

(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2013-539534

(P2013-539534A)

(43) 公表日 平成25年10月24日(2013.10.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A Z	2 G O 5 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B O 6 3
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 B O 6 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-522291 (P2013-522291)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月4日 (2011.8.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月29日 (2013.3.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/001173
 (87) 国際公開番号 W02012/017208
 (87) 国際公開日 平成24年2月9日 (2012.2.9)
 (31) 優先権主張番号 61/442, 823
 (32) 優先日 平成23年2月15日 (2011.2.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/372, 981
 (32) 優先日 平成22年8月12日 (2010.8.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/370, 479
 (32) 優先日 平成22年8月4日 (2010.8.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

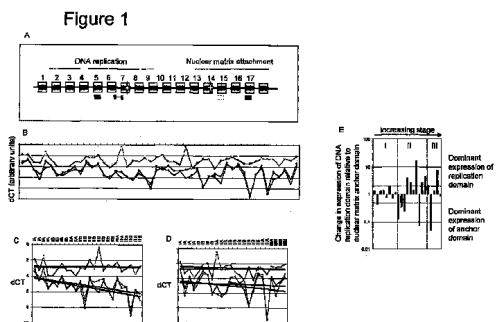
(71) 出願人 513025956
 シズル バイオテクノロジー リミテッド
 英国 ノース ヨークシャー ヨーク ハ
 スリントン ヘスリントン ホール
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断および処置のための方法および化合物

(57) 【要約】

本発明は、ガンの診断および予後判定における使用のための方法を提供する。本発明は、例えば、そのような方法における使用のための結合剤およびキットをさらに提供する。本発明はさらに、組成物、前記組成物を作製する方法、ならびに、それを使用する方法であって、肺ガン、リンパ腫、肝臓ガン、甲状腺ガン、および膀胱ガンを含むガンの処置および診断における使用を含む、方法に関する。ガンの処置において有用な本発明の組成物は、アンチセンスおよび低分子の阻害性RNA (siRNA) を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象においてガンを診断する方法であって、以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが該試料中に存在するか否かを検出する工程

を含み、該Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在が、該対象がガンを有することを示す、方法。

【請求項 2】

ガンが、肺ガン、リンパ腫、腎臓ガン、乳ガン、肝臓ガン、膀胱ガン、および甲状腺ガンより選択される、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

対象における肺ガンの早期検出のための方法であって、以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが該試料中に存在するか否かを検出する工程

を含み、該試料中の該Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在が、対象がガンを有することを示す、方法。

【請求項 4】

肺ガンに関して以前に処置された対象における肺ガン再発の検出のための方法であって、以下：

- i) 該対象由来の、試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが該試料中に存在するか否かを検出する工程

を含み、該試料中の該Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在が、該対象における肺ガンの再発を示す、方法。

20

【請求項 5】

肺結節を伴う対象においてガンを診断する方法であって、以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが該試料中に存在するか否かを検出する工程

を含み、該試料中の該Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在が、対象がガンを有することを示す、方法。

【請求項 6】

肺炎または肺ガンのいずれかを有することが疑われる対象において肺ガンを肺炎から鑑別診断する方法であって：

- i) 該対象由来の、試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが該試料中に存在するか否かを検出する工程

を含み、該試料中の該Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在が、対象がガンを有することを示す、方法。

30

【請求項 7】

ガンが、非小細胞肺ガン（NSCLC）である、請求項 1～6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

肺ガンが、小細胞肺ガン（SCLC）である、請求項 1～6 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 9】

肺ガンが、ステージ0のNSCLCである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

肺ガンが、ステージIAのNSCLCである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

肺ガンが、ステージIBのNSCLCである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】

肺ガンが、限定されたステージのSCLCである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 13】

肺結節が、直径約20mm未満である、請求項 5 記載の方法。

50

- 【請求項 14】
肺結節が、約15mm未満である、請求項 13 記載の方法。
- 【請求項 15】
肺結節が、10mm未満または約10mmである、請求項 14 記載の方法。
- 【請求項 16】
肺結節が、約7.5mm未満である、請求項 15 記載の方法。
- 【請求項 17】
肺結節が、約5mm～約10mmの間である、請求項 16 記載の方法。
- 【請求項 18】
対象の肺を撮像する工程を含む、請求項 1～17のいずれか一項記載の方法。 10
- 【請求項 19】
撮像が、胸部X線、コンピューター断層撮影（CT）スキャン、磁気共鳴イメージング（MRI）スキャン、または陽電子放射断層撮影（PET）スキャンを実施する工程をさらに含み、該撮像が、単独ではガンの該診断のためには不十分である、請求項 18 記載の方法。
- 【請求項 20】
撮像が、胸部X線を実施する工程を含む、請求項 19 記載の方法。
- 【請求項 21】
撮像が、コンピューター断層撮影（CT）スキャンを実施する工程を含む、請求項 19 記載の方法。
- 【請求項 22】 20
CTスキャンが、低線量ヘリカルコンピューター断層撮影CTスキャンである、請求項 21 記載の方法。
- 【請求項 23】
撮像が、MRIスキャンを実施する工程を含む、請求項 19 記載の方法。
- 【請求項 24】
撮像が、PETスキャンを実施する工程を含む、請求項 19 記載の方法。
- 【請求項 25】
肺ガンに関して処置された対象においてガン細胞死を示す方法であって、以下：
i) 該処置の前後に、該対象由来の、試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程； 30
ii) 該処置の前後に、該生物学的試料中に存在する該Ciz1 b変異体ポリペプチドの量を測定する工程
を含み、処置後の該Ciz1 b変異体ポリペプチドの量の増加が、腫瘍細胞死を示す、方法。
- 【請求項 26】
Ciz1 b変異体ポリペプチドが、アミノ酸配列
DEEEIEVRSRDIS (SEQ ID NO: 8)
- を含む、請求項 1～25のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 27】
Ciz1 b変異体ポリペプチドが、SEQ ID NO:22のアミノ酸配列を含む、請求項 26 記載の方法。 40
- 【請求項 28】
生物学的試料が、組織、血液、血漿、喀痰、気管支肺胞洗浄液、気管支肺胞擦過物または尿である、請求項 1～27のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 29】
生物学的試料が、組織である、請求項 28 記載の方法。
- 【請求項 30】
組織が、肺組織である、請求項 29 記載の方法。
- 【請求項 31】
生物学的試料が、血液である、請求項 28 記載の方法。 50

- 【請求項 3 2】
生物学的試料が、単離されたCTCである、請求項 3 1 記載の方法。
- 【請求項 3 3】
生物学的試料が、血漿である、請求項 2 8 記載の方法。
- 【請求項 3 4】
生物学的試料が、喀痰である、請求項 2 8 記載の方法。
- 【請求項 3 5】
生物学的試料が、気管支肺胞洗浄液である、請求項 2 8 記載の方法。
- 【請求項 3 6】
生物学的試料が、尿である、請求項 2 8 記載の方法。 10
- 【請求項 3 7】
Ciz1 b変異体ポリペプチドが、細胞外にある、請求項 1 ~ 2 9 および 3 3 ~ 3 6 のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 3 8】
生物学的試料 100 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 3 3 記載の方法。
- 【請求項 3 9】
生物学的試料 50 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 3 8 記載の方法。 20
- 【請求項 4 0】
生物学的試料 25 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 3 9 記載の方法。 20
- 【請求項 4 1】
生物学的試料 10 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 0 記載の方法。
- 【請求項 4 2】
生物学的試料 5 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 0 記載の方法。
- 【請求項 4 3】
生物学的試料 1 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 1 記載の方法。 30
- 【請求項 4 4】
生物学的試料 0.5 ~ 5 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 1 記載の方法。
- 【請求項 4 5】
生物学的試料 0.25 ~ 5 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 1 記載の方法。
- 【請求項 4 6】
生物学的試料 0.25 ~ 2 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 1 記載の方法。 40
- 【請求項 4 7】
生物学的試料 0.5 ~ 1.5 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 1 記載の方法。
- 【請求項 4 8】
生物学的試料 約1 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する、請求項 4 1 記載の方法。
- 【請求項 4 9】
生物学的試料をCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤と接触させる工程をさらに含む、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 5 0】 50

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項49記載の方法。

【請求項51】

抗体が、ポリクローナルである、請求項50記載の方法。

【請求項52】

抗体が、モノクローナルである、請求項50記載の方法。

【請求項53】

抗原結合フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはsdAbより選択される、請求項50記載の方法。

【請求項54】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、核酸アプタマーである、請求項49記載の方法。

【請求項55】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、ペプチドアプタマーである、請求項49記載の方法。

【請求項56】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、ペプチド模倣体である、請求項49記載の方法。

【請求項57】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、アミノ酸配列 SEQ ID NO:22を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項49～56のいずれか一項記載の方法。

【請求項58】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項57記載の方法。

【請求項59】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、エクソン14bおよび15にまたがるエピトープに特異的に結合する、請求項57記載の方法。

【請求項60】

結合剤が、少なくとも100倍上回る親和性で、SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を含むCiz1ポリペプチドよりも、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項58記載の方法。

【請求項61】

結合剤が、少なくとも1,000倍上回る親和性で、Ciz1ポリペプチドよりも、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項60記載の方法。

【請求項62】

結合剤が、少なくとも10,000倍上回る親和性で、Ciz1ポリペプチドよりも、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項60記載の方法。

【請求項63】

結合剤が、SEQ ID NO:23のアミノ酸配列に特異的に結合しない、請求項49～62のいずれか一項記載の方法。

【請求項64】

生物学的試料を第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤と接触させる工程をさらに含み、該第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、エクソン14bおよび15にまたがるエピトープ以外のエピトープを認識する、請求項49～63のいずれか一項記載の方法。

【請求項65】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項64記載の方法。

【請求項66】

抗体が、ポリクローナルである、請求項65記載の方法。

【請求項67】

抗体が、モノクローナルである、請求項65記載の方法。

【請求項68】

10

20

30

40

50

抗原結合フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはsdAbより選択される、請求項 6 5 記載の方法。

【請求項 6 9】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、核酸アプタマーである、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 7 0】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、ペプチドアプタマーである、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 7 1】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、ペプチド模倣体である、請求項 6 4 記載の方法。

10

【請求項 7 2】

Ciz1 b変異体ポリペプチドを固体支持体上に固定化する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 7 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7 3】

固体支持体が、ビーズである、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

固体支持体が、マイクロタイタープレートである、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 5】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤を固体支持体上に固定化する工程をさらに含む、請求項 6 4 ~ 7 4 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 7 6】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤の結合によって、それに結合する場合にCiz1 b変異体ポリペプチドを固体支持体上に固定化する、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 7】

サンドイッチアッセイである、請求項 1 ~ 7 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7 8】

サンドイッチイムノアッセイである、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】

ELISAである、請求項 1 ~ 7 8 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 8 0】

Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、単離されたCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤。

【請求項 8 1】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、アミノ酸配列 SEQ ID NO:22を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項 8 0 記載の結合剤。

【請求項 8 2】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項 8 1 記載の結合剤。

【請求項 8 3】

Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、エクソン14bおよび15にまたがるエピトープに特異的に結合する、請求項 8 0 記載の結合剤。

40

【請求項 8 4】

少なくとも100倍上回る親和性で、SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を含むCiz1 ポリペプチドよりも、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項 8 2 記載の結合剤。

【請求項 8 5】

少なくとも1,000倍上回る親和性で、Ciz1 ポリペプチドよりも、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項 8 4 記載の結合剤。

【請求項 8 6】

50

少なくとも10,000倍上回る親和性で、Ciz1 ポリペプチドよりも、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、請求項 8 4 記載の結合剤。

【請求項 8 7】

SEQ ID NO:23のアミノ酸配列に特異的に結合しない、請求項 8 0 ~ 8 6 のいずれか一項記載の結合剤。

【請求項 8 8】

結合剤が、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 8 0 ~ 8 7 のいずれか一項記載のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤。

【請求項 8 9】

ポリクローナルである、請求項 8 8 記載の抗体。

10

【請求項 9 0】

モノクローナルである、請求項 8 8 記載の抗体。

【請求項 9 1】

Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはsdAbより選択される、請求項 8 8 記載の抗原結合フラグメント。

【請求項 9 2】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、核酸アプタマーである、請求項 8 0 ~ 8 7 のいずれか一項記載のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤。

【請求項 9 3】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、ペプチドアプタマーである、請求項 8 0 ~ 8 7 のいずれか一項記載のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤。

20

【請求項 9 4】

第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤が、ペプチド模倣体である、請求項 8 0 ~ 8 7 のいずれか一項記載のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤。

【請求項 9 5】

請求項 8 0 ~ 9 1 のいずれか一項記載のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤を発現する、単離された細胞。

【請求項 9 6】

Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する、単離されたヒト自己抗体。

【請求項 9 7】

対象においてガンを診断する方法であって、以下：

30

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) Ciz1 b変異体転写物が該生物学的試料中に存在するか否かを決定する工程

を含み、該Ciz1 b変異体転写物の存在が、該生物学的試料中でのガン細胞の存在を示す、方法。

【請求項 9 8】

Ciz 1複製ドメインとCiz 1固定化ドメインの発現を比較することによって、対象においてガンを診断する方法であって、以下：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程；

iii) Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程

40

；

iv) 該Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む該mRNAに対する該Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む該mRNAの相対的な発現レベルを比較する工程

を含み、相対的な発現における少なくとも2倍の差が、ガン細胞の存在を示す、方法。

【請求項 9 9】

Ciz 1複製ドメインを含むポリペプチドと、Ciz 1固定化ドメインを含むポリペプチドの発現を比較することによって、対象においてガンを診断する方法であって、以下：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

50

ii) 該Ciz 1複製ドメインおよび該Ciz 1固定化ドメインを検出する工程；

iii) 該試料中に存在する該Ciz 1固定化ドメインに対する該Ciz 1複製ドメインの相対的レベルを比較する工程

を含み、Ciz 1複製ドメインと該Ciz 1固定化ドメインの相対的レベルにおける2倍超の差が、ガンの存在を示す、方法。

【請求項100】

Ciz 1複製ドメインとCiz 1固定化ドメインの発現を比較することによって、ガン患者の予後を示すための方法であって、以下：

i) 試験に供する単離された生物学的固形組織試料を提供する工程であって、該組織が固形腫瘍に隣接している、工程；

ii) Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程；

iii) Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程；

iv) 該Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む該mRNAと、該Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む該mRNAの相対的な発現レベルを比較する工程

を含み、相対的レベルにおける少なくとも2倍の差が、より不良な予後を示す、方法。

【請求項101】

Ciz 1複製ドメインを含むポリペプチドと、Ciz 1固定化ドメインを含むポリペプチドの発現を比較することによって、ガン患者の予後を示すための方法であって、以下：

i) 試験に供する単離された生物学的固形組織試料を提供する工程であって、該組織が固形腫瘍に隣接している、工程；

ii) 該組織試料中の該Ciz 1複製ドメインおよび該Ciz1固定化ドメインを検出する工程；

iii) 該試料中に存在する該Ciz 1複製ドメインと該Ciz1固定化ドメインの相対的レベルを比較する工程

を含み、該Ciz 1固定化ドメインに対するCiz 1複製ドメインの相対的レベルにおける2倍超の差が、より不良な予後を示す、方法。

【請求項102】

対象におけるガンの診断または予後判定のための方法であって、以下：

(a) 対象に由来する生物学的試料中のCiz1タンパク質を定量的に検出する工程；および

(b) 対象の試料中で検出された該Ciz1タンパク質のレベルと、対照試料中で検出されたタンパク質のレベルを比較する工程

を含み、対照試料と比較した、対象の試料中で検出されたCiz1タンパク質のレベルの増加が、ガンを伴う対象の指標である、方法。

【請求項103】

生物学的試料中の抗Ciz1抗体を検出するための方法であって、以下：

(a) 抗Ciz1抗体を含む試料を、Ciz1タンパク質抗原を含む試料と、免疫特異的な抗原-抗体結合反応が生じうるような条件下で接触させる工程；および

(b) 試料中でのCiz1タンパク質への抗Ciz1抗体の免疫特異的な結合を検出する工程を含む、方法。

【請求項104】

試料中の抗Ciz1抗体を検出する工程が、試料中の抗Ciz1抗体に対して特異的である抗体に結合しているシグナル生成成分を使用することを含む、請求項103記載の方法。

【請求項105】

試料中の抗Ciz1抗体の存在が、イムノアッセイによって測定され、以下：

(a) 固体基質上に1つまたは複数のCiz1タンパク質を固定化する工程；

(b) 固体基質と試料を接触させる工程；および

(c) 試料中の、Ciz1タンパク質に対して特異的な抗Ciz1抗体の存在を検出する工程を

10

20

30

40

50

含む、請求項103記載の方法。

【請求項106】

生物学的試料中のCiz1ポリペプチドの存在を検出するための成分を含む、対象におけるガンの診断および予後判定のためのキット。

【請求項107】

Ciz1ポリペプチドの存在を検出するための成分が、Ciz1結合剤である、請求項106記載のキット。

【請求項108】

Ciz1ポリペプチドが、Ciz1 b変異体ポリペプチドである、請求項106記載のキット。

【請求項109】

Ciz1ポリペプチドを検出するための成分が、抗Ciz1抗体である、請求項106～108のいずれか一項記載のキット。

【請求項110】

抗Ciz1抗体が標識された、請求項109記載のキット。

【請求項111】

標識が、放射性、蛍光、比色、または酵素標識である、請求項110記載のキット。

【請求項112】

抗Ciz1抗体に免疫特異的に結合する標識二次抗体をさらに含む、請求項109記載のキット。

【請求項113】

生物学的試料中の抗Ciz1抗体の存在を検出するための成分を含む、生物学的試料中の該抗Ciz1自己抗体の存在を検出するためのキット。

【請求項114】

成分が、Ciz1抗原である、請求項113記載のキット。

【請求項115】

Ciz1抗原が標識された、請求項114記載のキット。

【請求項116】

Ciz1抗原が固相に連結された、請求項113または114記載のキット。

【請求項117】

Ciz1 b変異体mRNAを標的とする、単離されたアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNA。

【請求項118】

請求項117記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNAまたはshRNA、および薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項119】

アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAが、エクソン14b及び15の接合部にまたがるCiz1のヌクレオチド配列を介してCiz1 b変異体mRNAを標的とする、請求項118記載の薬学的組成物。

【請求項120】

細胞においてCiz1 b変異体mRNAの発現を低下させる方法であって、b変異体mRNAを発現する細胞を、b変異体mRNAを低下させる量の請求項117記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAと接触させる工程を含む、方法。

【請求項121】

哺乳動物においてb変異体mRNAの発現を低下させる方法であって、哺乳動物に、b変異体mRNAを低下させる量の請求項117記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAを含む組成物を投与する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

10

20

30

40

50

本願は、米国仮出願61/370,479（2010年8月4日出願）、米国仮出願61/372,981（2010年8月12日出願）、および米国仮出願61/442,823（2011年2月15日出願）の優先権の利益を主張する。本願はまた、PCT/GB2010/000204（2010年2月5日出願）の一部継続であり、それは、同様に、GB出願0901837.5（2009年2月5日出願）の優先権の利益を主張する。

【0002】

参照による組み入れ

米国仮出願第61/370,479号、第61/372,981号、および第61/442,823号、PCT出願PCT/GB2010/000204およびGB出願第0901837.5号は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

背景

Cip1相互作用ジンクフィンガータンパク質1 (Ciz1) (NCBI Reference Sequence : NM_01131016.1) は、細胞増殖のために必要である。Ciz1は、DNA複製部位をS期初期の間に形成する核マトリクス結合フォーカスに局在し、かつサイクリンA/CDK2、サイクリンE/CDK2、およびp21cip1を含む細胞周期調節因子と関連してDNA複製の開始を促す。転写との関連においては、CIZ1それ自体がエストロゲン受容体 (ER) のポジティブなコファクターであるエストロゲン応答遺伝子であり、クロマチンを標的とするERの動員を増強することが可能である。Ciz1は選択的にスプライシングされ、マウスおよびヒトにおいて保存されたアイソフォームを産生する。正常なCiz1タンパク質は、少なくとも2つの定義された機能的なドメインである「複製」ドメインおよび「固定化」ドメインを含む。

【0004】

本発明は、部分的に、小細胞肺ガン (SCLC)、非小細胞肺ガン (NSCLC)、リンパ腫、甲状腺ガン、腎臓ガン、および肝臓ガンを含むガンにおけるCiz1エクソン14の選択的スプライシングの発見に関する。本発明はさらに、NSCLC、乳ガン、結腸ガン、腎臓ガン、肝臓ガン、膀胱ガン、および甲状腺ガンを含むガンにおける複製ドメインまたは固定化ドメインのいずれかの過剰発現の発見、ならびにドメイン発現とガンのステージとの相関に関する。本発明は、Ciz1遺伝子発現におけるこれらの分子の異常に基づく新規バイオマーカーおよび標的を介して、肺ガンなどのガンに罹患した患者の生存率を改善させる診断用の試験および処置を開発するための継続的な必要性に対処する。

【発明の概要】

【0005】

概要

一局面において、本発明は、対象においてガンを診断する方法に関し、この方法は以下：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが試料中に存在するか否かを検出する工程

を含み、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、対象がガンを有することを示す。

【0006】

一態様において、ガンは、肺ガン、リンパ腫、腎臓ガン、乳ガン、肝臓ガン、膀胱ガン、および甲状腺ガンより選択される。

【0007】

一局面において、本発明は、対象における肺ガンの早期検出のための方法に関し、この方法は以下：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが試料中に存在するか否かを検出する工程

を含み、試料中の前記Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、対象がガンを有することを示す。

【0008】

10

20

30

40

50

一局面において、本発明は、肺ガンに関して以前に処置された対象における肺ガン再発の検出のための方法に関し、この方法は以下：

- i) 対象由来の、試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
 - ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが試料中に存在するか否かを検出する工程
- を含み、試料中の前記Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、対象における肺ガンの再発を示す。

【0009】

一局面において、本発明は、肺結節を伴う対象においてガンを診断する方法に関し、この方法は以下：

- iii) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
 - iv) Ciz1 b変異体ポリペプチドが試料中に存在するか否かを検出する工程
- を含み、試料中のCiz1 b変異体ポリペプチドの存在は、対象がガンを有することを示す。

【0010】

一局面において、本発明は、肺炎または肺ガンのいずれかを有することが疑われる対象において肺ガンを肺炎から鑑別診断する方法に関し：

- i) 対象由来の、試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドが試料中に存在するか否かを検出する工程、であり、試料中のCiz1 b変異体ポリペプチドの存在は、対象がガンを有することを示す。

【0011】

本発明の方法の一態様において、ガンは非小細胞肺ガン(NSCLC)である。別の態様において、肺ガンは小細胞肺ガン(SCLC)である。別の態様において、肺ガンはステージ0のNSCLCである。別の態様において、肺ガンはステージIAのNSCLCである。別の態様において、肺ガンはステージIBのNSCLCである。別の態様において、肺ガンは限定されたステージのSCLCである。

【0012】

方法の一態様において、肺結節は直径約20mm未満である。別の態様において、肺結節は約15mm未満である。別の態様において、肺結節は10mm未満または約10mmである。別の態様において、肺結節は約7.5mm未満である。別の態様において、肺結節は約5mm～約10mmの間である。

【0013】

一態様において、方法は、対象の肺を撮像する工程を含む。別の態様において、撮像は、胸部X線、コンピューター断層撮影(CT)スキャン、磁気共鳴イメージング(MRI)スキャン、または陽電子放射断層撮影(PET)スキャンを実施する工程をさらに含み、前記撮像は、それ単独ではガンの前記診断のためには不十分である。別の態様において、撮像は、胸部X線を実施する工程を含む。別の態様において、撮像は、コンピューター断層撮影(CT)スキャンを実施する工程を含む。別の態様において、CTスキャンは、低線量ヘリカルコンピュータ断層撮影CTスキャンである。別の態様において、撮像は、MRIスキャンを実施する工程を含む。別の態様において、撮像は、PETスキャンを実施する工程を含む。

【0014】

一局面において、本発明は、肺ガンに関して処置された対象においてガン細胞死を示す方法に関し、この方法は以下：

- i) 処置の前後に、対象由来の、試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
 - ii) 処置の前後に、生物学的試料中に存在する前記Ciz1 b変異体ポリペプチドの量を測定する工程
- を含み、処置後の前記Ciz1 b変異体ポリペプチドの量の増加は、腫瘍細胞死を示す。

【0015】

方法の一態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチドは、アミノ酸配列DEEEIEVRSRDIS (SEQ ID NO:8)を含む。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチドは、SEQ ID NO:22のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0016】

方法の一態様において、生物学的試料は、組織、血液、血漿、喀痰、気管支肺胞洗浄液、または尿である。別の態様において、生物学的試料は組織である。別の態様において、生物学的試料は肺組織である。別の態様において、生物学的試料は血液である。別の態様において、生物学的試料は単離されたCTCである。別の態様において、生物学的試料は血漿である。別の態様において、生物学的試料は喀痰である。別の態様において、生物学的試料は気管支肺胞洗浄液である。別の態様において、生物学的試料は尿である。本発明の方法の一態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチドは細胞外にある。

【0017】

方法の一態様において、生物学的試料100 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料50 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料25 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料10 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料5 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料1 μ L未満を、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料0.5~5 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料の0.25~5 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料の0.25~2 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料0.5~1.5 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。別の態様において、生物学的試料約1 μ Lを、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在について試験する。

【0018】

一態様において、方法は、生物学的試料をCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤と接触させる工程をさらに含む。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は抗体またはその抗原結合フラグメントである。別の態様において、抗体はポリクローナルである。別の態様において、抗体はモノクローナルである。別の態様において、抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはsdAbより選択される。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は核酸アプタマーである。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤はペプチドアプタマーである。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤はペプチド模倣体である。

【0019】

方法の一態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、アミノ酸配列SEQ ID NO:22を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、エクソン14bおよび15にまたがるエピトープに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、少なくとも100倍上回る親和性で、SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を含むCiz1 ポリペプチドよりもSEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、少なくとも1,000倍上回る親和性で、Ciz1 ポリペプチドよりも前記Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、少なくとも10,000倍上回る親和性で、Ciz1 ポリペプチドよりもCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、SEQ ID NO:23のアミノ酸配列に特異的に結合しない。

【0020】

一態様において、方法は、生物学的試料を第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤と接触させる工程を含み、この第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、エクソン14bおよび15にまたがるエピトープ以外のエピトープを認識する。別の態様において、第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤は抗体またはその抗原結合フラグメントである。別の態様において、抗体はポリクローナルである。別の態様において、抗体はモノクローナルである。

別の態様において、抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはsdAbより選択される。別の態様において、第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤は核酸アプタマーである。別の態様において、第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤はペプチドアプタマーである。別の態様において、第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤はペプチド模倣体である。

【0021】

一態様において、方法は、Ciz1 b変異体ポリペプチドを固体支持体上に固定化する工程をさらに含む。別の態様において、固体支持体はビーズである。別の態様において、固体支持体はマイクロタイプレートである。別の態様において、第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤を固体支持体上に固定化する工程をさらに含む。別の態様において、第2のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、それに結合する場合、Ciz1 b変異体ポリペプチドを固体支持体上に固定化する。別の態様において、方法はサンドイッチアッセイである。別の態様において、方法はサンドイッチイムノアッセイである。別の態様において、方法はELISAである。

10

【0022】

一局面において、本発明は、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する単離Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤に関する。

【0023】

一態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、アミノ酸配列 SEQ ID NO:22を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、Ciz1 b変異体ポリペプチド結合剤は、エクソン14bおよび15にまたがるエピトープに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、少なくとも100倍上回る親和性で、SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を含むCiz1 ポリペプチドよりもSEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、少なくとも1,000倍上回る親和性で、Ciz1 ポリペプチドよりもCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、少なくとも10,000倍上回る親和性で、Ciz1 ポリペプチドよりもCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。別の態様において、結合剤は、SEQ ID NO:23のアミノ酸配列に特異的に結合しない。別の態様において、結合剤は単離抗体またはその抗原結合フラグメントである。別の態様において、抗体はポリクローナルである。別の態様において、抗体はモノクローナルである。別の態様において、抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはsdAbより選択される。別の態様において、結合剤は核酸アプタマーである。別の態様において、結合剤はペプチド模倣体である。

20

30

【0024】

一局面において、本発明は、本発明のCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤を発現する単離細胞に関する。

【0025】

一局面において、本発明は、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する単離ヒト自己抗体に関する。

40

【0026】

一局面において、本発明は、対象においてガンを診断する方法に関し、以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz1 b変異体転写物が前記の生物学的試料中に存在するか否かを決定する工程を含み、Ciz1 b変異体転写物の存在が、生物学的試料中でのガン細胞の存在を示す。

【0027】

一局面において、本発明は、Ciz 1複製ドメインとCiz 1固定化ドメインの発現を比較することによって、対象においてガンを診断する方法に関し、この方法は以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

50

- ii) Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程；
- iii) Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程

；

iv) Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAと、Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAの相対的な発現レベルを比較する工程を含み、相対的な発現における少なくとも2倍の差は、ガン細胞の存在を示す。

【0028】

一局面において、本発明は、Ciz 1複製ドメインを含むポリペプチドと、Ciz 1固定化ドメインを含むポリペプチドの発現を比較することによって、対象においてガンを診断する方法に関し、この方法は以下：

10

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz 1複製ドメインおよびCiz 1固定化ドメインを検出する工程；
- iii) 前記試料中に存在するCiz 1固定化ドメインに対するCiz 1複製ドメインの相対的レベルを比較する工程

を含み、Ciz 1複製ドメインとCiz 1固定化ドメインの相対的レベルにおける2倍超の差は、ガンの存在を示す。

【0029】

一局面において、本発明は、Ciz 1複製ドメインとCiz 1固定化ドメインの発現を比較することによって、ガン患者の予後を示すための方法に関し、この方法は以下：

20

- i) 試験に供する単離された生物学的固形組織試料を提供する工程であって、組織が固形腫瘍に隣接している、工程；
- ii) Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程；
- iii) Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAを検出する工程

；

iv) Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAと、Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAの相対的な発現レベルを比較する工程を含み、相対的発現における少なくとも2倍の差は、より不良な予後を示す。

【0030】

一局面において、本発明は、Ciz 1複製ドメインを含むポリペプチドと、Ciz 1固定化ドメインを含むポリペプチドの発現を比較することによって、ガン患者の予後を示すための方法に関し、この方法は以下：

30

- i) 試験に供する単離された生物学的固形組織試料を提供する工程であって、組織が固形腫瘍に隣接している、工程；
- ii) 組織試料中のCiz 1複製ドメインおよびCiz1固定化ドメインを検出する工程；
- iii) 試料中に存在するCiz 1複製ドメインとCiz1固定化ドメインの相対的レベルを比較する工程

を含み、Ciz 1固定化ドメインに対するCiz 1複製ドメインの相対的レベルにおける2倍超の差は、より不良な予後を示す。

【0031】

一局面において、本発明は、対象におけるガンの診断または予後判定のための方法に関し、以下の工程：

40

(a) 対象に由来する生物学的試料中のCiz1タンパク質を定量的に検出する工程；および

(b) 対象の試料中で検出されたCiz1タンパク質のレベルと、対照試料中で検出されたタンパク質のレベルを比較する工程を含み、対照試料と比較した、対象の試料中で検出されたCiz1タンパク質のレベルの増加は、ガンを伴う対象の指標である。

【0032】

一局面において、本発明は、生物学的試料中の抗Ciz1抗体を検出するための方法に関し、以下：

50

(a) 抗Ciz1抗体を含む試料を、Ciz1タンパク質抗原を含む試料と、免疫特異的な抗原-抗体結合反応が生じうるような条件下で接触させる工程；および

(b) 試料中でのCiz1タンパク質への抗Ciz1抗体の免疫特異的な結合を検出する工程を含む。

【0033】

一態様において、方法は、試料中の抗Ciz1抗体を検出する工程を含み、試料中の抗Ciz1抗体に対して特異的である抗体に結合しているシグナル生成成分を使用することを含む。別の態様において、試料中の抗Ciz1抗体の存在は、イムノアッセイによって測定され、以下：

