as well as agents, or modulators which have a stimulatory or inhibitory effect on marker protein activity (*e.g.*, marker gene expression) as identified by a screening assay described herein can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) marker-associated disorders (*e.g.*, prostate cancer) associated with aberrant marker protein activity. In conjunction with such treatment, pharmacogenomics (*i.e.*, the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a foreign compound or drug) may be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, a physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenomics studies in determining whether to administer a marker molecule or marker modulator as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with a marker molecule or marker modulator.

Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. See, for example, Eichelbaum, M. *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23(10-11) :983-985 and Linder, M.W. *et al.* (1997) *Clin. Chem.* 43(2):254-266. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic

conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

One pharmacogenomics approach to identifying genes that predict drug response, known as "a genome-wide association", relies primarily on a high-resolution map of the human genome consisting of already known gene-related markers (*e.g.*, a "bi-allelic" gene marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants.) Such a high-resolution genetic map can be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of subjects taking part in a Phase II/III drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect. Alternatively, such a high resolution map can be generated from a combination of some ten-million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP may be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that may be common among such genetically similar individuals.

Alternatively, a method termed the "candidate gene approach", can be utilized to identify genes that predict drug response. According to this method, if a gene that encodes a drugs target is known (*e.g.*, a marker protein of the present invention), all common variants of that gene can be fairly easily identified in the population and it can be determined if having one version of the gene versus another is associated with a particular drug response.

As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (*e.g.*, N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some subjects do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. The other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

Alternatively, a method termed the "gene expression profiling", can be utilized to identify genes that predict drug response. For example, the gene expression of an animal dosed with a drug (*e.g.*, a marker molecule or marker modulator of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

Information generated from more than one of the above pharmacogenomics approaches can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment an individual. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with a marker molecule or marker modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.

This invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application, are incorporated herein by reference.

EXAMPLES

Example 1: Identification and characterization of a Marker cDNA

(i) Methods and Materials

(a) Cell Cultures

Human prostatic cancer cell lines LNCaP, DU-145, PC-3, and Tsu-prl were obtained from ATCC. LNCaP cancer cells were maintained in humidified atmosphere of 5% CO_2 in air in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies, Inc, Rockville, MD), 3 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin. Other lines were maintained in DMEM containing 3 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, and 10% FCS in humidified atmosphere of 5% CO_2. To examine the effects of steroids, cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 5% FCS treated with dextran coated charcoal (Hyclone, Logan, Utah) for 24 hs before treatment. Cells were grown in the absence or presence of 10 nM DHT for 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, and 72 hs. They were collected and frozen at each time point. Two hundred µl of medium were collected from each flask for PSA assay.

(b) Cell Growth Assays

To verify the effect of DHT on the growth of LNCaP cells, cells at 3,000 cells/well were plated in 96-well plates for 24 hs before treatment with DHT. After 72 hs, MTT was added to each well and incubated at 37°C for four hs. At the end of incubation, the supernatant was removed and 100 µl DMSO was added to each well to dissolve the cells. Plates were subsequently read in a plate reader at 570 nM.

(c) PSA ELISA

Quantification of PSA was performed using an ELISA. Briefly, a 96-well Nunc plate was coated with 100 µl of goat anti-PSA (1 µg/ml, Scripps laboratory, San Diego, CA) overnight at 4°C. The plate was washed with water three times and incubated with 100 µl of blocking buffer (PBS, 0.05% Tween 20, 1 µM EDTA, 0.25% BSA, and 0.05% NaN_3) for 1 h at room temperature. The plate was washed three times with water and incubated with 1:1 mixture of mouse anti-human PSA and Eu-labeled anti-mouse IgG (10 ng/antibody each/well for $1^1/2$ hs at RT). The plate was then washed four times with

water. 100 µl of Delfia Enhancement Solution (PerkinElmer Wallac Inc (Norton, OH) was added to the plate was read using a Victor reader according to the manufacturer's instruction.

(d) RNA extraction and preparation

Total RNA was isolated from LNCaP cells using the Qiagen Rneasy Midi Kit following the manufacturer's recommendations. For polyA (+) selection, the Promega PolyATract kit was used according to manufacturer's procedures. Briefly, LNCaP cells were collected by centrifugation and the RNA isolated using the buffers and recommended procedures from the Qiagen kit. Following RNA extraction, all samples were frozen at –80°C. One microgram of poly A(+) RNA was used as template for synthesis of double-stranded cDNA using the GibcoBRL cDNA synthesis kit, with an oligo dT primer incorporating a T7 RNA polymerase promoter (10 minutes at 70°C for priming, 65 minutes at 37°C for first strand synthesis with Superscript II RT, followed by 150 min at 15.8°C for second strand synthesis with *E. coli* ligase, *E. coli* polymerase, and RNAse H). The double-stranded cDNA was purified by Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) using the methods described by De Angelis *et al.* using Perseptives paramagnetic beads (*See*, De Angelis *et al.* (1995) *Nuc. Acid Res.* 23: 4742-4743.) Approximately 50 ng of double-stranded cDNA was used as template for *in vitro* transcription to make labeled cRNA (16 hours at 37°C, Epicenter T7 RNA polymerase, Enzo Laboratories bio-11-CTP, bio-11- UTP). The cRNA was purified by SPRI using paramagnetic beads (Bangs Laboratories), and total molar concentration was determined from the absorbance at 260. Prior to hybridization, 10ug of labeled cRNA was fragmented randomly to an average length of approximately 50 bases by heating at 94°C in 40 mM Tris-acetate pH 8.1, 100mM potassium acetate, and 30 mM magnesium acetate, for 35 minutes.

