

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 512391

(P2003 - 512391A)

(43)公表日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 K 14/82 16/32	ZNA	C 0 7 K 14/82 16/32	ZNA 4 B 0 6 4 4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 6
G 0 1 N 33/53 33/574		G 0 1 N 33/53 33/574	D 4 H 0 4 5 A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 44数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 532201(P2001 - 532201)

(86) (22)出願日 平成12年10月16日(2000.10.16)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月15日(2002.4.15)

(86)国際出願番号 PCT/US00/28498

(87)国際公開番号 W001/029218

(87)国際公開日 平成13年4月26日(2001.4.26)

(31)優先権主張番号 09/418,839

(32)優先日 平成11年10月15日(1999.10.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ・オブ・ピッツバーグ
UNIVERSITY OF PITTSBURGH
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州15260
ピッツバーグ, サッカレー・アンド・オハラ・ストリート, ガードナー・スティール・コンフェレンス・センター, 200, オフィス・オブ・テクノロジー・マネージメント

(72)発明者 ゲッツェンバーグ ロバート エイチ.
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ピッツバーグ オーガスタ ドライブ 1627

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核マトリクスタンパク質、それらをコードするポリヌクレオチド配列およびその用途

(57)【要約】

組織、特に前立腺組織において定義された発現を特徴とする核マトリクスタンパク質 (NMP) を提供する。これらのNMPは、細胞の悪性段階を診断およびモニターするため、ならびにNMPに関連した細胞増殖性障害を治療するために有用なマーカーである。実質的に精製されたポリペプチドおよび本発明のNMPをコードするヌクレオチド配列も同様に提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 転移細胞には存在するが、非転移細胞に存在しない核マトリクスタンパク質の有無を決定する段階を含む、転移細胞の有無を決定する方法。

【請求項2】 決定段階が前立腺細胞の試料について行われる、請求項1記載の方法。

【請求項3】 核マトリクスタンパク質が、転移性前立腺細胞に存在するが非転移性前立腺細胞には存在しない、分子量約40 kDおよびpI約6.73を有するAM-1である、請求項2記載の方法。

【請求項4】 決定段階が、AM-1またはその免疫原性断片に対して作製された抗体について行われる、請求項3記載の方法。

【請求項5】 以下のタンパク質からなる群より選択される、癌様前立腺細胞に存在するが正常前立腺細胞に存在しない精製核マトリクスタンパク質：

(a) 分子量約63 kDおよびpI約8.55を有するタンパク質D-1、

(b) 分子量約40 kDおよびpI約5.91を有するタンパク質D-2、ならびに

(c) 分子量約33 kDおよびpI約6.97を有するタンパク質D-3；

または該タンパク質(a)～(c)の一つの免疫原性断片。

【請求項6】 タンパク質が分子量約63 kDおよびpI約8.55を有するD-1である、請求項5記載のタンパク質。

【請求項7】 配列番号：1、配列番号：2、および配列番号：3からなる群より選択される少なくとも一つの配列を含む、請求項6記載のタンパク質。

【請求項8】 タンパク質が分子量約40 kDおよびpI約5.91を有するD-2である、請求項5記載のタンパク質。

【請求項9】 配列番号：4および配列番号：5からなる群より選択される少なくとも一つの配列を含む、請求項8記載のタンパク質。

【請求項10】 タンパク質が分子量約33 kDおよびpI約6.97を有するD-3である、請求項5記載の方法。

【請求項11】 配列番号：6を含む請求項10記載のタンパク質。

【請求項12】 以下の段階を含む、癌様前立腺細胞と正常前立腺細胞とを区別する抗体を産生する方法：

請求項5記載のタンパク質または断片を抗原として選択する段階、
該抗原に対する抗体を作製する段階、および
該抗体を回収する段階。

【請求項13】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項12記載の方法。

【請求項14】 以下のタンパク質からなる群より選択される、正常前立腺細胞に存在するが癌様前立腺細胞には存在しない精製核マトリクスタンパク質：

- (a) 分子量約95 kDおよびpI約6.74を有するタンパク質NDP-1、
- (b) 分子量約57 kDおよびpI約8.33を有するタンパク質NDP-2、
- (c) 分子量約57 kDおよびpI約8.0を有するタンパク質NDP-3、
- (d) 分子量約47 kDおよびpI約5.26を有するタンパク質NDP-4、
- (e) 分子量約47 kDおよびpI約5.80を有するタンパク質NDP-5、
- (f) 分子量約41 kDおよびpI約6.83を有するタンパク質NDP-6、
- (g) 分子量約37.2 kDおよびpI約7.05を有するタンパク質NDP-7、
- (h) 分子量約36.9 kDおよびpI約7.35を有するタンパク質NDP-8、
- (i) 分子量約35 kDおよびpI約6.25を有するタンパク質NDP-9、ならびに
- (j) 分子量約32.5 kDおよびpI約5.46を有するタンパク質NDP-10、

または該タンパク質(a)～(j)の一つの免疫原性断片。

【請求項15】 分子量約95 kDおよびpI約6.74を有するNDP-1である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項16】 分子量約57 kDおよびpI約8.33を有するNDP-2である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項17】 分子量約57 kDおよびpI約8.0を有するNDP-3である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項18】 分子量約47 kDおよびpI約5.26を有するNDP-4である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項19】 分子量約47 kDおよびpI約5.80を有するNDP-5である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項20】 分子量約41 kDおよびpI約6.83を有するNDP-6である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項21】 分子量約37.2 kDおよびpI約7.05を有するNDP-7である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項22】 分子量約36.9 kDおよびpI約7.35を有するNDP-8である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項23】 分子量約35 kDおよびpI約6.25を有するNDP-9である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項24】 分子量約32.5 kDおよびpI約5.46を有するNDP-10である、請求項14記載のタンパク質。