(a) 固体基質上に1つまたは複数のCiz1タンパク質を固定化する工程；

(b) 固体基質と試料を接触させる工程；および

(c) 試料中の、Ciz1タンパク質に対して特異的な抗Ciz1抗体の存在を検出する工程を含む。

【0034】

一局面において、本発明は、生物学的試料中のCiz1ポリペプチドの存在を検出するための成分を含む、対象におけるガンの診断および予後判定のためのキットに関する。キットの一態様において、Ciz1ポリペプチドの存在を検出するための成分は、Ciz1結合剤である。別の態様において、Ciz1ポリペプチドはCiz1 b変異体ポリペプチドである。別の態様において、Ciz1ポリペプチドを検出するための成分は抗Ciz1抗体である。別の態様において、抗Ciz1抗体を標識する。別の態様において、標識は、放射性、蛍光、比色、または酵素標識である。別の態様において、キットは、抗Ciz1抗体に免疫特異的に結合する標識二次抗体を含む。

【0035】

一局面において、本発明は、生物学的試料中の抗Ciz1抗体の存在を検出するための成分を含む、生物学的試料中の抗Ciz1自己抗体の存在を検出するためのキットに関する。キットの一態様において、成分はCiz1抗原である。別の態様において、Ciz1抗原を標識する。別の態様において、Ciz1抗原を固相に連結する。

【0036】

本発明はさらに、組成物、組成物を作製する方法、および組成物を使用する方法に関し、ガンの処置および診断における使用を含む。

【0037】

一局面において、本発明は、本明細書においてエクソン14b (SEQ ID NO:3) と称すエクソン14の変異体を含む、Ciz1のmRNAを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAまたはshRNAに関する。Ciz1エクソン14bは、エクソン14a (SEQ ID NO:1) と称す完全長エクソン14と比較して、3'末端の24ヌクレオチドを欠く。エクソン14a (a変異体) よりはむしろエクソン14bを発現するCiz1転写物を、Ciz1 b変異体または単純にb変異体と称す。

【0038】

本発明の種々の局面は、細胞においてb変異体転写物の発現を低下させるのに適した化合物を提供する。

【0039】

一局面において、本発明は、エクソン14bおよび15の接合部にまたがるCiz1のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26) を介してCiz1 b変異体転写物を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

【0040】

別の局面において、本発明は、エクソン14bおよび15の接合部にまたがるCiz1のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26) を介してCiz1 b変異体転写物を標的とするsiRNAまたはshRNAを提供する。

【0041】

別の局面において、本発明は、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組

10

20

30

40

50

成物を提供する。

【0042】

別の局面において、本発明は、本発明によるsiRNAまたはshRNAを含む組成物を提供する。

【0043】

別の局面において、本発明は、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を提供する。

【0044】

別の局面において、本発明は、本発明によるsiRNAまたはshRNAと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を提供する。

10

【0045】

別の局面において、本発明は、b変異体転写物を発現する細胞を、b変異体を低下させる量の本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAと接触させる工程を含む、細胞においてb変異体転写物の発現を低下させる方法を提供する。別の局面において、本発明は、哺乳動物に、b変異体を低下させる量の本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAを含む組成物を投与する工程を含む、非ヒト哺乳動物においてb変異体転写物の発現を低下させる方法を提供する。

【0046】

別の局面において、本発明は、ヒトに、b変異体を低下させる量の本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAを含む組成物を投与する工程を含む、ヒトにおいてb変異体転写物の発現を低下させる方法を提供する。

20

【0047】

一態様において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAは、ヒトまたはヒト細胞においてCiz1 b変異体転写物の発現を低下させるが、エクソン14aを含むCiz1転写物は低下させない。別の局面において、本発明は、b変異体転写物を検出する方法を提供し、この方法は、b変異体転写物を、前記b変異体転写物の全てまたは一部と相補的な核酸と、前記b変異体転写物と核酸の間でのハイブリダイゼーションが生じるために適した条件下で接触させる工程、および前記b変異体転写物に結合した核酸を検出する工程を含む。一態様において、核酸は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドであるか、または、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸配列を含む。一態様において、b変異体転写物と相補的な核酸は、エクソン14bおよび15の接合部にまたがるCiz1のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26) を含むb変異体転写物の全てまたは一部にハイブリダイズする。一態様において、b変異体転写物と相補的な核酸は、SEQ ID NO:7のヌクレオチド配列の全てまたは一部 (SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含む) にハイブリダイズする。一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、b変異体転写物にハイブリダイズするが、a変異体転写物にはしない。

30

【0048】

別の局面において、本発明は、本発明の化合物を作製する方法を提供する。

【0049】

配列の簡単な説明

40

SEQ ID NO:1は、本明細書中エクソン14aと称す、完全長Ciz1エクソン14のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:2は、エクソン14aと称す、完全長Ciz1エクソン14のポリペプチド配列である。

SEQ ID NO:3は、エクソン14の3'末端の24ヌクレオチドを欠き、本明細書中、エクソン14bと称す、Ciz1エクソン14の変異体のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:4は、エクソン14のCOOH末端の8アミノ酸残基を欠き、エクソン14bと称す、Ciz1エクソン14の変異体のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:5はCiz1エクソン15のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:6はCiz1エクソン15のアミノ酸配列である。

50

SEQ ID NO:7は、エクソン14bおよび15のスプライス接合部にまたがるCiz1 b変異体転写物の一部のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:8は、エクソン14bおよび15のスプライス接合部にまたがるCiz1 b変異体ポリペプチドの一部のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:9は、複製ドメイン（エクソン3からエクソン9の末端に合致する）のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:10は、複製ドメインの一部（エクソン5~9）のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:11は、複製ドメインの、さらに制限された部分（エクソン8の内部分を除くエクソン5~9）のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:12は、複製ドメイン（エクソン3からエクソン9の末端に合致する）のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:13は、複製ドメインの一部（エクソン5~9）のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:14は、複製ドメインの、さらに制限された部分（エクソン8の内部分を除くエクソン5~9）のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:15は、固定化ドメインのアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:16は、固定化ドメインの一部のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:17は、固定化ドメインの、さらに制限された部分のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:18は、固定化ドメインのヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:19は、固定化ドメインの一部のヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:20は、固定化ドメインの、さらに制限された部分のヌクレオチド配列である

。SEQ ID NO:21は、エクソン14aおよび15のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:22は、エクソン14bおよび15のアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:23は、エクソン14aおよび15のスプライス接合部にまたがるCiz1 a変異体ポリペプチドの一部のアミノ酸配列である。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】エクソン構造を示す、Ciz1遺伝子の概略図を例示する。DNA複製³および核マトリクスへの付着¹に関する機能的ドメインをコードする領域を、上に黒色線で示す。点線は、ドメインの境界に関する不確実性を示す。ギャップは、インビトロでの完全な活性を伴う変異体からスプライシングされる配列を示す。PCRプライマーおよびプローブの位置を、公知の機能ドメインとの関係において示す。ピンクバー：エクソン5中のプローブT5、緑色バー：エクソン6と7の間の接合部でのプローブT7、黄色バー：エクソン14中のプローブT4、青色バー：エクソン16中のプローブT3。B) 肺ガンおよび正常な隣接組織に由来する46のcDNA (Origene cDNAアレイHLRT504) にわたるA) に示すプローブを使用した、Ciz1発現の定量化（アクチンに対する標準化後のdCT値）。Ciz1複製ドメイン（RD）内の配列を増幅する両方の試薬セットは、アレイにわたって同様のプロファイルを生成する。逆に、核マトリクスアンカードメイン（AD）中の配列を増幅する試薬セットは、互いに非常に類似するプロファイルを生成するが、これは、RDと明確に異なっている。C) ステージI A、IB、IIA、IIB、IIIA、またはIIIB腫瘍を有する23人の患者由来の隣接する対照組織中での、およびD) 腫瘍自体中でのCiz1発現の定量化（アクチンに対する標準化後のdCT値）。グラフは、線形回帰トレンド線を含む。E) マッチド対照と比較して、複製ドメインとアンカードメインの発現間の均衡が腫瘍において変化する範囲での単一の数値指標を開発するために、2つの複製ドメインプローブまたは2つのアンカードメインプローブに関するRQ（試料セット1/2中の対照組織に対して校正する）を平均化した。腫瘍試料に関する平均RQを、そのマッチド対照の平均RQによって割り、各々のドメインについての周囲組織と比べた、変化の個々の測定値を与えた。複製ドメインにおける変化をアンカードメインにおける変化で割ることによって値を組み合わせることで、例えば、アンカードメインの発現増加によって均衡されている複製ドメインの発現増加が、1に近い値をもたらすようになる。逆に、アンカードメインの発現減少によって悪化している複製ドメインの発現

増加は、1よりも有意に大きい値をもたらすであろう。結果をログスケールで表現する。2倍未満である変化（灰色領域によって示される）は、有意ではないと考えられる。この分析は、Ciz1の均衡した過小発現または過剰発現ではなく、発現における周囲組織と比べた変化のみを明らかにする。RDとADの不均衡の程度は、腫瘍ステージとともに増加する。

【図2】様々な固形腫瘍におけるDNA複製ドメインおよび核マトリクスアンカードメインの非共役発現を示す。ヒストグラムは、cDNAアレイCSRT1において示される試料セットにおけるCiz1エクソン7（RD、白色バー）およびCiz1エクソン16（AD、黒色バー）の相対的な定量値（RQ）を示す。各々の組織型について、進行するステージ（左から右）の9つの独立した腫瘍の分析について、ガン患者由来の、見掛け上は正常な組織に由来する3つの非マッチド対照試料（対照として同定される）と並べて示す。2つのプローブについての結果は、RDについて、灰色に陰をつけた対照（C）の平均に対して標準化され、 $RQ = 2^{-Ct}$ （ Ct 試験したエクソン - $Ct_{ex 7}$ の平均対照）であった。肺腫瘍ステージI~IIIについての結果は、図1において分析した試料セットと同等であり、灰色に陰をつけた。全ての腫瘍型について、ステージIV腫瘍の例も含まれる。これらの大半について、RDの発現は、RDと等しいかまたはそれを越える（*を用いて示す）。B）右側のパネルは、左から右へのステージ進行に伴う、ADおよびRD（比率 = エクソン16の Ct /エクソン7の Ct ）の発現の比率を示す。最初のデータ点は平均化対照を、最後のデータ点はステージIV試料を表す。二次回帰トレンド線を、Excelを使用して生成した。肝臓を除く全ての腫瘍型について、対照と比較すると早期ステージ腫瘍ではRDと比べてADで比例してトレンドが増加し、かつ、より後期ステージではこのトレンドは逆転するため、大半のステージIV腫瘍について、RDはしばしばADを超える。

【図3】A）図2のように分析し、対照試料と比較した、40の悪性黒色腫におけるADの発現変化を示す。2セットの検出ツールについての結果を、最初の対照試料についての1に対して標準化する。右側のパネルは、アンカードメイン発現が複製ドメインのものを越えている試料の%を示す、ステージII、III、およびIV腫瘍についての結果の概要である。

【図4】A）Ciz1複製ドメイン（黒色線）および核マトリクスアンカードメイン（黄色円）の非共役発現が、Ciz1の固定化およびそのDNA複製活性の核内局在に影響を及ぼしうる方法。灰色のパレルは、複製起点で組み立てられたDNA複製タンパク質を表す。灰色の楕円は、Ciz1についての核マトリクスとのドッキング部位を表す。モデルは、核マトリクスとのドッキング部位が限定的であると仮定する。右側のパネルは、核マトリクスと会合する能力が損なわれたCiz1の変異体を示す。B）ヒト腫瘍において見られるCiz1誤発現の2つの型の概要：i）最も一般的に固形腫瘍において見られ、図1~3に記載される非共役発現。ii）小細胞肺ガン、甲状腺ガン、およびリンパ腫において高い割合で見られるb変異体。

【図5 - 1】Ciz1複製ドメイン（RD）およびアンカードメイン（AD）抗体の生成および検証、ならびにRDおよびADタンパク質発現の分析。A）ポリクローナル抗体（上方のパネル）およびモノクローナル抗体（下方のパネル）のための免疫原として使用される領域を示す、Ciz1エクソンの模式図（陰をつけた四角形）。B）固定前の処理を行わず（「非抽出」）、0.1%トリトンX100の存在における可溶性タンパク質の抽出後（「界面活性剤耐性」）、およびDNase 1を用いたインキュベーション後（「DNase耐性」）の、正常な胎児肺細胞（WI38）と2つの代表的な腫瘍細胞株とにおいてCiz1-RD抗体（赤色）を用いて検出された内在性Ciz1の代表的な免疫蛍光画像を示す。標準化された露出時間を伴う同一条件下で画像を収集したが、細胞株内および細胞株間で、Ciz1の強度およびDNAの強度は、異なる条件下で細胞中に残っているCiz1およびDNAのレベルを反映する。全DNAを、Hoechst 33258（青色）を用いて染色する。バーは10ミクロンである。同様の結果が、異なる由来の4つの他のガン細胞株について得られた。C）検出が、Ciz1-AD抗体（緑色）を用いていること以外はBと同じ。結果として、i）タンパク質レベルでのCiz1-RDおよびCiz1-ADの非共役および不均衡発現、ii）ガン細胞中で固定化されていないCiz1-RDタンパク質の増加、iii）Ciz1-ADタンパク質の大部分の固定化、が例示される。

【図5 - 2】Ciz1複製ドメイン（RD）およびアンカードメイン（AD）抗体の生成および検

10

20

30

40

50

証、ならびにRDおよびADタンパク質発現の分析。D) 内在性Ciz1の固定化に対する組換えADタンパク質の効果。マウスADタンパク質をコードする組換えGFP-C275 (緑色) を発現しない (左側のパネル) または発現する (右側のパネル)、NIH3T3細胞中での内在性Ciz1-RD (赤色) のDNase耐性画分の高倍率画像。全DNAを、Hoechst 33258 (青色) を用いて染色する。GFP-C275を用いてトランスフェクトした細胞中での焦点染色低下に注目すること。E) 画像は、界面活性剤を用いた抽出後の、GFP-Ciz1の焦点パターン、GFP-C275の非焦点パターンを伴うNIH3T3核、および両方のベクターを用いてコトランスフェクトした細胞を示す。緑色はGFPである。青色は、Hoechst 33258を用いて染色された核を示す。GFP-C275は、GFP-Ciz1核内フォーカスの形成に干渉する。

【図6】A) b型転写物接合部にまたがるプライマーを使用して生成された産物 (赤色矢印) および接合部にまたがるtaqmanプローブの位置 (赤色線) を示す模式図。B) SCLC細胞株由来のb変異体エクソンを伴うクローン産物および正常な細胞株由来の完全長産物において観察された移動度の変動。C) 接合部にまたがるプライマーを、正常な転写物 (クローン19) またはb型転写物 (クローン20) を発現するレポータープラスミドを使用して検証した。ゲルは、選択的プライマー対P3/4、または非選択的Ciz1プライマー対P1/2を用いた場合のプラスミド由来PCR産物を示す。D) 2つの神経内分泌肺ガン細胞株 (L95、SBC5) および1つの正常な胎児肺細胞株 (HFL1) より調製されたcDNAから、プライマーセットP11/P12 (アクチン、下方のパネル)、プライマーセットP1/P2 (Ciz1、上方のパネル)、またはb型転写物の接合部にまたがるプライマーP4/P3 (中央のパネル) を使用して生成したPCR産物。産物の配列を検証した。noTは鋳型を用いない対照レーンである。E) 可変領域のいずれかの側からのプライマー (P1/P2またはP6/P7) を、b型転写物中の固有の接合物にまたがる (T2) かまたは選択的にスプライシングされない領域を認識する (T4およびT3) taqmanプローブと共役させた。100、75、50、25、または0%のいずれかでクローン20を含む、プラスミドクローン19と20との混合物に対する適用により、b型の転写産物を選択的に検出できることを実証している。グラフは、閾値に達するために要求されるサイクル数が、非選択的検出ツールの場合一定であるが、変異体選択ツールの場合、プラスミド混合組成物によって影響を受けることを示す。

【図7】A) 3つの「正常な」胎児肺細胞株および3つの神経内分泌肺腫瘍細胞株、加えて、1つの神経内分泌カルチノイドからの鋳型を使用した、図1~3にあるような、b変異体のRD (左側のパネル) またはAD (中央のパネル) についてのQPCR。結果を、アクチンに対して標準化し、IMR90 RDに対して校正する。D) ヒト肺ガン組織。同じ検出ツールを、3人のSCLC患者および同じ個人由来の3つの正常な隣接組織由来のcDNAに適用した。b型転写物の発現は、これらの神経内分泌腫瘍において劇的に増加する。

【図8】A) グレードI~グレードIIIにある23人の肺ガン患者由来の、マッチド試料セット (図1と同じセット) におけるb型転写物 (黒色バー) の発現 (Origene cDNAアレイHLRT504)。発現はアクチンに対して標準化され、各組において、任意の値1が与えられる「正常」試料 (白色バー) と比べて表現される。B) 示したステージからの非小細胞肺腫瘍および非マッチド対照の別々のセットでの同様の分析 (OrigeneアレイCSRT303)。ヒストグラムは、アクチンに対する標準化後のb変異体RQを示す。C) 肝臓腫瘍およびD) CSRT303にも由来する腎臓腫瘍についての同等の結果。結果を、対照組織試料の平均に対して校正し、灰色のブロックによって示す。図8に示す全ての試料セットについて、b変異体が少数のランダムケースにおいて増加している。

【図9】リンパ腫、甲状腺ガン、膀胱ガン、肝臓ガン、および腎臓ガンについての分析 (図8の通り) を例示する。

【図10】エクソン14b変異体タンパク質検出ツールの生成および検証。A) 16アミノ酸ペプチド内で固有のEEIEVRSR接合部を生成するための介在配列 (灰色) を欠く免疫原性ペプチド (下方の列)、および、接合部隣接エピトープと反応する抗体種を除去するために使用される完全長ペプチド (上方の列)。ポリクローナル血清およびハイブリドーマを、固定化された完全長ペプチドに対してネガティブスクリーニングし、あるいは14b接合部含有ペプチドを使用して親和性精製し、親和性精製ポリクローナル抗体を生成した (抗体2B

10

20

30

40

50

)。B) GFP-hCiz1またはGFP-hCiz1 b変異体を発現するNIH3T3細胞を使用した、抗b変異体抗体を用いた免疫蛍光(緑色)。組換え14bタンパク質を赤色で検出し、DNAを青色で染色する。C) エクソン14b接合部を持つ過剰発現GFP-Ciz1タンパク質の選択的検出を示すウエスタンブロット。抗b変異体血清、免疫前の血清、および抗Ciz1ポリクローナル抗体を用いた結果を示す。D) SCLC細胞および代表的な正常細胞中での、親和性精製した抗b変異体ポリクローナル抗体を用いた内在性14bタンパク質の免疫検出を示す。SCLC細胞は抗b変異体血清と反応するが、正常細胞は反応しない。E) 同じ細胞中でのCiz1の検出を比較のために示す。F) サイズは同様であるが、DNA複製フォーカスよりも数がより少ない、核における分散フォーカスを明らかにする、SCLC細胞の高倍率(600×)画像D。

【図11】b型転写物選択的RNA干渉ツールの開発。A) 最上部のパネルは、固有のエクソン接合部にまたがるsiRNA配列のパネルを示す模式図。下方のパネルは、SCLC細胞中への一過性トランスフェクションの24時間後の、Ciz1 AD転写物レベルおよびb型転写物レベルに対するそれらの効果を示す。結果を、アクチンに対して標準化し、対照siRNA(Dcon)を用いてトランスフェクトした細胞由来の試料に対して校正する。B) 結果は、ADとb型転写物の比率として表現され、ここで、対照siRNAは比率1を有する。最も有効で選択的なsiRNA配列を、さらなる試験のために選んだ(星印)。C) 組換えCiz1タンパク質の発現に対する変異体選択的な効果。クローン19および20を、b型転写物に選択的なsiRNAまたは対照siRNAを用いてマウス3T3細胞中にコトランスフェクトした。b型転写物siRNAは、発現クローン20由来のタンパク質の発現を抑制するが、発現クローン19由来の内在性マウスCiz1またはヒトCiz1は抑制しない。

【図12】培養中のSCLC細胞増殖に対するb変異体選択的shRNAの誘導性発現の効果。A) 選んだb型選択的配列およびdox調節shRNAベクター(Clontech)由来の対照配列(ルシフェラーゼに対する)の安定的な発現。結果は、4日間にわたる細胞数における増加を示す。試験試料にDoxを、0および3日目に加えた(黒色矢印)。対照細胞(ルシフェラーゼshRNAを発現するSCLC)は、誘導によっては大部分が影響を受けず、一方試験細胞(b型選択的配列を発現するSCLC)は、通常で増殖することが妨げられる。B) ドキシサイクリンを0日目に加え、細胞数を4日目に3組で定量化した、独立した実験。エラーバーはSEMを示す。C) ゲル画像は、RT-PCR産物およびb型転写物対全Ciz1発現についての選ばれた配列の選択性を示す。誘導後26時間までに、b型転写物レベルが回復しており、試料を単離する1時間前に第2用量を与えたものでは、b型転写物の選択的抑制が明らかである。D) ドキシサイクリンを用いたshRNA発現の誘導から48時間後の、b変異体ポリクローナル抗体を用いて検出された、SBC5細胞中でのb変異体タンパク質の抑制。E) 誘導を行わず、低tet血清中での培養1ヶ月後の、誘導性b変異体shRNAベクター細胞を持つSBC5。慢性的な漏出発現は、細胞に対して、可視的かつ進行性の効果を有する。

【図13】インビボ試験(Southern Research Institute, USA) A) 15匹のNOD/SCIDマウスの2つのコホートに、0日目に、dox調節型のb型変異体選択的shRNAベクターを持つ 1.5×10^7 個の細胞を注射した。21日目に、100mg未満の腫瘍を有するマウスを間引き、等しい平均腫瘍重量および低い固有変動を有する群を作製した。Doxを、21日目に、群2(黒色丸)に飲料水で投与し、その後、腫瘍サイズを週に2回測定した。グラフは、平均腫瘍重量をSEMと共に示す。B) SCLC細胞を用いた注射の前に、追加で10匹のマウスを3日目からDoxで維持した。doxを与えられていない15匹のマウスの平均腫瘍重量と比較した、それらの平均腫瘍重量の結果をSEMと共に示す。C) 群1の、腫瘍を伴う2匹のマウス(図14A中の白丸)、および群3の、腫瘍を伴わない2匹のマウス(図14B中の黒四角形)の、全血由来cDNA中でのb型転写物の相対的レベルを示す定量的RT-PCR。ヒストグラムは、マウスアクチンに対する標準化後の二度の分析(各々が三つ組み試料の平均である)およびサンプルSRI-3-8に対する校正を示す。4匹のマウスが有する皮下腫瘍の推定サイズも示す。

【図17】A) エクソンを示すCiz1遺伝子(番号付き)およびsiRNAの位置(灰色の三角形)の概略図。B) Dharmaconスマートプール抗ヒトCiz1 siRNAを、個別に(A、B、C、D)または混合物として用いた、および、Dharmaconスマートプール対照siRNA用いた、ヒトSCLC細胞株SBC5の一過性トランスフェクション後のヒトCiz1転写物の抑制。ヒストグラムは、

10

20

30

40

50

プライマーP1/P2およびプローブT4を用いて検出された、示された時間でのCiz1アンカードメイン転写物の相対的定量化 (RQ) を示す。任意の値1が与えられる、アクチンに対して標準化され対照siRNAをトランスフェクトされた細胞の結果に対して、結果が校正される。C) トランスフェクションの24時間後に収集した、SBC5細胞由来の界面活性剤可溶性の上清 (SN) および界面活性剤耐性ペレット (P) のタンパク質画分のウエスタンブロットにおける、Ciz1タンパク質に対するsiRNA Bおよび対照siRNAの効果。Ciz1タンパク質を、抗マウスCiz1 RDポリクローナル抗体1793を用いて検出した。複数のCiz1アイソフォームが、以前に報告された通り、NIH3T3細胞およびU2OS細胞について検出される。D) 単一の過性トランスフェクションに続く5日間にわたる、抗ヒトCiz1 siRNA B (灰色の四角形)、およびCiz1 siRNA 1 (灰色の丸)、Ciz1 siRNA 3 (灰色の三角形)、および対照siRNA (白丸) の、SBC5細胞の増殖に対する効果。結果を、3つの独立した集団に由来する、1日あたりの細胞数における増加倍率としてSDと共に表現する。

【0051】

出願人は、固形腫瘍試料に加えて、Ciz1 b変異体ポリペプチドをガン患者の血漿中で検出することができることを発見した。この知見は注目すべきであり、予想外である。その理由は、Ciz1は核タンパク質であり、分泌されることは公知ではないからである。さらに、プロテアーゼが血液中に存在し、多くのタンパク質を分解する。さらにより予想外なことでは、出願人は、腫瘍負荷が低い場合での、早期ガン患者 (ステージIのNSCLCおよび限定されたステージのSCLC) の血漿中で、Ciz1 b変異体ポリペプチドを発見している。Ciz1 b変異体バイオマーカーは、高程度の感度および特異度を両立してガンを検出する。

【図18】肺ガン患者の血漿中のb変異体Ciz1タンパク質。A) エクソンを示すCiz1遺伝子 (番号付き)、直下のエクソン14の一部を欠くCiz1 b変異体の提示を伴う、DNA複製ドメインおよび核マトリクスアンカードメイン。B) 抗体2Bを用いて検出された、SCLCおよびNSCLCを伴う患者由来の血漿、加えて、疾患と診断されなかった個人由来の5つの試料の1 μ l中でのb変異体タンパク質を示すウエスタンブロット (補足図10に記載)。内在性免疫グロブリンを使用し、添加について標準化する (対照)。C) 示した疾患の型およびステージを伴う肺ガン患者由来の合計119の前処理試料、加えて、疾患を伴わない個人、または、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、喘息、または貧血を伴う患者由来の51試料についての結果を示す、ウエスタンブロットのデンシトメトリーによって決定された平均b変異体タンパク質レベル (SEMを伴う)。ガンではない試料の平均値 (+1 SD) にて設定された閾値を使用し、試験によって、限定されたステージのSCLC患者およびステージIのNSCLC患者の93%を正確に分類した。D) 連続分散データ (AUCは0.958である) のROC分析用のWebベース電卓を使用し、全ての170の試料について生成された95%信頼区間を伴う受信者動作特性曲線。<http://www.jrocf.it.org>で入手可能なWebベースの電卓 (連続分布データ用のフォーマット5) を、計算のために使用した。

【発明を実施するための形態】

【0052】

詳細な説明

本発明は、化合物および組成物ならびに前記化合物および組成物を作製する方法およびこれらを使用する方法に関する。本発明の化合物および組成物は、例えば、肺、乳房、結腸、腎臓、肝臓、およびリンパ腫のガンを含む、ガンの処置および診断において有用である。

【0053】

一局面において、本発明は、Ciz1のb変異体転写物のみを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAに関する。

【0054】

別の局面において、本発明は、Ciz1のb変異体転写物のみを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAを含む組成物に関する。

【0055】

別の局面において、本発明は、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA

、またはshRNAおよび薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物に関する。

【0056】

別の局面において、本発明は、Ciz1 b変異体転写物の発現レベルを低下させるためにsiRNAまたはshRNAを使用する方法に関する。本明細書において使用される通り、用語「サイレンス」および「ロックダウン」は、遺伝子発現に言及する場合、遺伝子発現における低下を意味する。用語「転写物」は、転写のRNA産物を指す。一態様において、転写物はmRNAである。

【0057】

本発明はさらに、化学合成によって、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAを作製するためのプロセスに関する。

【0058】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Ciz1 b変異体転写物の発現を検出するために適している。一局面上において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、哺乳動物細胞においてCiz1 b変異体転写物のレベルを低下させるために適している。本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNAレベルで遺伝子発現を減少させることによって、Ciz1 b変異体mRNAによりコードされるCiz1 b変異体タンパク質の発現を減少させるためにさらに適している。

【0059】

本発明のsiRNAまたはshRNAは、Ciz1 b変異体転写物のレベルを低下させるために適している。本発明によるsiRNAまたはshRNAは、mRNAレベルで遺伝子発現を減少させることによって、Ciz1 b変異体mRNAによりコードされるタンパク質の発現を減少させるためにさらに適している。

【0060】

アンチセンスデザイン： Ciz1 b変異体転写物のレベルを低下させるために適したアンチセンスオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:7の25～26位のヌクレオチドを含むSEQ ID NO:7と相補的な少なくとも8つの連続ヌクレオチドを含む12～50ヌクレオチド長の一本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0061】

一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドとSEQ ID NO:7の間の相補性は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、SEQ ID NO:7の25～26位のヌクレオチドを含むSEQ ID NO:7の配列に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることができるようになるものであり、この「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、本明細書において、以下のハイブリダイゼーション条件として定義される：400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、70℃。

【0062】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、またはそれらの組み合わせでありうる。アンチセンスオリゴヌクレオチドがRNaseHを介してmRNAを分解するために使用される場合、通常、ヌクレオチドの少なくとも一部はデオキシリボヌクレオチドである。

【0063】

siRNAデザイン： 本発明のsiRNAは、1つはアンチセンス鎖でありもう1つはセンス鎖である、核酸の2つの鎖を含む。核酸は、通常、リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチドからなるが、核酸はデオキシリボヌクレオチド（DNA）を含みうる。siRNAは、アンチセンス鎖の全てまたは一部およびセンス鎖の全てまたは一部により形成される二本鎖核酸部分またはデュプレックス領域をさらに含む。センス鎖とデュプレックス領域を形成するアンチセンス鎖の部分は、アンチセンス鎖デュプレックス領域、または単にアンチセンスデュプレックス領域であり、アンチセンス鎖とデュプレックス領域を形成するセンス鎖の部分は、センス鎖デュプレックス領域、または単にセンスデュプレックス領域である。デュプレックス領域は、アンチセンス鎖とセンス鎖の間に形成される最初の塩基対で開始し、アンチセンス鎖とセンス鎖の間に形成される最後の塩基対までで終わると定義され

10

20

30

40

50

る。デュプレックス領域のいずれかの側のsiRNAの部分は、隣接領域である。アンチセンスデュプレックス領域のいずれかの側のアンチセンス鎖の部分は、アンチセンス隣接領域である。アンチセンスデュプレックス領域の5'のアンチセンス鎖の部分は、アンチセンス5'隣接領域である。アンチセンスデュプレックス領域の3'のアンチセンス鎖の部分は、アンチセンス3'隣接領域である。センスデュプレックス領域のいずれかの側のセンス鎖の部分は、センス隣接領域である。センスデュプレックス領域の5'のセンス鎖の部分は、センス5'隣接領域である。センスデュプレックス領域の3'のセンス鎖の部分は、センス3'隣接領域である。

【0064】

相補性： 一局面において、アンチセンスデュプレックス領域およびセンスデュプレックス領域は、互いに完全に相補的でありうるが、少なくとも部分的には相補的である。そのような相補性は、ワトソクリック塩基対合（即ち、A:UおよびG:C塩基対合）に基づく。siRNAの長さに依存して、アンチセンスデュプレックス領域とセンスデュプレックス領域の間の塩基相補性に関する完全一致は必ずしも要求されないが、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、生理学的条件下でハイブリダイズできなければならない。一態様において、アンチセンス鎖とセンス鎖の間の相補性は完全である（いずれの鎖においてもヌクレオチドミスマッチまたは追加/欠失ヌクレオチドがない）。一態様において、アンチセンスデュプレックス領域とセンスデュプレックス領域の間の相補性は完全である（いずれの鎖のデュプレックス領域においてもヌクレオチドミスマッチまたは追加/欠失ヌクレオチドがない）。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域とセンスデュプレックス領域の間の相補性は、完全ではない。

【0065】

本発明のsiRNAまたはshRNAまたは他の関連デザインを使用したRNAiは、アンチセンス鎖の全てまたは一部と、25~26位のヌクレオチド（「標的核酸」または「標的配列」）を含むSEQ ID NO:7のヌクレオチド配列の一部の間のデュプレックス領域の形成を含む。より具体的には、「標的配列」は、アンチセンス鎖とデュプレックス領域を形成する、25~26位のヌクレオチドを含むSEQ ID NO:7の一部であり、アンチセンス鎖とSEQ ID NO:7の間に形成される最初の塩基対で開始し、アンチセンス鎖とSEQ ID NO:7の間に形成される最後の塩基対で終わると定義される。

【0066】

アンチセンス鎖とセンス鎖の間に形成されるデュプレックス領域は、アンチセンス鎖と標的配列の間に形成されるデュプレックス領域と同じでありうるが、その必要はない。すなわち、センス鎖は、標的核酸とは異なる配列を有しうるが、アンチセンス鎖は、生理学的条件下で、センス鎖および標的核酸の両方とデュプレックス構造を形成することができなければならない。