For material made directly from cellular RNA, cytoplasmic RNA was extracted from cells by the method of Favaloro *et al.* ((1980) *Methods Enzymol.* 65: 718-749), and poly (A) RNA was isolated with an oligo dT selection step (Promega PolyA tract mRNA Isolation System IV, Madison, WI).

(e) Chip Hybridization and Analysis

Affymetrix Genechip™ technology was used to monitor the expression of about 6000 full-length human genes in response to a natural androgen DHT in LNCaP cells. Fig. 2 illustrates the general scheme used for sample preparation, hybridization, and analysis. Hybridization cocktail was made using 10 μg of fragmented cRNA, 2X MES buffer with BSA, herring sperm DNA, control prokaryotic transcripts for internal control, and biotinylated control oligo 948 (for chip quality control). DEPC-water was added to bring the volume to 200 μl. Prior to hybridization, the hybridization cocktails were heated to 99°C for 10 minutes, and then 37°C for an additional 10 minutes before loading into Hu6800FL arrays (Affymetrix GeneChips™). The Hu6800Fl array is comprised of 6800 known full-length genes, about 250,000 25-mer oligonucleotide probes with 20 probe pairs per gene. Array hybridization proceeded overnight at 45°C with 50 rpm. Following hybridization, the arrays were washed and stained using the manufacturer's recommendations and procedures. (Affymetrix Expression Analysis Technical Manual). Non-stringent wash buffer (20X SSPE, 1.0ml of 10% Tween 20, and water) at 25°C, and stringent wash buffer (20X SSPE, 5M NaCl, 10% Tween 20, and water) at 50°C were used for the wash steps. The arrays were then stained with strepavidin-conjugated phycoerythrin (SAPE, Molecular Probes), followed by biotinylated anti-strepavidin and a second round of SAPE for signal amplification at 25 °C. Each stain step was done for 10 minutes. All arrays were then scanned using the HP Genearray Scanner and the resulting fluorescence emmisions were collected and quantified using Affymetrix Genechip software. Within the software, the signal intensities for all the probes on each array were calculated from the scanned image, and the appropriate probe array algorithm was applied to determine the expression levels (average difference) for each gene. Average differences for all genes were converted into mRNA frequency estimates (in molecules per million) based on the standard spike-in control transcripts.

(f) Data Filtering and Statistics

Initial data was reduced by filtering for all genes called "present" by GeneChip™. A two-way ANOVA was then performed on the replicate data for each of

these genes in the statistical computing package S-plus. The potential effects of two experimental factors (treatment and time) and the interaction of both factors on the expression level were evaluated in the analysis of variance model, and the p-values for the main effects ($P_{treatment}$, P_{time}) and for the interaction($P_{interact}$) were obtained. Only those genes that were statistically significant (p-value <= 0.05) for the treatment factor and/or the interaction were considered for the time being. First, the average was taken for baseline and experimental replicate mRNA frequencies of the 705 genes that passed this p-value criterion. Average frequencies obtained for each gene were then standardized across all samples to have a mean of zero and a standard deviation of one. A modified version of the original self-organizing map (SOM) algorithm developed by Kohonen *et al* (Self-Organizing Maps, Second Extended Edition edition, Vol. 30. New York, 1997), created using the MATLAB toolbox, was then applied to the standardized expression values to generate a 6 by 6 matrix of 36 clusters (Tamayo *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 2907-2912). Several public databases such as Genecards and Swiss-Prot were used for gene annotation (*See e.g.,* Rebhan *et al.* GeneCards: encyclopedia for genes, proteins and diseases. Weizmann Institute of Science, Bioinformatics Unit and Genome Center (Rehovot, Israel), 1997. World Wide Web URL: http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards, and Appel *et al.* (1994).A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server.*Trends Biochem. Sci.* 19:258-260 World Wide Web URL: http://www.expasy.ch/sprot/).

(g) Quantitative Taqman RT-PCR

The same total RNA samples used for the GeneChip experiments can be analyzed using a *Taqman*® EZ RT-PCR kit. (PE Applied Biosystems) to confirm gene expression changes. Total RNA samples can be diluted to a concentration of 50ng/ul and a total of 50 ng can be used for each reaction. Primers and florescence probes for PSA and ID-1 and ID-3 can be designed using the Primer Express software and were chosen based upon the manufacturer's recommendations for primer selection. The primers used can be of 100uM concentration and for PSA can be PSA-F (forward primer) CGTGGCCAACCCCTGA (SEQ ID NO: 1), PSA-R (reverse primer) CTTGGCCTGGTCATTTCCAA (SEQ ID NO: 2), and PSA-P (probe)

CACCCCTATCAACCCCCTATTGTAGTAAACTTGGA (SEQ ID NO: 3). For SMARC1 and SMARC3, primers can be designed based on the sequences of SMARC1 and SMARC3 available from Genbank Accession numbers U66617 and U66619, respectively.