【請求項25】 以下の段階を含む、癌様前立腺細胞と正常前立腺細胞とを区別する抗体を産生する方法：

請求項15記載のタンパク質または断片を抗原として選択する段階、
該抗原に対する抗体を作製する段階、および
該抗体を回収する段階。

【請求項26】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項25記載の方法。

【請求項27】 以下のタンパク質からなる群より選択される、転移性前立腺細胞には存在するが非転移性前立腺細胞には存在しない、精製核マトリクスタンパク質：

(a) 分子量約40 kDおよびpI約6.73を有するタンパク質AM-1、ならびに

(b) 分子量約36 kDおよびpI約8.33を有するタンパク質AM-2；

または該タンパク質(a)もしくは(b)の一つの免疫原性断片。

【請求項28】 分子量約40 kDおよびpI約6.73を有するAM-1である、請求項27記載のタンパク質。

【請求項29】 配列番号：7を含む、請求項28記載のタンパク質。

【請求項30】 分子量約36 kDおよびpI約8.33を有するAM-2である、請求項27記載のタンパク質。

【請求項31】 配列番号：8を含む、請求項30記載のタンパク質。

【請求項32】 以下の段階を含む、転移性細胞と非転移性前立腺細胞とを区別する抗体を産生する方法：

請求項29記載のタンパク質または断片を抗原として選択する段階、

該抗原に対する抗体を作製する段階、および
該抗体を回収する段階。

【請求項33】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項32記載の方法。

【請求項34】 以下のタンパク質からなる群より選択される、転移性前立腺細胞には存在しないが非転移性前立腺細胞には存在する、精製核マトリクスタンパク質：

(a) 分子量約55 kDおよびpI約6.48を有するタンパク質G-1、ならびに

(b) 分子量約52 kDおよびpI約6.93を有するタンパク質G-2；

または該タンパク質(a)もしくは(b)の一つの免疫原性断片。

【請求項35】 分子量約55 kDおよびpI約6.48を有するG-1である、請求項34記載のタンパク質。

【請求項36】 分子量約52 kDおよびpI約6.93を有するG-2である、請求項34記載のタンパク質。

【請求項37】 以下の段階を含む、転移性細胞と非転移性前立腺細胞とを区別する抗体を産生する方法：

請求項34記載のタンパク質または断片を抗原として選択する段階、

該抗原に対する抗体を作製する段階、および

該抗体を回収する段階。

【請求項38】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項37記載の方法。

【請求項39】 タンパク質が以下からなる群より選択される、精製核マトリクスタンパク質またはその免疫原性断片に対して作製された抗体：

(i) 以下からなる群より選択される、癌様前立腺細胞に存在するが正常前立腺細胞に存在しないタンパク質：

(a) 分子量約63 kDおよびpI約8.55を有するD-1、

(b) 分子量約40 kDおよびpI約5.91を有するD-2、ならびに

(c) 分子量約33 kDおよびpI約6.97を有するD-3；

(ii) 以下のタンパク質からなる群より選択される、正常前立腺細胞に存在するが癌様前立腺細胞には存在しないタンパク質：

(a) 分子量約95 kDおよびpI約6.74を有するタンパク質NDP-1、

- (b) 分子量約57 kDおよびpI約8.33を有するタンパク質NDP-2、
 - (c) 分子量約57 kDおよびpI約8.0を有するタンパク質NDP-3、
 - (d) 分子量約47 kDおよびpI約5.26を有するタンパク質NDP-4、
 - (e) 分子量約47 kDおよびpI約5.80を有するタンパク質NDP-5、
 - (f) 分子量約41 kDおよびpI約6.83を有するタンパク質NDP-6、
 - (g) 分子量約37.2 kDおよびpI約7.05を有するタンパク質NDP-7、
 - (h) 分子量約36.9 kDおよびpI約7.35を有するタンパク質NDP-8、
 - (i) 分子量約35 kDおよびpI約6.25を有するタンパク質NDP-9、ならびに
 - (j) 分子量約32.5 kDおよびpI約5.46を有するタンパク質NDP-10、
- (iii) 以下のタンパク質からなる群より選択される、転移性前立腺細胞には存在するが非転移性前立腺細胞には存在しないタンパク質：
- (a) 分子量約40 kDおよびpI約6.73を有するタンパク質AM-1、ならびに
 - (b) 分子量約36 kDおよびpI約8.33を有するタンパク質AM-2；
- (iv) 以下のタンパク質からなる群より選択される、転移性前立腺細胞には存在しないが非転移性前立腺細胞には存在するタンパク質：
- (a) 分子量約55 kDおよびpI約6.48を有するタンパク質G-1、ならびに
 - (b) 分子量約52 kDおよびpI約6.93を有するタンパク質G-2。
- 【請求項40】 請求項5記載のタンパク質の有無を決定する段階を含む、前立腺癌細胞の有無を決定する方法。
- 【請求項41】 決定段階が、請求項5記載のタンパク質または断片に対して作製された抗体について行われる、請求項40記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、ピッツバーグ大学癌研究所およびピッツバーグ大学癌研究所に与えられたNIH助成金CA65463号からの支援を受けて行われた。

【0002】**発明の背景**

本発明は、一般的に本明細書において「NMP」と呼ばれる核マトリクスタンパク質、より詳しくは細胞増殖障害に関連する前立腺の新規核マトリクスタンパク質に関する。

【0003】

前立腺癌の早期診断は、疾患の有効な治療にとって重要である。さらに、転移能を有する疾患と転移能を有しない前立腺癌とを区別することは重要である。核の構造変化は癌細胞では非常に頻繁であるために、それらは多くのタイプの癌の病的な形質転換マーカーとして一般的に用いられている。核の形状は、核のマトリクス、核の動的な骨格によって部分的に左右される。

【0004】

核マトリックスは、核の形態を決定し、組織特異的である3次元的な様式でDNAを組織化し、遺伝子発現の調節を含む数多くの核過程を調節する際に重要な役割を果たす、核の構成成分である。核マトリックスはDNA複製および転写などの重要な細胞過程を調節する際に重要な役割を果たすことが明らかにされている（ゲッツェンベルグ（Getzenberg）、J. Cell Biochem. 55: 22~31（1994））。核マトリックスは核の骨組みまたは足場であり、外縁のラミナと孔の複合体、内部のリボ核タンパク質の網目構造および残りの核小体からなる（ベレズニー（Berezney）ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 60; 141017（1974））。核マトリックスは約10%の核タンパク質からなり、実質的に脂質、DNAおよびヒストンを含まない（フェイ（Fey）ら、Critical. Reviews. Eukaryotic Gene Expression 1; 127~44（1991））。

【0005】

大多数の既知のNMPは全ての細胞型および生理的条件に共通である。数多くの

研究室が、ある種の細胞型または状態に独特である可能性のあるNMPを同定している。マイトジェン刺激および分化の誘発は核マトリックスタンパク質の組成および構造を変化させることが明らかにされている。核マトリックスは、形質転換に関与することが明らかにされている数多くの結合タンパク質を含有する。ベレズニー (Berezney) は、肝細胞癌の核マトリックスタンパク質を調査して、核マトリックスが形質転換の際に変化されることを最初に示した (ベレズニー (Berezney) ら、Cancer Res. 39; 3031~39 (1979))。フェイ (Fey) およびペンマン (Penman) は、発癌プロモーターは、腎細胞の核マトリックス-中間フィラメント足場に特異的な形態学的識別特性を有することを明らかにした (フェイ (Fey) ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81; 859~66 (1984))。フェイ (Fey) およびペンマン (Penman) は、NMPのパターンが正常細胞株と腫瘍発生細胞株との間で異なることを続いて明らかにした (フェイ (Fey) ら、Loc. cit. 85; 121~25 (1989))。NM-200.4と呼ばれる、核マトリックスタンパク質に対する抗体は乳癌細胞株T-47Dにより形成された (エウイドナー (Weidner) ら、Am. J. Path. 138; 1293~98 (1991))。この抗体はヒト乳癌試料並びに肺癌、甲状腺癌および卵巣癌由来の試料に強力に反応するが、同様の起源の正常な上皮細胞には反応しない。これにより、ある種の抗NMP抗体を診断手段として使用する可能性が高まっている。

【0006】

米国特許第5,824,490号は、前立腺癌を同定するために用いられる「PC-1」と呼ばれるものを含む、前立腺組織に関連した特定の核マトリックスタンパク質を開示する。ヒト前立腺試料を調べたところ、(1) 正常前立腺のみに存在するが、前立腺癌および良性前立腺過形成 (BPH) の双方では欠失している (正常パターン)、(2) 前立腺癌細胞のみに認められ、正常前立腺およびBPHにおいて欠失している (前立腺癌パターン)、ならびに (3) 正常およびBPH試料の双方に存在するが、前立腺癌には存在しない核マトリックスタンパク質が同定された。同様に、ゲッツェンバーグ (Getzenberg) ら、Cancer Res. 1991 (51) : 6514~20を参照のこと。

【0007】

前立腺組織に関連したさらなる核マトリクスタンパク質は、パーチン (Partin) から、Cancer Res. 1993 (53) : 744 ~ 746に開示されている。

【0008】

発明の概要

本発明は、癌様細胞を正常細胞と区別する、そして転移性癌細胞を非転移性疾患の細胞と区別することができる新規核マトリクスタンパク質、それらをコードするポリヌクレオチド配列、それらをコードする配列とハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、それらに対する抗体、およびその使用方法に関する。特に、これらのタンパク質は、前立腺の細胞増殖性障害を診断および治療を作製するために有用である。

【0009】

好ましい態様の詳細な説明

一つの局面に従って、本発明は、正常前立腺細胞には存在しないが癌様前立腺細胞に存在する精製核マトリクスタンパク質 (NMP) またはその断片を含む。好ましくは、この態様のタンパク質は、「D-1」、「D-2」、および「D-3」と呼ばれるタンパク質から選択される。タンパク質D-1、D-2、およびD-3は、転移性および非転移性癌様前立腺細胞の双方に存在する。

【0010】

もう一つの局面に従って、本発明は、正常前立腺細胞に存在するが、癌様前立腺細胞には存在しない精製NMPまたはその断片に向けられる。好ましくは、この態様のタンパク質は、NDP-1、NDP-2、NDP-3、NDP-4、NDP-5、NDP-6、NDP-7、NDP-8、NDP-9、およびNDP-10と呼ばれるタンパク質から選択される。

【0011】

もう一つの局面に従って、本発明は一般的に、転移細胞または非転移細胞に対して独自の核マトリクスタンパク質の有無を決定する段階を含む、転移細胞 (好ましくは前立腺) を非転移細胞 (好ましくは前立腺) と区別する方法に向けられる。特に、前立腺の転移性癌細胞と非転移性細胞とを区別することができる前立腺の核マトリクスタンパク質を本明細書において開示する。

【0012】

もう一つの局面に従って、本発明は、転移性前立腺腫瘍に存在するが、非転移性前立腺腫瘍および正常前立腺細胞には存在しない精製NMPまたはその断片に向けられる。好ましくは、この態様のタンパク質は、AM-1およびAM-2と呼ばれるタンパク質から選択される。

【0013】

もう一つの局面に従って、本発明は、転移性前立腺腫瘍に存在しないが非転移性前立腺腫瘍に存在する、精製NMPまたはその断片に向けられる。好ましくは、この態様のタンパク質は、G-1およびG-2と呼ばれるタンパク質から選択される。これらの2つのタンパク質、G-1およびG-2も同様に、正常前立腺細胞に存在しない。

【0014】

好ましくは、上記の態様におけるNMPの断片は、免疫原性断片である。同様に、上記の態様において、NMPはヒトに由来することが好ましい。

【0015】

特に明記していない限り、「一つの(a)」、「一つの(an)」または「その(the)」という用語は、一つまたはそれ以上を意味する。

【0016】

「精製核マトリクスタンパク質」という用語は、少なくとも一つの細胞成分から分離されている核マトリクスタンパク質を意味する。この用語は、組み換えによって産生された精製核マトリクスタンパク質と、天然資源からの抽出によって産生された精製核マトリクスタンパク質の両者を意味する。

【0017】

本発明の別の態様は、上記のように同定された先の態様のNMPまたはNMP断片をコードする精製ポリヌクレオチド配列である。別の態様は、上記のNMPまたはNMP断片をコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする精製ポリヌクレオチド配列である。

【0018】

別の態様は、上記のNMPまたはNMP断片をコードするポリヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞である。組換えDNAによる宿主細胞の形質転換は当技術分