【0067】

一態様において、アンチセンス鎖と標的核酸の間の相補性は、完全である（いずれの核酸においてもヌクレオチドミスマッチまたは追加/欠失ヌクレオチドはない）。一態様において、アンチセンスデュプレックス領域（センス鎖とデュプレックス領域を形成するアンチセンス鎖の部分）と標的核酸の間の相補性は、完全である（いずれの核酸においてもヌクレオチドミスマッチまたは追加/欠失ヌクレオチドがない）。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域と標的核酸の間の相補性は、完全ではない。

【0068】

別の態様において、本発明のsiRNAはデュプレックス領域を含み、ここでアンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域においてヌクレオチドに塩基対合していない1、2、または3ヌクレオチドを有し、ここでsiRNAは、b変異体転写物の発現を低下させるために適している。別の態様において、アンチセンス鎖は、センス鎖と塩基対合しない1、2、または3ヌクレオチドを有し、ここでアンチセンス鎖を含むsiRNAは、b変異体転写物の発現を低下させるために適している。塩基対合の欠如は、塩基間の相補性の欠如（即ち、ワトソクリック塩基対合なし）に起因するか、または、バルジもしくはオーバー

10

20

30

40

50

ーハングが形成されるように、対応するヌクレオチドがないから、のいずれかであることが理由である。

【0069】

別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域およびセンスデュプレックス領域は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、ここで、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、70℃として定義される。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域および標的核酸は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域ならびにセンスデュプレックス領域および標的核酸の両方は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。

10

【0070】

本発明のsiRNAのように、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的核酸と完全に相補的でありうるが、少なくとも部分的に相補的である。アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸の間の塩基相補性に関する完全一致は必ずしも要求されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび標的核酸は、生理学的条件下でハイブリダイズできなければならない。一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸の間の相補性は、完全である（いずれの鎖においてもヌクレオチドミスマッチまたは追加/欠失ヌクレオチドがない）。別の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸の間の相補性は、完全ではない。別の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび標的核酸配列は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。

20

【0071】

長さ： 本発明の局面は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを構成する核酸および特定の領域の長さに関する。

【0072】

特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO:7と相補的な少なくとも8つの連続ヌクレオチドを含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチド長に関し、ヌクレオチド25～26を含む。

30

【0073】

特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO:7と相補的な、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50連続ヌクレオチドを含む、単離アンチセンスオリゴヌクレオチドに関し、ヌクレオチド25～26を含む。

【0074】

特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO:7と相補的な、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50連続ヌクレオチドからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドに関し、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25～26を含む。

40

【0075】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々独立して、30ヌクレオチド長未満または30ヌクレオチド長に等しく；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも16連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25～26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス

50

領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0076】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々独立して、30ヌクレオチド長未満または30ヌクレオチド長に等しく；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも18連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；このアンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；かつこのアンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

10

【0077】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々独立して、25ヌクレオチド長未満または25ヌクレオチド長に等しく；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも16連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

20

【0078】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々独立して、25ヌクレオチド長未満または25ヌクレオチド長に等しく；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも18連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

30

【0079】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々独立して、18~25ヌクレオチド長であり；このセンス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも16連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

40

【0080】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々独立して、18~25ヌクレオチド長であり；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも18連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

50

ド配列を含む。

【0081】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々独立して、19~23ヌクレオチド長であり；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも18連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

10

【0082】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、各々、19~25ヌクレオチド長であり；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも19連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

20

【0083】

一態様において、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖を含むsiRNAに関し；ここで、アンチセンス鎖および前記センス鎖は、各々、19~23ヌクレオチド長であり；ここで、センス鎖はセンスデュプレックス領域を含み；ここで、センスデュプレックス領域は、SEQ ID NO:7のうち少なくとも19連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、ここで、連続ヌクレオチドは、SEQ ID NO:7のヌクレオチド25~26を含み；ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンスデュプレックス領域を含み；ここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と等しいヌクレオチド長を有し；およびここで、アンチセンスデュプレックス領域は、センスデュプレックス領域と相補的なヌクレオチド配列を含む。

30

【0084】

一態様において、本発明のsiRNAまたはshRNAのアンチセンス鎖は、以下より選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を含む：

5'AAGAAGAGAUCGAGGUGAGGU 3'；

5' AAGAGAUCGAGGUGAGGUCCA 3'；

5' AGAAGAGAUCGAGGUGAGGUC 3'；

5' GAAGAGAUCGAGGUGAGGUCC 3'；または

5' AGAGAUCGAGGUGAGGUCCAG 3'

40

。

【0085】

末端（オーバーハングおよび平滑末端）：別の局面は、siRNAの末端デザインに関する。本発明のsiRNAは、オーバーハングを含みうるか、または平滑末端でありうる。「オーバーハング」は、本明細書において使用されるように、当技術分野におけるその通常の慣習的な意味、即ち二本鎖核酸中の相補鎖の末端ヌクレオチドを越えて伸長する核酸の一本鎖部分、を有する。用語「平滑末端」は二本鎖核酸を含み、両方の鎖は、末端ヌクレオチドが塩基対合しているか否かにかかわらず、同じ位置で終結する。

【0086】

50

一態様において、平滑末端の末端ヌクレオチドは塩基対合している。

【0087】

別の態様において、平滑末端の末端ヌクレオチドは対合していない。

【0088】

一態様において、本発明のsiRNAは、1つの末端に1、2、3、4、または5ヌクレオチドのオーバーハングおよび他の末端に平滑末端を有する。

【0089】

別の態様において、siRNAは、両方の末端に1、2、3、4、または5ヌクレオチドのオーバーハングを有する。

【0090】

一態様において、siRNAは、両方の末端で平滑末端になっている。

【0091】

別の態様において、siRNAは、センス鎖の5'末端およびアンチセンス鎖の3'末端によって定義される末端で平滑末端になっている。

【0092】

別の態様において、siRNAは、センス鎖の3'末端およびアンチセンス鎖の5'末端によって定義される末端で平滑末端になっている。

【0093】

別の態様において、siRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれかまたは両方の3'もしくは5'末端での、1、2、3、4、または5ヌクレオチドのオーバーハングを含む。

【0094】

一態様において、siRNAは、アンチセンス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの3'オーバーハングを有し、他の末端で平滑末端になっている。

【0095】

一態様において、siRNAは、センス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの3'オーバーハングを有し、他の末端で平滑末端になっている。

【0096】

一態様において、siRNAは、アンチセンス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの5'オーバーハングを有し、他の末端で平滑末端になっている。

【0097】

一態様において、siRNAは、センス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの5'オーバーハングを有し、他の末端で平滑末端になっている。

【0098】

一態様において、siRNAは、アンチセンス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの3'オーバーハングおよびセンス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの3'オーバーハングを有する。

【0099】

一態様において、siRNAは、アンチセンス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの5'オーバーハングおよびセンス鎖上に1、2、3、4、または5ヌクレオチドの5'オーバーハングを有する。

【0100】

塩基部分への修飾：別の局面は、塩基部分への修飾に関する。本発明の核酸の1つまたは複数のヌクレオチドは、修飾塩基を含みうる。「修飾塩基」は、1'位置でのアデニン、グアニン、シトシン、またはウラシル以外のヌクレオチド塩基を意味する。

【0101】

一態様において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAは、修飾塩基を含む、少なくとも1つのヌクレオチドを含む。

【0102】

別の態様において、本発明の核酸は修飾ヌクレオチドを含み、ここで、修飾ヌクレオチドは修飾塩基を含み、ここで、修飾塩基は、2-アミノアデノシン、2,6-ジアミノプリン、

10

20

30

40

50

イノシン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、プソイドウラシル、2,4,6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン（例えば、5-メチルシチジン）、5-アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、5-ハロウリジン（例えば、5-プロモウリジン）、6-アザピリミジン、6-アルキルピリミジン（例えば、6-メチルウリジン）、プロビン、クエオシン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、ワイプトシン、ワイプトキソシン、4-アセチルシチジン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、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リジン、ベータ-D-ガラクトシルクエオシン、1-メチルアデノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、3-メチルシチジン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、5-メチルオキシウリジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、ベータ-D-マンノシルクエオシン、ウリジン-5-オキシ酢酸、2-チオシチジンN4-エタノシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデニン、4-アセチルシトシン、5-フルオロウラシル；5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、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、N6-イソペンチル-アデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルクエオシン、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、プソイドウラシル、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、N-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、クエオシン、2-チオシトシン、5-プロピルウラシル、5-プロピルシトシン、5-エチルウラシル、5-エチルシトシン、5-ブチルウラシル、5-ペンチルウラシル、5-ペンチルシトシン、および2,6-ジアミノプリン、メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルシトシンより選択される。

10

20

30

40

50

【0103】

別の局面において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAは、脱塩基ヌクレオチドを含む。用語「脱塩基」は、本明細書において使用される通り、例えば、3',3'結合または5',5'結合デオキシ脱塩基リボース誘導体のような、1'位置の塩基の場所において塩基を欠くまたは他の化学基を有する部分を指す。本明細書において使用されるように、「修飾塩基」を伴うヌクレオチドは、脱塩基ヌクレオチドを含まない。

【0104】

糖部分への修飾：別の第2の局面は、糖部分への修飾に関する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはshRNAの1つまたは複数のヌクレオチドは、修飾リボース部分を含みうる。

【0105】

2'-OHが置換される2'位置の修飾は、アルキル、置換アルキル、アルカリル-、アラキル-、-F、-Cl、-Br、-CN、-CF₃、-OCF₃、-OCN、-O-アルキル、-S-アルキル、-O-アリル、-S-アリル、HS-アルキル-O、-O-アルケニル、-S-アルケニル、N-アルケニル、-SO-アルキル、-アルキル-OSH、-アルキル-OH、-O-アルキル-OH、-O-アルキル-SH、-S-アルキル-OH、-S-アルキル-SH、-アルキル-S-アルキル、-アルキル-O-アルキル、-ONO₂、-NO₂、-N₃、-NH₂、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ-、アミノアルキル-、アミノアルコキシ、アミノ酸、アミノアシル-、-ONH₂、-O-アミノアルキル、-O-アミノ酸、-O-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル-、ヘテロシクロアルカリル-、アミノアルキルアミノ-、ポリアルキルアミノ-、置換シリル-、メトキシエチル-(MOE)、アルケニルおよびアルキニルより選択される非限定的な例を含む。2'ヒドロキシルが、例えば、メチレン架橋により、同じリボース糖の4'炭素に連結される「ロックド」核酸(LNA)は、本発明の2'修飾としてさらに含まれる。好ましい置換基は、2'-メトキシエチル、2'-OCH₃、2'-O-アリル、2'-C-アリル、および2'-フルオロである。

【0106】

一態様において、本発明のsiRNAは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド3、5、7、9、11、13、15、および17ならびにセンス鎖上のヌクレオチド4、6、8、10、12、14、および16で2'-OCH₃修飾を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は5'から3'へ番号を付けられ、前記センス鎖は3'から5'へ番号を付けられる。

【0107】

一態様において、本発明のsiRNAは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド7、9、11、および13ならびにセンス鎖上のヌクレオチド8、10、および12で2'-OCH₃修飾を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は5'から3'へ番号を付けられ、前記センス鎖は3'から5'へ番号を付けられる。

10

【0108】

一態様において、本発明のsiRNAは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド7、9、および11ならびにセンス鎖上のヌクレオチド8、10、および12で2'-OCH₃修飾を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は5'から3'へ番号を付けられ、前記センス鎖は3'から5'へ番号を付けられる。

【0109】

別の態様において、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25の2'-デオキシヌクレオチドを含む。

【0110】

別の態様において、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25の2'-デオキシヌクレオチドを含む。

20

【0111】

別の態様において、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25の2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0112】

別の態様において、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25の2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0113】

別の態様において、アンチセンス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-フルオロプリンヌクレオチドである。別の態様において、センス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。別の態様において、センス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである。別の態様において、センス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-フルオロプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域中のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域中のプリンヌクレオチドは、2'-デオ

30

40

50

キシプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス領域中のプリンヌクレオチドは、2'-フルオロプリンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-0-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス領域中のプリンヌクレオチドは、2'-0-メチルプリンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス領域中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス領域中のプリンヌクレオチドは、2'-フルオロプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス隣接領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-0-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス隣接領域中のプリンヌクレオチドは、2'-0-メチルプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス隣接領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス隣接領域中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス隣接領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、アンチセンスデュプレックス隣接領域中のプリンヌクレオチドは、2'-フルオロプリンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス隣接領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-0-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス隣接領域中のプリンヌクレオチドは、2'-0-メチルプリンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス隣接領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス隣接領域中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス隣接領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。別の態様において、センスデュプレックス隣接領域中のプリンヌクレオチドは、2'-フルオロプリンヌクレオチドである。

10

20

30

40

50

【0114】

リン酸骨格への修飾： 別の第2の局面は、リン酸骨格への修飾に関する。本発明の核酸のヌクレオチドの全てまたは一部を、非修飾核酸において見出される通り、ホスホジエステル結合を介して連結してもよい。しかし、本発明の核酸は、修飾ホスホジエステル結合を含みうる。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAのアンチセンス鎖もしくはセンス鎖のいずれかのホスホジエステル結合を修飾し、独立して、窒素および硫黄からなる群より選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含みうる。一態様において、リボヌクレオチドを隣接リボヌクレオチドに連結するホスホエステル基を、修飾基により置換する。一態様において、リボヌクレオチドを隣接リボヌクレオチドに連結する1つまたは複数のホスホエステル基を、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロジチオエート、リン酸エステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホルアミデート、カルバメート、リン酸トリエステル、アセトアミデート、ペプチド、またはカルボキシメチルエステルにより置換する。一態様において、ホスホエステル基を置換する修飾基は、ホスホチオエート、メチルホスホネート、またはホスホラミデート基より選択される。一態様において、ホスホエステル基を置換する修飾基は、ホスホチオエート、メチルホスホネート、またはホスホラミデート基より選択される。一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAのアンチセンス鎖のヌクレオチドの全てを、ホスホジエステル結合を介して連結する。別の態様において、siRNAのアンチセンスデュプレックス領域のヌクレオチドの全てを、ホスホジエステル結合を介して連結する。別の態様において、siRNAのセンス鎖のヌクレオチドの全てを、ホスホジエステル結合を介して連結する。別の態様にお

いて、siRNAのセンスデュプレックス領域のヌクレオチドの全てを、ホスホジエステル結合を介して連結する。別の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAのアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の修飾ホスホエステル基を含む。別の態様において、siRNAのアンチセンスデュプレックス領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の修飾ホスホエステル基を含む。別の態様において、siRNAのセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の修飾ホスホエステル基を含む。別の態様において、siRNAのセンスデュプレックス領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の修飾ホスホエステル基を含む。

【0115】

5'および3'末端の修飾： 別の第2の局面は、5'および3'修飾に関する。本発明の核酸は、1つまたは複数の修飾ヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、非環式またはデオキシリボヌクレオチドを、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'または3'末端あるいはsiRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかまたは両方に含む核酸分子を含みうる。

【0116】

一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'および3'末端ヌクレオチドまたはsiRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方は非修飾である。別の態様において、siRNAのセンス鎖の5'末端ヌクレオチドを修飾する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端ヌクレオチドを修飾する。別の態様において、siRNAのセンス鎖の3'末端ヌクレオチドを修飾する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端ヌクレオチドおよびsiRNAのセンス鎖の3'末端ヌクレオチドを修飾する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端ヌクレオチドおよびsiRNAのセンス鎖の5'末端ヌクレオチドを修飾する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端ヌクレオチドならびにsiRNAのセンス鎖の5'および3'の両方の末端ヌクレオチドを修飾する。

【0117】

別の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAのアンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドをリン酸化する。別の態様において、siRNAのセンス鎖の5'末端ヌクレオチドをリン酸化する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の5'末端ヌクレオチドをリン酸化する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドをリン酸化し、センス鎖の5'末端ヌクレオチドは遊離ヒドロキシ基(5'-OH)を有する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドをリン酸化し、センス鎖の5'末端ヌクレオチドを修飾する。

【0118】

5'および3'末端ヌクレオチドへの修飾は、これらの末端ヌクレオチド上の5'および3'位置に限定されない。末端ヌクレオチドへの修飾の例は、非限定的に、ビオチン、逆向きの(デオキシ)脱塩基、アミノ、フルオロ、クロロ、プロモ、CN、CF、メトキシ、イミダゾール、カルボキシレート、チオエート、C₁-C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリルまたはアラキル、OCF₃、OCN、O-、S-、またはN-アルキル；O-、S-、またはN-アルケニル；SOCH₃；SO₂CH₃；ONO₂；NO₂、N₃；ヘテロシクロアルキル；ヘテロシクロアルカリル；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノまたは置換シリルを含み、とりわけ、例えば、PCT特許出願WO 99/54459、欧州特許EP 0 586 520 B1またはEP 0 618 925 B1に記載される通りであり、それらの全体が参照により組み入れられる。本明細書において使用される通り、「アルキル」はC₁-C₁₂-アルキルを意味し、「低級アルキル」はC₁-、C₂-、C₃-、C₄-、C₅-、およびC₆-アルキルを含むC₁-C₆アルキルを意味する。

【0119】

別の局面において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端、アンチセンス鎖の5'末端、センス鎖の5'末端、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端、アンチセンス鎖の3'末端、またはセンス鎖の3'末端を、プロドラッグ部分に共有結合的に連結する。一態様において、その部分をエンドソーム中で切断する。別において、その部分を細胞質中で切断する。

【0120】

10

20

30

40

50

別の態様において、アンチセンス鎖もしくはセンス鎖のいずれかもしくは両方の上のその末端3'ヌクレオチドまたは2つの末端3'-ヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチドである。別の態様において、2'-デオキシヌクレオチドは2'-デオキシ-ピリミジンである。別の態様において、2'-デオキシヌクレオチドは2'-デオキシ-チミジンである。別の態様において、アンチセンス鎖もしくはセンス鎖のいずれかもしくは両方の上のその末端3'ヌクレオチドまたは2つの末端3'-ヌクレオチドは、塩基対合しておらず、即ち、それらは、1つまたは2つのヌクレオチドオーバーハングである。一態様において、アンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の3'末端は、-TTジヌクレオチドオーバーハングを有する。

【0121】

本発明の一局面は、ギャップマーを形成するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの修飾に関する。「ギャップマー」は、非デオキシオリゴヌクレオチドセグメントが隣接した2'-デオキシオリゴヌクレオチド領域を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドとして定義される。中央領域を「ギャップ」と称す。隣接セグメントを「ウィング」と称す。各々のウィングは、1つまたは複数の非デオキシオリゴヌクレオチドモノマーでありうる。一態様において、ギャップマーは、5つの非デオキシヌクレオチドウィングが隣接した10のデオキシヌクレオチドギャップである。これを5-10-5ギャップマーと称す。他の配置は、当業者により容易に認識される。一態様において、ウィングは、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-MOE)修飾ヌクレオチドを含む。別の態様において、ギャップマーはホスホロチオエート骨格を有する。別の態様において、ギャップマーは2'-MOEウィングおよびホスホロチオエート骨格を有する。他の適した修飾は、当業者により容易に認識可能である。

【0122】

shRNAおよび連結siRNA：別の局面は、shRNAおよび連結siRNAに関する。二本鎖構造が、2つの別々の鎖、即ち、アンチセンス鎖およびセンス鎖によって形成されることは本発明の範囲内である。しかし、アンチセンス鎖およびセンス鎖が、互いに共有結合的に連結されていることも本発明の範囲内である。そのような連結は、それぞれアンチセンス鎖およびセンス鎖を形成するヌクレオチドのいずれかの間に生じうる。そのような連結は、共有結合的または非共有結合的な連結から形成することができる。共有結合的な連結は、好ましくはメチレンブルーおよび二官能基を含む群より選択される化合物により、両方の鎖を、1回または数回、1つまたはいくつかの位置でそれぞれ連結することによって形成される。そのような二官能基は、好ましくは、ビス(2-クロロエチル)アミン、N-アセチル-N'-*p*-グリオキサールベンゾイル)シスタミン、4-チオウラシル、およびソラレンを含む群より選択される。

【0123】

一局面において、本発明のsiRNAのアンチセンス鎖およびセンス鎖は、ループ構造により連結される。一態様において、ループ構造は非核酸ポリマーで構成される。別の態様において、非核酸ポリマーはポリエチレングリコールである。別の態様において、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖の3'末端に連結される。別の態様において、アンチセンス鎖の3'末端は、センス鎖の5'末端に連結される。

【0124】

別の態様において、本発明のsiRNAのアンチセンス鎖およびセンス鎖は、核酸からなるループにより連結される。本明細書において使用される通り、ロックド核酸(LNA)(Ela yadi and Corey (2001) Curr Opin Investig Drugs.2(4):558-61)およびペプチド核酸(PNA)(Faseb J. (2000) 14:1041-1060に概説される)は、核酸として見なされ、ループ形成ポリマーとしても使用されうる。一態様において、核酸はリボ核酸である。一態様において、核酸はデオキシリボ核酸である。一態様において、siRNAのアンチセンス鎖の5'末端は、siRNAのセンス鎖の3'末端に連結され、shRNAを形成する。別の態様において、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端は、siRNAのセンス鎖の5'末端に連結され、shRNAを形成する。ループは、4つのヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの最小長からなる。特定の態様において、ループは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログからなる。一態様において、ループヌクレオチド配列

は、アンチセンス鎖の一部である。別の態様において、ループヌクレオチド配列は、センス鎖の一部である。別の態様において、アンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の部分が、ループヌクレオチド配列を形成する。別の態様において、ループヌクレオチド配列は異種配列であり、即ち、標的配列と同じまたは相補的ではない。

【0125】

リボ核酸コンストラクトを、適した発現ベクターシステム中に組み入れてもよい。好ましくは、ベクターは、RNAiの発現のためのプロモーターを含む。Good et al. (1997) Gene Ther, 4, 45-54に記載される通り、好ましくは、各々のプロモーターはpol IIIであり、より好ましくは、プロモーターはU6、H1、7SKプロモーターである。

【0126】

作製のプロセス：本発明の核酸は、化学合成、または核酸をインビトロ（例えば、ランオフ転写）またはインビボのいずれかで発現させることを含む当技術分野における通常の方法を使用して産生することができる。一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAは、固相化学合成を使用して産生する。別の態様において、核酸は、発現ベクターを使用して産生される。一態様において、発現ベクターは、本発明の核酸を、標的細胞において産生した。したがって、そのようなベクターは、医薬の製造のために使用することができる。本明細書に記載される核酸分子の合成のための方法は、当業者に公知である。

【0127】

一態様において、前記のsiRNAまたはshRNAは、真核生物発現のために適応された発現ベクターの一部である。好ましくは、前記のsiRNAまたはshRNAは、少なくとも1つのプロモーター配列に機能しうる態様で連結される。

【0128】

本発明の別の態様において、前記核酸分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方を転写する少なくとも2つのプロモーターを伴う、前記カセットを提供する。

【0129】

本発明の別の態様において、カセットは核酸分子を含み、ここで、この分子は、第2の部分に連結された第1の部分を含み、ここで、第1および第2の部分は、それらの配列の少なくとも一部にわたって相補的であり、さらにここで、核酸分子の転写はRNA分子を産生し、それは、第1および第2の部分の相補的な塩基対合によって二本鎖領域を形成し、それによってshRNAを形成する。

【0130】

「プロモーター」は、当技術分野で認識された用語であり、明瞭さのために、例示のみによって提供される以下の特徴を含む。エンハンサーエレメントは、遺伝子の転写開始部位の5'でしばしば見出されるシス作用性核酸配列である（エンハンサーは、遺伝子配列の3'でも見出される、または、イントロン配列中にさえ位置付けられる）。エンハンサーは、エンハンサーが連結される遺伝子の転写速度を増加させるように機能する。エンハンサー活性は、エンハンサーエレメントに特異的に結合することが示されているトランス作用性転写因子に応答性である。転写因子の結合/活性（Eukaryotic Transcription Factors, by David S Latchman, Academic Press Ltd, San Diegoを参照のこと）は、多数の生理学的/環境的な合図に対し応答する。

【0131】

プロモーターエレメントはまた、いわゆるTATAボックスおよびRNAポリメラーゼ開始選択配列を含み、それらは、転写開始部位を選択するように機能する。これらの配列は、とりわけ、RNAポリメラーゼによる転写開始選択を促進するように機能するポリペプチドにも結合する。

【0132】

適応はまた、選択可能マーカーおよび自律複製配列の提供を含み、それらは、真核細胞または原核宿主のいずれかにおける前記ベクターの維持を促進する。自律的に維持されるベクターを、エピソームベクターと称す。

10

20

30

40

50

【0133】

ベクターにコードされる遺伝子の発現を促進する適応には、転写終結/ポリアデニル化配列の提供が含まれる。発現制御配列は、いわゆる、遺伝子座制御領域(LCR)も含む。これらは、トランスジェニックコンストラクトとしてアッセイした場合、連結された遺伝子に、位置非依存的、コピー数依存的な発現を与える調節エレメントである。LCRは、隣接ヘテロクロマチンのサイレンシング効果からトランスジーンを隔離する調節エレメントを含む(Grosveld et al., Cell (1987), 51: 975-985)。

【0134】

一般的な発現ベクター構築および組換えDNA技術に関して、数多くの文献が発表されている。Sambrook et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NYおよびその中の参考文献; Marston, F (1987) DNA Cloning Techniques: A Practical Approach Vol III IRL Press, Oxford UK; DNA Cloning: F M Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)を参照。

10

【0135】

治療剤としてのウイルスまたは「ウイルスベクター」の使用は、当技術分野において周知である。加えて、多数のウイルスが、外因性遺伝子の送達のためのベクターとして一般に使用される。一般に用いられるベクターは、好ましくは、レトロウイルス科(retroviridae)、バキュロウイルス科(baculoviridae)、バルボウイルス科(parvoviridae)、ピコルナウイルス科(picornoviridae)、ヘルペスウイルス科(herpesviridae)、ボックスウイルス科、アデノウイルス科(adenoviridae)、またはピコルナウイルス科(picornaviridae)より選択される、組換え改変されたエンベロープまたは非エンベロープDNAおよびRNAウイルスを含む。キメラベクターも用いてもよく、それは親ベクターの特性の各々の有利な要素を利用する(例えば、Feng, et al. (1997) Nature Biotechnology 15:866-870を参照のこと)。そのようなウイルスベクターは、野生型でありうるが、または、組換えDNA技術によって改変され、複製欠損、条件的複製、または複製能力がありうる。

20

【0136】

好ましいベクターは、レトロウイルスゲノム(例えば、レンチウイルス)およびアデノ随伴ウイルスに由来するものを含む。ウイルスベクターは、条件的複製または複製能力がありうる。条件的複製ウイルスベクターを使用し、有害な広範囲の感染を回避しながら、特定の細胞型において選択的な発現を達成する。条件的複製ウイルスベクターの例は、Pennisi, E. (1996) Science 274:342-343; Russell, and S.J. (1994) Eur. J. of Cancer 30A(8):1165-1171に記載されている。選択的に複製するベクターのさらなる例は、ウイルスの複製のために必須、つまりそのような遺伝子の発現がない場合にはウイルスが複製しないような遺伝子が、特定の細胞型、または、細胞状態においてのみ活性であるプロモーターの制御下にあるようなベクターを含む。そのようなベクターの例は、Hendersonら、米国特許第5,698,443号(1997年12月16日取得)およびHendersonら、米国特許第5,871,726号(1999年2月16日取得)に記載されており、それらの全教示が、参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0137】

加えて、ウイルスゲノムは、特定の条件下でのみ複製または発現を達成する誘導性プロモーターを含むように改変してもよい。誘導性プロモーターの例は、科学文献において公知である(例えば、Yoshida and Hamada (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 230:426-430; Iida, et al. (1996) J. Virol. 70(9):6054-6059; Hwang, et al. (1997) J. Virol 71(9):7128-7131; Lee, et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17(9): 5097-5105; および Dreher, et al. (1997) J. Biol. Chem 272(46); 29364-29371を参照のこと)。

【0138】

一態様において、前記ベクターは、実質的に肺またはガンに特異的であるプロモーターを含む。好ましくは、前記プロモーターは肺ガン細胞において優先的に活性である。

50

【0139】

送達 / 製剤：アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびsiRNAを、インビトロおよびインビボの両方で、細胞との直接接触（「ネイキッド」送達）を含む当業者に公知の種々の方法により、または、細胞中への標的化または送達を促進する1つまたは複数の薬剤との組み合わせにより、細胞に送達することができる。そのような薬剤および方法は、リポプレックス、リポソーム、イオントフォレーシス、ヒドロゲル、シクロデキストリン、ナノカプセル、マイクロおよびナノスフィア、ならびにタンパク質性ベクターを含む（例えば、Bioconjugate Chem. (1999) 10:1068-1074およびWO 00/53722）。

【0140】

核酸組成物は、インビボで、局所的または全身的のいずれかで、静脈内、皮下、筋肉内、もしくは皮内注射または吸入を含む種々の手段により送達されうる。

【0141】

本発明の分子は、薬学的な剤として使用することができる。好ましくは、薬学的な剤は、対象における疾患状態の発生を予防、調節、または処置する（ある程度まで症状を、好ましくは症状の全てを軽減する）。ガンを処置する場合において、処置は、対象において腫瘍量または腫瘍体積を低下させる。

【0142】

また、ポリ(エチレングリコール)脂質(PEG修飾、または長期循環リポソームもしくはステルスリポソーム)を含む表面修飾リポソームを含む組成物の使用を提供する。これらの製剤は、それらの凝集および融合を防止することによって、リポソームまたはリポプレックス溶液の安定性を増加させるための方法を与える。製剤はまた、インビボにおいて、単核食細胞系(MPSまたはRES)によるオプソニン化および除去に抵抗するさらなる利点を有し、それによって、カプセル化薬物について、より長い血液循環時間および増強された組織への曝露を可能にする。そのようなリポソームは、恐らくは新血管形成標的組織における血管外漏出および捕捉によって、腫瘍中に選択的に蓄積することが示されている(Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90)。長期循環リポソームは、特にMPSの組織中に蓄積することが公知である従来のカチオン性リポソームと比較して、DNAおよびRNAの薬物動態および薬力学を増強する(Liuら、J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24780; Choiら、国際PCT公開WO 96/10391; Ansellら、国際PCT公開WO 96/10390; Hollandら、国際PCT公開WO 96/10392)。長期循環リポソームはまた、ヌクレアーゼ分解からsiRNAを保護する。

【0143】

本発明の核酸は、薬学的組成物として製剤化してもよい。薬学的組成物は、単独でまたは他の薬剤と組み合わせて、医薬としてまたは診断用薬剤として使用してもよい。例えば、本発明の1つまたは複数の核酸を、送達媒体(例えば、リポソーム)および/または担体、希釈剤などの賦形剤と組み合わせることができる。用語「賦形剤」は、薬学的に活性な成分のための担体として使用される、薬学的に許容される、薬学的に不活性な物質を指す。核酸分子の送達のための方法は、当技術分野において公知であり、例えば、Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., 1999, Mol. Memb. Biol., 16, 129-140; Hofland and Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192; およびLee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192、米国特許第6,395,713号、およびPCT WO 94/02595に記載される(それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)。本発明の核酸はまた、他の治療用化合物と組み合わせて投与することができる、例えば、組み合わせた単位用量として、別々にまたは同時に投与される。一態様において、本発明は、生理学的 / 薬学的に許容される安定剤、保存剤、希釈剤、緩衝剤などの賦形剤中に、本発明の1つまたは複数の核酸を含む薬学的組成物を含む。

【0144】

本発明の核酸を送達するために適した送達製剤の例は、WO28137758 (US28317839A1) およびWO29046220A2に開示されるものを含み、各々はその全体が参照により組み入れられる

