

(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2005-519606  
(P2005-519606A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/40	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 3 3
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-574817 (P2003-574817)  
 (86) (22) 出願日 平成15年3月14日 (2003. 3. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年11月9日 (2004. 11. 9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2003/000833  
 (87) 国際公開番号 W02003/076610  
 (87) 国際公開日 平成15年9月18日 (2003. 9. 18)  
 (31) 優先権主張番号 02/03186  
 (32) 優先日 平成14年3月14日 (2002. 3. 14)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)  
 (31) 優先権主張番号 02/10975  
 (32) 優先日 平成14年9月5日 (2002. 9. 5)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

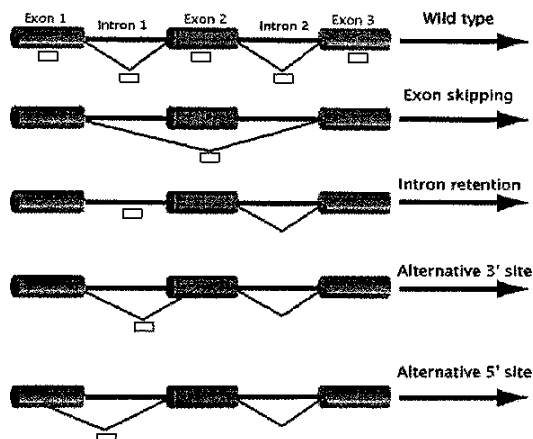
(71) 出願人 599022270  
 エグゾニ・テラピューティック・ソシエテ  
 ・アノニム  
 EXONHIT THERAPEUTIC  
 S SA  
 フランス国、エフー75017 パリ、リ  
 ュ・ブリユネル 26  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100075225  
 弁理士 篠田 文雄  
 (72) 発明者 ブラッコ, ローラン  
 フランス国、エフー75014 パリ、リ  
 ュ・デパルシュ 30

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトカリクレイン-2及びカリクレイン-3のバリエント並びにそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、生物学、遺伝学及び医学の領域に関する。特に、本発明は、前立腺癌のような癌病理の検出、特徴決定及び/又は処置の新規方法に関する。本発明は、該病理において活性化化合物の同定及びスクリーニングの方法にも関する。さらに、本発明は、前記方法を実施するために使用される化合物、遺伝子、細胞、プラスミド又は組成物に関する。より具体的には、本発明は、前述の病理における、ヒトカリクレイン2及びヒトカリクレイン3のバリエントの役割、並びに治療、診断又は実験の標的としてのそれらの使用を概説する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

- a) 配列番号：1～49の配列、
  - b) 遺伝暗号の縮重に起因する配列番号：1～49の配列のバリエーション、
  - c) 配列番号：1～49の配列の相補鎖、及び
  - d) 配列 a)～c)の特定の断片：
- の中から選択された配列を含む核酸。

**【請求項 2】**

好ましくは cDNA 及び gDNA より選択される DNA、又は RNA である、請求項 1 記載の核酸。

10

**【請求項 3】**

好ましくは配列番号：50～167より選択された配列の全部又は特定の一部を含むポリペプチドより選択される、請求項 1～2のいずれか 1 項記載の核酸によりコードされたポリペプチド。

**【請求項 4】**

それぞれ配列番号：50～167の配列のバリエーション K L K 2 - E H T 0 0 2～K L K 2 - E H T 0 1 1 及び P S A - E H T 0 0 1～P S A - E H T 0 2 7 又は K L K 2 - E H T b～K L K 2 - E H T l 及び P S A - E H T a～P S A - E H T u より選択されたタンパク質。