野上周知の従来技法によって実施することができる。宿主が大腸菌 (*E. coli*) などの原核細胞である場合には、DNAを取り込むことができる適格細胞は、指数増殖期の後に採取し、その後当技術分野上周知の手順によりCaCl₂法によって処理した細胞から調製することができる。または、MgCl₂もしくはRbClを使用してもよい。形質転換はまた、宿主細胞のプロトプラストを形成することにより、またはエレクトロポレーションによって実施することができる。

【0019】

宿主が真核細胞である場合には、リン酸カルシウム共沈のようなDNAのトランスフェクション方法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソームに封入したプラスミドの挿入またはウイルスベクターなどの従来の機械的手順を使用することができる。真核細胞はまた、本発明のNMPをコードするDNA配列および単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの選択可能な表現型をコードする第2の外来DNA分子で同時形質転換することもできる。別の方法は、真核細胞を一時的に感染または形質転換して、タンパク質を発現するために、シミアンウイルス40 (SV40) またはウシパピローマウイルスなどの真核細胞ウイルスベクターを使用することである (真核細胞ウイルスベクター (EUKARYOTIC VIRAL VECTORS)、グルツマン (Gluzman) (編)、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、1982)。

【0020】

形質転換した宿主が発現するNMPまたはNMP断片の単離および精製は、分取クロマトグラフィーおよびモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む免疫学的分離法を含む従来的手段によって実施することができる。本発明中に提供する抗体はNMPまたはその断片に免疫反応性である。

【0021】

別の態様は、上記のポリヌクレオチド配列を有する組換え発現ベクターである。好ましくは、ベクターはウイルスである。好ましいウイルスはRNAウイルスであり、好ましいRNAウイルスはレトロウイルスである。別の好ましいベクターはリポソームであり、好ましくは、例えば抗体またはリガンドを用いて標的にすることができる標的的特異的なリポソームである。別の好ましいベクターはプラスミ

ドである。

【0022】

もう一つの態様は、上記のNMPまたはNMP断片に結合する抗体である。抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。本発明者らによって単離されたNMPを用いて、ダニング (Dunning) モデルとヒト組織の双方において癌様前立腺組織と正常前立腺組織とを区別することができる抗体を調製する。本発明の一つまたはそれ以上の態様はこれらの抗体に向けられる。さらに、本発明のもう一つの態様は、進行および/または転移能を有する前立腺癌を有する人を検出することができる抗体に向けられる。

【0023】

別の態様は、被験者の細胞増殖性疾患を検出するための方法、または細胞増殖性疾患、好ましくは前立腺癌が進行する危険性にさらされた個体を検出する方法であって、被験者の細胞構成成分に、細胞増殖性疾患に関連する細胞構成成分に結合する抗体または核酸プローブを接触させる段階を含む方法である。好ましくは、細胞構成成分は被験者の前立腺から採取され、好ましくは、核酸である。好ましくは、核酸は、上記のNMPまたはNMP断片をコードするDNAである。核酸としてはRNAが好ましい。別の好ましい細胞構成成分は上記のNMPまたはNMP断片である。分化の方法は単一のNMPおよび/もしくはその対応するDNA、または上記NMPおよび/もしくはそのDNAの1つ以上の組み合わせで行ってもよい。

【0024】

好ましくは、核酸プローブは上記の細胞構成成分に特異的にハイブリダイゼーションする。薬剤が核酸プローブである場合、好ましくは、それは検出可能なように標識される。好ましい標識には放射性同位体、生物発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレートおよび酵素が含まれる。

【0025】

または、細胞構成成分がNMPまたはNMP断片である場合には、NMPまたはNMP断片に特異的に結合する抗体を使用する。上記のように、抗体はモノクローナルであってもポリクローナルであってもよい。

【0026】

別の態様は、疾患を有する被験者に、上記NMPをコードする配列をブロックする治療的有効量のアンチセンスポリヌクレオチド配列を投与する段階を含む、D-1、D-2、D-3、AM-1、AM-2、NDP-1、NDP-2、NDP-3、NDP-4、NDP-5、NDP-6、NDP-7、NDP-8、NDP-9、NDP-10、G-1およびG-2からなる群より選択されるタンパク質に関連する細胞増殖性疾患を治療する方法である。この態様では、治療は、細胞増殖性疾患に生じている1種以上のNMPの発現をブロックするよう設計される。さらに好ましくは、方法が細胞増殖疾患の転移を阻害する方法であって、および好ましくは疾患が前立腺癌である。

【0027】

代替の治療方法では、アンチセンスポリヌクレオチド配列を使用する代わりに、上記NMPの1種をコードするポリヌクレオチド配列を使用する。この態様では、治療は、細胞増殖性疾患を予防または改善する1種以上のNMPが被験者に手依拠うされるよう設計される。

【0028】

別の治療方法では、上記NMPの1種以上の機能をブロックすることができる抗体を被験者に投与する。

【0029】

別の態様は、宿主被験者の細胞に、上記NMPの1種以上をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する段階を含む、遺伝子治療法である。好ましくは、発現ベクターはエクスピボで宿主被験者の細胞に導入されて形質転換細胞を形成し、次いで、形質転換された細胞を被験者に再導入する。この目的のための好ましい発現ベクターはRNAウイルスであり、好ましくはレトロウイルスである。

【0030】

本発明の別の態様は、前立腺細胞NMPの機能をブロックまたは増強する組成物を同定するための方法に関する。本発明の方法には下記の段階が含まれる：

- (a) 前立腺細胞と試験組成物とを相互作用させることができる条件下において、NMP含有前立腺細胞を試験化合物と共にインキュベーションする段階、および
- (b) 試験組成物が前立腺細胞NMPの機能をブロックまたは増強するかどうかを測

定する段階。

【0031】

本発明の別の態様は、上記NMPの1種をコードするポリヌクレオチド配列に結合する核酸プローブを含む、前立腺の細胞増殖性疾患を検出するためのキットである。好ましくは、プローブは検出を容易にするために、上記のような標識で標識される。または、本発明のキットは上記NMPの1種に特異的に結合する抗体を含む。さらに別の代替法は、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅によって、上記NMPの1種をコードする標的ポリヌクレオチド配列の増殖を可能にするオリゴヌクレオチドプライマーを本発明のキット中に使用することである。

【0032】

本発明のNMPはその断片および保存的置換された変異体を含む。本発明のNMPのアミノ酸の一次配列を僅かに変更することにより、本明細書に記載するNMPポリペプチドと比較して実質的に同等の活性を有するタンパク質が得られる。このような改変は部位特異的変異誘発によるように意図的なものであっても、自然発生性であってもよく、非必須アミノ酸の欠失を含むことができる。これらの改変によって作製されるポリペプチドは全て、天然型NMPの生物活性が維持される限り、本明細書に含まれる。さらに、1つ以上のアミノ酸が欠失しても、生物活性を有意に変更することなく、得られた分子の構造を改変することができる。これにより、より広い範囲の用途を有すると思われる比較的小さな活性分子が開発される。

【0033】

本明細書において使用される「保存的置換」という用語は、構造的に類似するアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を意味する。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンなどの1つの疎水性残基と別の疎水性残基との置換、またはアルギニンとリジンの置換、グルタミン酸とアスパラギン酸の置換、もしくはグルタミンとアルパラギンの置換等などの1つの極性残基と別の極性残基との置換が含まれる。

【0034】

本発明のペプチドは、例えば、メリフィールド（Merrifield）、J. Am. Chem.

Soc. 85; 2149 (1962) によって、並びにスチュワート (Stewart) およびヤング (Young)、SOLID PHASE PEPTIDES SYNTHESIS 27~62 (フリーマン出版 (Freeman Publ.)、1969) によって記載される周知の固相ペプチド合成方法によって合成することができる。

【0035】

本発明のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はNMPまたはNMPの免疫原性断片に免疫反応性である。必要に応じて、ポリクローナル抗体は、例えば、NMPポリペプチドを結合させたマトリックスに結合させて、溶出することによって、または通常の核マトリックスタンパク質を使用して非特異的抗体を選択的に除去することによって、さらに精製することができる。異なるエピトープ特異性を有するプールモノクローナル抗体から本質的に成る抗体、および別個のモノクローナル抗体製剤が提供される。本発明に使用される「抗体」という用語は、全長の分子、並びにNMPのエピトープ決定基に機能的に結合することができる、Fab およびF(ab')₂断片などのその断片を含む。

【0036】

NMPとの結合性を示す抗体結合領域を同定し、単離するための好ましい方法はXバクテリオファージベクター系である。このベクター系は、マウス抗体レパートリー (フセ (Huse) ら、Science 246: 1275~81 (1989) を参照のこと)、およびヒト抗体レパートリーのFab断片の組み合わせライブラリを大腸菌 (Escherichia coli) において発現するために使用されている (ヌリナックス (Nullinax) ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 8095~99 (1990))。