10

20

30

40

50

。

【 0 1 4 5 】

適した送達システムは、Traversa Therapeutics (San Diego, California) のPTD-DRBDを含み、それは、二本鎖RNA結合ドメイン (DRBD) に融合したペプチド導入ドメイン (PTD) を含む。PTD (細胞透過性ペプチドまたはCPPとも呼ばれる) は、細胞表面上のプロテオグリカンに結合するペプチドである。結合PTDは、全ての細胞が行う液相取り込みの特殊な形態であるマクロピノサイトーシスによって細胞中に取り込まれる。マクロピノサイトーシスの利点は、それがリソソーム経路を含まないことであり、それによって、エンドソームから逃れるためのsiRNAペイロードの必要性を回避する。DRBDは、自明であり、即ち、二本鎖RNAに結合するタンパク質の結合ドメインである。PTD-DRBDは、WO2007095152 (US20090093026A1) (The Regents Of The University Of Californiaに帰属する) に開示されており、Nature Biotechnology (2009) 27(6): 567-571に公開されている (各々の特許出願および刊行物は、その全体が参照により組み入れられる)。

10

【 0 1 4 6 】

一態様において、PTDは、3回反復するHIV-1 tatタンパク質 (RKKRRQRRR) の一部分である。一態様において、DRBDは、プロテインキナーゼRNA活性化、つまりPKRタンパク質 (真核生物翻訳開始因子2-アルファキナーゼ2 (EIF2AK2) およびPRKRとしても公知である) の65アミノ酸

(FFMEELNTYRQKQGVLKYQELPNSGPPHRRRFTFQVIIDG
REFPEGEGRSKKEAKNAAAKLAVEILNKE)

20

部分を含む。他の態様において、PTDは、ヘルペスウイルスVP22タンパク質；ヒト免疫不全ウイルス (HIV) TATタンパク質を含むポリペプチド；アンテナペディアタンパク質のホメオドメイン (Antp HD) を含むポリペプチド、およびそれらの機能的フラグメントである。他の態様において、DRBDは、ヒストン、RDE-4タンパク質、プロタミンからなる群より選択される配列を含み、dsRNA結合タンパク質 (カッコ中はアクセッション番号) は、PKR (AAA36409、AAA61926、Q03963)、TRBP (P97473、AAA36765)、PACT (AAC25672、AAA49947、NP609646)、Staufen (AAD17531、AAF98119、AAD17529、P25159)、NFAR1 (AF167569)、NFAR2 (AF167570、AAF31446、AAC71052、AAA19960、AAA19961、AAG22859)、SPNR (AAK20832、AAF59924、A57284)、RHA (CAA71668、AAC05725、AAF57297)、NREBP (AAK07692、AAF23120、AAF54409、T33856)、kanadaplin (AAK29177、AAB88191、AAF55582、NP499172、NP198700、BAB19354)、HYLL (NP563850)、hyponastic leaves (CAC05659、BAB00641)、ADAR1 (AAB97118、P55266、AAK16102、AAB51687、AF051275)、ADAR2 P78563、P51400、AAK17102、AAF63702)、ADAR3 (AAF78094、AAB41862、AAF76894)、TENR (XP059592、CAA59168)、RNaseIII (AAF80558、AAF59169、Z81070Q02555/S55784、P05797)、およびDicer (BAA78691、AF408-401、AAF56056、S44849、AAF03534、Q9884)、RDE-4 (AY071926)、FLJ20399 (NP060273、BAB26260)、CG1434 (AAF48360、EAA12065、CAA21662)、CG13139 (XP059208、XP143416、XP110450、AAF52926、EEA14824)、DGCRK6 (BAB83032、XP110167)、CG1800 (AAF57175、EAA08039)、FLJ20036 (AAH22270、XP134159)、MRP-L45 (BAB14234、XP129893)、CG2109 (AAF52025)、CG12493 (NP647927)、CG10630 (AAF50777)、CG17686 (AAD50502)、T22A3.5 (CAB03384) およびアクセッション番号EAA14308のものを含む。

30

40

【 0 1 4 7 】

別の適した送達システムは、Calando Pharmaceuticals (以前はInsert Therapeuticsおよび持株会社Arrowhead Research Corporationの子会社) のClycodextrin Based Deliveryであり、RNAi/Oligonucleotide Nanoparticle Delivery (RONDEL) 技術として言及される。

【 0 1 4 8 】

RONDELの直線状シクロデキストリンは、環状オリゴ糖とカチオン含有化学連結基を連結することにより形成されたコポリマーである。連結基および末端基において見出されるア

50

ミンおよびイミダゾールは、エンドソーム放出において役立つ。シクロデキストリン含有ポリカチオン（CDP）と呼ばれるポリマーは、siRNAペイロードと凝縮する。

【0149】

シクロデキストリン分子の内部の環または核は疎水性であり、疎水性化合物を取り込むために使用することができる。形成された複合体は、包接複合体と呼ばれる。RONDEL製剤中では、シクロデキストリンサブユニットの疎水性核は、アダマンチン-PEGコンジュゲートの分子を固定するために使用される。PEGはアダマンチンにコンジュゲートされ、次に、PEG-アダマンチンコンジュゲートは直線状シクロデキストリン（CDP）と組み合わせられる。特定の細胞型にナノ粒子を標的化するために、リガンドをPEG-アダマンチン分子のPEG部分にコンジュゲートし、アダマンチン-PEG-リガンド複合体を形成する。RONDELの場合において、ヒトトランスフェリンタンパク質（Tf）は、使用することができるリガンドの1つの例である。その理由は、大半のガン細胞が、細胞表面上にヒトトランスフェリン受容体を過剰発現するからである。

10

【0150】

RONDEL製剤の例が、David et al. (2010) Nature 464:1067-1070およびHeidel et al. PNAS (2007) 104(14):5717-5721に開示されている（各々は、その全体が参照により組み入れられる）。直線状シクロデキストリン技術が、WO0001734（US20070025952A1、US20020151523A1、US7091192、US6884789、およびUS6509323）に開示および特許請求されている（各々は、その全体が参照により組み入れられる）。アダマンチン-PEGおよびアダマンチン-PEG-TFとの包接複合体を含む直線状シクロデキストリン包接複合体が、WO0249676（US20070128167A1、US20060182795A1、US20030017972A1、US20030008818A1、US7166302、およびUS7018609）に開示されている（各々は、その全体が参照により組み入れられる）。

20

【0151】

他の製剤はSNALPを含み、Nature Biotechnology (2005) 23(8): 1002-1007に開示されており、その全体が参照により組み入れられる。SNALP製剤が、WO05120152（US20060083780A1 & US20060008910A1）、WO05026372A1（US20050175682A1）、WO06007712（US20060051405A1 & US20060025366A1）に開示されており、各々は、その全体が参照により組み入れられる。SNALP製剤の例は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3ホスホコリン（DSPC）MW 387、コレステロールMW 790、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン（DLinDMA）MW 616および3-N-[-メトキシポリ(エチレングリコール)平均MW2000]カルバモイル]-1,2-ジミリスチルオキシ-プロピルアミン（PEG-C-DMA）MW 2524である。別の有用な態様において、上のDLinDMA成分は、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン（DLin-KC2-DMA）を用いて置換される。これおよび他の有用な製剤が、WO2009086558およびWO2009132131に開示されており、各々は、その全体が参照により組み入れられる。

30

【0152】

他の有用な製剤はリポイドに基づき、Nature Biotechnology (2008) 26:561-569およびLove et al. PNAS (2010) 107(5): 1864-1869およびWO28042973A2（USUS20090023673A1）およびWO28042973A2（USUS20090023673A1）に開示されている通りであり、各々は、その全体が参照により組み入れられる。

40

【0153】

他の有用な製剤は、WO2010021865およびWO2007086881A2およびWO2007086883（US20100063308A1 US20090048197A1 US20080188675A1 US20080020058A1 US20060240554A1 US7691405、US7641915、US7514099およびUS7404969）WO2008147438A2（US20100048888A1、US2009048197A1、US20080020058A1およびUS7691405、US7404969）に開示されるものであり、各々は、その全体が参照により組み入れられる。

【0154】

他の有用な製剤は、WO2007095152（US20090093026A1）およびNature Biotechnology (2009) 27(6): 567-571のものを含み、各々は、その全体が参照により組み入れられる。

【0155】

50

他の有用な製剤は、Rozema et al. (2007) PNAS 104(32): 12982-12987、Heidel et al. PNAS (2007) 104(14): 5717-5721)、Wakefield et al. (2005) Bioconjugate Chem. 16 (5):1204-1208およびWO0001734 (US20070025952A1、US20020151523A1、US7091192、US68 84789、およびUS6509323)、WO0249676 (US20070128167A1、US20060182795A1、US2003001 7972A1、US20030008818A1、US7166302、およびUS7018609)、WO04090107 (US20070105804 A1、US20070036865A1、およびUS20040198687A1)、WO2008022309 (US20090048410A1、US2 0090023890A1、US20080287630A1、US20080287628A1、US20080281074A1、US20080281044A1、US20080281041A1、US20080269450A1、US20080152661A1)からのものを含み、各々は、その全体が参照により組み入れられる。

【0156】

本発明の組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独で、またはさらなる用量と一緒に、所望の応答を産生する組成物の量である。例えば、ガンなどの特定の疾患を処置する場合において、所望の応答とは、疾患の進行を阻害することである。これは、疾患の進行を一時的に遅らせることのみを含みうるが、より好ましくは、疾患の進行を恒久的に停止させることを含む。これは、日常的な方法によってモニターすることができる。

【0157】

そのような量は、当然、処置される特定の状態、状態の重症度、個々の患者パラメーター（年齢、健康状態、サイズおよび体重、処置の持続期間、併用治療の性質（ある場合）、特定の投与経路、および医療従事者の知識および専門知識内の同様の因子を含む）に依存する。これらの因子は当業者に周知であり、単に日常的な実験法を用いて対処することができる。一般的に、個々の成分またはそれらの組み合わせの最大用量、即ち、妥当な医学的判断に従った最も高い安全用量を使用することが好ましい。しかし、患者が、医学的な理由、心理学的な理由のために、または、実質的に任意の他の理由のために、より低い用量または耐容量を主張しうるものが、当業者により理解されるであろう。

【0158】

先の方法において使用される薬学的組成物は、好ましくは、無菌であり、患者への投与のために適した重量または容積単位で所望の応答を産生するために本発明による薬剤の有効量を含む。

【0159】

対象に投与される本発明によるsiRNA/shRNAの用量は、様々なパラメーターに従って、特に、使用される投与様式および対象の状態に従って選ぶことができる。他の因子は、所望の処置期間を含む。対象における応答が、適用された初回用量で不十分である事象において、より高い用量（または、異なる、より局所的な送達経路による有効でより高い用量）を、患者の耐容性が許す範囲で用いてもよい。

【0160】

本発明の医薬および薬学的組成物のための投与量レベルは、日常的な実験法によって、当業者により決定することができる。一態様において、単位用量は、約0.01mg/kg～約100 mg/kg体重の核酸を含む。一態様において、核酸の用量は、約10mg/kg～約25mg/kg体重である。一態様において、核酸の用量は、約1mg/kg～約10mg/kg体重である。一態様において、核酸の用量は、約0.05mg/kg～約5mg/kg体重である。別の態様において、核酸の用量は、約0.1mg/kg～約5mg/kg体重である。別の態様において、核酸の用量は、約0.1mg/kg～約1mg/kg体重である。別の態様において、核酸の用量は、約0.1mg/kg～約0.5mg/kg体重である。別の態様において、核酸の用量は、約0.5mg/kg～約1mg/kg体重である。別の態様において、siRNA/shRNAの用量は、1nM～1μMの間である。特定の態様において、用量は、1nM～500nM、5nM～200nM、および10nM～100nMの範囲でありうる。組成物の投与のための他のプロトコルが、当業者に公知であり、ここで、投与量、注射スケジュール、注射部位、投与様式などは前述とは異なる。ヒト以外の哺乳動物への組成物の投与は（例えば、試験目的または獣医治療目的のため）、上記と実質的に同じ条件下で行われる。対象は、本明細書において使用される通り、哺乳動物、好ましくはヒトであり、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、または齧歯類を含む。

10

20

30

40

50

【0161】

投与される場合、本発明の薬学的調製物は、薬学的に許容される量であり、薬学的に許容される組成物中で適用される。用語「薬学的に許容される」は、活性成分の生物学的活性の有効性に干渉しない非毒性物質を意味する。そのような製剤は、通常使用する、塩、緩衝剤、保存剤、適合する担体、および、場合によっては、他の治療剤を含んでもよい。薬学的組成物は、好都合に、単位投与形態で提示してもよく、薬学の分野において周知の方法のいずれかによって調製される。

【0162】

一態様において、薬学的組成物は、無菌の水性懸濁液または溶液である。別の態様において、薬学的組成物は、無菌の注射可能な水性懸濁液または溶液である。一態様において、薬学的組成物は凍結乾燥形態である。一態様において、薬学的組成物は凍結乾燥リポプレックスを含み、このリポプレックスは本発明の核酸を含む。別の態様において、薬学的組成物はリポプレックスの水性懸濁液を含み、このリポプレックスは本発明の核酸を含む。

10

【0163】

本発明の薬学的組成物および医薬は、哺乳動物に投与してもよい。一態様において、哺乳動物は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットからなる群より選択される。一態様において、哺乳動物はヒトである。別の態様において、哺乳動物は非ヒトの哺乳動物である。

【0164】

本明細書において使用される通り、用語「ガン」または「ガン性」は、自律増殖のための能力、即ち、急速に増殖する細胞増殖によって特徴付けられる異常な状態または条件を有する細胞を指す。この用語は、病理組織型および侵襲性のステージにかかわらず、ガン性増殖または発ガンプロセス、転移性組織、または悪性形質転換細胞、組織、もしくは臓器の全ての型を含むことを意味する。用語「ガン」は、種々の臓器系の悪性腫瘍、例えば、肺、乳房、甲状腺、リンパ系、胃腸、および尿生殖路に罹患するものなど、ならびに悪性腫瘍、例えば、大半の結腸ガン、腎細胞ガン、前立腺ガンおよび/または精巣腫瘍、肺の非小細胞ガン、小腸のガン、および食道のガンなどを含む腺ガンを含む。用語「ガン再発」は、本明細書において使用される通り、ガン細胞が身体において検出できなかった期間の後でのガンが検出されること、またはガンが再び現れることを指す。用語「ガン」は、当技術分野で認識されており、呼吸器系ガン、胃腸系ガン、泌尿生殖器系ガン、精巣ガン、乳ガン、前立腺ガン、内分泌系ガン、および黒色腫を含む、上皮または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。例示的なガンは、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸、および卵巣の組織から形成されるものを含む。用語「ガン」はまた、例えばガン組織および肉腫組織で構成される、悪性腫瘍を含むガン肉腫を含む。「腺ガン」は、腺組織に由来する、または、腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成するガンを指す。用語「肉腫」は、当技術分野で認識され、間葉系由来の悪性腫瘍を指す。さらなる例は、肺ガン、例えば、小細胞肺ガンまたは非小細胞肺ガンを含む。肺ガンの他のクラスは、神経内分泌ガン、肉腫、および異なる組織由来の転移性ガンを含む。

20

30

【0165】

本発明の別の局面によれば、対象においてガンを診断する方法において：この方法は、
i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
ii) Ciz1 b変異体転写物が生物学的試料中に存在するか否かを決定する工程
を含み、ここで、Ciz1 b変異体転写物の存在が対象におけるガンの存在を示す、方法が提供される。

40

【0166】

一態様において、対象はヒトである。

【0167】

一態様において、ガンはガンの再発である。

【0168】

50

Ciz1 b変異体は、いくつかのガン（NSCLCおよびSCLCの両方である肺ガン、乳ガン、甲状腺ガン、膀胱ガン、肝臓ガン、腎臓ガン、リンパ腫、および白血病を含む）において検出されている。一態様において、ガンは肺ガンである。さらなる態様において、肺ガンはNSCLCである。別のさらなる態様において、肺ガンはSCLCである。別の態様において、ガンは乳ガンである。別の態様において、ガンは甲状腺ガンである。さらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺髄様ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンはヒュルトレ細胞ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺乳頭ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺濾胞ガンである。別の態様において、ガンはリンパ腫である。さらなる態様において、リンパ腫はB細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はホジキンリンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は濾胞性リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は未分化大細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は節外周辺帯B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は脾臓周辺帯B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はマントル細胞リンパ腫である。別の態様において、ガンは白血病である。別のさらなる態様において、白血病は慢性リンパ性白血病である。別のさらなる態様において、白血病はヘアリー細胞白血病である。

10

【0169】

一態様において、生物学的試料は、固形組織試料、血液、血漿、血清、喀痰、尿、または気管支肺胞洗浄液より選択される。さらなる態様において、試料は固形組織試料である。別のさらなる態様において、試料は血液である。別のさらなる態様において、試料は血漿である。別のさらなる態様において、試料は血清である。別のさらなる態様において、試料は喀痰である。別のさらなる態様において、試料は尿である。別のさらなる態様において、試料は気管支肺胞洗浄液である。別のさらなる態様において、生物学的試料は循環腫瘍細胞（CTC）である。さらなる態様において、生物学的試料中のCiz1 b変異体転写物は、細胞外にある、即ち、細胞の外に存在する。

20

【0170】

一態様において、方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用し、Ciz1 b変異体転写物の存在を検出する。別の態様において、ヌクレオチドプライマーをPCRにおいて使用し、エクソン14bとエクソン15の間の接合部にまたがる核酸の部分を増幅する。別の態様において、PCRを使用して増幅された核酸産物は、ヌクレオチド配列

30

5' TGGACCTCACCTCGATCTCT 3'

を含む。別の態様において、PCRを使用して増幅された核酸は、ヌクレオチド配列

5' GATATATCTCTGGACCTCACCTCGATCTCTTCTTCATCCT 3'

を含む。別の態様において、増幅された核酸産物は、通常に対応する対照を伴う。

【0171】

一態様において、ガンは、リンパ腫、肺ガン、乳ガン、腎臓ガン、甲状腺ガン、または結腸ガンである。一態様において、ガンは小細胞肺ガン（SCLC）である。別の態様において、ガンは非小細胞肺ガンである。別の態様において、ガンは乳ガンである。別の態様において、ガンは腎臓ガンである。別の態様において、ガンはリンパ腫である。別の態様において、ガンは結腸ガンである。

40

【0172】

一態様において、前記の増幅産物を、核酸配列

5'GAAGAAGAGATCGAGGTGAGGTCCAGAGA3'

を切断しない制限エンドヌクレアーゼで消化する。

【0173】

別の態様において、前記の制限エンドヌクレアーゼはCAC81である。

【0174】

別の態様において、前記オリゴヌクレオチドプライマー対を適応し、核酸配列
GAAGAAGAGATCGAGGTGAGGTCCAGAGA

50

を含む核酸分子を特異的に増幅する。

【0175】

別の態様において、前記プライマー対中の前記オリゴヌクレオチドプライマーの1つは、核酸配列

5' GAAGAGATCGAGGTGAGGTC 3'

を含むか、またはそれからなる。

【0176】

別の態様において、前記オリゴヌクレオチドプライマー対は、核酸配列

5' GAAGAGATCGAGGTGAGGTC 3'; および

5' GAAGAAGAGATCGAGGTGAGGTCCAGAGA.3'

を含むか、またはそれからなる。

【0177】

別の態様において、配列

GAAGAAGAGATCGAGGTGAGGTCCAGAGA

を含む増幅産物は、ヌクレオチド配列

5' TGGACCTCACCTCGATCTCTTCTTCA 3'

を含むか、またはそれからなるオリゴヌクレオチドプローブを用いて検出する。

【0178】

本発明の好ましい方法において、生物学的試料は肺細胞を含む。

【0179】

別の態様において、診断を、診断されるガンについて適した処置計画と組み合わせる。

【0180】

別の態様において、処置計画は、抗ガン剤の投与を含む。

【0181】

別の態様において、化学療法剤は、シスプラチン、カルボプラチン、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン、エトポシド、ドキシソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタピン、およびビノレルピンからなる群より選択される。

【0182】

別の態様において、抗ガン剤は、本発明によるsiRNAまたはshRNAである。

【0183】

別の態様において、処置計画は、少なくとも1つのsiRNAまたはshRNAの投与を含み、化学療法剤は、別々に、同時に、または連続的に投与される。

【0184】

一態様において、ガンは肺ガンである。別の態様において、肺ガンは小細胞肺ガンである。別の態様において、肺ガンは非小細胞肺ガンである。

【0185】

本発明の一局面において、ガンを有するヒトにおいてCiz1 b変異体mRNAから翻訳されたCiz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出する方法を提供し、この方法は以下の工程：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出する工程、を含む。

【0186】

一態様において、生物学的試料は血漿である。

【0187】

一態様において、ガンは肺ガンである。

【0188】

本発明の一局面において、Ciz1 b変異体mRNAから翻訳されたCiz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

iii) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

10

20

30

40

50

iv) Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出する工程
を含み、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、ガンの存在を示す。

【0189】

一態様において、対象はヒトである。

【0190】

一態様において、生物学的試料は血漿である。

【0191】

一態様において、ガンはガン再発である。

【0192】

一態様において、ガンは肺ガンである。

10

【0193】

本発明の一態様において、Ciz1 b変異体mRNAから翻訳されたCiz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) 生物学的試料を、前記Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

iii) Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合した前記の抗体または抗原結合フラグメントの存在を検出する工程

を含み、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、ガンの存在を示す。

20

【0194】

一態様において、ガンはガン再発である。

【0195】

一態様において、対象はヒトである。

【0196】

一態様において、抗体は、前記Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合するが、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドには特異的に結合しない。

【0197】

一態様において、生物学的試料は、固形組織試料、血液、血漿、血清、喀痰、尿、または気管支肺胞洗浄液より選択される。さらなる態様において、生物学的試料は固形組織試料である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血液である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血漿である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血清である。別のさらなる態様において、生物学的試料は喀痰である。別のさらなる態様において、試料は尿である。別のさらなる態様において、生物学的試料は気管支肺胞洗浄液である。別のさらなる態様において、生物学的試料は循環腫瘍細胞（CTC）である。さらなる態様において、前記の生物学的試料中のCiz1 b変異体転写物は、細胞外にある、即ち、細胞の外に存在する。

30

【0198】

一態様において、ガンは肺ガンである。さらなる態様において、肺ガンはNSCLCである。さらなる態様において、肺ガンはステージ0のNSCLCである。さらなる態様において、肺ガンはステージIのNSCLCである。さらなる態様において、肺ガンはステージIIのNSCLCである。さらなる態様において、肺ガンはステージIIIのNSCLCである。さらなる態様において、肺ガンはステージIVのNSCLCである。別のさらなる態様において、肺ガンはSCLCである。別のさらなる態様において、肺ガンは限定されたステージのSCLCである。別のさらなる態様において、肺ガンは広範なステージのSCLCである。別の態様において、ガンは乳ガンである。別の態様において、ガンは甲状腺ガンである。さらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺髄様ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンはヒュルトレ細胞ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺乳頭ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺濾胞ガンである。別の態様において、ガンはリンパ腫である。さらなる態様において、リンパ腫はB細胞リンパ腫である。別のさらなる態

40

50

様において、リンパ腫はホジキンリンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は濾胞性リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は未分化大細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は節外周辺帯B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は脾臓周辺帯B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はマントル細胞リンパ腫である。別の態様において、ガンは白血病である。別のさらなる態様において、白血病は慢性リンパ性白血病である。別のさらなる態様において、白血病はヘアリー細胞白血病である。別のさらなる態様において、ガンは腎臓ガンである。別のさらなる態様において、ガンは肝臓ガンである。別のさらなる態様において、ガンは膀胱ガンである。

10

【0199】

一態様において、前記のb変異体ポリペプチドは、タンパク質分解的に切断されたCiz1 b変異体ポリペプチドフラグメントである。さらなる態様において、ポリペプチドフラグメントは、エクソン14bおよび15によってコードされるポリペプチド配列を含む。さらなる態様において、ポリペプチドフラグメントは、アミノ酸配列DEEEIEVRSRDISを含む。別の態様において、フラグメントは、分解の程度に依存して、8% SDS-PAGE上で、約50~60 kDaの間の見掛けの分子量を伴って移動する。さらなる態様において、フラグメントは、8% SDS-PAGE上で、約50kDaの見掛けの分子量を伴って移動する。一態様において、抗体は、エクソン14bおよびエクソン15の両方によってコードされるアミノ酸残基を含む連続エピートープに特異的に結合する。別の態様において、抗体は、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合するが、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドには特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、少なくとも10倍上回る親和性で、Ciz1 b変異体ポリペプチドよりもエクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドに特異的に結合する。一態様において、抗体は、少なくとも100倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、前記の抗体は、少なくとも1,000倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、抗体は、少なくとも10,000倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、抗体は、少なくとも100,000倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。

20

30

【0200】

一態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEIEVRSRDIS

に特異的に結合する。一態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEIEVRSRDIS

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEIE, VRSRDISまたはDEEEIEVEEELCKQVRSRDIS

のいずれにも特異的に結合しない。一態様において、抗体は、アミノ酸配列

40

EGDEEEEDDEDEEEIEVRSRDISREEWKGSETY

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EGDEEEEDDEDEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETY

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEEDDEDEEEIEVRSRDISREEWKGSE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEEDDEDEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEEDDEDEEEIEVRSRDISREEWKGSE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

50

DEEEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEEIEVRSRDISREEWKG

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKG

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEEIEVRSRDISREEW

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEW

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DDEDEEEEEIEVRSRDISRE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISRE

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEDEEEEEIEVRSRDISR

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISR

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EDEEEEEIEVRSRDIS

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDIS

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEEEIEVRSRDI

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEEEIEVEEELCKQVRSRDI

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EIEVRSR

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EIEVEEELCKQVRSR

には特異的に結合しない。

【0201】

別の局面において、本発明は、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。一態様において、抗体はモノクローナル抗体である。別の態様において、前記の抗体はポリクローナル抗体である。別の態様において、抗体は、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合するが、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドには特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、少なくとも10倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドよりもCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。一態様において、抗体は、少なくとも100倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、抗体は、少なくとも1000倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、抗体は、エクソン14bおよびエクソン15によってコードされるアミノ酸残基を含む連続エピトープに特異的に結合する。一態様において、抗体は、アミノ酸配列

EGDEEEEEDEDEEEEEIEVRSRDISREEWKGSETY

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EGDEEEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETY

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEEIEVRSRDISREEWKGSE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

10

20

30

40

50

DEEEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEIEVRSRDISREEWKGSE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEIEVRSRDISREEWKG

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKG

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEIEVRSRDISREEW

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEW

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DDEDEEEEIEVRSRDISRE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISRE

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEDEEEEIEVRSRDISR

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISR

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EDEEEEIEVRSRDIS

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EDEEEEIEVEEELCKQVRSRDIS

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

DEEEEIEVRSRDI

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEEIEVEEELCKQVRSRDI

には特異的に結合しない。別の態様において、抗体は、アミノ酸配列

EIEVRSR

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EIEVEEELCKQVRSR

には特異的に結合しない。

【0202】

本発明の別の局面において、本発明によるモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを産生するハイブリドーマ細胞株を提供する。

【0203】

本発明の別の局面は、肺結節が、胸部X線、コンピューター断層撮影（CT）スキャン（低線量ヘリカル（スパイラル）CTスキャンを含む）、磁気共鳴画像法（MRI）、陽電子放射断層撮影（PET）スキャン、または他の撮影方法によって観察される通り、ガン性であるか否かを予測または決定する方法である。肺における組織の小さな腫瘍である肺結節は、非常に一般的である。大半の肺結節が非ガン性（良性）であるが、一部は早期肺ガンを表す。肺結節は、通常、胸部X線またはCTスキャン上で、丸く白い影として現れる。肺結節は、通常、約1/5インチから1インチ、または5ミリメートル（mm）から25mmのサイズである。

【0204】

一局面において、本発明は、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出することによって、肺結節がガン性であるか否かを予測または決定する方法を提供し、この方法は以下：

i) 肺結節を伴うヒト由来の、試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程

10

20

30

40

50

;

ii) 生物学的試料を、例えば、前記Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントなどのCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤と接触させる工程；

iii) Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合したCiz1 b変異体ポリペプチド結合剤（抗体または抗原結合フラグメント）の存在を検出する工程を含み、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、肺ガンの存在を示す。

【0205】

一態様において、生物学的試料は血漿である。

【0206】

本発明の別の局面は、対象における肺ガンの早期検出のための方法であり、この方法は以下：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出する工程、

iii) Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、ガンの存在を示す、ことを含む。

【0207】

一態様において、肺ガンはステージ0、IA、またはIBのNSCLCである。NSCLCはステージ0からステージIVでありうる。ステージ0はインサイチュのガンとして定義される。ステージIAにおいて、ガンは肺内だけであり、3cmまたはそれより小さい。ステージIBにおいて、ガンは、(a) 3cmより大きく、しかし、5cmより大きくない、(b) 主気管支まで広がっている、および/または(c) 肺裏層の最も内側の層まで広がっている。SCLCについて2つのステージ、つまり限定されたステージおよび広範なステージの疾患がある。限定されたステージのSCLC対象は、半胸郭由来、縦隔、または鎖骨上リンパ節に限局した腫瘍を有し、当技術分野において周知であり、National Cancer Institute (NCI) (Bethesda, MD, USA) により公開されたPhysician Data Query (PDQ) によって定義され、その全体が参照により組み入れられる。

【0208】

しばしば、放射線単独を使用して肺炎とガン性病変とを鑑別診断することは困難である。本発明の別の局面は、本発明のCiz1 b変異体ポリペプチドの存在を検出することによって、患者が肺炎または肺ガンに苦しんでいるか否かを鑑別診断する手段を提供し、この方法は以下：

i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) 生物学的試料を、前記Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

iii) Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合した抗体または抗原結合フラグメントの存在を検出する工程

を含み、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在は、ガンの存在を示す。

【0209】

一態様において、生物学的試料は、固形組織試料、血液、血漿、血清、喀痰、尿、または気管支肺胞洗浄液より選択される。さらなる態様において、生物学的試料は固形組織試料である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血液である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血漿である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血清である。別のさらなる態様において、生物学的試料は喀痰である。別のさらなる態様において、試料は尿である。別のさらなる態様において、生物学的試料は気管支肺胞洗浄液である。別のさらなる態様において、生物学的試料は循環腫瘍細胞 (CTC) である。一態様において、ガンは肺ガンである。さらなる態様において、肺ガンはNSCLCである。別のさらなる態様において、肺ガンはSCLCである。

【0210】

本明細書において開示される、ガンを検出するための方法は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも94%の

10

20

30

40

50

1標準偏差 (SD) での感度を有する。本明細書において開示される、ガンを検出するための方法は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%の1標準偏差での特異度を有する。感度は、(ガンを有すると正確に診断された対象の数) / (ガンを伴う対象の総数) × 100 (1 SDでの) として定義される。特異度は、(ガンを有するおよびガンを有しないと正確に診断された対象の数) / (対象の総数) × 100 (1 SDでの) として定義される。

【0211】

ROC (受信者動作特性) 曲線は、全ての可能な間隔での (1 - 特異度) に対する感度を使用してプロットされ、ROC曲線下面積 (AUC) を生成する。例えば、<http://www.jrocf.it.org> で入手可能な、ウェブに基づく計算機 (連続分散データ用のフォーマット5) を便宜上使用してもよい。

10

【0212】

大半のガン治療 (放射線、小分子、または生物製剤を問わず) は細胞傷害性であり、アポトーシスを誘発することによって、ネクローシスを介して、または2つの組み合わせのいずれかによって細胞を殺傷する。さらに、これらの治療は、通常、ガン細胞に完全に特異的であるわけではなく、特定の治療および患者に依存して、多かれ少なかれ正常細胞を殺す。正常細胞の非特異的な殺傷は、用量依存的な副作用に導く。正常細胞が殺される範囲は患者間で変動し、患者が用量制限毒性を経験する用量を予測することを困難にする。患者がいつ治療的な制限用量を有するかまたはそれに達しうるかを決定または予測することができる、より良好な患者のケアを導きうる。非特異的な細胞傷害性または用量依存的な細胞傷害性の程度は、ガン細胞により、それが死ぬ時に放出されるバイオマーカの量を、ガン細胞または正常細胞のいずれかが死ぬ時に放出されるバイオマーカの量と比較することによって直接的に決定することができる。一局面において、本発明は、腫瘍細胞から、それが死ぬ時に放出されるCiz1 b変異体ポリペプチドの量を、腫瘍細胞または正常細胞の両方から、それが死ぬ時に放出される細胞死バイオマーカの量と比較することにより、Ciz1 b変異体ポリペプチドを発現するガンを処置するために施されたガン治療の結果としての非特異的な細胞傷害性を測定する方法を提供する。Ciz1 b変異体ポリペプチドと細胞死バイオマーカの比率が低いほど、非特異的な細胞傷害性は大きくなる。