Samples can be prepared using a reagent mix of manufacturer supplied RT-PCR components [(5X TaqMan EZ Buffer, manganese acetate (25 mM), dATP (10mM), dCTP (10mM), dGTP (10mM) and dUTP (20mM), rT*th* DNA polymerase (2.5U/μl), AmpErase UNG (1 U/μl), primers (final concentration 1μM) and RNA (50ng)], following manufacturer's recommendations. In addition, GAPDH control samples for standard curve generation and subsequent quantitation of sample RNA can be prepared. Primers and probe for GAPDH were included in the kit (GAPDH forward and reverse primers 10μM, GAPDH probe 5 μM). β-actin can also be used for standard curve generation, and dilutions can be made for both genes that ranged from 5 X 10^6 copies to 5 X 10^1 copies. The assay can be performed on a Perkin-Elmer/Applied Biosystems 7700 Prism, and the PCR cycling parameters can be chosen based on the manufacturer's recommendations. RNA of samples can be normalized to GAPDH and β-actin and quantified.

(h) Western Blot Analysis

To demonstrate that the protein production of SMARC (e.g., SMARC1 and/or SMARC3) can be regulated by androgen, Western blot analysis can be performed. For Western blot analysis, LNCaP cells can be plated in 6-well plate at 1 x 10^6 cells/well in charcoal stripped serum containing medium. Cells can be treated with a suitable amount of androgen, e.g., 10 nM DHT and harvested at designated time. Cells can be harvested in MPER reagent (Pierce, Rockford, IL) containing 400 mM NaCl. Protein can be quantified by Bradford method (Bradford (1976) *Anal. Bioch.* 72: 248-254). A suitable amount of protein, e.g., 30 μg of protein can be electrophoresed on a 12% SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane using a Bio Rad liquid transfer apparatus. The PVDF membrane can be incubated in TBST (TBS with 0.1%Tween-20) with 3% milk for 15 minutes before the addition of the first antibody, e.g., rabbit anti-SMARC antibody (anti-SMARC1, or anti- SMARC3 antibody). After overnight incubation, the PVDF membrane can be washed 3 times with TBST and incubated with a second

antibody, anti-rabbit-IgG coupled with horseradish peroxidase (Transduction Labs) for one hour. The PVDF membrane can then be washed 3 times with TBST and protein can be detected by using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce).

(i) Tissue Microarray Construction and Analysis

To investigate the role of SMARC, e.g., SMARC1 or SMARC3 in solid tumors, tissue microarray analysis can be performed on multiple human normal (*i.e.*, control samples) and prostate diseased specimens (Clinomics, Inc.). Following fixation in 10% neutral buffered formalin, tissues can be selected, trimmed, and placed in a processing cassette. The cassette can then placed in a processing basket on a Shandon Hypercenter™ tissue processor in which the tissues can be exposed to a series of buffers over a 16 hour processing cycle (10% Neutral Buffered formalin, 70%, 95%, 100% ethanol, xylene, and melted paraffin embedding media). All steps should be carried out under vacuum at 40°C except for the paraffin steps which should be at 58°C. Following processing, the tissues can be removed from the cassettes and embedded in paraffin blocks. The resulting blocks can be sectioned at 5 μm and mounted on glass slides. The slides can be heated at 58°C for 30 minutes prior to staining. Antibody α- SMARC (e.g., anti-SMARC1 or anti-SMARC3) can be titred to a suitable dilution, e.g., 1:150 dilution using DAKO® Antibody Diluent. Staining of test specimen can be performed employing HIER in pH 6.0 citrate buffer with no pretreatment. Tissues can then be stained using the Ventana ES® Automated Immunohistochemistry Stainer, involving the use of a standard indirect immunoperoxidase protocol with 3,3'-diaminobenzidine as a chromagen. Grading of the immunohistochemical staining is based on the intensity of the cytoplasmic staining of the epithelial components of both the tumor and the normal tissues. The strength of the staining can be scored using a 1+ to 4+ scale, 1+ indicating faint staining and 4+ indicating strongest staining (appearing as dark brown staining). A score of 0 indicated no staining.

(j) Transient Transfection of COS cells

To determine the effect of SMARC, (e.g., SMARC1 and/or SMARC3) on the transcriptional activity of androgen receptor (AR), COS-1 cells can be transiently transfected with a reporter construct containing androgen receptor response element

along with an expression vector encoding SMARC1 or SMARC3. COS-1 cells can be plated in 6-well plates at a density of 2 x10^5 cells per well in 2-ml pheno red-free DMEM containing 10% charcoal-stripped fetal bovine serum. The next morning, medium can be replaced with 2-ml DMEM. Indicated amount of DNA in 100 µl of DMEM can be mixed with 6 µl of PLUS reagent (Gibco) and incubated at room temperature while 4 µl of lipofectamine can be mixed with 100 µl of DMEM. After 30 min of incubation, the two mixtures can be combined together and added dropwise to each well. After incubation with DNA for 4 hours, 2 ml of phenol red-free DMEM containing 10% charcoal-stripped fetal bovine serum can be added and cells treated with indicated chemicals for additional 24 hours before being harvested.