【0037】

本明細書で用いられる、「細胞増殖性疾患」という用語は、前立腺の悪性および非悪性 (すなわち、良性) 疾患を意味する。この用語は前立腺の過形成疾患をさらに含む。これらの増殖性疾患を有する細胞は、形態的および遺伝子型的に周囲の正常組織と異なると思われることが多い。上記のように、細胞増殖性疾患は、例えば、本発明のNMPの発現または発現の欠損に関連することがある。細胞周期中の不適当な時期または適正でない細胞型におけるNMPの発現により細胞増殖性疾患が生じることがある。アンチセンスポリヌクレオチドの形態のNMPコード

ポリヌクレオチドは、前立腺の過形成および悪性腫瘍を治療する際に有用である。細胞増殖性疾患がNMP発現に関連する場合、アンチセンスNMPポリヌクレオチド配列またはNMP結合抗体を前立腺細胞に導入して、NMPの発現および/または機能をブロックすることができる。または、細胞増殖性疾患が発現不足または変異NMPポリペプチドの発現に関連する場合、欠損しているNMPまたは発現が低下しているNMPをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入することができる。

【0038】

本発明の目的のために、NMPに特異的な抗体または核酸プローブを使用して、NMPを含有することが疑われる生体液または生物組織中のNMPポリペプチド（抗体プローブの場合）またはポリヌクレオチド（核酸プローブの場合）の存在を検出することができる。NMP配列中の任意のコード配列領域に基づいたオリゴヌクレオチドプライマーは、例えばPCRによってDNAまたはRNAを増幅するために有用である。検出可能な量の抗原を含有する任意の試料を使用することができる。本発明の好ましい試料は、前立腺から採取された組織である。または、前立腺細胞を含有することがある生体液を使用することができる。

【0039】

「被験者」という用語は、本明細書では哺乳類を意味して用いられ、好ましくはヒトである。

【0040】

より感受性を高くすることができる別の技法は、プローブを低分子量ハプテンと結合することである。次いで、これらのハプテンを第2の反応によって特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、または特異的な抗ハプテン抗体と反応することができるジニトロフェノール、ピリドキサルおよびフルオレセインのようなハプテンを使用することは普通のことである。

【0041】

上記のように、本発明の特定のNMPを発現する細胞またはNMPに関連する細胞増殖性疾患を検出するための方法を、他の前立腺癌または他の悪性腫瘍または臨床的に寛解状態にある被験者の良性過形成症状を検出するために使用することができる。従って、細胞中のNMPポリペプチドを検出するための方法は、正常細胞中

で発現されるNMPと比較して、特異的NMPを発現する細胞を同定することによって、細胞増殖性疾患を検出するために有用である。本発明の方法を使用することによって、NMP発現を細胞中で同定することができ、適当な治療過程を使用することができる（例えば、NMPコードまたはアンチセンス遺伝子療法、および従来の化学療法）。本発明のNMPの発現パターンは細胞の悪性度の病期によって異なるので、NMP発現を検出し、細胞の悪性度の病期を診断するための一連のNMP特異的薬剤（例えば、核酸プローブまたはNMPに対する抗体）を用いて前立腺組織試料をスクリーニングすることができる。

【0042】

本発明のモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を液相に使用することができる、または固相担体に結合することができる免疫アッセイ法に使用するために好適である。また、これらの免疫アッセイ法のモノクローナル抗体は種々の方法で検出可能なように標識することができる。本発明のモノクローナル抗体を使用することができる免疫アッセイ法の種類の例は、直接的または間接的な形式の競合および非競合免疫アッセイ法である。このような免疫アッセイ法の例は、ラジオイムノアッセイ（RIA）法およびサンドイッチ（免疫測定）アッセイ法である。本発明のモノクローナル抗体を使用した抗原の検出は、生理的試料の免疫組織学的アッセイ法を含む、前進的、復帰的または併発的に実施される免疫アッセイ法を使用して実施することができる。または、本発明の抗体を使用して、ウェスタンブロットおよび二次元ゲルなどの電気泳動によって分散されたゲルブロットコールに存在するNMPを検出することができる。

【0043】

本発明のモノクローナル抗体は多数の異なる担体に結合することができ、NMPの存在を検出するために使用することができる。周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱が含まれる。本発明の目的のためには担体の性質は可溶性であっても、不溶性であってもよい。

【0044】

アッセイ法を実施する際には、インキュベーション培地中にある種の「ブロック剤」を添加することが望ましいことがある（通常、標識した可溶性抗体と共に添加する）。「ブロック剤」は、実験試料中に存在する抗NMP免疫グロブリンに対する非特異的なタンパク質、プロテアーゼまたは抗異好性免疫グロブリンが固相支持体の抗体または放射性標識した指標抗体を架橋したり、分解して、偽陽性または偽陰性の結果を生じないことを確実にするために添加される。従って、「ブロック剤」の選択が、本発明に記載されているアッセイ法の特異性に実質的に加わることがある。

【0045】

本発明のアッセイ法に使用されるもの（例えば、IgG1、IgG2a、IgM等）と同じ部類または小部類（イソタイプ）の数多くの関連のない（すなわち、非特異的）抗体を「ブロック剤」として使用することができるが見出されている。試料中に交差反応性タンパク質を突然変異により生ずることによって（通常1～100 μg/μl）、適切な感度を維持するが任意の望ましくない妨害を阻害するのに十分な高い濃度で「ブロック剤」は使用される。

【0046】

本明細書において、「抗原決定基」という用語は、本発明のモノクローナル抗体と特異的な相互作用をすることができる任意の決定基を意味する。抗原決定基は通常アミノ酸または糖側鎖などの化学的に活性な表面分子群を含み、通常特異的な三次元構造特性および特異的な荷電特性を有する。

【0047】

抗原のインビボ検出のために本発明のモノクローナル抗体を使用する際には、検出可能なように標識されたモノクローナル抗体が、診断的に有効な用量で投与される。「診断的に有効な」という用語は、検出可能なように標識されたモノクローナル抗体の量が、モノクローナル抗体が特異性を示すNMP抗原を有する部位の検出を可能にするのに十分な量で投与されることを意味する。

【0048】

インビボにおいて診断するための検出可能なように標識されたモノクローナル抗体の用量は、年齢、性別および個人の疾患の程度のような要因によって変わる

。モノクローナル抗体の用量は約0.001 mg/m² ~ 約500 mg/m²、好ましくは0.1 mg/m² ~ 約200 mg/m²、最も好ましくは約0.1 mg/m² ~ 約10 mg/m²と異なってもよい。このような用量は、例えば、多数回注射するかどうか、腫瘍負荷および他の因子によって変わってもよい。

【0049】

インビボにおける画像診断のためには、利用可能な検出機器の種類が所定の放射性同位体を選択する際の主要な要因となる。選択した放射性同位体は所定の種類の機器にとって検出可能である種類の崩壊を有しなければならない。インビボで診断するための放射性同位体を選択する際のさらに別の重要な要因は、放射性同位体の半減期は、標的による取り込みが最大の時でも放射性同位体が検出可能であるほど十分に長い、宿主に対する有害な照射が最少となるほど短いことである。理想的には、インビボにおける画像法に使用する放射性同位体は粒子放射を生じないが、従来の線カメラによって容易に検出することができる140 ~ 250 KeVの範囲の大多数のプロトン形成する。

【0050】

インビボにおける診断のためには、中間の官能基を使用することによって直接的または間接的に放射性同位体を免疫グロブリンに結合することができる。金属イオンとして存在する放射性同位体を免疫グロブリンに結合するためにしばしば使用される中間官能基は、ジエチレントリアミン-五酢酸 (DTPA) およびエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 並びに同様の分子などの二官能性キレート剤である。本発明のモノクローナル抗体に結合することができる放射性同位体の一般的な例は¹¹¹In、⁹⁷Ru、⁶⁷Ga、Ga、⁷²As、⁸⁹Zrおよび²⁰¹Tlである。

【0051】

本発明のモノクローナル抗体は、核磁気共鳴画像法 (MRI) または電子スピン共鳴 (ESR) におけるように、インビボにおける診断目的のためには、本発明のモノクローナル抗体を常磁性同位体で標識することもできる。一般に、画像診断を可視化するための任意の従来方法を使用することができる。通常、線および陽電子放出放射性同位体をMRIのカメラ画像法および常磁性同位体のために使用する。このような技法に特に有用な元素は⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、¹⁶¹Dy、⁵²Crおよび⁵⁶Fe

を含む。

【0052】

本発明のモノクローナル抗体を使用して、NMPに関連する細胞増殖性疾患の寛解経過をモニターすることができる。従って、NMPを発現する細胞の数の増加もしくは減少または射出精液もしくは尿などの種々の生体液中に存在するNMPの変化を測定することによって、疾患の改善を目的とする特定の治療法が有効であるかどうかを決定することができると思われる。

【0053】

本発明のモノクローナル抗体はまた、抗原決定基反応性のNMPポリペプチドを発現する細胞増殖性疾患を有する動物に、本発明のモノクローナル抗体を用いて免疫療法するために、単独またはエフェクター細胞と併用して使用することもできる（ドウィラード（Douillard）ら、Hybridoma 5（Supp.1）：S139（1986）を参照のこと）。