20

【0213】

一局面において、方法は以下：

30

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) 生物学的試料中に存在する前記Ciz1 b変異体ポリペプチドの量を測定する工程であって、Ciz1 b変異体ポリペプチドの存在がガン細胞の細胞傷害性を示す、工程；
- iii) 細胞死バイオマーカの量を測定する工程であって、細胞死バイオマーカが、ガン細胞および正常細胞の両方の細胞傷害性を示す、工程；
- iv) Ciz1 b変異体ポリペプチドの量を、細胞死バイオマーカの量と比較する工程を含む。

【0214】

一態様において、生物学的試料は、固形組織試料、血液、血漿、血清、喀痰、尿、または気管支肺胞洗浄液より選択される。さらなる態様において、生物学的試料は固形組織試料である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血液である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血漿である。別のさらなる態様において、生物学的試料は血清である。別のさらなる態様において、生物学的試料は喀痰である。別のさらなる態様において、試料は尿である。別のさらなる態様において、生物学的試料は気管支肺胞洗浄液である。

40

【0215】

一態様において、細胞死バイオマーカは、アポトーシスについてのバイオマーカである。別の態様において、細胞死バイオマーカは、ネクローシスについてのバイオマーカである。別の態様において、細胞死バイオマーカは、アポトーシスおよびネクローシスの両方についてのバイオマーカである。一態様において、細胞死バイオマーカは

50

、サイトケラチン18 (CK18) である。さらなる態様において、方法は、完全長CK18の量を測定する。別の態様において、方法は、カスパーゼ切断CK18の量を測定する。完全長CK18およびカスパーゼ切断CK18の両方を測定するための抗体およびキットは、市販されている。例えば、カスパーゼ切断CK18を検出するためのM30 APOPTOSENSEおよび完全長CK18を検出するためのM65 ELISAが、Peviva AB (Bromma, Sweden) から市販されている。別の態様において、細胞死バイオマーカーは、ヌクレオソームDNA (nDNA) である (ヒストン関連DNAとしても言及される)。nDNAを測定するための抗体およびキットは、市販されている。例えば、Cell Death Detection ELISAは、Roche Diagnosticsから市販されている。別の態様において、細胞死マーカーはシクロフィリンAである。

【0216】

本発明の別の局面は、前記のCiz1 b変異体転写物またはポリペプチドの相対量を、処置の過程の前、ならびにその間および後のいずれかまたは両方に測定することによって、対象においてガン治療の効力を決定する方法である。本明細書において使用される通り、「処置の過程」は、特定の期間にわたり追跡される処方された計画を指す。一態様において、方法は以下：

i) ガン治療を用いた処置の前に、対象由来の、試験に供する第1の単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) ガン治療を用いた処置の過程の間に、対象由来の、試験に供する第2の単離された生物学的試料を提供する工程；

iii) 各々の生物学的試料を、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと別々に接触させる工程；

iv) 各々の生物学的試料中に存在するCiz1 b変異体ポリペプチドの量を測定する工程を含み、第1の試料と比較した、第2の試料中のCiz1 b変異体ポリペプチドの量における増加は、ガン治療の効力を示している。

【0217】

別の態様において、方法は以下：

i) ガン治療を用いた処置の前に、対象由来の、試験に供する第1の単離された生物学的試料を提供する工程；

ii) ガン治療を用いた処置の過程の後に、対象由来の、試験に供する第2の単離された生物学的試料を提供する工程；

iii) 各々の生物学的試料を、前記Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと別々に接触させる工程；

iv) 各々の生物学的試料中に存在する前記Ciz1 b変異体ポリペプチドの量を測定する工程

を含み、第1の試料と比較した、第2の試料中のCiz1 b変異体ポリペプチドの量における減少は、ガン治療の効力を示している。

【0218】

他の態様においては、上記の方法を改変し、Ciz1 b変異体ポリペプチドよりはむしろ、Ciz1 b変異体転写物を検出する。

【0219】

本発明のさらなる局面によれば、核酸配列

5' GAAGAAGAGAUCGAGGUGAGGUCCAGAGA 3'

を含むmRNA分子を検出するためのオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブを含むキットを提供する。

【0220】

本発明の一態様において、前記キットは、核酸配列

5' GAAGAGATCGAGGTGAGGTC 3'および**5' TGGACCTCACCTCGATCTCTTCTTCA 3'**

を含むか、またはそれからなるオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブを含む。

【0221】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい態様において、前記キットは、さらに、熱安定性DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸を含む。別の態様において、前記キットは、前記の核酸分子を選択的に増幅するために必要な説明書を含む。

【0222】

本発明のさらなる局面によれば、Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAと、Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz 1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iii) Ciz 1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iv) Ciz1複製ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAと、Ciz1固定化ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むmRNAの相対的な発現レベルを比較する工程を含み、少なくとも2倍の相対的な発現における差は、ガンを示している。

10

【0223】

本発明の一態様において、SEQ ID NO:12のヌクレオチド配列を含むmRNAと、SEQ ID NO:18のヌクレオチド配列を含むmRNAの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

20

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) SEQ ID NO:12のヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iii) SEQ ID NO:18のヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iv) SEQ ID NO:12のヌクレオチド配列を含むmRNAと、SEQ ID NO:18のヌクレオチド配列を含むmRNAの相対的な発現を比較する工程を含み、相対における少なくとも2倍の差は、ガンを示している。

【0224】

本発明の別の態様において、SEQ ID NO:13のヌクレオチド配列を含むmRNAと、SEQ ID NO:19のヌクレオチド配列を含むmRNAの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

30

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) SEQ ID NO:13のヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iii) SEQ ID NO:19のヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iv) SEQ ID NO:13のヌクレオチド配列を含むmRNAと、SEQ ID NO:19のヌクレオチド配列を含むmRNAの相対的な発現を比較する工程を含み、相対における少なくとも2倍の差は、ガンを示している。

【0225】

本発明の別の態様において、SEQ ID NO:14のヌクレオチド配列を含むmRNAと、SEQ ID NO:20のヌクレオチド配列を含むmRNAの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

40

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) SEQ ID NO:14のヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iii) SEQ ID NO:20のヌクレオチド配列を含むmRNAの存在を検出する工程；
- iv) SEQ ID NO:14のヌクレオチド配列を含むmRNAと、SEQ ID NO:20のヌクレオチド配列を含むmRNAの相対的な発現を比較する工程を含み、相対における少なくとも2倍の差は、ガンを示している。

【0226】

一態様において、本方法はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用し、前記のCiz1複製および固定化ドメインの存在を検出する。別の態様において、本方法は、さらに、前記試料ならびに前記Ciz1複製の全てまたは一部を増幅するために適するオリゴヌクレオチドブラ

50

イマー対およびCiz1固定化ドメインの全てまたは一部を増幅するために適するオリゴヌクレオチドプライマー対を含む調製物を形成する工程、および試料でポリメラーゼ連鎖反応を実施する工程を含む。

【0227】

一態様において、ガンは、肺ガン、乳ガン、腎臓ガン、甲状腺ガン、黒色腫、肝臓ガン、膀胱ガン、または結腸ガンである。一態様において、ガンは非小細胞肺ガン（NSCLC）である。別の態様において、ガンは乳ガンである。別の態様において、ガンは腎臓ガンである。別の態様において、ガンは結腸ガンである。

【0228】

一態様において、Ciz 1複製ドメインを増幅する前記オリゴヌクレオチドプライマー対は、

CACAACCTGGCCACTCCAAATとCCTCTACCACCCCAATCG; および
ACACACCAGAAGACCAAGATTTACCとTGCTGGAGTGCGTTTTTCCT

10

からなる群より選択される。

【0229】

別の態様において、前記の増幅された複製ドメインは、配列
CGCCAGTCCTTGCTGGGACCまたはCCCTGCCCAGAGGACATCGCC
を含むオリゴヌクレオチドを用いて検出される。

【0230】

別の態様において、Ciz 1固定化ドメインを増幅する前記オリゴヌクレオチドプライマー対は、

CAGGGGCATAAGGACAAAGとGGCTTCCTCAGACCCCTCTG; および
CGAGGGTGATGAAGAAGAGGAとCCCCTGAGTTGCTGTGATA

20

からなる群より選択される。

【0231】

別の態様において、増幅された固定化ドメインは、配列
TGGTCCTCATCTTGCCAGCA, CACGGGCACCAGGAAGTCCAまたは
CACTGCAAGTCCCTGGGCCA

30

を含むオリゴヌクレオチドを用いて検出される。

【0232】

別において方法は、本発明のCiz 1 b変異体転写物の発現の分析と組み合わせる。

【0233】

本発明の好ましい方法において、診断方法は、本発明の処置の方法と組み合わせる。

【0234】

本発明の一局面において、Ciz 1複製ドメインを含むポリペプチドとCiz 1固定化ドメインを含むポリペプチドの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

40

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) Ciz 1複製ドメインおよびCiz 1固定化ドメインの存在を検出する工程；
- iii) 試料中に存在するCiz 1複製ドメインとCiz 1固定化ドメインの相対量を比較する工程

を含み、ここで、Ciz 1複製ドメインとCiz 1固定化ドメインの相対量における2倍超の差は、ガンの存在を示している。

【0235】

本発明の態様において、SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

50

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含む前記Ciz 1ポリペプチドおよびSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの存在を検出する工程；
- iii) 試料中に存在するSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む前記Ciz 1ポリペプチドの相対量を比較する工程を含み、SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの相対量における2倍超の差は、ガンの存在を示している。

【0236】

本発明の別の態様において、SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:16のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含む前記Ciz 1ポリペプチドおよびSEQ ID NO:16のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの存在を検出する工程；
- iii) 試料中に存在するSEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含む前記Ciz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:16のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの相対量を比較する工程を含み、ここで、SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含む前記Ciz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:16のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの相対量における2倍超の差は、ガンの存在を示している。

【0237】

本発明の別の態様において、SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドおよびSEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの存在を検出する工程；
- iii) 前記試料中に存在するSEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含む前記Ciz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含む前記Ciz 1ポリペプチドの相対量を比較する工程を含み、SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドとSEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含むCiz 1ポリペプチドの相対量における2倍超の差は、ガンの存在を示している。

【0238】

本発明の別の態様において、Ciz 1複製ドメインを含むポリペプチドとCiz 1固定化ドメインを含むポリペプチドの発現を比較することによって、対象においてガンを診断するための方法を提供し、この方法は以下：

- i) 試験に供する単離された生物学的試料を提供する工程；
- ii) 前記の生物学的試料を、Ciz 1ポリペプチド複製ドメインに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；
- iii) 生物学的試料を、前記Ciz1ポリペプチド固定化ドメインに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；
- iv) Ciz1 bポリペプチド複製ドメインに結合したおよびCiz1 bポリペプチド固定化ドメインに結合した抗体または抗原結合フラグメントの存在を検出する工程；
- v) 試料中に存在する前記Ciz1 bポリペプチド複製ドメインと前記Ciz1 bポリペプチド固定化ドメインの相対量を比較する工程を含み、Ciz1 bポリペプチド複製ドメインと前記Ciz1 bポリペプチド固定化ドメインの相対量における2倍超の差は、ガンの存在を示している。

【0239】

一態様において、固定化ドメインより少なくとも2倍より多い複製ドメインの存在は、転移性ガンを示している。

【0240】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる局面によれば、Ciz 1の複製ドメインおよびCiz 1の固定化ドメインを含む核酸分子を特異的に増幅するように適応されたオリゴヌクレオチドプライマーを含むキットを提供する。

【0241】

本発明の一態様において、複製ドメインを増幅するオリゴヌクレオチドプライマーは、CACAACCTGGCCACTCCAAATとCCTCTACCCACCCCAATCG;またはACACACCAGAAGACCAAGATTTACCとTGCTGGAGTGCGTTTTTCCT

である。

【0242】

本発明の好ましい方法において、固定化ドメインを増幅するオリゴヌクレオチドプライマーは、CAGGGGCATAAGGACAAAGとGGCTTCCTCAGACCCCTCTG;またはCGAGGGTGATGAAGAAGAGGAとCCCCTGAGTTGCTGTGATA

である。

【0243】

本発明の好ましい態様において、前記キットは、増幅されたCiz 1複製ドメインを検出する、CGCCAGTCCTTGCTGGGACCまたはCCCTGCCAGAGGACATCGCCより選択されるオリゴヌクレオチドプローブを含む。

【0244】

本発明の好ましい態様において、キットは、増幅されたCiz 1固定化ドメインを検出する、TGGTCCTCATCTTGCCAGCA, CACGGGCACCAGGAAGTCCAまたはCACTGCAAGTCCCTGGGCCA

より選択されるオリゴヌクレオチドプローブを含む。

【0245】

本発明のさらなる局面によれば、Ciz 1タンパク質の複製ドメインに特異的に結合する第1の抗体またはその抗原結合フラグメント、およびCiz 1タンパク質の固定化ドメインに特異的に結合する第2の抗体またはその抗原結合フラグメントを含むキットを提供する。

【0246】

本発明の別の局面は、ガン患者の予後を示すためのCiz1複製ドメインおよび固定化ドメイン(またはこれをコードするmRNA)の検出を含む上記の方法の使用に関する。一部の態様において、上記の方法は、腫瘍自体よりむしろ、腫瘍に隣接する組織における相対的レベルを測定し、ここで固定化ドメインより少なくとも2倍より多い複製ドメインを伴う患者は、2倍未満の差を伴う患者と比較して、より不良な予後を有する。一部の態様において、隣接組織は、腫瘍境界の20mm、15mm、10mm、または5mm内である。

【0247】

本発明の好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体である。

【0248】

本発明のCiz1ポリペプチドに結合する抗体は、好ましくは、例えば、モノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントのように単一特異的である。用語「単一特異的抗体」は、エピトープ等の特定の標的について単一の結合特異性および親和性を示す抗体を指す。この用語は「モノクローナル抗体」を含み、それは、単一分子種として、例えば、均一な単離細胞の集団から産生される抗体を指す。「モノクローナル抗体組成物」は、抗体の単一分子種を含む組成物中の抗体またはそのフラグメントの調製物を指す。一態様において、モノクローナル抗体は、哺乳動物細胞によって産生される。1つまたは複数のモノクローナル抗体種を組み合わせてもよい。本発明の抗体は、組換えであってもよく、また

10

20

30

40

50

は、ハイブリドーマ技術を使用して産生されてもよい。

【0249】

Ciz1ポリペプチド結合抗体は、完全長（例えば、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA（例えば、IgA1、IgA2）、IgD、およびIgE）であるか、または、抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、またはscFvフラグメント）だけを含んでもよく、例えば、それは、FcドメインまたはCH₂、CH₃、もしくはCH₄配列を含まない。抗体は、2つの重鎖免疫グロブリンおよび2つの軽鎖免疫グロブリンを含みうるか、または、一本鎖抗体でありうる。抗体は、場合によっては、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、エプシロン、またはミュー定常領域遺伝子より選ばれる定常領域を含む。本発明のCiz1ポリペプチド結合抗体は、ヒトIgG1定常領域またはその一部などの実質的にヒト抗体由来の、またはマウス、ラット、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ニワトリ、またはモルモットを含むがこれに限定されない別の種由来の重鎖および軽鎖定常領域を含む。

10

【0250】

一態様において、抗体（またはそのフラグメント）は、例えば、キメラ、ヒト化、脱免疫化、またはインビトロ生成抗体のような組換えまたは改変抗体である。用語「組換え」または「改変」抗体は、本明細書において使用される通り、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離された全ての抗体、例えば宿主細胞中にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、または他のDNA配列への免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体などを含むことが意図される。そのような組換え抗体は、ヒト化、CDRグラフト、キメラ、脱免疫、インビトロで生成された抗体を含み、場合によっては、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する定常領域を含みうる。

20

【0251】

本明細書において使用される通り、用語「抗体」は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を指す。例えば、抗体は、重（H）鎖可変領域（本明細書においてVHとして省略される）および軽（L）鎖可変領域（本明細書においてVLとして省略される）を含みうる。別の例において、抗体は、2つの重（H）鎖可変領域および2つの軽（L）鎖可変領域を含む。別の例において、抗体はラクダ単ドメインVH抗体である。用語「抗体」は、抗体の抗原結合フラグメント（例えば、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂、Fdフラグメント、Fvフラグメント、およびdAbフラグメント）ならびに完全抗体を包含する。

30

【0252】

VHおよびVL領域は、さらに、「相補性決定領域」（CDR）と呼ばれる超可変領域に細分化することができ、「フレームワーク領域」（FR）と呼ばれるより保存された領域が散在する。フレームワーク領域およびCDRの範囲が、正確に定義されている（Kabat, E. A., et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothia, C. et al.(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917を参照のこと）。Kabatの定義を本明細書において使用する。各々のVHおよびVLは、典型的には、3つのCDRおよび4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順番で配置される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

40

【0253】

「免疫グロブリンドメイン」は、免疫グロブリン分子の可変または定常ドメイン由来のドメインを指す。免疫グロブリンドメインは、典型的には、約7つのベータ鎖で形成される2つのベータ-シート、および保存されたジスルフィド結合を含む（例えば、A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 Ann. Rev Immunol. 6:381-405を参照のこと）。免疫グロブリン可変の超可変ループの正準構造は、その配列から推測することができ、Chothia et

50

al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817 ; Tomlinson et al. (1992) J. Mol. Biol. 227 :776-798) ; および Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14(18):4628-38 に記載される通りである。

【0254】

本明細書において使用されるように、「免疫グロブリン可変ドメイン配列」は、免疫グロブリン可変ドメインの構造を形成することができるアミノ酸配列を指す。例えば、配列は、天然の可変ドメインのアミノ酸配列の全てまたは一部を含みうる。例えば、配列は、1つ、2つまたはそれ以上のNまたはC末端アミノ酸を省略してもよく、内部のアミノ酸は、1つまたは複数の挿入または追加末端アミノ酸を含んでもよく、あるいは他の変化を含んでもよい。一態様において、免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むポリペプチドは、別の免疫グロブリン可変ドメイン配列に結合し、標的結合構造（または「抗原結合部位」）、例えば、本発明のCiz1ポリペプチドと相互作用する、例えば、本発明のCiz1ポリペプチド（例えば、b変異体）に結合するか、またはそれを阻害する構造を形成することができる。

10

【0255】

抗体のVHまたはVL鎖は、さらに、重鎖または軽鎖の定常領域の全てまたは一部を含むことができ、それにより、免疫グロブリン重鎖または軽鎖をそれぞれ形成する。一態様において、抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖のテトラマーであって、この免疫グロブリン重鎖および軽鎖は、例えば、ジスルフィド結合によって相互連結されている。重鎖定常領域は3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3を含む。軽鎖定常領域はCLドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、典型的には、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）を含む宿主組織または因子への抗体の結合を媒介する。用語「抗体」は、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM型（ならびにそれらのサブタイプを含む）のインタクトな免疫グロブリンを含む。一態様において、抗体はIgAである。別の態様において、抗体はIgGである。別の態様において、抗体はIgEである。別の態様において、抗体はIgDである。別の態様において、抗体はIgMである。免疫グロブリンの軽鎖は、カッパまたはラムダ型でありうる。一態様において、抗体をグリコシル化する。抗体は、抗体依存的な細胞傷害性および/または補体媒介性の細胞傷害性について機能的でありうる。

20

30

【0256】

抗体の1つまたは複数の領域は、ヒトでありうるか、または事実上ヒトでありうる。例えば、可変領域の1つまたは複数は、ヒトでありうるか、または事実上ヒトでありうる。例えば、CDRの1つまたは複数は、ヒトでありうる、例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、およびLC CDR3である。軽鎖CDRの各々はヒトでありうる。HC CDR3はヒトでありうる。フレームワーク領域の1つまたは複数は、ヒトでありうる、例えば、HCまたはLCのFR1、FR2、FR3、およびFR4である。一態様において、全てのフレームワーク領域は、ヒトであり、例えば、ヒト体細胞に由来し、例えば、免疫グロブリンを産生する造血細胞または非造血細胞である。一態様において、ヒト配列は生殖系列配列であり、例えば、生殖系列核酸によってコードされる。定常領域の1つまたは複数は、ヒトでありうる、または、事実上ヒトでありうる。別の態様において、例えば、FR1、FR2、およびFR3をまとめた、またはFR1、FR2、FR3、およびFR4をまとめたフレームワーク領域の少なくとも70、75、80、85、90、92、95、もしくは98%または抗体全体は、ヒトまたは事実上ヒトであり得る。例えば、FR1、FR2、およびFR3をまとめたものは、軽鎖または重鎖配列をコードする遺伝子座のヒト生殖系列Vセグメントによってコードされるヒト配列と少なくとも70、75、80、85、90、92、95、98、または99%同一でありうる。

40

【0257】

抗体の全てまたは一部は、免疫グロブリン遺伝子またはそのセグメントによってコードされうる。例示的な免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ（IgA1およびIgA2）、ガンマ（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域

50

遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。完全長の免疫グロブリン軽鎖（約25Kdまたは214のアミノ酸）が、NH₂末端の可変領域遺伝子（約110アミノ酸）およびCOOH末端のカッパまたはラムダ定常領域遺伝子によってコードされる。完全長の免疫グロブリン重鎖（約50Kdまたは446のアミノ酸）は、同様に、可変領域遺伝子（約116アミノ酸）および他の前述の定常領域遺伝子の1つ、例えば、ガンマ（約330アミノ酸をコードする）によってコードされる。軽鎖は、軽鎖可変ドメインを含む任意のポリペプチドを指す。重鎖は、重鎖可変ドメインを含む任意のポリペプチドを指す。

【0258】

完全長抗体の用語「抗原結合フラグメント」（または、単に「抗体部分」または「フラグメント」）は、本明細書において使用される通り、目的の標的に特異的に結合するための能力を保持する完全長抗体の1つまたは複数のフラグメントを指す。完全長抗体の用語「抗原結合フラグメント」内に包含される結合フラグメントの例は、(i) Fabフラグメント、VL、VH、CL、およびCH1ドメインからなる一価フラグメント；(ii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント；(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(v) dAbフラグメント (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)、VHドメインからなる；および(vi) 機能性を保持する、単離された相補性決定領域(CDR)を含む。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン、VLおよびVHは、別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、それらを単一タンパク質鎖として作ることを可能にする合成リンカーによって結合することができ、ここでVLおよびVH領域が対合し、単鎖Fv(scFv)として公知である一価の分子を形成する。例えば、Bird et al.(1988) Science 242:423-426；およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照のこと。

【0259】

「ヒト化」免疫グロブリン可変領域は、十分な数のヒトフレームワークのアミノ酸位置を含む免疫グロブリン可変領域であり、免疫グロブリン可変領域が、正常なヒトにおいて免疫原性応答を誘発しないようになる。「ヒト化」免疫グロブリンの記載は、例えば、米国特許第6,407,213号および米国特許第5,693,762号を含む。

【0260】

「事実上ヒトの」免疫グロブリン可変領域は、十分な数のヒトフレームワークのアミノ酸位置を含む免疫グロブリン可変領域であり、免疫グロブリン可変領域が、正常なヒトにおいて免疫原性応答を誘発しないようになる。「事実上ヒトの」抗体は、十分な数のヒトのアミノ酸位置を含む抗体であり、抗体が、正常なヒトにおいて免疫原性応答を誘発しないようになる。

【0261】

本明細書において使用される通り、「結合親和性」は、見掛けの会合定数またはK_aを指す。結合親和性は解離定数(K_d)として表現してもよく、それはK_aの逆数である。抗体などの標的結合剤は、例えば、特定の標的分子について10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、または10⁻⁸M未満のK_dを有しうる。結合親和性における差（例えば、特異性または他の比較について）は、例えば、少なくとも1.5、2、5、10、50、100、または1000倍でありうる。例えば、Ciz1ポリペプチド結合タンパク質は、エクソン14bの代わりにエクソン14aによってコードされるアミノ酸配列を含む別のCiz1ポリペプチドよりも、少なくとも1.5、2、5、10、50、100、または1000倍良くCiz1 b変異体に優先的に結合しうる。Ciz1ポリペプチド結合タンパク質はまた、種特異的または種一般的でありうる（例えば、1を上回る種由来の本発明のCiz1ポリペプチドに結合することができる、または、例えば、ヒトCiz1 b変異体などのヒトCiz1ポリペプチドに特異的でありうる）。

【0262】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲルろ過法、ELISA、表面プラズモン共鳴、または分光法（例えば、蛍光アッセイを使用して）を含む種々の方法によって決定することができる。これらの技術を使用し、リガンド（または標的）濃度の関数として結合リガンド

および遊離リガンドの濃度を測定することができる。結合リガンド（〔結合〕）の濃度は、遊離リガンド（〔遊離〕）の濃度および標的上のリガンドについての結合部位の濃度と関係し、ここで、(N)は、以下の等式による標的分子当たりの結合部位の数である：

$$[\text{結合}] = N[\text{遊離}] / ((1/K_a) + [\text{遊離}])$$

【0263】

K_aの定量的測定は通常行われるが、K_aの正確な決定を行うことが常に必要というわけではない。場合によっては、例えば、ELISAまたはFACS分析などの方法を使用して決定される、K_aに比例する、定性的な親和性の測定値を得ることで十分であるため、従って、例えば、参照よりも高い親和性であるか、例えば、2、5、10、20、または50倍高いか否かの決定などの比較のために使用することができる。結合親和性は、典型的には、0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、および0.005% (v/v) 界面活性剤P20中で評価する。

10

【0264】

タンパク質産生。標準的な組換え核酸方法を使用し、本発明のCiz1ポリペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させることができる。例えば、Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001)およびAusubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載される技術を参照のこと。一般的に、結合タンパク質をコードする核酸配列を、核酸発現ベクター中にクローン化する。タンパク質が複数のポリペプチド鎖を含む場合、各々の鎖は、例えば、同じまたは異なるベクターのような発現ベクター中にクローン化することができ、それは、同じまたは異なる細胞中で発現される。抗体を産生するための方法も、以下に提供される。Fabなどの一部の抗体は、大腸菌 (*E. coli*) 細胞などの細菌細胞中で産生することができる。抗体はまた、真核生物細胞中で産生することができる。一態様において、抗体（例えば、scFvなど）を、ピキア (*Pichia*)（例えば、Powers et al. (2001) *J Immunol Methods*. 251:123-35を参照のこと）、ハンゼヌラ (*Hansenula*)、またはサッカロミセス (*Saccharomyces*) などのような酵母細胞において発現させる。

20

【0265】

一態様において、抗体は哺乳動物細胞中で産生される。クローン抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させるための好ましい哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO細胞) (dhfr-CHO細胞を含む。Urlaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220に記載。DHFR選択可能なマーカーと使用。例えば、Kaufman and Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621に記載される通り)、リンパ球細胞株、例えば、NSO骨髄腫細胞、SP2細胞、COS細胞、HEK 293T細胞、およびトランスジェニック動物、例えば、トランスジェニック哺乳動物由来の細胞を含む。例えば、細胞は乳房上皮細胞である。

30

【0266】

免疫グロブリンドメインをコードする核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、追加の配列、例えば宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択可能なマーカー遺伝子などを保有しうる。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を促進する（例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号、および第5,179,017号を参照のこと）。例えば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、薬物、例えばG418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどに対する耐性を付与する。好ましい選択可能なマーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子 (メトトレキサート選択/増幅を伴うdhfr宿主細胞中での使用) およびneo遺伝子 (G418選択のため) を含む。別の例示的な発現システムは、Lonza Group Ltd. CHから入手可能なグルタミンシンターゼ (GS) ベクターシステムである（例えば、Clark et al. (2004) *BioProcess International* 2(4):48-52; Barnes et al. (2002) *Biotech Bioeng.* 81(6):631-639を参照のこと）。

40

【0267】

抗体またはその抗原結合部分の組換え発現のための例示的なシステムにおいて、抗体重

50

鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、例えば、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによってdhfr-CHO細胞中に導入する。組換え発現ベクター内に、抗体重鎖および軽鎖遺伝子を、エンハンサー/プロモーター調節エレメント（例えば、SV40、CMV、アデノウイルスなどに由来する。例えばCMVエンハンサー/AdMLPプロモーター調節エレメントまたはSV40エンハンサー/AdMLPプロモーター調節エレメントなど）に、各々、機能しうる態様で連結し、高レベルの遺伝子の転写をおこす。組換え発現ベクターはまたDHFR遺伝子を保有し、それは、メトトレキサート選択/増幅を使用して、ベクターを用いてトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能にする。選択された形質転換宿主細胞を培養し、抗体の重鎖および軽鎖の発現を可能にする。インタクトな抗体が、培養培地から回収される。標準的な分子生物学的技術を使用し、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体について選択し、宿主細胞を培養し、培養培地から抗体を回収する。例えば、一部の抗体を、プロテインAまたはプロテインGを用いた親和性クロマトグラフィーによって単離することができる。

10

20

30

40

50

【0268】

コドン使用頻度は、宿主細胞のコドンバイアスに適応させることができる。例えば、CHO細胞について、それは、モンゴルキヌゲネズミ（*Cricetulus griseus*）遺伝子のコドンバイアスに適応させることができる。また、非常に高い（>80%）または非常に低い（<30%）GC含量の領域は、可能な場合、回避することができる。最適化プロセスの間、以下のシス作用性配列モチーフを回避する：内部TATAボックス；カイ部位およびリボソーム進入部位；ATリッチまたはGCリッチ配列ストレッチ；ARE、INS、CRS配列エレメント；リピート配列およびRNA二次構造；ならびに（暗号化）スプライドナーおよびアクセプター部位、分岐点。2つのストップコドンを使用して、効率的な終結を確実にすることができる。配列のコドン最適化を、Sharp, P. M., Li, W. H., *Nucleic Acids Res.* 15 (3), 1987に従って評価することができる。標準コドン適応指数（CAI）を使用することができる。稀なコドンは、0~40のクオリティクラスを伴うものを含む。

【0269】

アダプター。一態様において、本発明はまた、標的タンパク質結合剤、例えば、アダプターなどを特徴とする。アダプターは、核酸アダプターまたはペプチドアダプターでありうる。用語「核酸アダプター」は、本明細書において使用される通り、少なくとも5つのヌクレオチドの内部非デュプレックス核酸構造を含む立体構造を有する核酸分子を指す。アダプターは、自己相補性の領域を有する一本鎖核酸分子でありうる。「ペプチドアダプター」は、頑強な不活性タンパク質スキヤフォールドにおいて提示され、立体構造的に制約される短いペプチド配列である（Evans et al., *Journal of Biology* 2008, 7:3、その全体において組み入れられる）。タンパク質スキヤフォールドによって適用される挿入ペプチドの三次元構造的な制約は、現実に、非制約ペプチド配列のそれを上回り、標的についてアダプターの親和性を向上させる。例示的なアダプターは、本発明のCiz1ポリペプチド（例えば、b変異体）に結合する核酸分子およびペプチドを含む。特定のアダプターを、多くの場合において、抗体の代わりに使用してもよい。本発明のCiz1ポリペプチドに結合する他のペプチドも含まれる。ペプチド様分子、例えば、ペプトイドなどが、さらに、本発明に含まれる。「ペプトイド」またはポリ-N-置換グリシンは、側鎖が、 α -炭素（それらがアミノ酸である場合）よりむしろ、 β -炭素の窒素原子に付加されるペプチド模倣物のクラスである。T細胞受容体はまた、標的結合剤として使用することができる。

【0270】

用語「結合剤」は、実験条件下で本発明のCiz1ポリペプチド（例えば、Ciz1 b変異体）に結合することが可能な薬剤を指し、非限定的に、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、または単一ドメイン抗体（sdAb）（ナノボディともいう）を含むがこれに限定されない抗体およびその抗原抗体結合フラグメント、核酸アダプター、およびペプチドアダプターを含む。Ciz1ポリペプチド結合剤は、インビトロおよびインビボでの診断的有用性を有する。例えば、対象に由来する試料中のCiz1ポリペプチドのレベルの測定を、疾患、例えばガンなどの

診断のために使用することができる。さらに、Ciz1ポリペプチドレベルのモニタリングおよび定量化を予後判定に使用し、病気の進行を病期分類し、ガン対象を処置するために使用される薬剤の効力を評価することができる。