(k) Luciferase Assay

Luciferase activity can be determined using Promega's Steady-Glo Luciferase Assay System. Briefly, after 24 hours of treatment, cells can be harvested by scraping in 1ml of PBS. A suitable amount of protein, e.g., 5 µg from each sample in a total of 100 µl PBS can be mixed with 100 µl of Stable-Glo reagent (Promega), and luminescence can be determined in a luminometer (Wallac, 1450 MicroBeth Counter) after 5 min.

(ii) Results

DHT stimulates the growth of LNCaP cells and PSA production

LNCaP cells are widely used as tumor models because they maintain responsiveness to androgen (Horoszewicz *et al.* (1983).*Cancer Res* 43: 1809-1818). For example, their ability to proliferate, to express differentiated secretory function, and to control processes such as lipid synthesis and accumulation, all remain androgen responsive. To ascertain whether LNCaP in the present culture conditions could be used to examine androgen-regulated genes, the response of LNCaP to androgen treatment was tested using the procedures described in sections (a-c). Cell growth and PSA production were studied.

Fig. 1A shows that the growth of LNCaP cells was stimulated by a natural androgen DHT in a dose-dependent manner. 10 nM DHT was chosen for the rest of the experiments because of its robust growth-stimulatory effect. PSA is a widely used

prostate marker and was therefore tested in the present study prior to the microarray experiment. In response to DHT treatment, PSA production was increased in a dose-dependent manner (Fig. 1B). PSA signal was detected as early as 12 hs and the maximal level was observed at about 48 hs. These results demonstrated that LNCaP are responsive to DHT

Genechip Hybridization and Analysis

Affymetrix Genechip™ technology was used to monitor the expression of about 6000 full-length human genes in response to a natural androgen DHT in LNCaP cells. Fig. 2 illustrates the general scheme used for sample preparation, hybridization, and analysis and the details of hybridization are described in section (e). To obtain reliable data, total RNA was prepared in duplicate from LNCaP cells treated or not with DHT for 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, and 72 hs as described in section (d). CRNAs were prepared and hybridized also in duplicate to Affymetrix chips. Therefore a set of biological replicates for a total of 30 samples were generated for each experiment to ensure reproducibility. Only those genes that were called "present" in either the baseline or the experiment in at least one time point and in either replicate passed the initial data reduction filter. Out of about 6000 genes represented on the chip, 4491 passed this initial filter (75%).

Statistical Analysis of Replicates

To assess reproducibility, the coefficient of variation (CV) to the mean frequencies of two replicates at each time point were compared. The results showed that across all genes, CV varied between 25 and 35% (data not shown). Based on the experimental design, a two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the statistical significance of the ~4500 gene expression changes. The results based on a 95% significance level show that 200 genes were significant due to androgen treatment alone, 431 genes were significant due to an interaction of androgen treatment and time, and 74 genes were significant due to both the treatment factor and the interaction. Only androgen-regulated genes were identified, the 242 genes that were significantly modulated due to time alone were not considered.

Rapid Classification of Expression Profiles using Self-Organizing Maps

For rapid classification and to understand the potential function of candidate genes, expression profiles of the 705 genes found to be regulated by androgen and/or an interaction between androgen and time by ANOVA analysis were clustered using an adaptation of the self-organizing map (SOM) algorithm developed by c and Tamayo *et al.* (*supra*), mRNA frequencies of each gene were averaged within treatment/time subgroups, and the averaged frequencies over all subgroups were standardized such that the mean of the averaged frequency was set to zero, and the standard deviation equal to one. Based on standardized mRNA frequencies for each gene, a 6 by 6 matrix of 36 clusters was generated and visualized.

Identification of Androgen-regulated genes

For rapid classification and to understand the potential function of candidate genes, expression profiles of the 705 genes found to be regulated by androgen and/or an interaction between androgen and time by ANOVA analysis were clustered using an adaptation of the self-organizing map (SOM) algorithm developed by Kohonen and Tamayo *et al.* (*Supra*). The results showed that Cluster (1,1) included genes that shared a similar pattern of induced expression upon androgen treatment, while cluster (6, 6) included genes that had a pattern of repressed expression upon androgen treatment. Genes that are induced in response to androgen clustered together in Cluster (1,1) and included prostate specific antigen (PSA), the most widely used diagnostic marker for prostate cancer. Elevated PSA levels are often detected when cancer is present. In response to androgen treatment, PSA expression ($p_{treatment}$ = 0.0000, p_{time} =0.8682, $p_{interact}$ = 0.3282) increased 3-fold relative to control at 12 hours, and maintained its high expression through 72 hours where it was induced approximately 4-fold.

In contrast, SMARCD3 expression levels were down-regulated by androgen. A 2-fold decrease in expression levels was observed 24 hours post-androgen treatment, a 4-fold decrease in expression levels 48 hours post-treatment, and a 6-fold decrease in expression levels 72 hours post-treatment.

Example 2: Screening for Compounds Useful for the Treatment of Prostate Cancer

The cDNA and protein sequences SMARC1 or SMARC3 are available in the public database Genbank with accession numbers, U66617 and U66619, respectively. The publications and sequence databases provide those skilled in the art with the genes needed to prepare the transfected cell lines useful in for the following screening assays.