**【請求項 5】**

請求項 1～2のいずれか 1 項記載の核酸の選択的ハイブリダイゼーションによる検出を可能にする核酸プローブ。

20

**【請求項 6】**

プローブが、請求項 1～2のいずれか 1 項記載の核酸の配列を含む、請求項 5 記載のプローブ。

**【請求項 7】**

20～1000ヌクレオチド、好ましくは 50～800ヌクレオチドを含む、請求項 6 記載のプローブ。

**【請求項 8】**

プライマーが、請求項 1～2のいずれか 1 項記載の核酸の選択的増幅を可能にするプライマー。

30

**【請求項 9】**

3～50塩基、好ましくは 3～40塩基、より好ましくは 3～35塩基から構成されている、請求項 8 記載のプライマー。

**【請求項 10】**

癌に関連している突然変異を含有している、PSAの特異抗原をコードする遺伝子又は K L K 2 をコードする遺伝子の少なくとも 1 つの領域に相補的である、請求項 8 又は 9 のいずれか 1 項記載のプライマー。

**【請求項 11】**

配列番号：1～49の配列又はそれらの相補鎖のうちの 1 つの少なくとも一部に相補的な、3～50ヌクレオチドを含む一本鎖核酸から構成されている、請求項 10 記載のプライマー。

40

**【請求項 12】**

センス配列及び逆方向配列を含むプライマー対であって、該対のプライマーが、請求項 1～2のいずれか 1 項記載の核酸のある領域にハイブリダイズし、該核酸の少なくとも一部の増幅を可能にするものである、プライマー対。

**【請求項 13】**

請求項 3 又は 4 のいずれか 1 項タンパク質又はポリペプチドに特異的である抗体。

**【請求項 14】**

ポリクローナル、モノクローナル又はそれらの誘導体である、請求項 14 記載の抗体。

50

## 【請求項 15】

対象における疾患又は疾患の素因を検出するための方法であって、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項記載の核酸又は請求項 3 もしくは 4 に記載のタンパク質もしくはポリペプチドの、該対象からの試料における存在を決定することを含む、方法。

## 【請求項 16】

決定が、配列決定、選択的ハイブリダイゼーション及び/又は増幅により達成される、請求項 15 記載の方法。

## 【請求項 17】

増幅が、請求項 12 のプライマー対を使用することにより達成される、請求項 16 記載の方法。

## 【請求項 18】

- 請求項 12 記載のプライマー対又は請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項記載のプローブ又は請求項 13 及び 14 のいずれか 1 項記載の抗体、並びに  
- 増幅、ハイブリダイゼーション又は免疫学的反応に必要な試薬、  
を含む、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項記載の方法を実施するために使用され得るキット。

## 【請求項 19】

活性化化合物を選択又は同定するための方法であって、請求項 3 記載のポリペプチドを発現している細胞とテスト化合物をインビトロ又はエキソビボ接触させること、及び該ポリペプチドの発現又は活性を調整する化合物を選択又は同定すること、を含む方法。

## 【請求項 20】

ポリペプチドと結合する化合物を選択することを含む、請求項 19 記載の方法。

## 【請求項 21】

ポリペプチドの発現を調整する化合物を選択することを含む、請求項 19 記載の方法。

## 【請求項 22】

請求項 1 又は 2 記載の核酸を含有しているベクター。

## 【請求項 23】

請求項 22 記載のベクターを含有している組換え細胞。

## 【請求項 24】

マトリックス上に固定化された、請求項 1、2、5、6 及び 7 のいずれか 1 項記載の核酸、請求項 22 記載のベクター、請求項 3 もしくは 4 記載のポリペプチド又は請求項 13 もしくは 14 記載の抗体を含む生成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、生物学、遺伝学及び医学の領域に属する。特に、本発明は、P S A 抗原（前立腺特異抗原又は K L K 3）及びカリクレイン - 2（K L K 2）に対応する遺伝子のオルタナティブスプライシング事象に関連した新たなヌクレオチド配列に関するものである。本発明は、生物学的試料におけるこれらの核酸又は対応するタンパク質の存在を検出するための、又はそれらの発現のレベルを決定するための方法、及びそれらの活性又は発現を調整することができる分子を選択するための方法にも関する。

## 【0002】

本発明は、癌、特に前立腺癌のスクリーニング、診断、分類又はモニタリング、特に前立腺癌と良性肥大症（B P H）の差別、及びこれらの疾患の新たな治療アプローチの開発に特に適している。