【0271】

一局面において、Ciz1ポリペプチドを含みうる生物学的試料、例えば、肺組織または他の生物学的組織などを、特定のガンまたはガンのリスクを有することが疑われる対象から得る。全組織または細胞の一定分量を、当業者に公知の種々の可溶化カクテルのいずれか1つを使用して可溶化する。例えば、組織を、8M尿素、20mlのNonidet P-40界面活性剤、20mlの両性電解質液（pH3.5~10）、20mlの2-メルカプトエタノール、および0.2mMフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）を蒸留脱イオン水（1リットル当たり）中に含む溶解バッファの添加によって可溶化することができる。

10

【0272】

一局面において、本発明は、本発明のCiz1ポリペプチドの存在を、インビトロ（例えば、組織のような生物学的試料、生検、例えば、ガン性組織）またはインビボ（例えば、対象におけるインビボ撮像）で検出するための診断方法を提供する。本方法は以下：(i) 試料を、本発明の結合剤のCiz1ポリペプチド（例えば、抗体、抗原結合フラグメントまたはアプタマー）と接触させること；および(ii) Ciz1ポリペプチド結合剤と試料の間の複合体の形成を検出すること、を含む。本方法はまた、参照試料（例えば、対照試料）を結合剤と接触させ、参照試料についてのそれと比べて、結合剤と試料の間での複合体形成の範囲を決定することを含むことができる。対照試料または対象と比べた、試料または対象における複合体の形成における変化、例えば、統計的に有意な変化は、試料中の本発明のCiz1ポリペプチド（例えば、b変異体）の存在を示しうる。本発明の結合剤のCiz1ポリペプチドを、検出可能な物質を用いて直接的にまたは間接的に標識し、結合または非結合体の検出を促進することができる。適した検出可能な物質は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、および放射性物質を含む。

20

【0273】

本明細書に記載される局面の一部の態様において、Ciz1ポリペプチドに対して特異的な薬剤、例えば抗体またはその抗原結合フラグメント、天然または組換えリガンド、小分子、あるいは修飾部分などを、タグを用いて直接的に標識し、修飾の検出を促進する。用語「標識」または「タグ」は、本明細書において使用される通り、標的の存在を示している検出可能なシグナル、例えば、生物学的試料中での特定の修飾の存在などを産生することが可能な組成物を指す。適した標識は、蛍光分子、放射性同位体、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、化学発光部分、磁性粒子、生物発光部分、ペプチドタグ（c-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5、またはHIS）などを含む。そのようなものとして、標識は、Ciz1ポリペプチドを同定するための方法のために必要とされる分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。本明細書に記載される局面の一部の態様において、修飾部分自体を直接的に標識してもよい。例えば、放射性標識または蛍光標識を使用することができ、タンパク質修飾を、抗体を使用することなく、直接的に（または他の修飾と組み合わせ）読むことができるようになる。また、当然、抗体を標識し、それらの直接的な検出を補助することもできる。

30

40

【0274】

用語「標識抗体」または「タグ付き抗体」は、本明細書において使用される通り、検出可能な手段によって標識された抗体を含み、非限定的に、蛍光、酵素、放射性、および化学発光標識された抗体を含む。抗体はまた、検出可能なタグ、例えばc-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5、またはHISなどを用いて標識することができ、それらは、タグに特異的な抗体、例えば、抗c-Myc抗体を使用して検出することができる。抗体はまた、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、およびリボヌクレアーゼ）を用いて標識することもできる。結合剤を標識する種々の方法が、当技術分野において公知であり、使用されうる。本発明の方法における使用のための抗体を標識するための蛍光標識またはタグの非限定的な

50

例は、ヒドロキシクマリン、スクシンイミジルエステル、アミノクマリン、スクシンイミジルエステル、メトキシクマリン、スクシンイミジルエステル、カスケードブルー、ヒドラジド、パシフィックブルー、マレイミド、パシフィックオレンジ、ルシファーイエロー、NBD、NBD-X、R-フィコエリトリン（PE）、PE-Cy5コンジュゲート（Cychrome、R670、Tri-Color、Quantum Red）、PE-Cy7コンジュゲート、レッド613、PE-テキサスレッド、PerCP、ペリジニクロロフィルタンパク質、TruRed（PerCP-Cy5.5コンジュゲート）、FluorX、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、BODIPY-FL、TRITC、X-ローダミン（XRITC）、LissamineローダミンB、テキサスレッド、アロフィコシアニン（APC）、APC-Cy7コンジュゲート、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、またはCy7を含む。種々の適した蛍光剤と発色剤が、Stryer (1968) Science, 162:526およびBrand, L. et al. (1972) Annual Review of Biochemistry, 41:843-868により記載されている。結合タンパク質を、例えば米国特許第3,940,475号、第4,289,747号、および第4,376,110号に開示されるものなどの従来の手順によって、蛍光発色基を用いて標識することができる。一態様において、蛍光剤はフルオレセインおよびローダミンを含むキサンテン色素である。別の態様において、蛍光化合物はナフチルアミンである。一度、フルオロフォアまたは発色団を用いて標識されれば、結合タンパク質を使用し、例えば、蛍光顕微鏡を使用して、試料中の本発明のCiz1ポリペプチドの存在または局在を検出することができる。一態様において、蛍光顕微鏡は共焦点またはデコンボリューション顕微鏡である。同様に、生物発光化合物を使用し、Ciz1抗体を標識してもよい。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識の目的のための重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンである。

10

20

30

40

50

【0275】

本発明の特定の態様において、生物学的試料中のCiz1ポリペプチドのレベルを、二次元ゲル電気泳動によって分析することができる。二次元電気泳動の方法は、当業者に公知である。生物学的試料、例えば組織試料などを、電荷に基づいてタンパク質を分離する一次元での等電点電気泳動分離のために、電気泳動ゲル上に添加する。多数の一次元ゲル調製物を利用することができ、担体両性電解質ベースの分離用チューブゲルまたは固定化勾配ベースの分離用ゲルストリップを含む。一次元分離後、タンパク質を、平衡化手順に続き、二次元ゲル上にトランスファーし、分子量に基づいてタンパク質を分離するSDS PAGEを使用して分離する。異なる対象に由来する生物学的試料を比較する場合、複数のゲルを、個々の生物学的試料（正常対照由来の試料を含む）から調製する。

【0276】

分離に続き、タンパク質を、二次元ゲルから、ウエスタンブロッティングのために一般に使用されるメンブレン上にトランスファーする。タンパク質のウエスタンブロッティングおよびその後の可視化の技術はまた、当技術分野において周知である（Sambrook et al, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2.sup.nd Edition, Volume 3, 1989, Cold Spring Harbor）。標準的な手順を使用してもよく、または、手順を、特定の型、例えば高度に塩基性もしくは酸性、または脂質可溶性などのタンパク質の同定のために、当技術分野において公知の通りに変更してもよい（例えば、Ausubel, et al., 1999, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, Inc., N.Y.を参照のこと）。Ciz1ポリペプチドに結合する抗体を、インキュベーション工程において利用する。これはウエスタンブロット分析の手順と同様である。一次抗体に対して特異的な二次抗体を、ウエスタンブロット分析の手順において利用し、一次抗体と反応したタンパク質を可視化する。

【0277】

生物学的試料中のCiz1ポリペプチドレベルの検出はまた、処置の間の潜在的な抗ガン剤の効力をモニターするために使用することができる。例えば、Ciz1ポリペプチド産生のレ

ベルを、処置の前およびその間に決定することができる。薬剤の効力は、処置を通してCiz1発現を比較することによって、追跡することができる。効力を示す薬剤は、薬剤を用いた処置が進行するにつれて、Ciz1ポリペプチド産生のレベルを減少させるものである。

【0278】

Ciz1ポリペプチド結合剤と本発明のCiz1ポリペプチド（例えば、b変異体）の間の複合体形成を、Ciz1ポリペプチドに結合した結合剤または非結合剤のいずれかを測定または可視化することによって検出することができる。本発明のアッセイ、例えば、イムノアッセイは、競合的および非競合的（「サンドイッチ」）アッセイを含む。本発明のイムノアッセイは、非限定的に、例えば、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、フローサイトメトリー、または組織の免疫組織化学など、少数の技術を使用したアッセイ系を含む。さらに、Ciz1ポリペプチド結合剤の標識に、本発明のCiz1ポリペプチドの存在を、検出可能な物質を用いて標識したスタンダードおよび非標識Ciz1ポリペプチド結合剤を利用した競合イムノアッセイによって、試料中でアッセイすることができる。このアッセイの1つの例において、生物学的試料、標識スタンダード、およびCiz1ポリペプチド結合剤を混合し、非標識結合剤に結合した標識スタンダードの量を決定する。試料中の本発明のCiz1ポリペプチドの量は、Ciz1ポリペプチド結合剤に結合した標識スタンダードの量に反比例する。

【0279】

組織学的分析。免疫組織化学は、Ciz1ポリペプチド結合剤（例えば、抗体、その抗原結合フラグメント、またはアプタマー）を使用して実施することができる。例えば、抗体の場合において、抗体を、標識（例えば、精製またはエピトープタグなど）を用いて合成することができる、または、例えば、標識または標識結合基をコンジュゲートさせることによって、検出可能に標識することができる。例えば、キレーターを抗体に付着させることができる。抗体を、次に、組織学的調製物、例えば、顕微鏡スライド上にある固定化した組織切片と接触させる。結合のためのインキュベーション後、調製物を洗浄し、非結合抗体を除去する。調製物を、次に、例えば、顕微鏡法を使用して分析し、抗体が調製物に結合したかどうかを特定する。この方法を使用し、細胞または組織（例えば、ガン細胞または固体腫瘍組織試料）を評価することができる。抗体（または他のポリペプチドもしくはペプチド）は、結合時に非標識でありうる。結合および洗浄後、抗体を、それを検出可能にするために、標識する。

【0280】

タンパク質アレイ。Ciz1ポリペプチド結合剤はまた、アレイ（例えば、タンパク質アレイまたはマイクロアレイ）上に固定化することができる。アレイを診断ツールとして使用し、例えば、医学的試料（例えば、単離細胞、血液、血漿、血清、尿、喀痰、生検など）をスクリーニングすることができる。当然、アレイはまた、例えば、本発明のCiz1ポリペプチドまたは他の標的分子に結合する他の結合タンパク質を含みうる。

【0281】

ポリペプチドアレイを産生するための方法は、例えば、De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994; Lueking et al. (1999) Anal. Biochem. 270:103-111; Ge (2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, 1-VII; MacBeath and Schreiber (2000) Science 289:1760-1763; WO 01/40803およびWO 99/51773A1に記載されている。アレイ用のポリペプチドは、例えば市販のロボット装置を使用して、高速でスポットすることができる。アレイ基板は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば、表面修飾ガラスでありうる。アレイはまた、多孔性マトリクス、例えば、アクリルアミド、アガロース、または他のポリマーを含むことができる。

【0282】

例えば、アレイは、抗体のアレイでありえ、例えば、De Wildt（上記）に記載される通りである。結合タンパク質を産生する細胞を、アレイ化フォーマットにおいてフィルター

10

20

30

40

50

上で増殖させることができる。ポリペプチド産生が誘導され、発現されたポリペプチドは、細胞の位置でフィルターに固定化される。タンパク質アレイを、標識された標的と接触させて、各々の固定化ポリペプチドへの標的の結合の範囲を決定することができる。標的が非標識である場合、サンドイッチ方法を使用して、例えば、非標識プローブを使用して、非標識標的の結合を検出することができる。アレイの各アドレスでの結合の範囲についての情報は、例えば、コンピュータデータベース中に、プロファイルとして保存することができる。タンパク質アレイを反復で産生し、例えば、標的および非標的の結合プロファイルを比較するために使用することができる。

【0283】

FACS（蛍光活性化細胞選別）。Ciz1ポリペプチド結合剤を使用し、細胞またはタンパク質、例えば、患者試料などの生物学的試料中の細胞またはタンパク質を標識することができる。結合タンパク質をまた、蛍光化合物に付着させることもできる（または付着可能である）。細胞を、次に、蛍光活性化細胞選別を使用して選別することができる（例えば、Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose Calif.から入手可能な選別機を使用する；米国特許第5,627,037号；第5,030,002号；および第5,137,809号も参照のこと）。細胞が選別機を通過する際、レーザービームが蛍光化合物を励起し、検出器は、通過する細胞をカウントし、蛍光化合物が細胞に付着しているか否かを、蛍光を検出することによって決定する。各々の細胞に結合した標識の量を、定量化し、分析し、試料を特徴付けることができる。選別機はまた、細胞を偏向させ、結合タンパク質によって結合した細胞を、結合していない細胞から分離することができる。分離された細胞を培養および/または特徴付けることができる。

【0284】

インビボ撮像。さらに別の態様において、本発明は、インビボのCiz1ポリペプチド（例えば、b変異体）発現ガン性組織またはその残遺物の存在を検出するための方法を提供する。本方法は、Ciz1ポリペプチド結合剤を対象に投与する工程；および、Ciz1ポリペプチド結合剤を対象において検出する工程を含む。検出する工程は、複合体の形成の位置または時間を決定することを含む。本方法は、対象、例えば、対象の身体の部位をスキャニングまたは、他の方法では、撮像することを含むことができる。別の方法は、(i) 対象（例えば、ガンまたは腫瘍性疾患を有する患者）に、検出可能なマーカーにコンジュゲートされたCiz1ペプチド結合抗体を投与する工程；(ii) 対象を、Ciz1ポリペプチド発現組織または細胞に対する前記の検出可能なマーカーを検出するための手段に曝露する工程を含む。例えば、本方法を使用して、患者において、死んだかまたは死にかけているガン細胞から放出されたCiz1 b変異体を可視化することができる。対象を、例えば、NMRまたは他の断層撮影手段によって撮像することができる。診断撮像のために有用な標識の例は、放射性標識、例えば¹³¹I、¹¹¹In、¹²³I、^{99m}Tc、³²P、¹²⁵I、³H、¹⁴C、および¹⁸⁸Rhなど、蛍光標識、例えばフルオレセインおよびローダミンなど、核磁気共鳴活性標識、陽電子放射断層撮影（「PET」）スキャナによって検出可能な陽電子放出同位体、化学発光体、例えばルシフェリンなど、および酵素マーカー、例えば、ペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどを含む。短距離放射エミッター、例えば、短距離検出器プローブによって検出可能な同位体なども用いてもよい。結合剤を、そのような試薬を用いて、公知の技術を使用して標識することができる。例えば、Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, N.Y.（抗体の放射標識に関する技術用）およびD. Colcher et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816を参照のこと。

【0285】

放射性標識された結合剤を、またインビトロ診断試験のために使用することができる。同位体標識タンパク質の特異的活性は、半減期、放射性標識の同位体純度、および標識がどのようにタンパク質中に組み込まれているかに依存する。

【0286】

また、本発明に含まれるのは、本発明のCiz1ポリペプチドに結合する結合剤を含むキットおよび診断的使用、例えば、インビトロで、例えば、試料、例えば、ガンまたは腫瘍性

10

20

30

40

50

障害を有する患者由来の生検または細胞中で、またはインビボで、例えば、対象を撮像することによって、本発明のCiz1ポリペプチドを検出するための標的結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント、あるいは他のポリペプチドまたはペプチドまたはアプタマー）の使用のための説明書を含む。キットは、少なくとも1つの追加試薬、例えば、標識または追加の診断用薬剤などをさらに含むことができる。インビボでの使用のために、結合タンパク質を、薬学的組成物として製剤化することができる。

【0287】

一態様において、本発明は、本発明のヒトCiz1ポリペプチドまたは抗原に、 1×10^{-8} M未満の親和性 K_D で結合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。別の態様において、本発明は、本発明のヒトCiz1ポリペプチドまたは抗原に、 5×10^{-9} M未満の親和性 K_D で結合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。別の態様において、本発明は、本発明のヒトCiz1ポリペプチドまたは抗原に、 1×10^{-9} M未満の親和性 K_D で結合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、マウス抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ラット抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ウサギ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、モルモット抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヤギ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒツジ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ウシ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ウマ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ニワトリ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ブタ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ネコ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、イヌ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、ラクダ抗体またはその抗原結合フラグメントである。一態様において、単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、組換えであるヒト抗体またはその抗原結合フラグメントである。

10

20

30

【0288】

本発明の一局面は、ガンの検出および予後評価のため、ガンの素因を持つ対象の同定のため、および薬物効力のサロゲートマーカーとしてガンの処置を受けている患者をモニターするため、および再発を検出するための、対象の生物学的試料中のCiz1自己抗体または循環免疫複合体（CIC）の上昇レベルの検出に基づく、スクリーニング方法を提供することである。用語「自己抗体」（または「複数の自己抗体」）は、対象自身のタンパク質の1つまたは複数に対して向けられる、対象の免疫系によって産生された抗体である。用語「抗Ciz1自己抗体」または「Ciz1自己抗体」は、Ciz1に対して特異的な自己抗体を指す。本発明はまた、ガンの診断または予後指標として、Ciz1自己抗体（遊離またはCiz1抗原との複合体かを問わず）を検出するための方法を提供する。一態様において、Ciz1ポリペプチドは、Ciz1 b変異体ポリペプチドである。

40

【0289】

本発明は、ガンを伴うまたはガンについての高リスクな対象（例えば、喫煙者、COPD、ガンについての遺伝的素因を伴う患者）由来の生物学的試料中のCiz1ポリペプチドまたはCiz1ポリペプチド抗原に対する自己抗体を検出することによる、ガンの診断的評価および/または予後判定に関する。一態様において、抗Ciz1自己抗体についてアッセイされる前記の生物学的試料は、血液、血漿、血清、喀痰、尿、または気管支肺胞洗浄液より選択さ

50

れる。別のさらなる態様において、試料は血液である。別のさらなる態様において、試料は血漿である。別のさらなる態様において、試料は血清である。別のさらなる態様において、試料は喀痰である。別のさらなる態様において、試料は尿である。別のさらなる態様において、試料は気管支肺胞洗浄液である。一態様において、ガンは、肺ガン、乳ガン、甲状腺ガン、膀胱ガン、肝臓ガン、腎臓ガン、リンパ腫、および白血病である。一態様において、ガンは肺ガンである。さらなる態様において、肺ガンはNSCLCである。別のさらなる態様において、肺ガンはSCLCである。別の態様において、ガンは乳ガンである。別の態様において、ガンは甲状腺ガンである。さらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺髄様ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンはヒュルトレ細胞ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺乳頭ガンである。別のさらなる態様において、甲状腺ガンは甲状腺濾胞ガンである。別の態様において、ガンはリンパ腫である。さらなる態様において、リンパ腫はB細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はホジキンリンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は濾胞性リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は未分化大細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は節外周辺帯B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫は脾臓周辺帯B細胞リンパ腫である。別のさらなる態様において、リンパ腫はマントル細胞リンパ腫である。別の態様において、ガンは白血病である。別のさらなる態様において、白血病は慢性リンパ性白血病である。別のさらなる態様において、白血病はヘアリー細胞白血病である。生物学的試料中でのCiz1ポリペプチドまたはCiz1ポリペプチドに対する自己抗体の増加レベルの検出は、ガンのスクリーニング、診断、および予後判定についての新規戦略を構成する。一態様において、Ciz1ポリペプチドはCiz1 b変異体ポリペプチドである。一態様において、Ciz1ポリペプチドに対する自己抗体は、Ciz1 b変異体ポリペプチドに対する。一態様において、自己抗体は、エクソン14bおよびエクソン15の両方によってコードされるアミノ酸残基を含む連続エピトープに特異的に結合する。別の態様において、自己抗体は、Ciz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合するが、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドには特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、少なくとも10倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドよりもCiz1 b変異体ポリペプチドに特異的に結合する。一態様において、自己抗体は、少なくとも10²倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、自己抗体は、少なくとも10³倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、自己抗体は、少なくとも10⁴倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。一態様において、自己抗体は、少なくとも10⁵倍上回る親和性で、エクソン14aを含むmRNAから翻訳されたCiz1ポリペプチドと比較して、Ciz1 b変異体ポリペプチドに結合する。

【0290】

一態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

DEEEIEVRSRDIS

に特異的に結合する。一態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

DEEEIEVRSRDIS

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEIE, VRSRDISまたはDEEEIEVEEELCKQVRSRDIS

のいずれにも特異的に結合しない。一態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

EGDEEEEDDEDEEEIEVRSRDISREEWKGSEY

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EGDEEEEDDEDEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSEY

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

DEEEEDDEDEEEIEVRSRDISREEWKGSE

10

20

30

40

50

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEIEVRSRDISREEWKGSE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEIEVRSRDISREEWKG

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKG

には特異的に結合しない。別の態様において、前記の自己抗体は、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEIEVRSRDISREEW

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEW

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

DDEDEEEEIEVRSRDISRE

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISRE

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

DEDEEEEIEVRSRDISR

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISR

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

EDEEEEIEVRSRDIS

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EDEEEEIEVEEELCKQVRSRDIS

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

DEEEEIEVRSRDI

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

DEEEEIEVEEELCKQVRSRDI

には特異的に結合しない。別の態様において、自己抗体は、アミノ酸配列

EIEVRSR

に特異的に結合するが、アミノ酸配列

EIEVEEELCKQVRSR

には特異的に結合しない。

【0291】

本発明は、Ciz1ポリペプチドに対する自己抗体の存在を検出するようにデザインされたイムノアッセイにおける抗原としてのCiz1ポリペプチドまたはそのペプチドの使用を提供する。そのようなイムノアッセイを、ガンの診断および予後判定のために利用することができる。本発明に従って、対象の尿、血液、血漿、または血清などにおけるCiz1自己抗体レベルの測定を、ガンの早期診断のために使用することができる。さらに、自己抗体レベルのモニタリングを予後判定に使用し、疾患の進行および再発を病期分類することができる。

【0292】

本発明はさらに、対象の生物学的試料中でCiz1自己抗体を検出するための方法に関する。そのようなアッセイは、本明細書に記載されるイムノアッセイを含み、ここでCiz1自己抗体は、Ciz1抗原を含むポリペプチドまたはペプチドとのそれらの相互作用によって検出される。Ciz1抗原を使用し、対象の生物学的試料中のCiz1自己抗体の存在および量を定量的に検出してもよい。

【0293】

10

20

30

40

50

本発明はまた、Ciz1ポリペプチドの発現レベルの増加によって特徴付けられる疾患に苦しむ患者に免疫を与えるための、Ciz1抗原を含むポリペプチドまたはペプチドの使用に関する。そのような抗原への免疫学的応答の刺激は、腫瘍細胞に対するより有効な攻撃を誘発することを意図する；例えば、とりわけ、腫瘍細胞増殖を阻害することまたは腫瘍細胞の殺傷を促進すること、である。

【0294】

本発明はさらに、ガンまたはガンを発症する素因を有する患者を診断するために臨床現場で便利に使用することができる、事前にパッケージ化された診断キットを提供する。キットをまた、使用し、ガンの処置のために使用される薬剤の効力をモニターすることができる。本発明の一態様において、キットは、試料中のCiz1ポリペプチド抗原に向けられた自己抗体のレベルを検出および/または測定するための成分を含む。第2の態様において、本発明のキットは、生物学的試料中のCiz1ポリペプチド抗原を検出および/または測定する成分を含む。

10

【0295】

一局面において、本発明は、対象におけるガンの診断のための方法を提供し、以下：

(a) 対象に由来する生物学的試料中のCiz1ポリペプチドのレベルを定量的に検出する工程；

(b) 対照試料中のCiz1ポリペプチドのレベルを検出する工程；および

(c) 対象の試料中で検出されるCiz1ポリペプチドのレベルを、対照試料中で検出されるCiz1ポリペプチドのレベルと比較する工程、および、対象の試料中のCiz1ポリペプチドのレベルにおける増加を同定することによって、ガンを伴う対象を診断する工程を含み、対照試料と比較した、対象の試料中で検出されるCiz1ポリペプチドのレベルにおける増加は、ガンを伴う対象の指標である。

20

【0296】

一態様において、ガンは肺ガンである。別の態様において、ガンはSCLCである。一態様において、Ciz1ポリペプチドを、イムノアッセイを使用して検出する。一態様において、イムノアッセイは免疫沈降アッセイである。一態様において、生物学的試料は肺組織試料である。一態様において、Ciz1ポリペプチドはCiz1 b変異体ポリペプチドである。

【0297】

一局面において、本発明は、対象におけるガンの診断のための方法を提供し、以下を含む：(a) 対象に由来する生物学的試料中のCiz1自己抗体のレベルを定量的に検出する工程；(b) 対照試料中のCiz1自己抗体のレベルを検出する工程；および(c) 対象の試料中で検出されるCiz1自己抗体のレベルを、対照試料中で検出されるCiz1自己抗体のレベルと比較する工程、ここで対照試料と比較した、対象の試料中で検出されるCiz1自己抗体のレベルにおける増加は、ガンを伴う対象の指標である。

30

【0298】

一態様において、ガンは肺ガンである。別の態様において、ガンはSCLCである。一態様において、Ciz1自己抗体を、イムノアッセイを使用して検出する。一態様において、イムノアッセイは免疫沈降アッセイである。一態様において、試料は肺組織試料である。一態様において、Ciz1自己抗体はCiz1 b変異体に対する自己抗体である。

40

【0299】

本発明は、対象におけるCiz1自己抗体の検出に基づく、疾患、例えば、ガンなどについての診断および予後判定方法を提供する。本方法は、例えば、ガンを伴う対象から、ならびに、ガンを伴わない年齢および性別を一致させた対照由来の生物学的試料の使用によって検証してもよい。自己抗体を含みうる生物学的試料、例えば、尿、血液、血清、または血漿などは、特定のガンを有するまたは有することが疑われる、あるいは、ガンを発症する素因があると疑われる対象から得られる。対応する体液は、例えば、対照として、ガンを有さない対象から得てもよい。

【0300】

本発明に従い、Ciz1ポリペプチド抗原に対して反応性の自己抗体の測定は、疾患、例え

50

ば、ガンなどの診断のために使用することができる。さらに、自己抗体レベルのモニタリングを予後判定に使用し、疾患の進行を病期分類し、再発を検出することができる。対象由来の尿、血液、血清もしくは血漿、または他の生物学的液体試料中での自己抗体の検出は、多数の方法のいずれかによって達成することができる。そのような方法は、非限定的に、例えば、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、競合イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、およびフローサイトメトリーなどの技術を使用したアッセイ系を含むが、少数および本明細書で他に開示するその他を含む、イムノアッセイも含む。

10

【0301】

そのようなイムノアッセイは、対象に由来する尿、血液、血清、または血漿試料を、免疫特異的な抗原-抗体結合を生じることができるような条件下でCiz1ポリペプチド抗原を含む試料と接触させる工程、および自己抗体による任意の免疫特異的な結合の量を検出または測定する工程を含む方法によって行う。尿、血液、血清、または血漿試料中の自己抗体のレベルを、障害を有さない対象由来の類似の生物学的試料中、抗原が存在しないまたは異なる抗原が存在する試料中に存在するレベルと比較してもよい。

【0302】

イムノアッセイは、種々の方法で行うことができる。例えば、1つの方法は、固体支持体上にCiz1ポリペプチド/ペプチドを固定化する工程、および、それに特異的に結合した抗Ciz1抗体を検出する工程を含む。代替アプローチは、例えば、抗ヒト抗体またはプロテインAもしくはGを使用し、生物学的試料由来の自己抗体を固定化する工程、および、例えば、Ciz1ポリペプチド/ペプチドを標識することによって、または抗体もしくは他の適切な手段を使用してCiz1ポリペプチド/ペプチドを検出することによってそれに結合したCiz1ポリペプチド/ペプチドを検出する工程を含む。本発明のアッセイにおいて利用されるCiz1ポリペプチド/ペプチド抗原は、例えば、当技術分野において周知である組換えDNA技術を介して調製することができる、または、化学的に合成することができる。例えば、Ciz1ポリペプチドまたはその抗原フラグメントをコードするDNA分子は、Ciz1ポリペプチドの大規模調製のために、適切な発現ベクター中に遺伝的に操作することができる。他の態様において、Ciz1抗原は、Ciz1自己抗体の標識、固定化、または検出を促進することができる融合タンパク質として操作される。例えば、Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載される技術を参照のこと。あるいは、Ciz1ポリペプチドは、当技術分野において周知のタンパク質分離技術を使用して、天然の供給源から精製してもよく、例えば、細胞から精製してもよい。そのような精製技術は、非限定的に、分子ふるいクロマトグラフィーおよび/またはイオン交換クロマトグラフィーを含みうる。実際には、マイクロタイタープレート、ビーズ、またはメンブレンは、便利に、Ciz1抗原のための固体支持体として利用される。表面を前もって調製し、保存してもよい。一態様において、Ciz1抗原は、別のビーズ中、および、別のメンブレン中、マイクロタイタープレートに結合される。別の態様において、Ciz1抗原の結合は、固体支持体に結合されず、自己抗体へのCiz1抗原の結合が液相中で起こるようになる。一態様において、Ciz1抗原-自己抗体複合体は、標識された抗原結合分子、例えば、抗体またはアプタマーなどを使用して検出される。好ましくは、抗原結合剤は抗体である。標識された抗原結合剤は、Ciz1抗原、例えば、液相の場合において、または自己抗体のいずれかに対して特異的でありうる。一態様において、標識された抗原結合剤は、抗ヒト抗体抗体、即ち、ヒト抗体に対して特異的な抗体である。低親和性Ciz1自己抗体の結合を促進するために、Ciz1抗原を、ダイマー、トリマー、テトラマーなどに多量体化してもよい。一態様において、Ciz1抗原を、ストレプトアビジンを使用して、テトラマーに多量体化する (McLaughlin, K., et al. *Protocol Exchange* (Nature Publishing), 2007年1月29日オンライン公開)。

20

30

40

【0303】

50

一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるCiz1抗原は、アミノ酸配列
EGDEEEEEDEDEEEEEIEVRSRDISREEWKGSETY

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

EGDEEEEEDEDEEEEEIEVRSRDISREEWKGSET

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEEIEVRSRDISREEWKGSE

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEEIEVRSRDISREEWKG

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEEIEVRSRDISREEW

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

DDEDEEEEEIEVRSRDISRE

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

EDEEEEEVRSRDIS

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

DEEEEEVRSRDI

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列

EEIEVRSR

を含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するために使用されるポリペプチドまたは
ペプチドは、アミノ酸配列IEVRSを含む。一態様において、Ciz1自己抗体を検出するた
めに使用されるポリペプチドまたはペプチドは、アミノ酸配列EVRSを含む。

【0304】

一態様において、Ciz1自己抗体を検出するための方法において対照として使用されるポ
リペプチドまたはペプチドは、アミノ酸配列

EGDEEEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETY

を含む。一態様において、ポリペプチドまたはペプチド対照は、アミノ酸配列

EGDEEEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSET

を含む。一態様において、ポリペプチドまたはペプチド対照は、アミノ酸配列

EGDEEEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSET

を含む。一態様において、ポリペプチドまたはペプチド対照は、アミノ酸配列

DEEEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

を含む。一態様において、ポリペプチドまたはペプチド対照は、アミノ酸配列

EEEEDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKG

を含む。一態様において、ポリペプチドまたはペプチド対照は、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEW

を含む。一態様において、ポリペプチドまたはペプチド対照は、アミノ酸配列

DDEDEEEEEIEVEEELCKQVRSRDISRE

を含む。一態様において、ポリペプチドまたはペプチド対照は、アミノ酸配列

EDEEEEEVEEELCKQVRSRDIS

を含む。Ciz1ポリペプチドまたはペプチドはまた、Ciz1自己抗体を検出するためのアッセ
イにおいて遮断剤として使用することができる。一態様において、Ciz1自己抗体を検出す

10

20

30

40

50

るための方法において対照として使用されるCiz1ポリペプチドまたはペプチドは、アミノ酸配列

DEEEIEVEEELCKQVRSRDI

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

EGDEEEEDDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETY

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

EGDEEEEDDEDEEEEIEVEE ELCKQVRSRDISREEWKGSET

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

EGDEEEEDDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSET

10

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

DEEEEDDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSE

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

EEEDDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKG

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

EEDDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEW

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

DDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISRE

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

EDEEEEIEVEEELCKQVRSRDIS

20

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

DEEEIEVEEELCKQVRSRDI

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

VEEELCKQV

を含む。別の態様において、ポリペプチドまたはペプチド遮断剤は、アミノ酸配列

EEELCKQ

を含む。

【0305】

本明細書の記載および特許請求の範囲を通して、文脈が他の意味を要求しない限り、単数形は複数を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、文脈が他を要求しない限り、本明細書は、複数ならびに単数を企図するものとして理解すべきである。