Test compounds potentially useful for the treatment of prostate cancer can be identified by expressing SMARC1 or SMARC3 in prostate cancer cells (*e.g.*, LNCaP cells) which are stably transfected with a vector capable of expressing SMARC1 or SMARC3 in the presence of tetracycline (Tet-on system, available from Clontech). The transfected LNCaP cells can be cultured under suitable conditions (*e.g.*, in T175 culture flasks in RPMI-1640 medium supplemented with 10%; fetal calf serum (FCS), 3mM L-glutamine, 100 μg/ml streptomycin, and 100 units/ml penicillin. To examine the effects of steroids, cells can be cultured for 2 days in RPMI 1640 medium containing 5% FCS pretreated with dextrancoated charcoal (CT-FCS). The cells can be incubated in the presence of a test compound with or without Tetracycline and the growth rate of the cells can be measured. A compound that demonstrates differential inhibitory activity in cells treated with Tet versus those not treated with Tet is a potential therapeutic compound for the treatment of prostate cancer.

Example 3: Detection of SMARC Markers

To evaluate the role of SMARC markers, e.g., SMARCD3 in cell growth and the effect on tumor inhibition, the growth rate of cells transfected with, for example, a SMARCD3 expression vector, or empty vector, will be determined. Altered growth will confirm the role of SMARC in the regulation of tumor cell growth and assure the therapeutical value of SMARC. The presence and expression levels of the SMARC markers can be assessed using standard molecular biology techniques as described in Sambrook *et al*, (1989) *supra*.

For the detection and quantitation of RNA species, the nucleic acids corresponding to the SMARC markers can be isolated and amplified. Pairs of primers that selectively hybridize to SMARCD1 or SMARCD3 nucleic acid can be designed based on the nucleotide sequences of these markers, which is available from Genbank,

accession number U66617 and U66619, respectively. The primers can be contacted with the isolated nucleic acid under conditions that allow selective hybridization. Once hybridized, the nucleic acid:primer complex can be contacted with one or more enzymes that facilitate template-dependent nucleic acid synthesis using PCR amplification. The amplified product can be detected, for example by gel electrophoresis and visualization with ethidium bromide under UV light. Alternatively, if the amplification products can be integrally labeled with radio- or fluorometrically-labeled nucleotides, the amplification products can then be exposed to x-ray film or visualized under the appropriate stimulating spectra, following separation.

Other methods for detecting the presence and expression levels of the SMARC markers include detecting the SMARC marker proteins by an ELISA immunodetection assay. For example, by using anti-SMARC antibodies, e.g., anti-SMARCD3 antibodies to detect the presence of the SMARC marker expressed in a cell sample. Anti-SMARC antibodies can be immobilized onto a selected surface exhibiting protein affinity, such as a well in a polystyrene microtiter plate. Then, a cell sample suspected of containing the SMARC marker can be added to the wells. After binding and washing to remove non-specifically bound immunocomplexes, the bound antibody may be detected. Detection can be achieved by the addition of a second antibody specific for a different region of the SMARC marker proteins, that is linked to a detectable label.

Example 4: Detection of SMARC Markers in Solid Tumors

To determine whether SMARC, e.g., SMARCD1 or SMARCD3 are effected at different stages of tumor growth. Solid tumors were scored using the Gleason scoring system (*See e.g.*, Bostwick (1994) *Amer. J. Clin. Path.* 102: S38-56, incorporated herein by reference). RNA can be isolated from normal prostate glands and prostate tumors with different Gleason grades. The total RNA can be extracted and be examined for the level of expression of SMARC in these different tumor stages using the affymetrix microarrays, as described in Example 1.

Equivalents

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

What is claimed:

1. A method of assessing whether a subject is afflicted with prostate cancer, comprising:

a) obtaining a level of expression of a marker in a sample from said subject, wherein said marker is selected from the group consisting of one or more SMARC markers;

b) obtaining a normal level of expression of said marker in a control sample; and

c) comparing (a) with (b), wherein a significant difference between said level of expression of said marker in said sample from said subject, and said normal level is an indication that said subject is afflicted with prostate cancer.

2. The method of claim 1, wherein said marker corresponds to a transcribed polynucleotide or portion thereof.

3. The method of claim 1, wherein said sample comprises cells obtained from said subject.

4. The method of claim 3, wherein said cells are collected from a prostate gland.

5. The method of claim 3, wherein said cells are collected from blood.

6. The method of claim 1, wherein said level of expression of said marker in said sample differs from said normal level of expression of said marker in a subject not afflicted with prostate cancer by a factor of about at least 2.

7. The method of claim 1, wherein said level of expression of said marker in said sample differs from said normal level of expression of said marker in a subject not afflicted with prostate cancer by a factor of above at least 3.

8. The method of claim 1, wherein said level of expression of said marker in said sample is assessed by detecting the presence in said sample of a protein corresponding to said marker.

9. The method of claim 8, wherein said presence of said protein is detected using a reagent which specifically binds with said protein.

10. The method of claim 9, wherein said reagent is selected from the group consisting of an antibody, an antibody derivative, and an antibody fragment.