【0054】

免疫療法に使用する場合には、本発明のモノクローナル抗体は標識していなくても、治療薬に結合されてもよい。これらの薬物は本発明のモノクローナル抗体と直接的または間接的に結合されてもよい。間接的な結合の一例はスペーサー部分を使用することによる。これらのスペーサー部分是不溶性であっても、可溶性であってもよい（ダイナー（Diener）ら、Science 231：148（1986）を参照のこと）。また、標的部位においてモノクローナル抗体分子から薬物の放出を可能にするようにこれらのスペーサー部分を選択することができる。免疫療法のために、本発明のモノクローナル抗体と結合することができる治療薬の例は薬物、放射性同位体、レクチンおよび毒素である。

【0055】

本発明のモノクローナル抗体と接合することができる薬物は、タンパク質性薬物と同様に非タンパク質性薬物を含む。「非タンパク質性薬物」という用語は、例えばマイトマイシンC、ダウノルビシン、ビンブラスチン、および癌治療用のその他の古典的に薬物を意味する化合物を包含する。

【0056】

本発明のモノクローナル抗体を結合することができるタンパク質性の薬物は、免疫調節剤および他の生物応答改良剤を含む。「生物応答改良剤」という用語は、本発明のモノクローナル抗体が特異性を示すNMP関連腫瘍の崩壊を増強するような様式で、免疫応答を改良する際に関与する物質を含む。免疫応答改良剤の例としてはリンフォカインのような化合物が含まれる。リンフォカインは腫瘍壊死因子、インターロイキン、リンホトキシン、マクロファージ活性化因子、遊走阻止因子、コロニー刺激因子およびインターフェロンを含む。本発明のモノクローナル抗体を標識することができるインターフェロンには α -インターフェロン、 β -インターフェロンおよび γ -インターフェロン並びにそれらのサブタイプが含まれる。

【0057】

免疫療法のために、放射性同位体を接合させた本発明のモノクローナル抗体を使用する際には、腫瘍細胞の分布並びに同位体の安定性および放射性のような要因に応じて、ある種の同位体は他よりもより好ましいことがある。必要に応じて、腫瘍細胞の分布を、上記のインビボにおける診断技法によって評価することができる。細胞増殖性疾患に応じて、一部の放射物が他よりも好ましいことがある。一般に、 α および β 粒子放射性の放射性同位体が免疫療法に好ましい。例えば、動物が固形腫瘍病巣を有する場合には、数ミリメートルの組織を貫通することができる、9%ほどの高エネルギーの β 放射物が好ましい。一方、白血病の場合のように、細胞増殖性疾患が1つの標的細胞からなる場合には、Biなどの幅が狭く、高エネルギーの α 照射が好ましい。治療目的のために、本発明のモノクローナル抗体に結合することができる放射性同位体の例はI、Y、Cu、Bi、At、Pb、Sc、Pd、ZnおよびReの放射性同位体である。

【0058】

レクチンは通常植物材料から単離されるタンパク質であり、特異的な糖部分に結合する。多数のレクチンが細胞を凝集させることができ、リンパ球を刺激することができる。リシンは免疫治療的に使用されている毒性レクチンである。毒性を示す、リシンの α -ペプチド鎖を本発明の抗体に結合して、毒性効果の部位特異的搬送を可能にすることができる。

【0059】

毒素は、植物、動物または微生物が産生する毒作用のある物質で、十分な用量では致死的であることも多い。ジフテリア毒素はコリネバクテリウム-ジフテリア (*Corynebacterium diphtheria*) が産生する物質であり、治療に使用することができる。この毒素は、適当な条件下において分離することができる サブユニットおよび サブユニットを含む。毒性のA成分を抗体に結合して、NMP産生細胞に部位特異的に搬送するために使用することができる。

【0060】

本発明のモノクローナル抗体は γ -インターフェロンと併用して使用することができる。この治療法は、癌腫細胞によるモノクローナル抗体反応性抗原の発現を増強することによって、モノクローナル抗体の癌腫標的性を高める (グライナー (Greiner) ら、*Science* 235: 895 (1987))。または、本発明のモノクローナル抗体を、例えば γ -インターフェロンと併用して使用し、それによってエフェクター細胞によるFc受容体の発現を活性化して増加し、モノクローナル抗体とエフェクター細胞との結合性を増強し、標的腫瘍細胞を死滅させる。

【0061】

リポソームをNMP発現腫瘍に特異的に搬送するために、リポソームの膜に本発明のモノクローナル抗体を組み込んだリポソームを使用することも可能である。これらのリポソームは、モノクローナル抗体以外に、腫瘍部位で放出されると思われる、上記のもののような免疫治療薬を含有するように形成することができる (ウォルフ (Wolf) ら、*Biochem. Biophys. Acta* 802:259 (1984))。

【0062】

本発明のモノクローナル抗体を投与するための用量範囲は、悪性疾患の症状が改善される望ましい効果を生ずるのに十分多いものである。用量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応等などの有害な副作用を生じるほど大きくすべきでない。一般に、用量は、患者の年齢、症状、性別および疾患の程度で変わり、当業者によって決定される。用量は、任意の複雑な事象では各医師者によって調整することができる。用量は、約0.1mg/kg ~ 約2000mg/kg、好ましくは約0.1mg/kg ~ 約500mg/kgを毎日1回以上、1日または数日間と変化させてもよい。一般

に、本発明のモノクローナル抗体を治療薬と接合して投与する場合、インビボにおける画像診断に使用するものと比較して、より低用量を使用することができる。

【0063】

本発明のモノクローナル抗体は注射または点滴によって非経口的に投与することができる。本発明のモノクローナル抗体は静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内または経皮的に、単独またはエフェクター細胞と併用して投与することができる。

【0064】

本発明はまた、NMPヌクレオチド配列を使用してNMP関連細胞増殖性疾患患者を治療するための方法を提供する。サプレッサーポリペプチドをコードすることができるNMPヌクレオチド配列は正常細胞における発現と比較すると、発現が低下していることがあるので、この配列に関する適当な治療または診断技法を設計することが可能である。従って、細胞増殖性疾患が悪性腫瘍に関連するNMPの発現に関連する場合には、翻訳レベルでのNMP発現を妨害する核酸配列を使用することができる。この方法は、例えば、アンチセンス核酸およびリボザイムを使用して、アンチセンス核酸でNMP mRNAをマスキングするか、またはそれをリボザイムで切断することによって、特異的なNMP mRNAの翻訳をブロックする。細胞増殖性疾患または異常な細胞表現型が、例えば、NMPサプレッサーの発現低下に関連する場合には、UMPをコードする核酸配列（センス）を、この疾患を有する被験者に投与してもよい。

【0065】

アンチセンス核酸は、特異的なmRNA分子の少なくとも一部と相補的であるDNAまたはRNA分子である（ウェインタウブ（Weintaub）、Scientific American, 262: 40（1990））。細胞内では、アンチセンス核酸は対応するmRNAにハイブリダイゼーションして、2本鎖分子を形成する。細胞は2本鎖となっているmRNAを翻訳しないので、アンチセンス核酸はmRNAの翻訳を妨害する。約15ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが好ましい。その理由は、それらは容易に合成され、標的のNMP産生細胞に導入されたとき、比較的大きな分子より発現される可能性が低

いからである。

【0066】

リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼと類似した様式で他の1本鎖RNAを特異的に切断する能力を有するRNA分子である。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列を変更することにより、RNA分子中の特異的なヌクレオチド配列を認識し、それを切断する分子を作製することができる(チェチ(Cech)、J. Amer. Med. Assn, 260: 3030(1988))。この方法の主要な利点は、それらは配列特異的であるので、特定の配列を有するmRNAだけを不活性化することである。

【0067】

2種の基本的な型のリボザイム、すなわちテトラヒメナ型(ハッセルホッフ(Hasselhoff)、Nature, 334: 585, 1988)および「槌」型が存在する。テトラヒメナ型リボザイムは鎖長4塩基の配列を認識するが、「槌」型リボザイムは鎖長11~18塩基の塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、配列が標的mRNA種に主に存在する可能性が大きい。従って、特異的mRNA種を不活性化するためには、槌型リボザイムはテトラヒメナ型リボザイムより好ましく、18塩基の認識配列はこれより短い認識配列より好ましい。

【0068】

本発明はまた、NMPが媒介する細胞増殖性疾患を治療するための遺伝子療法を提供する。この療法は適当なNMPポリヌクレオチド配列(アンチセンスまたはコード鎖)を増殖性疾患を有する被験者の細胞に導入することが必要である。アンチセンスNMPポリヌクレオチドの搬送は、キメラウイルスまたはリポソームなどの組換え発現ベクターを使用して実施することができる。NMPの発現低下に関連する疾患または癌関連NMPの発現に関連する疾患は、それぞれ、コードヌクレオチド配列またはアンチセンスヌクレオチド配列を用いた遺伝子療法を使用して治療することができる。

【0069】

本明細書に開示されている遺伝子療法に使用することができる種々のウイルスベクターにはアデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、好ましくはレトロウィルスなどのRNAウイルスが含まれる。好ましくは、レトロウイルスベクタ