30

【0306】

本発明の特定の局面、態様、または実施例と併せて記載される特徴、整数、特性、化合物、化学部分、または化学基は、それと不適合ではない限り本明細書に記載される他の任意の局面、態様、または実施例に適用可能であると理解すべきである。

【0307】

(表1) オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブの概要

名称	配列	エクソン
プライマー		
P1	CAGGGGCATAAGGACAAAG	13F
P2	TCCGAGCCCTTCCACTCCTCTCTGG	15R
P3	TCAGGTTTTGAGGCGGGTTGAG	17R
P3'	GGTTTTGAGGCGGGTTGAG	17R
P4	GAAGAGATCGAGGTGAGGTC	14bF
6	CGAGGGTGATGAAGAAGAGGA	14F
7	CCCCTGAGTTGCTGTGATA	16R
9	CACAACCTGGCCACTCCAAT	5F
10	CCTCTACCACCCCAATCG	5R
P11	CAACCGCGAGAAGATGACC	アクチンF
P12	TCCAGGGCGACGTAGCACA	アクチンR
13	ACACACCAGAAGACCAAGATTTACC	6/7 接合部
14	TGCTGGAGTGCGTTTTTCCT	7
P3b	GAA TCT CCA GGG CAC CAA C	3F
P5	CGA TTG GGG GTG GTA GAG G	5R
P24	TGTTGCATGAGAAAACGCCA	アルブミンF
P25	GTC GCC TGT TCA CCA AGG AT	アルブミンR
プローブ		
T1	CACTGCAAGTCCCTGGGCCA	16
T2	TGGACCTCACCTCGATCTCTTCTTCA	14b
T3	CACGGGCACCAGGAAGTCCA	16
T4	TGGTCCTCATCTTGGCCAGCA	14
T5	CGCCAGTCCTTGCTGGGACC	5
T6	CCCTGTACGCCTCTGGCCGT	アクチン
T7	ccc tgc cca gag gac atc gcc	7
T26	AAG TGA CAG AGT CAC CAA ATG CTG CA	アルブミン

10

20

30

40

50

【実施例】

【0308】

cDNAアレイ

48の異なる肺試料 (HLRT101)、ならびに、同じ患者由来の肺ガンと隣接組織の24のマッチドペア (HLRT504)、または、異なるガン由来の10セットの組織試料 (CSRT504) から得た、2~3ngのcDNAを含むTissueScan qPCRアレイは、OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD) からのものであった。肺 / 正常マッチドペア組織アレイについての腫瘍分類および要約された病理報告書が、<http://www.origene.com/geneexpression/disease-panels/products/HLRT504.aspx>に与えられる。図3B中のデータについての多重の反応、および全ての他のアレイについての単一の反応において、供給業者による*bアクチン発現および

Ciz1発現についての結果を標準化するために、*bアクチンの増幅に関して各ウェル中のcDNAのレベルが標準化された。閾値を設定し、全ての分析をABI 700ソフトウェアを使用して実施した。

【0309】

ヒト組織由来RNA

IRBの承認プロトコール下で採取された組織由来の肺腫瘍 / 正常RNAの3ペアは、Cytomyx (http://www.cytomyx.com/cytomyx/cytomyx_biorepository.asp) からのものであった。ドナーのインフォームドコンセントを得て採取したヒト肺組織の追加試料が、ILSbio (<http://www.ilsbio.com/>) から得られた。製造業者の指示に従って、TRIzolを使用して組織からRNAを単離した。組織の均質化をRNaseフリーの1.5mL Pellet Pestle (Anachem) を使用して行った。以下のように、ランダムプライマー、またはオリゴdTおよびランダムプライマーの混合物を用いてRNA試料を逆転写した。約1.6^{*}mgの全RNAを、1 μ Lの10mM dNTP、0.5 μ Lの0.5 μ g/ μ Lランダムプライマー (Promega)、および0.5 μ Lの0.5 μ g/ μ LオリゴdT₁₂₋₁₈プライマー (Invitrogen) を用いて、DEPC水中、全体積12 μ Lでインキュベートした。あるいは全RNAを、1 μ Lの500 μ g/mLランダムプライマー、1 μ Lの10mM dNTPを用いて、DEPC水中、全体積13 μ Lでインキュベートした。試料を、65 $^{\circ}$ Cで10分間、PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) においてインキュベートし、氷上で5分間インキュベーションを続けた。ランダムプライム反応物に、以下を加え体積20 μ Lとする：1 \times First-Strandバッファー、5mM DTT、200U SuperScript III、および40U RNaseOUT (全てInvitrogen)。反応物を、46 $^{\circ}$ Cで3時間、その後70 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。ランダムプライマー / オリゴdT反応物に、以下を加え最終体積20 μ Lとした：1 \times M-MLV反応バッファー、10mM DTT、200U M-MLV逆転写酵素 (全てがPromega)、および40U RNaseOUT (Invitrogen)。反応物を、42 $^{\circ}$ Cで52分間、その後70 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。

【0310】

PCRおよびQPCR

フラグメント増幅のために使用されたプライマー対の組み合わせは、p8/p2Taqポリメラーゼ (NEB, Herts, UK) を使用し、94 $^{\circ}$ C / 5分、次に94 $^{\circ}$ C / 15秒、55 $^{\circ}$ C / 30秒および68 $^{\circ}$ Cで1分間の33サイクル、68 $^{\circ}$ Cで7分間の最終工程)、p1/p2phusionポリメラーゼ (Finnzymes, Espoo, Finland) を使用し、98 $^{\circ}$ C / 30秒、次に98 $^{\circ}$ C / 10秒、62 $^{\circ}$ C / 30秒、および72 $^{\circ}$ Cで40秒の33サイクル、および72 $^{\circ}$ Cで7分間)、ならびにp4/p3Taqポリメラーゼ (NEB, Herts, UK)、94 $^{\circ}$ C / 5分、次に94 $^{\circ}$ C / 30秒、62 $^{\circ}$ C / 30秒、および72 $^{\circ}$ C / 40秒の33サイクル、72 $^{\circ}$ Cで7分間の最終工程が続く) を含む。PCR反応は、MJサーマルサイクラ-PTC-200で行った。定量的PCR反応は、光学接着フィルム付きのMicroAmp (商標) 光学96ウェル反応プレート中 (Applied Biosystems) で、全体積25 μ L中で行った。各反応について、cDNAを、1 \times TaqMan (登録商標) PCRミックス (Applied Biosystems)、0.4 μ Mフォワードプライマー、0.4 μ Mリバースプライマー、および0.4 μ Mプローブとインキュベートした。試料を、ABI Prism 7000または7300配列検出システムで、相対定量化アッセイおよび以下のプログラムを使用して実行した；50 $^{\circ}$ C [2分間]、95 $^{\circ}$ C [10分間]、それに続く、40サイクルの95 $^{\circ}$ C変性 [15秒間]、60 $^{\circ}$ Cアニーリングおよび伸長 [1分間]。試料が閾値レベルを通過したサイクル数は、Ct値である。1つの試料を、「キャリブレーター」試料として選択し、全ての他の発現値を、それと比べて表現した (RQ)。他に明記しない限り、プライマーはSigma Aldrichから、プローブはMWGから入手し、クローンおよびPCR産物の配列検証はMWGによって行った。

【0311】

細胞培養およびトランスフェクション

細胞株は、European Cell Culture Collection (<http://www.ecacc.org.uk/>) またはJapanese Collection of Research Bioresource (<http://cellbank.nibio.go.jp/>) から得るか、または、J. Southgateの好意によって得た。全ての細胞株を、推奨に従って培養した。NIH3T3細胞を、以前に記載された通りに増殖させ、Mirus 3T3を使用し、GFP-Ciz1またはGFP-C275を用いてトランスフェクトした。

【0312】

核分画

核分画は、基本的には記載された通りである。示したように、典型的には、カバースリップ上の細胞を、冷PBS、次に冷CSKバッファー（10mM Pipes/KOH Ph6.8、100mM NaCl、1mM EGTA、300mMスクロース）、加えて、1mM DTT、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche）を用い、界面活性剤（0.1% TX100）を使用してまたは使用せずにリンスした。DNase処理のために、細胞をさらに、CSK（示したように、0.1または0.5M NaCl）、続いてPBS中でリンスし、消化バッファー（10mM Tris [pH 7.6]、2.5mM MgCl₂、0.5mM CaCl₂）中のDNase 1と、25℃で20分間、推奨にしたがって（Roche）インキュベートした。示したように、DNase処理細胞を、固定の前に0.5M NaClを用いて1分間リンスした。全ての調製物を、新鮮な4%パラホルムアルデヒドを用いて室温で20分間固定した。

10

【0313】

免疫蛍光

カバースリップ上の固定細胞をPBSを用いて洗浄し、次に抗体バッファー（PBS中の10%プロテアーゼ不含有BSA、0.02% SDS、0.1% Triton X-100）を用いてブロックした。Ciz1-RDを、抗Ciz1ポリクローナル抗体1793を用いて、Ciz1-ADを、Ciz1アンカードメインペプチド

DEDEEEIEVEEELCKQVRSRDISR

を使用して、アフィニティー精製したポリクローナル抗体2Cを用いて検出した。DNAを、Hoechst 33258（Sigma）を用いて対比染色した。画像を、Zeiss Axiovert 200 MおよびOpenlab画像取得ソフトウェアを使用し、実験内で同一のパラメーター、典型的にはTRITC標識Ciz1については300ms、GFPについては400ms、Hoeschtについては15msを使用して収集した。画像をデジタル的に増強し、バックグラウンド蛍光を除去する、または、Adobe Photoshopを使用して明るさを増加させる場合、同一の操作を1つの実験内で画像に適用した。そのため、例えば抽出前後のCiz1染色の強度は、処理の効果を反映する。蛍光強度を、Openlab「Profile」ツールを使用して同一の撮像パラメーター下で取得した生画像から定量化した。

20

【0314】

実施例1DNA複製ドメインおよびアンカードメインの非共役発現

Ciz1の2つのよく特徴付けられた機能（DNA複製のサイクリン依存的刺激および核マトリクスとの結合）は、別々のタンパク質ドメインによってコードされる。これらは、RD（複製ドメイン）およびAD（アンカードメイン）と呼ばれる。インビトロでは、DNA複製を促すためには、Ciz1の核マトリクスアンカーは不要である。実際に、ADを欠くCiz1フラグメントは、核マトリクス³に付着しうるものよりも活性であるように見え、固定化が、機能固有であるものよりむしろ、制約的な特徴であることを意味する。本明細書では、RDおよびADの発現が、大半のガン細胞において一致していないという証拠、即ち、「非共役発現」を示す。ドメインの一方または他方の発現が、肺ガンの大部分、ならびに広範な他の一般の固形腫瘍において変化しており、不均衡である。

30

【0315】

RDまたはADの発現を検出する定量的PCR試薬（図1a）を使用し、46の肺由来cDNAを含むcDNAアレイを調べた（図1b）。アレイにわたり、両方のRDプローブによって、一致した発現パターンが明らかになった。同様に、両方のADプローブによって、一致した発現パターンが明らかになった。しかし、RDおよびADの発現は、互いに決して同一ではなかった。これは、2つのドメインがいつも一緒に発現しているわけではないこと、および、それらは恐らく、Ciz1タンパク質中にいつも両方が存在するわけではないことを実証する。

40

【0316】

肺腫瘍における非共役発現

隣接対照試料とは対照的に、腫瘍自体は、はるかに説得力のない傾向を示す。Ciz1発現は明らかに非共役および不均衡であるが、一部の患者についてはこれはRD減少として、他

50

についてはRD増加として（ステージIA試料と比べて）顕在化し、不良な適合を伴う水平に近い傾向線を生じる。

【0317】

一方のドメインの発現増加および他方の発現減少の組み合わせ効果も明らかにされている。RDおよびAD発現についての組み合わせ結果を、各々の個々の隣接対照と比べて提示する場合（図1E）、データから、それらの均衡比の崩壊が腫瘍ステージと相関することがわかる。ステージ1の疾患を伴う患者由来の腫瘍について、12.5%（8人中1人）が、周囲組織と比較して、ADとRDの間の均衡における2倍超の変化を有し、ステージII腫瘍について、これは90%（9/10）であり、ステージIII腫瘍について60%（3/5）である。この傾向は、Ciz1発現が腫瘍形成の期間中、非共役および不均衡であるという結論を支持する。

10

【0318】

腫瘍の他の型における非共役発現

Ciz1転写物発現の概要をつかむために、RDおよびADを、多数の一般の固形腫瘍においてサンプリングした（図2）。ADは、大半の腫瘍型の（非マッチド）対照試料と比べて、ほぼ全てのステージI、II、およびIII腫瘍において過剰に提示される。これは、乳ガン、肺ガン、および甲状腺ガンについて最も明白である（図2Bに示す比率曲線における下落から、明白）。

【0319】

ステージIV疾患における非共役発現

注目すべきことに、全ての組織型のステージIV腫瘍の半数以上において、逆のことがあてはまる（図2Aにおいて星印で示す）。これらの試料中では、RD転写物が過剰に提示され、転移した、または転移するであろう腫瘍のサブセットにおいて、RDで優先して発現が崩壊することを示唆する。

20

【0320】

同様の分析を、ステージIV疾患を伴う患者由来の19試料を含む40の悪性黒色腫の試料に適用した（図3A）。全てのグレードの腫瘍の大部分において、AD発現はRDを超えるが、3つ全ての対照試料について、これは当てはまらない。従って、悪性黒色腫は上記の傾向に従わず、この型の腫瘍についてはRDの優性発現へ切り替わっても、転移能力は伴わないことを示す。

【0321】

タンパク質レベルで、かつ既に公知のCiz1機能に照らして考える場合、細胞DNA複製に対する過剰なRDまたは過剰なADの影響は非常に類似し、重症度に差をもたらさう。具体的には、Ciz1の複製ドメインは、核マトリクスアンカー³が存在しない場合にDNA複製の開始を刺激するように機能することが可能であること、しかし、核マトリクスへの付着が、NIH3T3細胞¹および出願人が試験してきた非腫瘍由来の大半の他の確立された細胞株（示さず）中でのCiz1の多くにとって普通のことであることが、出願人により公知であった。出願人は、核マトリクスアンカー非存在下での複製ドメインの発現が、非アンカー活性をもたらさうること、および、これが、DNA複製の空間 - 時間組織化についての結果を有しうることを示唆する。同様に、触媒機能を持たないタンパク質の状況におけるC末端固定化ドメインの発現は、核マトリクス上の固定化部位について完全長タンパク質と競合することにより、ドミナントネガティブな効果を有しうる（図4A）。

30

40

【0322】

実施例2

タンパク質検出ツール

出願人は、RDおよびADに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のセットを開発し（図5A）、それらを用いて、タンパク質レベルでCiz1発現を検出した。これらは、分子診断ツールとしての潜在的な能力を有し、現在、ガン細胞株中でのCiz1タンパク質の機能および挙動についての問いに答えるために使用されている。今までに、出願人は、Ciz1 RDおよびADの両方がタンパク質レベルでは独立して存在すること（図5B、C）、RDは付着しないがADが一部のガン細胞中で核マトリクスに付着すること（図5C）、および、ADの

50

過剰発現が内在性RDの正常な細胞内局在化および固定化を崩壊させること（図5D、E）を実証してきた。これらの観察の全てが、Ciz1 RDとADの間の比率の崩壊が核の構築を変えらるゝとの考えと一致している。

【0323】

実施例3

b型変異体

出願人は、Ciz1コード配列中の選択的スプライシングを証明するために、Ciz1 Unigene クラスターHs.212395 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>) にマップされる発現配列タグ (EST) を調査した。これは、神経内分泌肺ガン (主に肺小細胞ガン、SCLC) が、非ガン組織よりもはるかに高頻度で選択的スプライシングされたCiz1の形態で発現する (b型転写物を産出する) ことを示唆した (図4Bに示す)。b型転写物において選択的スプライシングされている領域にまたがるCiz1転写物は、合計23の異なるライブラリーである10のガンおよび13の非ガンにおいて検出された。非ガンライブラリー由来のわずか3%と比較して、ガン由来転写物について、その40%はb型転写物であった。

10

【0324】

選択的検出ツール

出願人は、b型転写物を検出する分子ツールを開発した。これらは、エクソン接合部のいずれかの側に位置付けられるプライマーであり、エクソン接合部にわたってb型転写物由来の産物のみを与えるプライマーであり、かつエクソン接合部にもわたるがb型転写物のみを認識するQ-PCRプローブである。最初に、これらを、肺ガン細胞株のパネルに適用し、a) ツールを検証し、b) b型転写物の発現に関する確認データを生成した。

20

【0325】

SCLCにおける発現

選択的転写物検出ツールの適用によって、SCLC患者に由来する細胞株が、b型変異体を、対照細胞株よりも高頻度で発現することを示した (図6、7A)。神経内分泌肺ガン患者由来の腫瘍の少量のサンプリング、および、同様に同じ患者由来の正常な隣接肺組織に由来するRNA試料への適用によって、b型転写物が、3人のSCLC患者全てにおいて優先的に発現していることが確認される (図7B)。

【0326】

非小細胞肺ガンにおけるb変異体発現

b型転写物について選択的であるQPCR試薬を、図1において使用したマッチド肺腫瘍 / 正常組織cDNAアレイに適用した。試料セットの6つが、正常な隣接対照組織と比較して、腫瘍中で2倍超のb型転写物を発現した (図8A)。これは、アレイ上に単一の神経内分泌腫瘍を含む (セット9/10)。同様に、NSCLC試料の別々のセット内で、b変異体は、非マッチド対照と比較して、症例の小サブセットにおいて上昇した (図8B)。このように、b型転写物の発現は、神経内分泌腫瘍においてよく見られるが、肺ガンのこの型に限定されない。

30

【0327】

他の型のガンにおけるb変異体発現

出願人は、異なるグレードの腫瘍および見掛け上は正常な組織由来の非マッチド試料のセットを含む、同様のcDNAアレイ (Origene) を使用して、広範な他の一般のガンを調査した。対照と比較した場合、b変異体の増加が、肝臓腫瘍 (図8C) および腎臓腫瘍 (図8D) のサブセットにおいて検出された。対照的に、甲状腺腫瘍およびリンパ腫の両方が、症例の高い割合において、高レベルのb変異体を発現する (図9)。従って、これら2つの腫瘍型は、Ciz1 b変異体選択的な診断および治療ツールの適用のための、有力な代替指標である。

40

【0328】

Ciz1変異体タンパク質

高親和性の変異体特異的ポリクローナル抗体が生成されており、SCLC細胞株における組換えタンパク質 (図10A、10B、および10C) および内在性b変異体タンパク質 (図10D) を使用して検証されている。これは、変異体転写物が実際に肺ガン細胞において変異体タン

50

パク質に翻訳されること、および、細胞の状況においても、本発明者らのツールが有効で選択的な検出を可能にすることを示す。Cizzleがまた、同様の高程度の特異性を有するモノクローナル抗体の産生および検証に参与する。

【0329】

実施例4

マウス培養細胞由来Ciz1のRNA干渉を使用した枯渇によって、細胞周期の進行が阻害され、細胞増殖³が制限される。従って、Ciz1を阻害する薬剤は、ガン細胞の増殖を制限する治療的分子としての潜在力を有する。出願人は、概してCiz1を標的とすることによって、または、肺ガン関連b型転写物を選択的に標的とすることによって、Ciz1発現を阻害するヒト特異的RNA干渉分子を生成し、かつ試験してきた。両方とも、神経内分泌肺ガン細胞の増殖を抑制する。

【0330】

b型転写物抑制

本発明者らの主な戦略は、b型転写物を発現する肺ガン細胞の増殖を選択的に抑制することを目的とした選択的な方法でb型転写物を抑制することである。b型転写物に特異的なRNA干渉分子候補の、Ciz1の他の形態に影響を与えずb型転写物発現を抑制する能力について比較した。最も有効で選択的なsiRNA配列を、Ciz1タンパク質の選択的抑制についてさらに試験した(図11)。誘導性shRNA送達ベクターへのトランスファー後、内在性b型転写物を発現するSCLC細胞の増殖に対する顕著な効果(図12A)が、b変異体転写物(図12B)およびタンパク質(図12C)の選択的抑制とともに、記録された。4日間の時間経過後、同様に処置された対照細胞の約35%にまで増殖が抑制された(図12D)。b変異体抑制を伴う長期培養の間に、細胞形態における著しい変化が観察された(図12E)。

【0331】

インビボでの標的抑制

誘導性shRNA送達ベクターを有する同じSCLC細胞を使用し、皮下注射によりマウスに腫瘍を作成した。細胞注射の日から活性化されたか、または、腫瘍が形成された後に開始されたかを問わず、b型転写物に選択的なRNAiは、インビボでの腫瘍増殖を有効に阻害した(図13A、B)。これらのデータから、SCLC関連Ciz1スプライス変異体(b型転写物)を標的とすることは、それを発現する腫瘍型における細胞増殖の選択的な抑制のための潜在的に実行可能な戦略であることが示される。追加の検証が、リンパ腫ベースのモデルおよび安定化siRNAの全身送達を包含するように計画される。

【0332】

循環腫瘍細胞の検出

皮下腫瘍を有するマウスの一部の全末梢血から単離したRNAを使用し、b型転写物検出ツールの感度を試験した(図13C)。b変異体は、腫瘍を伴う両方のマウスにおいて簡単に検出されたが、対照群の両方のマウスにおいては検出されず、b変異体がSCLCについての血液試験の基礎を形成する可能性を高めている。

【0333】

参考文献

10

20

30

1. Ainscough, J.F. *et al.* C-terminal domains deliver the DNA replication factor Ciz1 to the nuclear matrix. *J Cell Sci* **120**, 115-124 (2007).
2. Copeland, N.A., Sercombe, H.E., Ainscough, J., F-X. & Coverley, D. Ciz1 cooperates with cyclin A/CDK2 to activate mammalian DNA replication in vitro. *Journal of Cell Science* (in press).
3. Coverley, D., Marr, J. & Ainscough, J.F.-X. Ciz1 promotes mammalian DNA replication. *Journal of Cell Science* **118**, 101-112 (2005).
4. den Hollander, P., Rayala, S.K., Coverley, D. & Kumar, R. Ciz1, a novel DNA-binding coactivator of the estrogen receptor α , confers hypersensitivity to estrogen action. *Cancer Research* **66**, 11021-11030 (2006). 10
5. Warder, D.E. & Keherly, M.J. Ciz1, Cip1 interacting zinc finger protein 1 binds the consensus DNA sequence ARYSR(0-2)YYAC. *Journal of Biomedical Science* **10**, 406-417 (2003).
6. Rahman, F.A., Ainscough, J.F., Copeland, N. & Coverley, D. Cancer-associated missplicing of exon 4 influences the subnuclear distribution of the DNA replication factor CIZ1. *Human Mutation* **28**, 993-1004 (2007). 20
7. Dahmcke, C.M., Buchmann-Moller, S., Jensen, N.A. & Mitchelmore, C. Altered splicing in exon 8 of the DNA replication factor CIZ1 affects subnuclear distribution and is associated with Alzheimer's disease. *Molecular and cellular neurosciences* **38**, 589-594 (2008).
8. Zink, D., Fischer, A.H. & Nickerson, J.A. Nuclear structure in cancer cells. *Nature reviews* **4**, 677-687 (2004).

上記明細書に記載の文献は全て参照により本明細書に組み入れられる。本発明に記載した方法およびシステムの様々な変更および変形が、本発明の範囲および主旨の範囲から逸脱しないことは当業者にとって自明であろう。本発明を具体的な好ましい態様との関連で記載したが、本発明の特許請求の範囲がそのような具体的な態様によって必要以上に制限されないことが理解されるべきである。実際に、本発明を実施するために記載した様式の、分子生物学や関連する分野の当業者に自明である種々の変更が、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。

【 0 3 3 4 】

配列表

30

SEQ ID NO: 1 (完全長Ciz1エクソン14のヌクレオチド配列。本明細書中エクソン14aと称す。):

CUG AAG UCG CUU GAG AAA GAA AUU GCU GGC CAA GAU GAG GAC
CAC UUC AUU ACA GUG GAC GCU GUG GGU UGC UUC GAG GGU GAU
GAA GAA GAG GAA GAG GAU GAU GAG GAU GAA GAA GAG AUC GAG
GUU GAG GAG GAA CUC UGC AAG CAG

SEQ ID NO: 2 (完全長Ciz1エクソン14のポリペプチド配列。エクソン14aと称す。):

LKSLE KEIAGQDEDH FITVDAVGCF EGDEEEEEDEDEEEEIE VEE ELCKQ

10

SEQ ID NO: 3 (エクソン14の3'末端の24ヌクレオチドを欠くCiz1エクソン14の変異体のヌクレオチド配列。本明細書中、エクソン14bと称す。):

CUG AAG UCG CUU GAG AAA GAA AUU GCU GGC CAA GAU GAG GAC
CAC UUC AUU ACA GUG GAC GCU GUG GGU UGC UUC GAG GGU GAU
GAA GAA GAG GAA GAG GAU GAU GAG GAU GAA GAA GAG AUC GAG

20

SEQ ID NO: 4 (エクソン14のCOOH末端の8アミノ酸残基を欠くCiz1エクソン14の変異体のアミノ酸配列。エクソン14bと称す。):

LKSLE KEIAGQDEDH FITVDAVGCF EGDEEEEEDEDEEEEIE

SEQ ID NO: 5 (Ciz1エクソン15のヌクレオチド配列。):

GUG AGG UCC AGA GAU AUA UCC AGA GAG GAG UGG AAG GGC UCG
GAG ACC UAC AGC CCC AAU ACU GCA UAU

30

SEQ ID NO: 6 (Ciz1エクソン15のアミノ酸配列。):

VRSRD ISREEWKGSE TYSPNTAY

SEQ ID NO: 7 (エクソン14bおよび15のスプライス接合部にまたがるCiz1 b変異体転写物の一部のヌクレオチド配列。エクソン14bの3'末端の25ヌクレオチドおよびエクソン15の5'末端の25ヌクレオチドからなる。):

5'
UGAUGAGGAUGAAGAAGAGAUCGAGGUGAGGUCCAGAGAUUAUAUCCAGAG 3'

40

SEQ ID NO: 8 (エクソン14bおよび15のスプライス接合部にまたがるCiz1 b変異体ポリ

ペプチドの一部のアミノ酸配列。エクソン14bにコードされる最後の8アミノ酸およびエクソン15にコードされる最初の8アミノ酸からなる。):

DEDEEEIEVRSRDISR

SEQ ID NO: 9(複製ドメイン(RD)ポリペプチド(エクソン3からエクソン9の末端に合致する。)):

MLQRALLLQQLQGLDQFAMPPATYDTAGLTMPTATLGNLRGYGMASPLAAPSSTLTPPQ
LATPNLQQFFPQATRQSLLGPPVGVPMNPSQFNLSGRNPQKQARTSSSTTPNRKDS
SSQTMPVEDKSDPPEGSEEAEPMDTPEDQDLPPCPEDIAKEKRTPAPEPEPCEASE
LPAKRLRSSEEPTEKEPPGQLQVKAQPQARMTVPKQTQTPDLLPEALEAQVLPRFQPR
VLQVQAQVQSQTQPRIPSTDTQVQPKLQKQAQTQTSPEHLVLQKQVQPQLQQAEP
QKQVQPQVQPQAHSQGPRQVQLQQAEPKQVQPQVQPQAHSQPPRQVQLQKQ
VQTQTYPVHTQAQPSVQPQEHPAQSVPPEQTHEQPHTQPQVSLLAPEQTPVVV
HVCGLEMPDAVEAGGGMEKTLPEPVGTQVSMEEIQNESACGLDVGECENRAREMP
G

10

20

SEQ ID NO: 10 (RDの一部(エクソン5~9。)):

MASPLAAPSSTLTPPQLATPNLQQFFPQATRQSLLGPPVGVPMNPSQFNLSGRNPQK
QARTSSSTTPNRKDSSTMPVEDKSDPPEGSEEAEPMDTPEDQDLPPCPEDIAKE
KRTPAPEPEPCEASELPAKRLRSSEEPTEKEPPGQLQVKAQPQARMTVPKQTQTPDLL
PEALEAQVLPRFQPRVLQVQAQVQSQTQPRIPSTDTQVQPKLQKQAQTQTSPEHLVLQ
QKQVQPQLQQAEPQKQVQPQVQPQAHSQGPRQVQLQQAEPKQVQPQVQPQAHS
SQPPRQVQLQKQVQTQTYPVHTQAQPSVQPQEHPAQSVPPEQTHEQPHTQ
PQVSLLAPEQTPVVVHVCGLEMPDAVEAGGGMEKTLPEPVGTQVSMEEIQNESACG
LDVGECENRAREMPG

30

SEQ ID NO: 11 (さらに制限されたRD(エクソン8の内部分を除くエクソン5~9。)):

MASPLAAPSSTLTPPQLATPNLQQFFPQATRQSLLGPPVGVPMNPSQFNLSGRNPQK
QARTSSSTTPNRKDSSTMPVEDKSDPPEGSEEAEPMDTPEDQDLPPCPEDIAKE
KRTPAPEPEPCEASELPAKRLRSSEEPTEKEPPGQLQVKAQPQARMTVPKQTQTPDLL
PEALEAQVLPRFQPRVLQVQAQVQSQTQPRIPSTDTQVQPKLQKQAQTQTSPEHLVLQ
QKQVQPQLQQAEPQKQVQPQVHTQAQPSVQPQEHPAQSVPPEQTHEQPHTQ
PQVSLLAPEQTPVVVHVCGLEMPDAVEAGGGMEKTLPEPVGTQVSMEEIQNESACG
LDVGECENRAREMPG

40

SEQ ID NO: 12 (RDヌクレオチド(エクソン3からエクソン9の末端に合致する。)):

AUGCUGCA GAGAGCUUUG CUUUUACAGC AGUUGCAAGG ACUGGACCAG

UUUGCAAUGC CACCAGCCAC GUAUGACACU GCCGGUCUCA CCAUGCCCAC
AGCAACACUG GGUAACCUCC GAGGCUAUGG CAUGGCAUCC CCAGGCCUCG
CAGCCCCCAG CCUCACACCC CCACAACUGG CCACUCCAAA UUUGCAACAG
UUCUUUCCCC AGGCCACUCG CCAGUCCUUG CUGGGACCUC CUCCUGUUGG
GGUCCCCAUG AACCCUUCCC AGUUCAACCU UUCAGGACGG AACCCCCAGA
AACAGGCCCG GACCUCCUCC UCUACCACCC CCAAUCGAAA GGAUUCUUCU
UCUCAGACAA UGCCUGUGGA AGACAAGUCA GACCCCCCAG AGGGGUCUGA
GGAAGCCGCA GAGCCCCGGA UGGACACACC AGAAGACCAA GAUUUACCGC
CCUGCCCAGA GGACAUCGCC AAGGAAAAC GCACUCCAGC ACCUGAGCCU
GAGCCUUGUG AGGCGUCCGA GCUGCCAGCA AAGAGAUUGA GGAGCUCAGA
AGAGCCCACA GAGAAGGAAC CUCCAGGGCA GUUACAGGUG AAGGCCCAGC
CGCAGGCCCG GAUGACAGUA CCGAAACAGA CACAGACACC AGACCUGCUG
CCUGAGGCCC UGGAAGCCCA AGUGCUGCCA CGAUUCCAGC CACGGGUCCU
GCAGGUCCAG GCCCAGGUGC AGUCACAGAC UCAGCCGCGG AUACCAUCCA
CAGACACCCA GGUGCAGCCA AAGCUGCAGA AGCAGGCGCA
AACACAGACC UCUCAGAGC ACUUGAGUCU GCAACAGAAG CAGGUGCAGC
CACAGCUGCA GCAGGAGGCA GAGCCACAGA AGCAGGUGCA GCCACAGGUA
CAGCCACAGG CACAUUCACA GGGCCCAAGG CAGGUGCAGC UGCAGCAGGA
GGCAGAGCCG CUGAAGCAGG UGCAGCCACA GGUGCAGCCC CAGGCACAUU
CACAGCCCCC AAGGCAGGUG CAGCUGCAGC UGCAGAAGCA GGUCCAGACA
CAGACAUUUC CACAGGUCCA CACACAGGCA CAGCCAAGCG UCCAGCCACA
GGAGCAUCCU CCAGCGCAGG UGUCAGUACA GCCACCAGAG CAGACCCAUG
AGCAGCCUCA CACCCAGCCG CAGGUGUCGU UGCUGGCCUCC AGAGCAAACA
CCAGUUGUGG UUCAUGUCUG CGGGCUGGAG AUGCCACCUG AUGCAGUAGA
AGCUGGUGGA GGCAUGGAAA AGACCUUGCC AGAGCCUGUG GGCACCCAAG
UCAGCAUGGA AGAGAUUCAG AAUGAGUCGG CCUGUGGCCU AGAUGUGGGA
GAAUGUGAAA ACAGAGCGAG AGAGAUGCCA GGG