11. The method of claim 1, wherein said level of expression of said marker in said sample is assessed by detecting the presence in said sample of a transcribed polynucleotide or portion thereof.

12. The method of claim 11, wherein said transcribed polynucleotide is a mRNA.

13. The method of claim 11, wherein said transcribed polynucleotide is a cDNA.

14. The method of claim 11, wherein said detecting the presence in said sample of a transcribed polynucleotide or portion thereof further comprises amplifying said transcribed polynucleotide or portion thereof.

15. The method of claim 1, wherein said level of expression of said marker in said sample is assessed by detecting the presence in said sample of a transcribed polynucleotide, or portion thereof, which anneals with said marker, or portion thereof, under stringent hybridization conditions.

16. The method of claim 1, further comprising comparing:

a) the level of expression in said sample of at least two SMARC markers independently, and

b) the normal level of expression of each of at least two SMARC markers in samples of the same type obtained from control subjects not afflicted prostate cancer,

c) comparing (a) with (b), wherein said level of expression of more than one of the markers is significantly altered, relative to the corresponding normal levels of expression of the markers, is an indication that the subject is afflicted prostate cancer.

17. A method for monitoring the progression of prostate cancer in a subject, the method comprising:

a) detecting in a subject sample at a first point in time, the expression of a marker, wherein the marker is selected from the group consisting of one or more SMARC markers or a combination thereof;

b) repeating step (a) at a subsequent point in time; and

c) comparing said level of expression detected in steps (a) and (b), and therefrom monitoring the progression of prostate cancer in said subject.

18. The method of claim 17, wherein said marker corresponds to a transcribed polynucleotide or portion thereof.

19. The method of claim 17, wherein the sample comprises cells obtained from said subject.

20. The method of claim 19, wherein said cells are collected from a prostate gland.

21. The method of claim 19, wherein said cells are collected from blood.

22. A method of assessing the efficacy of a therapy for inhibiting prostate cancer in a subject, comprising:

a) expression of a SMARCD3 marker in a first sample obtained from said subject prior to providing at least a portion of said therapy to said subject;

b) expression of the SMARCD3 marker in a second sample obtained from said subject following therapeutic treatment; and

c) comparing (a) with (b), wherein a significantly enhanced level of expression of said marker in said second sample, relative to said first sample, is an indication that said therapy is efficacious for inhibiting prostate cancer in said subject.

23. A method of assessing the potential of a test compound to trigger prostate cancer in a cell, comprising:

a) maintaining separate aliquots of cells in the presence and absence of said test compound; and

b) comparing expression of a SMARCD3 marker in each of said aliquots, wherein a significantly reduced level of expression of the marker in the aliquot maintained in the presence of the test compound, relative to said aliquot maintained in the absence of said test compound, is an indication that said test compound possesses the potential for triggering prostate cancer in a cell.

24. A method of inhibiting prostate cancer in a subject at risk for developing prostate cancer, the method comprising inhibiting expression of SMARCD3 marker in the cells of a subject.

25. A method for identifying a compound useful for treating prostate cancer, comprising:

a) measuring the expression level of a SMARCD3 marker in a cell in the presence of a test compound; and

b) comparing the expression measured in step (a) to the expression of the SMARCD3 marker in a cell in the absence of said test compound, wherein said compound is useful for treating prostate cancer when the expression level of said

marker in the presence of said test compound is higher than its expression level in the absence of said test compound.

26. The method of claim 25, wherein said expression level is determined by measuring the levels of mRNA of said marker.

27. The method of claim 25 wherein said expression level is determined by measuring the levels of protein of said marker.

28. A method for identifying a compound useful for treating prostate cancer, comprising

a) measuring an activity of a SMARDCD3 marker; and

b) comparing the activity measured in step (a) to the level of activity of said marker in the absence of the test compound, wherein said compound is useful for treating prostate cancer when the activity of the SMARCD3 marker in the presence of said test compound is higher than its activity in the absence of said test compound.

29. The method of claim 28, wherein said cell is a prostate cancer cell.

30. A method of treating prostate cancer in a patient, comprising administering to the patient in need thereof a compound which increases the expression of a SMARCD3 marker.

31. The method of claim 30, wherein said compound increases the expression of a SMARCD3 mRNA.

32. The method of claim 31, wherein said compound decreases expression of a SMARCD3 marker protein.

33. A method for determining the efficacy of androgen withdrawal treatment in a subject afflicted with prostate cancer, comprising:

a) detecting in said subject sample at a first point in time, the expression level of a SMARCD3 marker;

b) repeating step (a) at a subsequent point in time occurring after said subject begins androgen withdrawal treatment; and

c) comparing the level of expression of said marker detected in steps (a) and (b), wherein a increase in said level of expression indicates that the androgen withdrawal treatment has reduced efficacy.