## 【0003】

カリクレインとは、ウイルス前駆タンパク質の生物学的活性型への翻訳後修飾を可能にする活性を有するタンパク質群に相当する。このファミリーのある種のメンバー、即ち P S A（「前立腺特異抗原」）という名称でも既知のカリクレイン 3、そしてより最近ではカリクレイン 2 が、前立腺癌の検出、診断及びモニタリングのため利用可能な最良のマー

10

20

30

40

50

カーと見なされている。血中の P S A 量を測定するテストの使用は、増加しつつある前立腺癌 ( P c a ) を有する患者の診断を行う可能性を提供する。しかしながら、P S A は非癌性の前立腺上皮細胞によっても産生されており、前立腺癌を有する患者を、良性前立腺肥大症 ( B P H ) の症状を有する患者から識別することは、しばしば困難である。血清において、P S A は、遊離の非複合体化形態、及びとりわけアルファ - アンチキモトリプシンとの複合体化形態で存在する。これらの異なる形態の測定及びそれらの比率は、P C a 及び B P H の鑑別診断において有益である。

**【 0 0 0 4 】**

オルタナティブスプライシングは、限定された遺伝情報から機能的多様性が生成することを可能にする、遺伝子の発現を制御するための機序である。この高度に制御された機序は、ヒト疾患の発達の際、改変され得る。従って、癌におけるスプライシング機構の脱制御は、ある種のヒト腫瘍において特異的に発現されるアイソフォーム又はバリエーションの発現をもたらす場合がある。これらのアイソフォームは、疾患状態の発達又は維持において決定的な機能的役割を有するかもしれない。そのようなアイソフォームの特異的発現は、医用生成物及び / 又は診断法の開発のための合理的な指向的なアプローチのための優れた事象を構成する。最近、オルタナティブスプライシングによる改変に対して感受性の遺伝子及びこれらの遺伝子内のドメインを系統的に同定するための、遺伝子発現のプロファイリングのための技術 ( D A T A S ) が開発された ( W O 9 9 / 4 6 4 0 3 ) 。

10

**【 0 0 0 5 】**

本発明は、ここで、前立腺組織における P S A 遺伝子及び K L K 2 遺伝子のオルタナティブスプライシングに関連した新たな遺伝学的事象を記載する。本発明は、とりわけ、腫瘍性前立腺組織に関連したスプライシング改変のレパートリーの構築、並びに P S A 遺伝子及び K L K 2 遺伝子又は対応する m R N A の構造的改変の同定に基づく。従って、本発明は、癌、特に前立腺癌の新たな治療的及び診断的アプローチを提供する。

20

**【 0 0 0 6 】**

より具体的には、前立腺の癌を有する患者の腫瘍又は非腫瘍エリアからの前立腺組織の試料から抽出された R N A を使用して、定性的差次的分析が実施された。この分析は、無類の利点を示す ( 出願 W O 9 9 / 4 6 4 0 3 に記載された ) D A T A S 技術の実行のおかげで、定性的差次的スクリーニングを使用して実施された。腫瘍性及び非腫瘍性の前立腺組織からの R N A 分子に対する D A T A S 技術の適用は、ヒトカリクレイン 2 及びカリクレイン 3 ( P S A ) の m R N A に由来する c D N A の様々な断片の単離をもたらした。次いで、これらの結果は、オルタナティブスプライシングに関連した事象を明らかにする多数の c D N A を同定する可能性を提供した。

30

**【 0 0 0 7 】**

従って、本発明は、前立腺組織における、より具体的には癌性組織又は良性前立腺肥大症 ( B P H ) に関連した組織における、K L K 3 ( P S A ) 及び K L K 2 のアイソフォーム又はバリエーションの特異的発現を起こさせることができる、いくつかの最初の分子的事象を記載する。本発明は、これらのバリエーションのうち 1 個又は数個の、新規の治療的及び診断的標的としての使用を正当化する、そして癌、特に前立腺癌の診断及び処置において有利に使用され得る、分子的データを提供する。