ーはマウスまたは鳥類 (avian) レトロウイルスの誘導體である。1本鎖の外来遺伝子を導入することができるレトロウイルスベクターの例には、モロニー (Moloney) マウス白血病ウイルス (MoNuLV)、ハービー (Harvey) マウス肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳腺癌ウイルス (MuMTV) およびラウス (Rous) 肉腫ウイルス (RSV) が含まれるが、これらに限定されない。数多くの別のレトロウイルスベクターは同義遺伝子を組込むことができる。被形質導入細胞を同定して、形成することができるように、これらのベクターは全て選択可能なマーカーの遺伝子を導入または組み入れることができる。例えば、関心のあるNMP配列を特異的な標的細胞の受容体のリガンドをコードする別の遺伝子と共にウイルスベクターに導入することによって、ベクターを標的特異的にする。レトロウイルスベクターは、例えば糖、糖脂質またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを導入することによって、標的特異的にすることができる。好ましい標的化は、レトロウイルスベクターを標的にする抗体を使用して実施される。

【0070】

組換えレトロウイルスは1つ以上の遺伝子が欠損しているため、それらは感染性のあるベクター粒子を作製するためには助けを必要とする。パッケージングシグナルを欠失しているヘルパー細胞株には、例えばW2、PA317およびPA12が含まれるがこれらに限定されない。ゲノムがパッケージングされていないので、これらの細胞株は中空ビリオンを産生する。パッケージングシグナルに欠失がないが、構造遺伝子が関心のある他の遺伝子と置換されているこのような細胞にレトロウイルスベクターを導入すると、ベクターをパッケージングすることができ、ベクタービリオンを作製することができる。

【0071】

または、NIH 3T3または他の組織培養細胞に、従来のリン酸カルシウムトランスフェクションによって、レトロウイルスの構造遺伝子gag、polおよびenvをコードするプラスミドで直接トランスフェクションすることができる。次いで、これらの細胞に関心のある遺伝子を有するベクタープラスミドをトランスフェクションする。得られた細胞は培養培地中にレトロウイルスベクターを放出する。

【0072】

NMPアンチセンスポリヌクレオチドの他の標的搬送系には巨大高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質に基づいた系が含まれる。リポソームは、人工的な膜小胞で、インビトロおよびインビボにおいて搬送基材として有用である。サイズが0.2~4.0 μ mの単ラメラ小胞(ULV)は、大きな巨大分子を含有する実質的な割合の水性緩衝液を封入することができる。RNA、DNAおよび欠失のないビリオンをその水性の内部に封入することができ、生物的に活性な形態で細胞に搬送することができる(フラレイ(Fraley)ら、Trends Biochem. Sci. 6: 77 (1981))。

【0073】

リポソームの組成は、通常、リン脂質、特に相転移温度が高いリン脂質の組み合わせに、ステロイド、特にコレステロールを併用したものである。他のリン脂質または他の脂質を使用してもよい。リポソームの物理特性はpH、イオン強度および2価陽イオンの存在に依存する。

【0074】

リポソームを作製する際に有用な脂質の例には、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシドおよびガングリオシドなどのホスファチジル化合物が含まれる。脂質部分が炭素原子数14~18、好ましくは炭素原子数16~18で、飽和であるジアシルホスファチジルグリセロールが特に有用である。例示的なリン脂質は卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンを含む。

【0075】

リポソームの標的化は解剖学および機械論的要因に基づいて分類されている。解剖学的分類は選択性のレベル、例えば、器官特異的、細胞特異的および細胞小器官特異的に基づいている。機械論的標的化は、それが受動的か、または能動的かに基づいて識別することができる。受動的標的化は、洞様毛細血管を有する器官の細網内皮系(RES)の細胞にリポソームが分配する自然の傾向を利用して。一方、能動的標的化は、リポソームをモノクローナル抗体、糖、糖脂質ま

たはタンパク質などの特異的なリガンドと結合することによって、または天然に存在する局在化部位ではない標的化を器官および細胞種に実施するために、リポソムの組成またはサイズを変化させることによって、リポソムを変更することを含む。

【0076】

標的搬送系の表面は種々の方法で変更することができる。低浸透圧標的搬送系の場合には、標的リガンドをリポソムの2重膜に安定して結合させておくために、脂質基を脂質2重膜に導入してもよい。脂質鎖を標的リガンドに結合するために種々の結合基を使用することができる。

【0077】

一般に、標的搬送系の表面に結合される化合物は、標的搬送系に望ましい細胞を見つけさせ、「中に入れさせる」リガンドおよび受容体である。リガンドは、受容体などの別の化合物に結合する、関心のある任意の化合物であってもよい。

【0078】

一般に、特異的なエフェクター分子に結合する表面膜タンパク質は受容体と呼ばれる。本発明において、本発明の抗体は好ましい受容体である。本発明の優れたNMPの場合には、抗体を使用して、リポソムに特異的細胞表面リガンドを標的にさせる。好ましくは、標的組織は前立腺組織である。数多くの手法を使用して、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体をリポソム2重膜に共有結合することができる。抗体標的リポソムはモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体または標的細胞の抗原決定基に効率的に結合する限り、Fabもしくは $F(ab')_2$ などの断片を含んでもよい。

【0079】

非経口投与のための製剤は滅菌した水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例はプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、生理食塩水および緩衝培地を含む水、アルコール性/水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれる。非経口投与基材には塩化ナトリウム溶液、リンガー (Ringer) のデキストロース、デキストロースおよび

塩化ナトリウム、流体と栄養強化剤、電解質強化剤（リンガー（Ringer）のデキストロースに基づいたものなど）を含む乳酸塩化したリンガー（Ringer）の静脈内注射用基材等が含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤が存在してもよい。

【0080】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはモノクローナル抗体を含有し、NMPに関連する細胞増殖性疾患を治療するために使用される薬物または薬学的組成物を調製するための方法に関する。

【0081】

本発明は以下の実施例によってさらに説明されるが、決して限定されるものではない。

【0082】

ラット核マトリクスタンパク質の単離とシーケンシング

ダニングR3327ラット前立腺癌細胞株のG、AT2.1、およびMLL亜株を用いた。細胞を10%ウシ胎児血清、250 nMデキサメタゾン、ペニシリンGおよびストレプトマイシンいずれも100単位/mlを含むRPMI 1640中で培養した。細胞を下記のように回収して分画し、核マトリクスタンパク質を単離した。

【0083】

ダニングR3327 AT2.1ラット前立腺腫瘍を、雄性コペンハーゲンラットの皮下に移植して、腫瘍重量が3～4 gに達した際に採取した。正常なラット背側前立腺を、チャールスリバー社（ウィルミントン、マサチューセッツ州）から得た無傷の成熟スプレージ・ドーリーラット（300～350 g）から得た。腫瘍および組織試料を分画して、下記のように核マトリクスタンパク質を単離した。

【0084】

正常および腫瘍前立腺組織試料は、ピッツバーグ大学メディカルセンターで前立腺癌のために手術を受ける予定の患者から得た。明記した細胞タイプのほぼ純粋な集団を含むと病理学者によって明らかに同定されうる試料のみを用いた。

【0085】

核マトリクスタンパク質は、フェイ（Fey）ら、J. Cell Biol. 98 : 1983～198

4) およびゲッツェンバーグ (Getzenberg) ら、Cancer Res. 51: 6514~6520、1991の教示に従って上記で選択した前立腺組織、細胞、および腫瘍から単離した。組織片を小片に細切し(1 mm. sup3)、テフロン(登録商標)製の乳棒によって氷中で2 mMバナジルリボヌクレオシド(RNA分解酵素阻害剤)を含む溶液中で0.5%トライトンX-100によってホモジナイズし、脂質と可溶性タンパク質とを放出した。次に、抽出物を350ミクロンのナイロンメッシュを濾過して通過させ、0.25 M硫酸アンモニウムによって抽出して、可溶性細胞骨格成分を放出した。25 でのDNA分解酵素処理を用いて可溶性染色質を除去した。次に、残りの分画を8 M尿素によって解離して、主に炭水化物と細胞外マトリクス成分で構成される不溶性成分を沈殿させた。尿素を透析して除去し、中間フィラメントを再集合させて、遠心によって除去した。次に、核マトリクスタンパク質をエタノール沈殿した。溶液は全て、新しく調製した、セリンプロテアーゼを阻害するための1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、0.3 μMアプロトニン(aprotinin)、1 μMロイペプチン、および1 μMペプスタチンを含んだ。

【0086】

この分画のタンパク質に対する抗体を調製して、核および単離された核マトリクス分画のみに存在することが証明された。タンパク質組成物を、0.1 N水酸化ナトリウム中にタンパク質を再浮遊させ、クーマシープラスタンパク質アッセイ試薬キット(ピアス社、ロックフォード、イリノイ州)を用いてウシ血清アルブミン(BSA)を標準物質として用いることによって決定した。

【0087】

二次元ゲル電気泳動に関して、エタノール沈殿させたNMPを9 M尿素、65 mM 3-[(3-コーラミドプロピル) -ジメチルアンモニオ] -1-プロパンスルホネート(CHAPS)、2.2%両性電解質および140 mMジチオスレイトールを含む試料緩衝液に溶解した。NMPsを含む最終沈殿物は、総細胞タンパク質の1%未満であった。