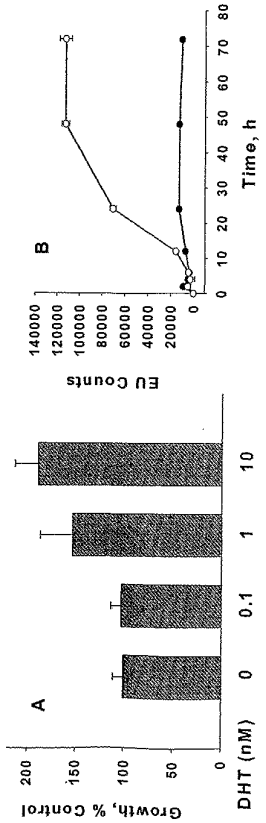

A
Growth, % Control
200
150
100
50
0
DHT (nM)
0
0.1
1
10
B
EU Counts
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Time, h

Figure 1

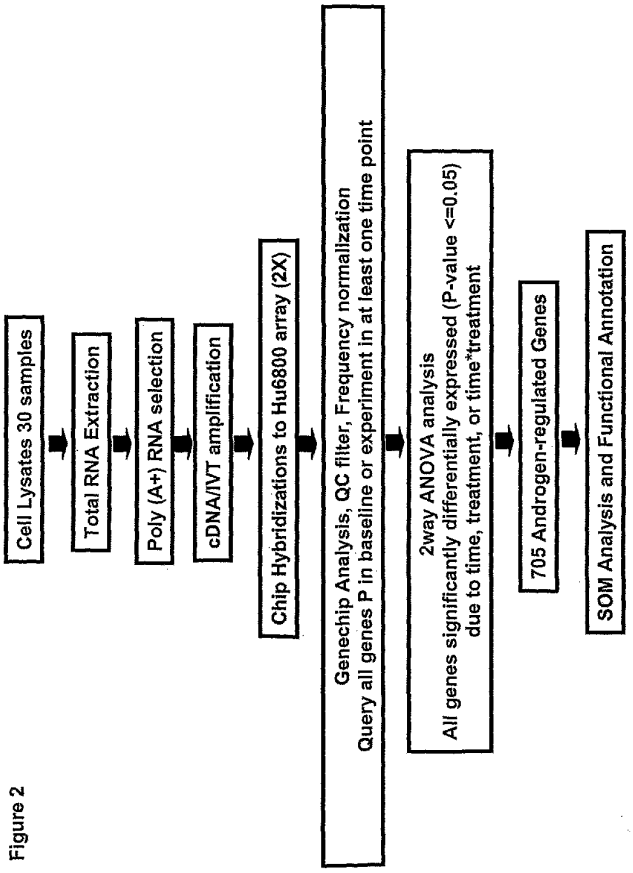

Cell Lysates 30 samples
Total RNA Extraction
Poly (A+) RNA selection
cDNA/IVT amplification
Chip Hybridizations to Hu6800 array (2X)
Genechip Analysis, QC filter, Frequency normalization
Query all genes P in baseline or experiment in at least one time point
2way ANOVA analysis
All genes significantly differentially expressed (P-value <=0.05)
due to time, treatment, or time*treatment
705 Androgen-regulated Genes
SOM Analysis and Functional Annotation

Figure 2

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/044420 A3

(51) International Patent Classification[7]: C12Q 1/68, G01N 33/574

(21) International Application Number: PCT/US01/44571

(22) International Filing Date:
28 November 2001 (28.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/253,487 28 November 2000 (28.11.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/253,487 (CON)
Filed on 28 November 2000 (28.11.2000)

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **WYETH** [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GILLIS, Kimberly, A.** [US/US]; 203 Humphrey Street, Swampscott, MA 01907 (US). **ZHANG, Yixian** [US/US]; 115 Villa Road, Pearl River, NY 10965 (US).

(74) Agent: **ENGELLENNER, Thomas, J.**; Nutter McClennen & Fish, LLP, World Trade Center West, 155 Seaport Boulevard, Boston, MA 02210-2604 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
12 September 2003

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

WO 02/044420 A3

(54) Title: EXPRESSION ANALYSIS OF SMARC NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES USEFUL IN TIIE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROSTATE CANCER

(57) Abstract: The invention relates to compositions, kits, and methods for detecting, characterizing, preventing, and treating prostate cancer. SWI/SNI-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) markers are provided, wherein changes in the levels of expression of one or more of the SMARC markers is correlated with the presence of prostate cancer.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int nal Application No
PCT/US 01/44571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q G01N

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)
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RING HUIJUN Z ET AL: "Five SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) genes are dispersed in the human genome." GENOMICS, vol. 51, no. 1, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 140-143, XP002223620 ISSN: 0888-7543 cited in the application abstract page 142, column 1, paragraph 2 --- -/--	1-33

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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' 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.
'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 December 2002	07/01/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Tilkorn, A-C

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int nal Application No
PCT/US 01/44571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WONG A K C ET AL: "BRG1, A COMPONENT OF THE SWI-SNF COMPLEX, IS MUTATED IN MULTIPLE HUMAN TUMOR CELL LIENS" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 60, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 6171-6177, XP002949207 ISSN: 0008-5472 abstract page 6176, column 2, paragraph 1 -page 6177, column 1, paragraph 2; table 2 ---	1-33
A	YOUNG C Y-F ET AL: "HORMONAL REGULATION OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN MESSENGER RNA IN HUMAN PROSTATIC ADENOCARCINOMA CELL LINE LNCAP" CANCER RESEARCH, vol. 51, no. 14, 1991, pages 3748-3752, XP001120397 ISSN: 0008-5472 abstract page 3748, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 2 page 3751, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 1 ---	1-33
A	WANG W ET AL: "DIVERSITY AND SPECIALIZATION OF MAMMALIAN SWI/SNF COMPLEXES" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR, NY, US, vol. 10, no. 17, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 2117-2130, XP000985617 ISSN: 0890-9369 abstract page 2120, column 2, paragraph 2 -page 2122, column 2, paragraph 3 ---	1-33
A	ULRIX W ET AL: "The differentiation-related gene 1, Drg1, is markedly upregulated by androgens in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 455, no. 1-2, 16 July 1999 (1999-07-16), pages 23-26, XP004259953 ISSN: 0014-5793 abstract page 23, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1 page 25, column 2, paragraph 3 -page 26, column 1, paragraph 1 --- -/--	1-33