40

**【 0 0 0 8 】**

本発明の第一の面は、ヒト P S A 及び K L K 2 のバリエーション、特にスプライシングバリエーションに関する。本発明は、これらのバリエーションに対応する核酸、又はそれらが示す特異的改変に関し、コードされたタンパク質 ( 又はポリペプチド又はタンパク質ドメイン ) にも関する。

**【 0 0 0 9 】**

本願のもう 1 つの面は、これらのバリエーションもしくは改変の生物学的試料 ( 血液、血漿、尿、血清、唾液、生検材料又は細胞培養物等 ) における存在を検出するための、又はそれらのそれぞれの量もしくは割合を決定するための方法又は道具に関する。そのような道具は、特に、核酸プローブ又はプライマー、抗体又はその他の特異的リガンド、キット、

50

デバイス、チップ等を含む。検出法は、ハイブリダイゼーション、PCR、クロマトグラフィ及び免疫学的方法等を含み得る。これらの方法は、疾患の進行、もしくは癌、特に前立腺癌のための処置の効力の検出、特徴決定及びモニタリング、又はそのような疾患の素因の決定に、特に適している。

【0010】

本願のもう1つの面は、記載されたバリエーションに対して活性な、即ちそれらの発現又は活性を調整することができる化合物を作製するための道具及び方法に関する。これらの道具及び方法は、特に、核酸、ベクター、組換え細胞（又は、そのような細胞に由来する調製物）、結合アッセイ等を含む。本発明は、そのようにして同定又は作製された化合物、それらを含む医薬組成物、及びそれらの治療的使用も含むものとする。

10

【0011】

従って、本発明は、癌、特に前立腺癌の診断、及びそれらの治療戦略の開発に適用可能である。

【0012】

KLK2及びKLK3のバリエーション

従って、本願の第一の面は、KLK2及びKLK3（PSA）のバリエーション、又はこれらの遺伝子（又は対応するRNAもしくはタンパク質）に影響を与える特定の遺伝学的変化に関する。本発明のさらなる特定の目的は、これらのPSA及びKLK2のバリエーションに対応する核酸、又はそれらが示す特異的変化に関し、コードされたタンパク質（又はポリペプチドもしくはタンパク質ドメイン）にも関する。

20

【0013】

KLK2遺伝子及びKLK3遺伝子の多数のアイソフォームが、先行技術において記載されている。

【0014】

K-LMは、KLK2のイントロン1の完全な保持に対応する（Genbank登録番号：AF336106）（Davidら（2002））。デイヴィッド（David）らは、K-LMメッセンジャーRNAの発現が、前立腺上皮に限定されていること、及びK-LMタンパク質が、免疫組織化学によって分泌上皮細胞中に検出され得ることを指摘している（使用された抗体の特異性を示すデータはないにも関わらず）。K-LMがヒト血清中に存在するか否かを示すデータは存在しない。K-LMは、良性前立腺肥大症に対応する2つの精液試料及び組織試料において検出されるようである。内因性型のK-LMは、前立腺細胞系に検出され得ない（アンドロゲン刺激がある場合でも、又はない場合でも）。前立腺癌を有する患者からの組織又は血清におけるK-LMの優先的又は差次的な発現に関する結果は示されていない。

30

【0015】

783塩基対ではなく669塩基対のオープンリーディングフレームに対応する、エキソン4とエキソン5との間のオルタナティブ部位を使用するKLK2バリエーションが記載されている（Genbank登録番号：S39329）（Riegmanら（1991））。

【0016】

より長い3'UTR領域を有する3つのバリエーションが記載されている（Liuら（1999））（Genbank登録番号：AF188745-79）。これらのバリエーションのうちの一つは、野生型KLK2と等しいオープンリーディングフレームを有し；第二のバリエーションは以前に記載されたバリエーション（Riegmanら（1991））のそれに対応するオープンリーディングフレームを有するであろう。これらのバリエーションのうちの一つは、エキソン3とエキソン4との間に13ヌクレオチド欠失を有し、従って、カルボキシ末端部分が97アミノ酸短縮されたタンパク質をコードする。著者らは、RT-PCRを使用したいくつかの発現データを提示しているが、対応する1個以上のタンパク質に関する結果は示していない。