【0088】

核マトリクスタンパク質は、高分解能二次元ゲル電気泳動技法によって分離した。高分解能二次元ゲル電気泳動は、インベスチゲーター2-Dシステム(ゲノミック・ソリューションズ社、ケルムスフォード、マサチューセッツ州)を用いて

行った。簡単に説明すると、一次元等電集束を、前集束の1.5時間後に1 mm×18 cmチューブ状ゲルを用いて18,000 V-時間行った。チューブゲルを押し出して、1 mmドデシル硫酸ナトリウムデュラクリル(ゲノミック・ソリューションズ社、ケルムスフォード、マサチューセッツ州)高引張力ポリアクリルアミドゲル電気泳動スラブゲルの上部に載せて、ゲルを12 の一定温度制御で約5時間電気泳動した。ゲルを50%メタノールおよび10%酢酸で固定した。十分にすすいで、脱水した後、ゲルを、50 mMリン酸塩によって緩衝化した後、5%グルタルアルデヒドおよび5 mMジチオスレイトールによって処理した(pH 7.2)。ゲルを銀染色によって染色するか(アキュレートケミカル社、ウェストバリー、ニューヨーク州)、または以下のようにPVDF(イムノビロン社、ミリポアコーポレーション)に転写した。

【0089】

核マトリクスタンパク質50 µgを各ゲルにローディングした。タンパク質の分子量標準物質は、ディバーシファイドバイオテクノロジー社(ニュートンセンター、マサチューセッツ州)からの銀標準物質であった。等電点はガラロ・シュレシガー社(カールプレース、ニューヨーク州)およびシグマケミカル社(セントルイス、ミズーリ州)からのカルバミル化標準物質を用いて決定した。多数のゲルを各試料について泳動し、多数の試料を異なる時間で泳動した。試料タイプの全てのゲルにおいて明らかに再現よく認められたタンパク質スポットのみを、各マトリクス成分を実際に表すとして計数した。ゲルをバイオイメージ電気泳動分析システム(バイオイメージ社、アナーバー、ミシガン州)を用いて分析し、これはゲル間のタンパク質スポットを合致させて、ゲルとタンパク質スポットとをデータベース化する。チャプス洗剤と両性電解質との独自の組み合わせを用いて、これらのゲルを泳動した。組織を用いてこれらの核マトリクスタンパク質を単離したため、得られたタンパク質は、細胞培養から得られた核マトリクスタンパク質とは有意に異なる組織核マトリクスタンパク質である。

【0090】

独自の染色方法論を用いて、高分解能二次元ゲルを染色した。ZnCl₂陰性染色技術を用いて、新規核マトリクスタンパク質をシーケンシングする必要なく同定

した。

【0091】

関係するタンパク質スポットを多くのゲルから切除して、回収し、SDS/PAGEシステムを用いてアガロース中で単一のバンドに濃縮した。アガロース切片にエドマン分解プロセスを行って、そのアミノ酸配列を得た。

【0092】

以下のラットタンパク質を同定した：

【0093】

【表1】

タンパク質	タンパク質配列	相同性	抗体	ラット反応性	ヒト ^{***} 反応性
D-1 分子量 63 kD pI 8.55	ペプチド 1 ITGLNMVEM (配列番号: 1) ペプチド 2 YGPQYGHPPPPPP PPDYGPHADSPV (配列番号: 2) ペプチド 3 IQHPSNVLHFFN APLEVTEENFFE I (配列番号: 3)	なし hnRNP L* の w/ ポリプロリン領域 と96%の相同性 hnRNP L* の C末端部分と 100%の相同性	ポリクローナル (2D) ウェスタンブロット では不良	ウェスタンブロット は有用でない	?
D-2 分子量 40 kD pI 5.91	ペプチド 1 DESTLQGF (配列番号: 4) ペプチド 2 ALQDKV (配列番号: 5)	なし なし	ポリクローナル (2D) 良好	ウェスタンブロット は G, AT-2, AT-6, MLL においてタンパク質を 検出する	ウェスタンブロット は、ヒトPcaを同定す るが、正常組織は 同定しない
D-3 分子量 33 kD pI 6.97	ペプチド 1 RL???TKPMVNL IK (配列番号: 6)	なし	ポリクローナル (2D) 良好	ウェスタンブロット は G, AT-2, AT-6, MLL においてタンパク質 を検出する	
AM-1 分子量 40 kD pI 6.73	ペプチド 1 VSNTPLPGVFT K (配列番号: 7)		ポリクローナル (2D) 良好	ウェスタンブロット は 転移性株 AT-2, AT-6, MLL に おいてタンパク質を 検出するが G では 検出しない 免疫蛍光/共焦点核断続	ウェスタンブロット はいくつかのヒトPca を同定する
AM-2 分子量 36 kD pI 8.33	ペプチド 1 NLDLDSIIAEVK (配列番号: 8)		ポリクローナル (2D) 不良		

【0094】

【表2】

タンパク質	分子量 (kD)	PI
NDP-1	95	6.74
NDP-2	57	8.33
NDP-3	57	8.0
NDP-4	47	5.26
NDP-5	47	5.80
NDP-6	41	6.83
NDP-7	37.2	7.05
NDP-8	36.9	7.35
NDP-9	35	6.25
NDP-10	32.5	5.46
G-1	55	6.48
G-2	52	6.93

【0095】

上記の表1および2において、分子量およびpIは、既知の分子量およびpIの標準物質との比較によって決定した。

【0096】

抗体の産生

ポリクローナル抗体は、KLHに結合させたD-2ペプチド2配列（上記の表を参照のこと）を用いてニュージーランドホワイトウサギにおいて作製した。さらに、AM-1に対応するより高い分解能の二次元ゲルから単離したゲルスポットに対する抗体を産生した。ペプチドまたはスポットはウサギの背部にフロイントのアジュバント（FCA）0.5 mlを含む150 μ g/mlの濃度で投与した。5回の追加免疫を3週間間隔で投与した。各追加免疫のペプチドまたはスポットの濃度は、0.5 ml FCAを含む100 μ g/mlであった。

【0097】

抗体の試験

正常および腫瘍組織からの各マトリクスタンパク質をSDS/PAGEで分離した。一次抗体（100倍希釈）として抗血清を、そしてHRP標識ヤギ抗ウサギ（20,000倍希

釈) 抗体を二次抗体として用いてウェスタン分析を行った。抗原を注射する前のウサギからの血清を内部対照として用いた。

【0098】

抗体の結果

ウェスタン分析を用いて、D-2抗体は、ヒト前立腺腫瘍試料においてタンパク質を検出することができるが、合致させた正常試料ではタンパク質に反応しない。抗体はまた、それが同定された全てのダニング腫瘍細胞株においてD-2タンパク質を検出することができる。

【0099】

ダニング腫瘍または細胞株をAM-1抗体によって染色すると、反応性は、転移性株に限って認められ、調べた非転移性株のいずれにおいても認められない。

【0100】

ヒトNMP相対物 (counterpart) を得る

上記のラットD-2およびAM-1抗体を用いて、ヒトNMP相対物をヒト前立腺組織試料から部分精製し、特徴を調べた。ヒト前立腺組織試料には、ラットNMPを単離する上記の技術と類似の技術を行った。得られたゲルは、分離されたヒトNMPを表す様々なバンドを含んだ。ラットD-2およびAM-1抗体をバンドに適用して、それが特定のバンドに結合するか否かを調べた。双方の場合において、2つの抗体は、ヒトNMP相対物を表す2つの明確なバンドに結合した。これらのバンドを既知の標準物質と比較すると、ヒトD-2 NMPがラットD-2 NMPとほぼ同じ分子量とpI (約40 kDとpI約5.91) を有することが示された。同様に、ヒトAM-1 NMPはラットD-2 NMPとほぼ同じ分子量とpIを有した (約40 kDとpI約6.73)。

【0101】

さらに、ラットAM-1抗体を用いてヒト前立腺組織を染色し、ラットモデルにおいて分離できるように、ヒトにおいても転移性腫瘍と非転移性腫瘍とを分離できるか否かを調べた。ラットAM-1 NMPに対するこの抗体によるイムノプロットおよび免疫組織化学試験は、ヒト前立腺腫瘍組織と反応し、この転移性疾患特異的NMPが同様にヒト前立腺癌組織にも存在する証拠を提供する。抗AM-1抗体は、いくつかのヒト前立腺癌を染色するが、正常前立腺組織は染色しない。前立腺癌から

の根治的前立腺切除術を受けた患者13人からの組織から、NMPをスクリーニングした。イムノプロット分析から、患者13人中3人(23%)が腫瘍に限って陽性染色を有し、5人(38%)が正常組織中、微量認められる腫瘍において有意な量の染色を有したことが示される。これらの患者における陽性染色は、転移能を有する疾患と相関する可能性があるという仮説を立てることができる。

【0102】

本発明は詳細に且つ本発明の具体的な態様を参照して説明されているが、本発明の精神および請求の範囲から逸脱することなく、種々の変更および改良を加えられることが当業者には明らかであると思われる。