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/44571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 01 59094 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 16 August 2001 (2001-08-16) page 23, paragraph 1 page 28, line 1 - line 17; claims 15,24	25-33
E	WO 02 31209 A (BUBENDORF LUKAS ;MOUSSES SPYRO (US); GOVERNMENT OF UNITED STATES O) 18 April 2002 (2002-04-18) page 86; tables 1,P21 abstract page 1, paragraph 5 -page 2, paragraph 1 page 114; tables 2,P1 page 124 page 101; tables 1,P36	1-33

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int ial Application No
PCT/US 01/44571

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0159094	A	16-08-2001	AU	3696101 A	20-08-2001
			WO	0159094 A2	16-08-2001
			US	2002022021 A1	21-02-2002
WO 0231209	A	18-04-2002	AU	1457602 A	22-04-2002
			WO	0231209 A2	18-04-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/574	Ｇ０１Ｎ 33/574	Ａ	
	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
フロッピー

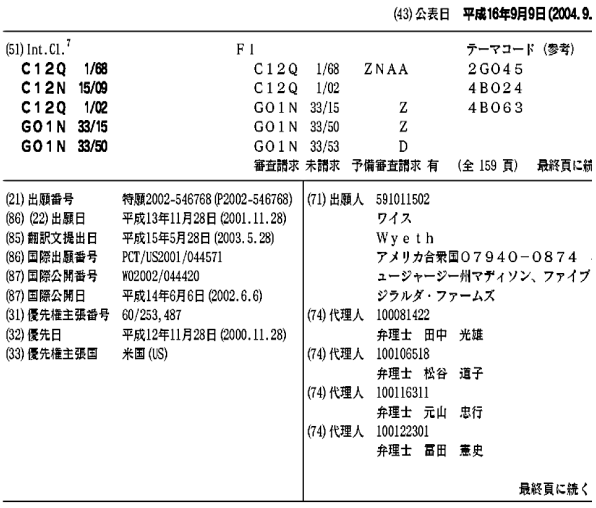
(72)発明者 キンバリー・エイ・ジリス
アメリカ合衆国０１９０７マサチューセッツ州スワンプスコット、ハンフリー・ストリート２０３番
(72)発明者 ジャン・イシャン
アメリカ合衆国１０９６５ニューヨーク州パール・リバー、ビラ・ロード１１５番

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BB20 DA36 FB01 FB03
4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA04 CA09 CA12 CA20 HA11 HA13
HA14 HA20
4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61
QQ79 QQ89 QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62
QR77 QR80 QS16 QS25 QS33 QS34 QX01 QX02

专利名称(译)	用于诊断和治疗前列腺癌的SMARC核酸和多肽的表达分析		
公开(公告)号	JP2004527225A	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2002546768	申请日	2001-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	キンバリーエイジリス ジャンイシャン		
发明人	キンバリー·エイ·ジリス ジャン·イシャン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	田中，三夫 富田健二		
优先权	60/253487 2000-11-28 US		
其他公开文献	JP2004527225A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测，鉴定，预防和治疗前列腺癌的方法。提供了SMARC标志物，其中一种或多种SMARC标志物的表达水平的变化与前列腺癌的存在相关。



(43) 公表日 平成16年9月9日 (2004.9.

(51) Int.Cl.[7]	FI			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	C12Q 1/68	ZNAA		2G045
C12N 15/09	C12Q 1/02			4B024
C12Q 1/02	G01N 33/15	Z		4B063
G01N 33/15	G01N 33/50	Z		
G01N 33/50	G01N 33/53	D		

審査請求 未請求 予備審査請求 有 （全 159 頁） 最終頁に続

(21) 出願番号	特願2002-546768 (P2002-546768)
(86) (22) 出願日	平成13年11月28日 (2001.11.28)
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月28日 (2003.5.28)
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044571
(87) 国際公開番号	WO2002/044420
(87) 国際公開日	平成14年6月6日 (2002.6.6)
(31) 優先権主張番号	60/253,487
(32) 優先日	平成12年11月28日 (2000.11.28)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(71) 出願人	591011502
	ワイス
	Ｗｙｅｔｈ
	アメリカ合衆国０７９４０－０８７４
	ニュージャージー州マディソン、ファイブ
	ジラルダ・ファームズ
(74) 代理人	100081422
	弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100106518
	弁理士 松谷 道子
(74) 代理人	100116311
	弁理士 元山 忠行
(74) 代理人	100122301
	弁理士 冨田 憲史

最終頁に続く