40

【0017】

50

PSA-LMは、PSAイントロン1の完全な保持に対応する(Davidら(2002))(Genbank登録番号:AF335477、AF335478、AJ459784)。Davidらは、PSA-LMメッセンジャーRNAの発現が、前立腺上皮に限定されていること、及びPSA-LMタンパク質が、免疫組織化学によって分泌上皮細胞中に検出され得ることを指摘している。良性前立腺肥大症に対応するヒト血清、精液又は組織におけるPSA-LMの存在を示すデータは存在しない。内因性型のPSA-LMは、前立腺細胞系に検出され得ない(アンドロゲン刺激がある場合でも、又はない場合でも)。前立腺癌を有する患者からの組織又は血清におけるPSA-LMの優先的又は差次的な発現に関係している結果は存在しない。

【0018】

10

エキソン3に129ヌクレオチド欠失を有するPSAバリエントが記載されている(Tanakaら(2000))。それは、PSA-RP3(Heuzae-Vourc'hら(2003))としても既知である。Tanakaらは、悪性及び良性の前立腺組織における、RT-PCRを使用して、このバリエントに関する定性的発現データを示している。対応するタンパク質の発現は特徴決定されていない。

【0019】

イントロン3の完全な保持(PA424)及びイントロン4の最後の442ヌクレオチドの部分的保持(PA525)に対応する2つのPSAバリエントが記載されている(Genbank登録番号:M21896、M21897)(Riegmanら(1988))。PA424は、156アミノ酸長の成熟タンパク質を生じ得る。最後の16アミノ酸は、野生型PSAと異なるであろう。PA525は、214アミノ酸の成熟タンパク質を与えるであろう。最後の28アミノ酸は、野生型PSAと異なるであろう。Riegmanらは、メッセンジャーRNA又はタンパク質の差次的発現に関する付加的なデータを提示していない。

20

【0020】

下記のPA424及びPA525は、引き続いて単離されたPSA-RP1及びPSA-RP2(Genbank登録番号:AJ310937、AJ310938)(Heuzaeら(1999);Heuzae-Vourc'hら(2001))と極めて類似している。PSA-RP1及びPSA-RP2のcDNAでトランスフェクトされたCOS細胞系は、対応するタンパク質を発現し分泌し得るが、Heuzaeらは、前立腺組織における内因性のPSA-RP1及びPSA-RP2タンパク質の発現を証明する結果を示していない。

30

【0021】

別のグループ(Mengら(2002))は、ノーザンブロット及びin situハイブリダイゼーションを使用して、PSA-RP1メッセンジャーRNA発現を特徴決定した。正常な顕微解剖組織と腫瘍性の顕微解剖組織との間に、発現の違いは観察されなかった。正常な前立腺組織及び腫瘍性の前立腺組織の切片における特異的PSA-RP1抗体を使用し、免疫組織化学により上皮細胞の細胞質にPSA-RP1タンパク質の発現を検出することが可能であった。

【0022】

40

イントロン4の5'部分の保持に対応するPSAバリエント、PSA-RP5が、Genbankに寄託されている(登録番号:AJ512346)。

【0023】

エキソン3に欠失を有するPSAバリエント、PSA-RP4が、Genbankに寄託されている(登録番号:AJ459782)。

【0024】

本願は、ここで、PSA遺伝子及びKLK2遺伝子の異なる型の存在、並びにそれらの病理学的状況との相関を記載する。これらのアイソフォームは、腫瘍試料から同定された。cDNA及びこれらのcDNAによりコードされるタンパク質/ポリペプチドの説明が、以下に示される。完全配列は、添付の配列表に提供される。本発明の特異的バリエント