10

20

30

SEQ ID NO: 13 (RDの一部(エクソン5~9)):

GGUAACCUCC GAGGCUAUGG CAUGGCAUCC CCAGGCCUCG CAGCCCCCAG
CCUCACACCC CCACAACUGG CCACUCCAAA UUUGCAACAG UUCUUUCCCC
AGGCCACUCG CCAGUCCUUG CUGGGACCUC CUCCUGUUGG GGUCCCCAUG
AACCCUUCCC AGUUCAACCU UUCAGGACGG AACCCCCAGA AACAGGCCCG
GACCUCCUCC UCUACCACCC CCAAUCGAAA GGAUUCUUCU UCUCAGACAA
UGCCUGUGGA AGACAAGUCA GACCCCCCAG AGGGGUCUGA GGAAGCCGCA
GAGCCCCGGA UGGACACACC AGAAGACCAA GAUUUACCGC CCUGCCCAGA

40

GGACAUCGCC AAGGAAAAC GCACUCCAGC ACCUGAGCCU GAGCCUUGUG
AGGCGUCCGA GCUGCCAGCA AAGAGAUUGA GGAGCUCAGA AGAGCCCACA
GAGAAGGAAC CUCCAGGGCA GUUACAGGUG AAGGCCCAGC CGCAGGCCCG
GAUGACAGUA CCGAAACAGA CACAGACACC AGACCUGCUG CCUGAGGCC
UGGAAGCCCA AGUGCUGCCA CGAUUCCAGC CACGGGUCCU GCAGGUCCAG
GCCCAGGUGC AGUCACAGAC UCAGCCGCGG AUACCAUCCA CAGACACCCA
GGUGCAGCCA AAGCUGCAGA AGCAGGCGCA
AACACAGACC UCUCAGAGC ACUUAGUGCU GCAACAGAAG CAGGUGCAGC
CACAGCUGCA GCAGGAGGCA GAGCCACAGA AGCAGGUGCA GCCACAGGUA
CAGCCACAGG CACAUUCACA GGGCCCAAGG CAGGUGCAGC UGCAGCAGGA
GGCAGAGCCG CUGAAGCAGG UGCAGCCACA GGUGCAGCCC CAGGCACAUU
CACAGCCCCC AAGGCAGGUG CAGCUGCAGC UGCAGAAGCA GGUCCAGACA
CAGACAUUUC CACAGGUCCA CACACAGGCA CAGCCAAGCG UCCAGCCACA
GGAGCAUCCU CCAGCGCAGG UGUCAGUACA GCCACCAGAG CAGACCCAUG
AGCAGCCUCA CACCCAGCCG CAGGUGUCGU UGCUGGCUCC AGAGCAAACA
CCAGUUGUGG UUCAUGUCUG CGGGCUGGAG AUGCCACCUG AUGCAGUAGA
AGCUGGUGGA GGCAUGGAAA AGACCUUGCC AGAGCCUGUG GGCACCCAAG
UCAGCAUGGA AGAGAUUCAG AAUGAGUCGG CCUGUGGCCU AGAUGUGGGA
GAAUGUGAAA ACAGAGCGAG AGAGAUGCCA GGG

10

20

SEQ ID NO: 14 (さらに制限された部分RD (エクソン8の内部分を除くエクソン5~9)):

GGUAACCUCC GAGGCUAUGG CAUGGCAUCC CCAGGCCUCG CAGCCCCCAG
CCUCACACCC CCACAACUGG CCACUCCAAA UUUGCAACAG UUCUUUCCCC
AGGCCACUCG CCAGUCCUUG CUGGGACCUC CUCCUGUUGG GGUCCCAUG
AACCCUUCUCC AGUUCAACCU UUCAGGACGG AACCCCCAGA AACAGGCCCG
GACCUCCUCC UCUACCACCC CCAAUCGAAA GGAUUCUUCU UCUCAGACAA
UGCCUGUGGA AGACAAGUCA GACCCCCAG AGGGGUCUGA GGAAGCCGCA
GAGCCCCGGA UGGACACACC AGAAGACCAA GAUUUACCGC CCUGCCCAGA
GGACAUCGCC AAGGAAAAC GCACUCCAGC ACCUGAGCCU GAGCCUUGUG
AGGCGUCCGA GCUGCCAGCA AAGAGAUUGA GGAGCUCAGA AGAGCCCACA
GAGAAGGAAC CUCCAGGGCA GUUACAGGUG AAGGCCCAGC CGCAGGCCCG
GAUGACAGUA CCGAAACAGA CACAGACACC AGACCUGCUG CCUGAGGCC
UGGAAGCCCA AGUGCUGCCA CGAUUCCAGC CACGGGUCCU GCAGGUCCAG
GCCCAGGUGC AGUCACAGAC UCAGCCGCGG AUACCAUCCA CAGACACCCA
GGUGCAGCCA AAGCUGCAGA AGCAGGCGCA

30

40

AACACAGACC UCUCAGAGC ACUUAGUGCU GCAACAGAAG CAGGUGCAGC
CACAGCUGCA GCAGGAGGCA GAGCCACAGA AGCAGGUGCA GCCACAGGUC
CACACACAGG CACAGCCAAG CGUCCAGCCA CAGGAGCAUC CUCCAGCGCA GG
UGUCAGUACA GCCACCAGAG CAGACCCAUG AGCAGCCUCA CACCCAGCCG
CAGGUGUCGU UGCUGGCUCC AGAGCAAACA CCAGUUGUGG UUCAUGUCUG
CGGGCUGGAG AUGCCACCUG AUGCAGUAGA AGCUGGUGGA GGCAUGGAAA
AGACCUUGCC AGAGCCUGUG GGCACCCAAG UCAGCAUGGA AGAGAUUCAG
AAUGAGUCGG CCUGUGGCCU AGAUGUGGGA GAAUGUGAAA ACAGAGCGAG
AGAGAUGCCA GGG

10

SEQ ID NO: 15 (固定化ドメイン(ID) (エクソン9-17。)) :

GMEKTLPEPVGTVQSMEEIQNESACGLDVGECENRAREMPGVWGAGGSLKVILQSS
DSRAFSTVPLTPVPRPSDSVSTPAATSTPSKQALQFFCYICKASCSSQQEFQDHMSE
PQHQQRLGEIQHMSQAACLLSLLVPRDVLETEDEEPPRRWCNTCQLYMGDLIHR
RTQDHKIAKQSLRPFCTVCNRYFKTPRKFEHVKSQGHKDKAKELKSLEKEIAGQDEDH
FITVDAVGCFEGDEEEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETYSPNTAYG
VDFLVPVMGYICRICHKFYHSNSGAQLSHCKSLGHFENLQKYKAAKNPSPTRPVSRRRC
AINARNALTALFTSSGRPPSQPNTQDKTPSKVTARPSQPPLPRRSTRLKT

20

SEQ ID NO: 16 (IDの一部。中央のエクソン12-17。):

RTQDHKIAKQSLRPFCTVCNRYFKTPRKFEHVKSQGHKDKAKELKSLEKEIAGQDEDH
FITVDAVGCFEGDEEEEEDEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETYSPNTAYG
VDFLVPVMGYICRICHKFYHSNSGAQLSHCKSLGHFENLQKYKAAKNPSPTRPVSRRRC
AINARNALTALFTSSGRPPSQPNTQDKTPSKVTARPSQPPLPRRSTRLKT

30

SEQ ID NO: 17 (IDのさらに制限された部分。中央のエクソン13-17。):

NRYFKTPRKFEHVKSQGHKDKAKELKSLEKEIAGQDEDHFITVDAVGCFEGDEEEEEED
DEDEEEEIEVEEELCKQVRSRDISREEWKGSETYSPNTAYGVDFLVPVMGYICRICHKFY
HSNSGAQLSHCKSLGHFENLQKYKAAKNPSPTRPVSRRCAINARNALTALFTSSGRP
PSQPNTQDKTPSKVTARPSQPPLPRRSTRLKT

40

SEQ ID NO: 18(ID。エクソン9-17。):

GGCAUGGAAA AGACCUUGCC AGAGCCUGUG GGCACCCAAG UCAGCAUGGA
AGAGAUUCAG AAUGAGUCGG CCUGUGGCCU AGAUGUGGGA GAAUGUGAAA
ACAGAGCGAG AGAGAUGCCA GGGGUAUGGG GCGCCGGGGG
CUCCCUGAAG GUCACCAUUC UGCAGAGCAG UGACAGCCGG GCCUUUAGCA

CUGUACCCCU GACACCUGUC CCCC GCCCA GUGACUCCGU CUCCUCCACC
CCUGCGGCUA CCAGCACUCC CUCUAAGCAG GCCUCCAGU UCUUCUGCUA
CAUCUGCAAG GCCAGCUGCU CCAGCCAGCA GGAGUCCAG GACCACAUGU
CGGAGCCUCA GCACCAGCAG CGGCUAGGGG AGAUCCAGCA CAUGAGCCAA
GCCUGCCUCC UGUCCCUGCU GCCCGUGCCC CGGGACGUCC UGGAGACAGA
GGAUGAGGAG CCUCCACCAA GCGCUGGUG CAACACCUGC CAGCUCUACU
ACAUGGGGGA CCUGAUCCAA CACCGCAGGA CACAGGACCA CAAGAUUGCC
AAACAAUCCU UGCGACCCUU CUGCACCGUU UGCAACCGCU ACUUCAAAAC
CCCUCGCAAG UUUGUGGAGC ACGUGAAGUC CCAGGGGCAU AAGGACAAAG
CCAAGGAGCU GAAGUCGCUU GAGAAAGAAA UUGCUGGCCA AGAUGAGGAC
CACUUCAUUA CAGUGGACGC UGUGGGUUGC UUCGAGGGUG AUGAAGAAGA
GGAAGAGGAU GAUGAGGAUG AAGAAGAGAU CGAGGUUGAG GAGGAACUCU
GCAAGCAGGU GAGGUCCAGA GAUUAUCCA GAGAGGAGUG GAAGGGCUCG
GAGACCUACA GCCCAAUAC UGCAUAUGGU GUGGACUUCC UGGUGCCCGU
GAUGGGCUAU AUCUGCCGCA UCUGCCACAA GUUCUAUCAC AGCAACUCAG
GGGCACAGCU CUCCCACUGC AAGUCCCUGG GCCACUUUGA GAACCUGCAG
AAAUACAAGG CGGCCAAGAA CCCAGCCCC ACCACCCGAC CUGUGAGCCG
CCGGUGCGCA AUCAACGCC GGAACGCUUU GACAGCCCUG UUCACCUCCA
GCGGCCGCC ACCCUCCCAG CCCAACACCC AGGACAAAAC ACCCAGCAAG
GUGACGGCUC GACCCUCCA GCCCCACUA CCUCGGCGCU CAACCCGCCU
CAAAACCUGA

10

20

SEQ ID NO: 19 (IDの一部。中央エクソン12-17。):

30

AGGA CACAGGACCA CAAGAUUGCC
AAACAAUCCU UGCGACCCUU CUGCACCGUU UGCAACCGCU ACUUCAAAAC
CCCUCGCAAG UUUGUGGAGC ACGUGAAGUC CCAGGGGCAU AAGGACAAAG
CCAAGGAGCU GAAGUCGCUU GAGAAAGAAA UUGCUGGCCA AGAUGAGGAC
CACUUCAUUA CAGUGGACGC UGUGGGUUGC UUCGAGGGUG AUGAAGAAGA
GGAAGAGGAU GAUGAGGAUG AAGAAGAGAU CGAGGUUGAG GAGGAACUCU
GCAAGCAGGU GAGGUCCAGA GAUUAUCCA GAGAGGAGUG GAAGGGCUCG
GAGACCUACA GCCCAAUAC UGCAUAUGGU GUGGACUUCC UGGUGCCCGU
GAUGGGCUAU AUCUGCCGCA UCUGCCACAA GUUCUAUCAC AGCAACUCAG
GGGCACAGCU CUCCCACUGC AAGUCCCUGG GCCACUUUGA GAACCUGCAG
AAAUACAAGG CGGCCAAGAA CCCAGCCCC ACCACCCGAC CUGUGAGCCG
CCGGUGCGCA AUCAACGCC GGAACGCUUU GACAGCCCUG UUCACCUCCA
GCGGCCGCC ACCCUCCCAG CCCAACACCC AGGACAAAAC ACCCAGCAAG

40

GUGACGGCUC GACCCUCCCA GCCCCCACUA CCUCGGCGCU CAACCCGCCU
CAAAACCUGA

SEQ ID NO: 20 (IDのさらに制限された部分。中央部エクソン13-17。):

GCAACCGCU ACUUCAAAAC CCCUCGCAAG UUUGUGGAGC ACGUGAAGUC
CCAGGGGCAU AAGGACAAAG CCAAGGAGCU GAAGUCGCUU GAGAAAGAAA
UUGCUGGCCA AGAUGAGGAC CACUUCAUUA CAGUGGACGC UGUGGGUUGC
UUCGAGGGUG AUGAAGAAGA

10

GGAAGAGGAU GAUGAGGAUG AAGAAGAGAU CGAGGUUGAG GAGGAACUCU
GCAAGCAGGU GAGGUCCAGA GAUAUAUCCA GAGAGGAGUG GAAGGGCUCG
GAGACCUACA GCCCAAUAC UGCAUAUGGU GUGGACUUCC UGGUGCCCGU
GAUGGGCUAU AUCUGCCGCA UCUGCCACAA GUUCUAUCAC AGCAACUCAG
GGGCACAGCU CUCCCACUGC AAGUCCCUGG GCCACUUUGA GAACCUGCAG
AAUACAAGG CGGCCAAGAA CCCAGCCCC ACCACCCGAC CUGUGAGCCG
CCGGUGCGCA AUCAACGCCG GGAACGCUUU GACAGCCCUG UUCACCUCCA
GCGGCCGCC ACCCUCCAG CCCAACACCC AGGACAAAC ACCCAGCAAG
GUGACGGCUC GACCCUCCCA GCCCCCACUA CCUCGGCGCU CAACCCGCCU
CAAAACCUGA

20

SEQ ID NO: 21 (エクソン14aおよび15のアミノ酸配列。):

LKSLE KEIAGQDEDH FITVDAVGCF EGDEEEEEDEDEEEEIE VEE ELCKQ VRSD
ISREEWKGSE TYPNTAY

30

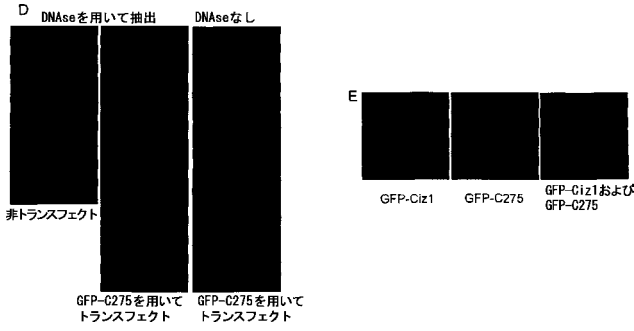
SEQ ID NO: 22 (エクソン14bおよび15のアミノ酸配列。):

LKSLE KEIAGQDEDH FITVDAVGCF EGDEEEEEDEDEEEEIE VRSD ISREEWKGSE
TYPNTAY

SEQ ID NO: 23 (エクソン14aおよび15にまたがるアミノ酸配列。):

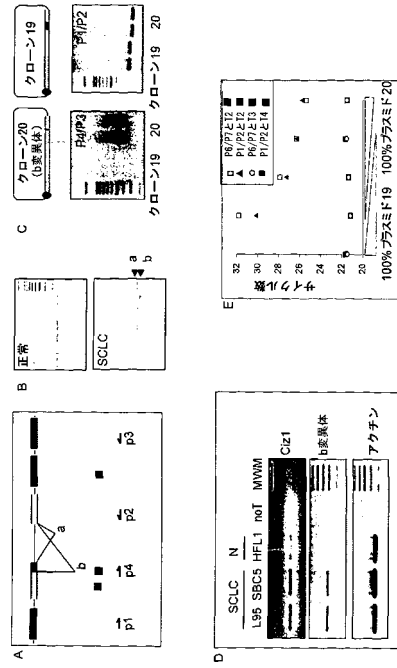
DEDEEEIEVEEELCKQVRSRDISR

【 図 5 - 2 】



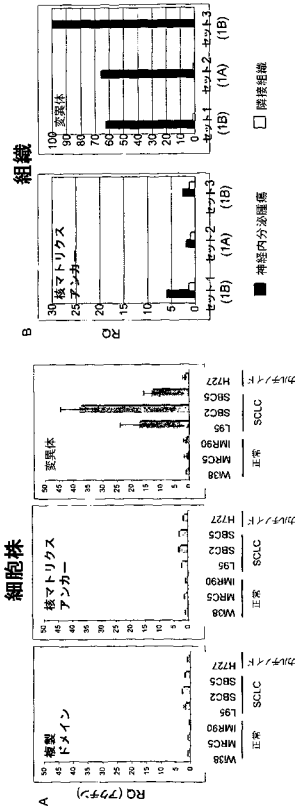
【 図 6 】

b型転写特異的抽出ツールの開発



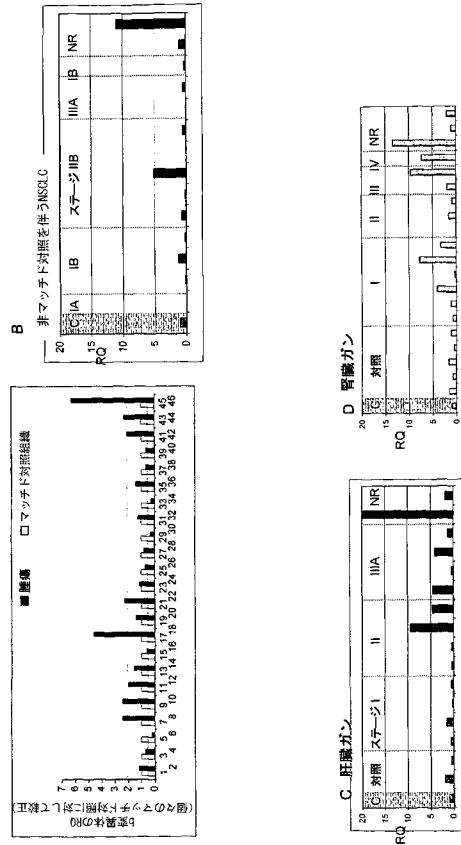
【 図 7 】

SCLC細胞株及び腫瘍へのb型転写特異的抽出ツールの適用

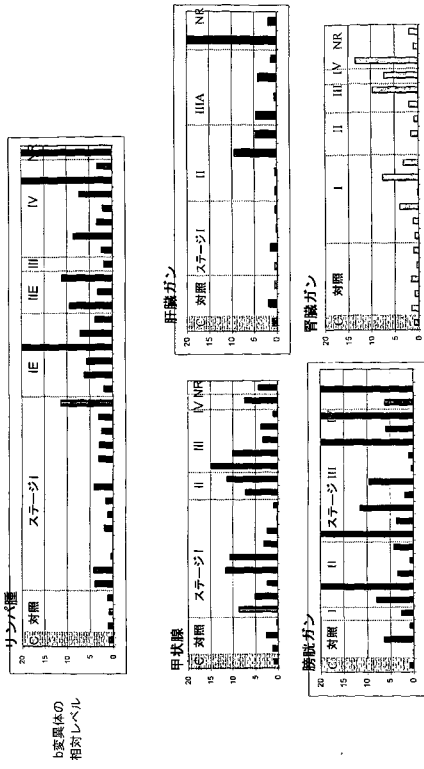


【 図 8 】

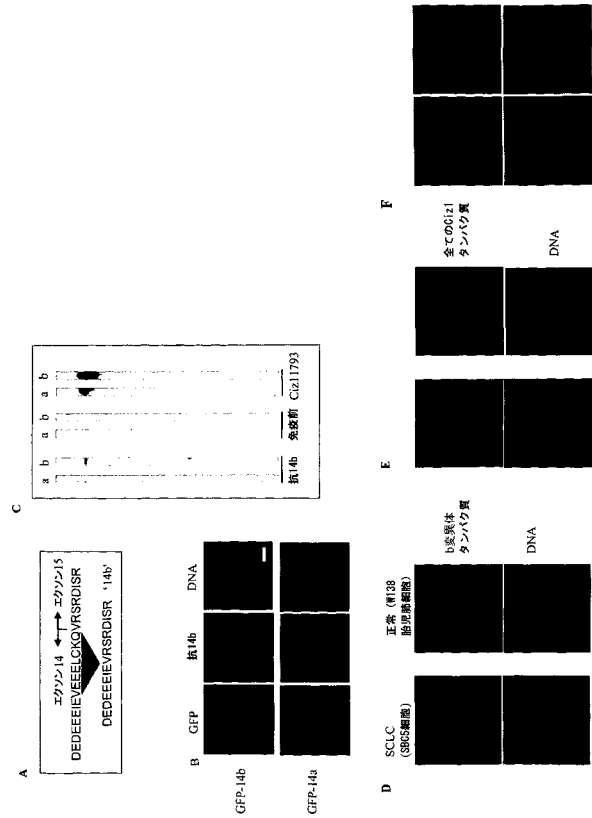
マッチド対照を伴う非小細胞肺癌 (NSCLC)



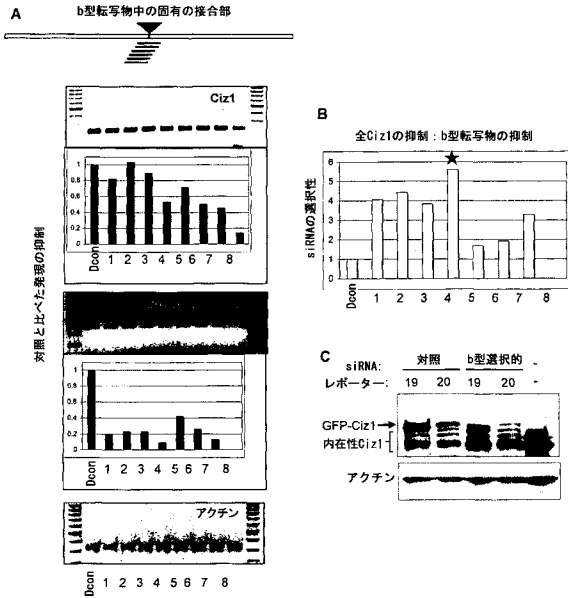
【図 9】



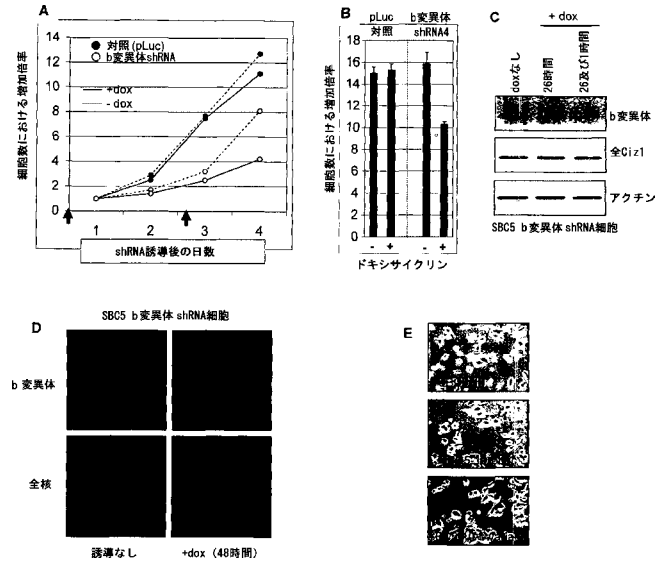
【図 10】

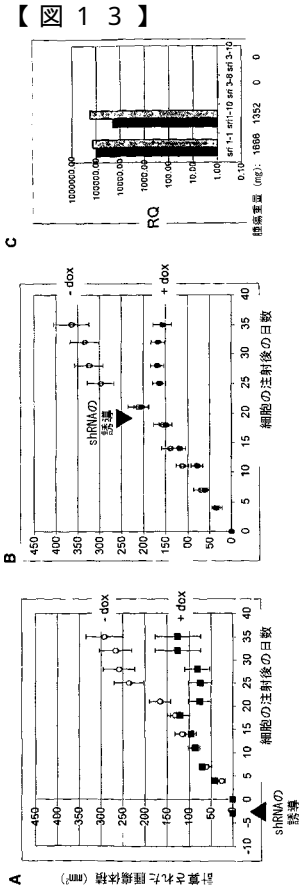


【図 11】

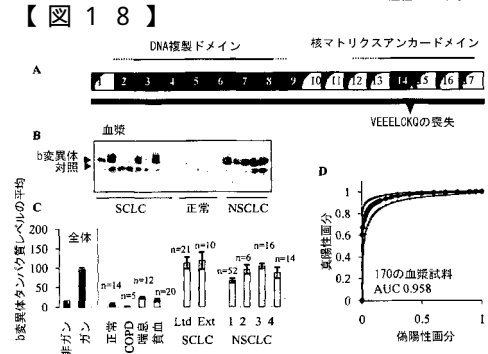
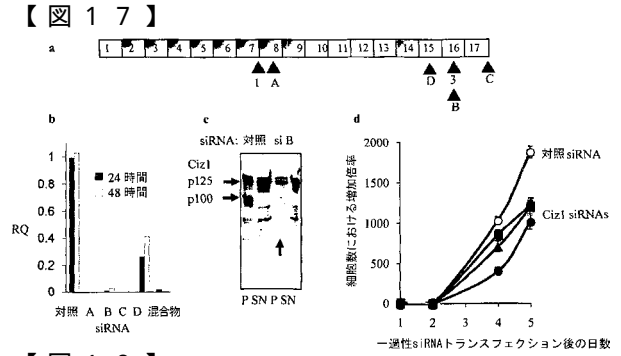


【図 12】





誘導性G1Z1変異体転写物選択的siRNAを持つSCLC細胞を用いた皮下注射後のNOD/SCIDマウスにおける腫瘍増殖



【配列表】

2013539534000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成25年4月30日(2013.4.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2013539534000001.app

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/001173

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COPELAND NIKKI A ET AL: "Ciz1 cooperates with cyclin-A-CDK2 to activate mammalian DNA replication in vitro", JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 123, no. 7, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 1108-1115, XP008122893, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/JCS.059345 [retrieved on 2010-03-09]	80,81, 88,89
A	left-hand column, last paragraph; figure 2a	72-76
X	COVERLEY DAWN ET AL: "Ciz1 promotes mammalian DNA replication", JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 118, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 101-112, XP002585230, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/JCS.01599 left-hand column; figure 2 figure 2c	80,81, 88,89,95
X	MITSUI KAORU ET AL: "Cloning and characterization of a novel p21 Cip1/Waf1-interacting zinc finger protein, Ciz1", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 264, no. 2, 22 October 1999 (1999-10-22), pages 457-464, XP002285057, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1006/BBRC.1999.1516 the whole document	80,81, 83,88, 90,95
A	DAHMCCKE C M ET AL: "Altered splicing in exon 8 of the DNA replication factor CIZ1 affects subnuclear distribution and is associated with Alzheimer's disease", MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCES, SAN DIEGO, US, vol. 38, no. 4, 4 August 2008 (2008-08-04), pages 589-594, XP023182953, ISSN: 1044-7431, DOI: 10.1016/J.MCN.2008.05.007 [retrieved on 2008-05-20] figure 3	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/001173

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AINSCOUGH JUSTIN F-X ET AL: "C-terminal domains deliver the DNA replication factor Ciz1 to the nuclear matrix", JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 120, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 115-124, XP002585229, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/JCS.03327 figure 1 -----	1
A	RAHMAN FAISAL ABDEL ET AL: "Cancer-associated missplicing of exon 4 influences the subnuclear distribution of the DNA replication factor CIZ1", HUMAN MUTATION, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 28, no. 10, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 993-1004, XP002585231, ISSN: 1059-7794 the whole document -----	1
A	WARDER D E ET AL: "CIZ1, CIP1 INTERACTING ZINC FINGER PROTEIN 1 BINDS THE CONSENSUS DNA SEQUENCE ARYSR(0-2)YYAC", JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE, KARGER, BASEL, CH, vol. 10, no. 4, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 406-417, XP009032440, ISSN: 1021-7770, DOI: 10.1159/000071160 the whole document -----	1
A	DEN HOLLANDER PETRA ET AL: "Ciz1, a novel DNA-binding coactivator of the estrogen receptor alpha, confers hypersensitivity to estrogen action", CANCER RESEARCH, vol. 66, no. 22, November 2006 (2006-11), pages 11021-11029, XP002664092, ISSN: 0008-5472 the whole document -----	1
X,P	WO 2010/089559 A1 (CIZZLE BIOTECHNOLOGY LTD [GB]; COVERLEY DAWN [GB]) 12 August 2010 (2010-08-12) page 15 - page 18; example 3 ----- -/--	1-3,26, 49-52, 58, 80-83, 88-90, 95,106, 117,118, 120,121

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/001173

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>RAHMAN FAISAL A ET AL: "Differential detection of alternatively spliced variants of Ciz1 in normal and cancer cells using a custom exon-junction microarray", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 1, 10 September 2010 (2010-09-10), page 482, XP021075304, ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-10-482 -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/001173

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004051269 A2	17-06-2004	AU 2003290240 A1	23-06-2004
		CA 2507403 A1	17-06-2004
		CN 1720442 A	11-01-2006
		EP 1570268 A2	07-09-2005
		EP 2316966 A1	04-05-2011
		JP 2006508659 A	16-03-2006
		MX PA05006034 A	27-01-2006
		US 2006155113 A1	13-07-2006
		US 2011070591 A1	24-03-2011
		WO 2004051269 A2	17-06-2004
		-----	-----
WO 2010089559 A1	12-08-2010	EP 2393498 A1	14-12-2011
		WO 2010089559 A1	12-08-2010
-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	G 0 1 N 21/78 C	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 G	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 49/04 A	
	A 6 1 K 49/02 A	
	A 6 1 K 49/00 A	
	C 1 2 P 21/08	

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

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 カバーリー ダウン アリソン
英国 ノース ヨークシャー ヨーク ヘスリントン ヘスリントン ホール シズル バイオテ
クノロジー リミテッド

Fターム(参考) 2G054 AA07 AA08 AB05 GA04 GA05 GB02

专利名称(译)	用于诊断和治疗的方法和化合物		
公开(公告)号	JP2013539534A	公开(公告)日	2013-10-24
申请号	JP2013522291	申请日	2011-08-04
申请(专利权)人(译)	啾啾声生物科技有限公司		
[标]发明人	カバーリーダウンアリソン		
发明人	カバーリー ダウン アリソン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N21/78 C12Q1/68 C07K16/18 C12N15/02 C12N5/10 C07K14/47 C12N15/113 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/713 A61K31/711 A61K49/04 A61K51/00 A61K49/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61B6/037 C07K14/4702 C07K16/18 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/158 C12Q1/6883 G01N33/57423 G01N33/57484 G01N2333/4703 A61B5/004 A61B5/055 A61B6/032 G01N33/6893		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/53.Y G01N33/543.501.A G01N33/577.B G01N21/78.C C12Q1/68.Z C07K16/18 C12N15/00.C C12N5/00.102 C12Q1/68.A C07K14/47 C12N15/00.G A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.105 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/713 A61K31/711 A61K49/04.A A61K49/02.A A61K49/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/GB02 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C085/HH03 4C085/HH05 4C085/HH07 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB92 4C085/LL18 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/442823 2011-02-15 US 61/372981 2010-08-12 US 61/370479 2010-08-04 US		
其他公开文献	JP5952815B2 JP2013539534A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于癌症诊断和预后的方法。本发明进一步提供了例如用于这些方法的结合剂和试剂盒。本发明进一步涉及组合物，制备所述组合物的方法及其使用方法，其包括用于治疗 and 诊断癌症，包括肺癌，淋巴瘤，肝癌，甲状腺癌和膀胱癌。该方法包括：可用于治疗癌症的本发明组合物包括反义和小抑制RNA (siRNA)。

Figure 1