【図1】

タンパク質	タンパク質配列	相同性	抗体	ラット反応性	ヒト ^{***} 反応性
D-1 分子量 63 kD pI 8.55	ペプチド 1 ITGLNMVEM (配列番号: 1) ペプチド 2 YGPQYGHPPPPP PPDYGPHADSPV (配列番号: 2) ペプチド 3 IQHPSNVLHFFN APLEVTEENFFE I (配列番号: 3)	なし hmRNP L* の w/ ポリプロリン領域 と96%の相同性 hmRNP L* の C末端部分と 100%の相同性	ポリクローナル (2D) ウェスタンブロット では不良	ウェスタンブロット は有用でない	?
D-2 分子量 40 kD pI 5.91	ペプチド 1 DESTLQGF (配列番号: 4) ペプチド 2 ALQDKV (配列番号: 5)	なし なし	ポリクローナル (2D) 良好	ウェスタンブロット は G, AT-2, AT-6, MLL においてタンパク質を 検出する	ウェスタンブロット は、ヒトPcaを同定す るが、正常組織は 同定しない
D-3 分子量 33 kD pI 6.97	ペプチド 1 RL???TKPMVNL IK (配列番号: 6)	なし	ポリクローナル (2D) 良好	ウェスタンブロット は G, AT-2, AT-6, MLL においてタンパク質 を検出する	
AM-1 分子量 40 kD pI 6.73	ペプチド 1 VSNTPLPGVFT K (配列番号: 7)		ポリクローナル (2D) 良好	ウェスタンブロット は転移性株 AT-2, AT-6, MLL に おいてタンパク質を 検出するが G では 検出しない 免疫蛍光/共焦点核断続	ウェスタンブロット はいくつかのヒトPca を同定する
AM-2 分子量 36 kD pI 8.33	ペプチド 1 NLDLDSIIAEVK (配列番号: 8)		ポリクローナル (2D) 不良		

【図2】

タンパク質	分子量 (kD)	PI
NDP-1	95	6.74
NDP-2	57	8.33
NDP-3	57	8.0
NDP-4	47	5.26
NDP-5	47	5.80
NDP-6	41	6.83
NDP-7	37.2	7.05
NDP-8	36.9	7.35
NDP-9	35	6.25
NDP-10	32.5	5.46
G-1	55	6.48
G-2	52	6.93

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/28498		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53		
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 C12N C07K 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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KONETY B R ET AL: "Characterization of a metastatic Dunning rat prostate tumor specific nuclear matrix protein (NMP) AM-1." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 37, 1996, page 73 XP002172068 87th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Washington, D.C., USA; April 20-24, 1996, 1996 ISSN: 0197-016X see abstract #507 abstract --- -/--	1-4, 27-29, 32,33,39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 July 2001	Date of mailing of the international search report 25. 10. 01	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5318 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Oderwald, R	

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/28498

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 18222 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 18 August 1994 (1994-08-18) cited in the application the whole document	
A	--- PARTIN A W ET AL: "NUCLEAR MATRIX PROTEIN PATTERNS IN HUMAN BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND PROSTATE CANCER" CANCER RESEARCH,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 53, no. 4, 15 February 1993 (1993-02-15), pages 744-746, XP000673445 ISSN: 0008-5472 cited in the application	
A	--- PIENTA K J ET AL: "A COMMON SET OF NUCLEAR MATRIX PROTEINS IN PROSTATE CANCER CELLS" PROSTATE,US,WILEY-LISS, NEW YORK, NY, vol. 23, no. 1, 1993, pages 61-67, XP000197472 ISSN: 0270-4137 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/28498**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 1, 40 and 41 directed to a diagnostic method practised on the human/animal body insofar as in vivo methods are concerned, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 28,29,32,33 comp. (27, 39 part.)

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA 210

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

1. Claims: {1-4, 28, 29, 32, 33 complete}, {27, 39 partially}

A method for determining the presence or absence of a metastatic cell. A purified nuclear matrix protein which is present in metastatic prostate cells but absent in non-metastatic cells comprising AM-1. A method of producing an antibody that differentiates between metastatic and non-metastatic prostate cells comprising AM-1 or a fragment thereof as antigen. An antibody directed against AM-1.

2. Claims: {5, 12, 13, 39-41 partially}, {6, 7 complete}

A purified nuclear matrix protein which is present in cancerous prostate but absent in normal prostate cells comprising D-1. A method of producing an antibody that differentiates between cancerous and normal prostate cells comprising D-1 as an antigen. An antibody directed against D-1. A method of determining the presence or absence of a prostate cancer cell comprising determining the presence of D-1.

3. Claims: {5, 12, 13, 39-41 partially}, {8, 9 complete}

same as invention 2 but comprising D-2.

4. Claims: {5, 12, 13, 39-41 partially}, {10, 11 complete}

same as invention 2 but comprising D-3.

5. Claims: {14, 39 partially}, {15, 25, 26 complete}

A purified nuclear matrix protein that is present in normal prostate cells but absent in cancerous prostate cells comprising NDP-1. An antibody directed against NDP-1.

6. Claims: {14, 39 partially}, {16 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-2.

7. Claims: {14, 39 partially}, {17 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-3.

8. Claims: {14, 39 partially}, {18 complete}

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

same as invention 5 but comprising NDP-4.

9. Claims: {14, 39 partially}, {19 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-5.

10. Claims: {14, 39 partially}, {20 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-6.

11. Claims: {14, 39 partially}, {21 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-7.

12. Claims: {14, 39 partially}, {22 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-8.

13. Claims: {14, 39 partially}, {23 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-9.

14. Claims: {14, 39 partially}, {24 complete}

same as invention 5 but comprising NDP-10.

15. Claims: {27, 39 partially}, {30, 31 complete}

A purified nuclear matrix protein which is present in metastatic prostate cells but absent in non-metastatic prostate cells comprising AM-2. An antibody directed against AM-2.

16. Claims: {34, 37-39 partially}, {35 complete}

A purified nuclear matrix protein which is absent in metastatic prostate cells but present in non-metastatic prostate cells comprising G-1. A method of producing an antibody that differentiates between metastatic and non-metastatic prostate cells comprising G-1 as an antigen. An antibody directed against G-1.

17. Claims: {34, 37-39 partially}, {36 complete}

same as invention 16 but comprising G-2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/28498

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9418222 A	18-08-1994	CA 2155645 A	18-08-1994
		EP 0684955 A	06-12-1995
		JP 8508396 T	10-09-1996
		US 6030793 A	29-02-2000
		US 5824490 A	20-10-1998
		US 5874539 A	23-02-1999
		US 5849509 A	15-12-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト (参考)
// A 6 1 K 31/7088 48/00		A 6 1 K 31/7088 48/00	
A 6 1 P 35/00 35/04		A 6 1 P 35/00 35/04	
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 DA05 DA14 4C084 AA13 MA01 NA14 ZB262 4C086 AA02 EA16 MA01 NA14 ZB26 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA41 DA76 DA86 EA28 EA51 FA71 FA74 HA05 HA06 HA15 HA16 HA17		

专利名称(译)	核基质蛋白，编码它们的多核苷酸序列及其用途		
公开(公告)号	JP2003512391A	公开(公告)日	2003-04-02
申请号	JP2001532201	申请日	2000-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学		
申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学		
[标]发明人	ゲッツエンバーグロバートエイチ		
发明人	ゲッツエンバーグ ロバート エイチ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/32 C12N15/12 C12P21/08 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/04 C07K14/47		
FI分类号	C07K14/82.ZNA C07K16/32 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/574.A A61K31/7088 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA05 4B064/DA14 4C084/AA13 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/FA74 4H045/HA05 4H045/HA06 4H045/HA15 4H045/HA16 4H045/HA17		
优先权	09/418839 1999-10-15 US		
其他公开文献	JP2003512391A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供核基质蛋白 (NMP) ，其特征在于在组织 (尤其是前列腺组织) 中的明确表达。 这些NMP是诊断和监测细胞恶性阶段以及治疗NMP相关细胞增殖性疾病的有用标志物。 还提供了基本上纯化的编码本发明NMP的多肽和核苷酸序列。

タンパク質名	タンパク質配列	特異性	抗体	アッセイ反応性	注
D-1 分子量 63 kD pI 8.55	配列番号 1 ITGLNMVEM (配列番号: 1) 配列番号 2 YGPQYGHPPPPP PPDYGPHADSPV (配列番号: 2) 配列番号 3 IQHPSNVLHFFN APLEYTEENFEE I (配列番号: 3)	なし	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。	?
D-2 分子量 40 kD pI 5.91	配列番号 4 DESTLQGF (配列番号: 4) 配列番号 5 ALQDKV (配列番号: 5)	なし	なし	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。
D-3 分子量 33 kD pI 6.97	配列番号 7 RL??TKPMVNL IK (配列番号: 6)	なし	なし	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。
AM-1 分子量 40 kD pI 6.73	配列番号 7 VSNTPLQGVET K (配列番号: 7)	なし	なし	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。
AM-2 分子量 36 kD pI 8.33	配列番号 7 NLDLDSIAEVK (配列番号: 8)	なし	なし	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。	抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。 抗 haRNP L* の抗体は、NMPの組織発現と特異的親和性を示す。