50

の主要な特徴は、実施例に記載される。

【0025】

本発明の第一の目的は、本願に記載された P S A 及び K L K 2 のバリエーションの配列、又はその特定の一部を含む核酸に関する。

【0026】

本発明の別の目的は、本願において記載された P S A 及び K L K 2 のバリエーションにおける遺伝学的変化を特徴とする核酸に関する。そのような核酸は、特に、突然変異型領域、保持されたイントロンドメイン、又は欠失により新たに作出されたジャンクションに相補的であり得る。

【0027】

本発明の別の目的は、K L K 2 - E H T 0 0 2 ~ K L K 2 - E H T 0 1 1 及び P S A - E H T 0 0 1 ~ P S A - E H T 0 2 7 又はこれらのバリエーションの任意の組み合わせからのメッセンジャー R N A (又は c D N A) に由来する配列の全部又は一部を含む核酸、並びに癌、特に前立腺癌、特にその良性型 B H P の診断、検出又はモニタリングのための方法を実行するためのそれらの使用に関する。

【0028】

本発明の別の目的は、

- a) 配列番号：1 ~ 49 の配列；
- b) 遺伝暗号の縮重に起因する配列番号：1 ~ 49 の配列のバリエーション；
- c) 配列番号：1 ~ 49 の配列の相補鎖；及び
- d) 配列 a) ~ c) の特定の断片：の中から選択された配列を含む任意の核酸にある。

【0029】

「特定の」断片又は一部という用語は、関係しているバリエーションの特徴的な断片、典型的には関係しているバリエーションに特徴的な遺伝学的変化を少なくとも含有している断片をさす。従って、そのような特定の断片は、本出願人らによって証明された患者における改変事象に起因する特定の構造的性質（例えば、突然変異、新たなジャンクション、イントロンの保持、配列の欠失、終止コドン、リーディングフレームシフトに起因する新たな配列等）の存在によって野生型配列と異なっている。この特定の構造的性質は、「標的配列」という表現によっても表される。本発明に係る特定の断片は、前記定義のような標的断片を少なくとも含む。好ましい断片は、関係している配列の少なくとも5個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも8個、より好ましくは少なくとも12個を含む。断片は、最大50、75もしくは100ヌクレオチド又はそれ以上を含み得る。

【0030】

本発明において使用されるように、核酸は、好ましくは c D N A 及び g D N A より選択される D N A、又は R N A であり得る。それらは、合成又は半合成の核酸、P C R 断片、オリゴヌクレオチド、二本鎖又は一本鎖の領域等であり得る。核酸は、合成、組換え経路、クローニング、(1つ以上の)遺伝子組立て、突然変異誘発等によって、又はこれらの技術の組み合わせを使用することによって作製され得る。

【0031】

核酸は、*in vitro*、*ex vivo*、*in vivo* 又は無細胞転写系のいずれかにおいて、本発明の P S A 又は K L K 2 のバリエーションを作製するために使用され得る。それらは、細胞における対応する m R N A の発現又は翻訳を減少させることができるアンチセンス又は干渉性 (R N A i) 分子の作製においても使用され得る。それらは、ハイブリダイゼーション反応によって、本発明において記載された P S A 又は K L K 2 の突然変異型の試料における存在の特異的な同定を可能にするプローブ、特に標識されたプローブを作製するためにも使用され得る。さらに、それらは、特に疾患のスクリーニング又は診断を目標として、試料中の P S A 又は K L K 2 のバリエーション (又はそのようなバリエーションの標的配列) を増幅するのに有用な核酸プライマーを作製するために使用され得る。

【0032】

これに関して、本発明の別の目的は、典型的には選択的ハイブリダイゼーションによっ

10

20

30

40

50

て、テスト核酸集団からの前記定義のような核酸の検出を可能にする核酸プローブに関する。一般に、プローブは、前記定義のような核酸の配列、又はそのような核酸の配列の(特定の)一部を含む。特定の部分は、好ましくは、本明細書に既に記載されたようなバリエーションに特徴的なものであり、特に、前立腺癌に関連した改変を含有している一部である。それは、典型的には、10~1000ヌクレオチド、好ましくは50~800を含み、通常一本鎖である。プローブの具体例は、本明細書において既に定義されたような核酸の少なくとも1つの領域に特異的であり相補的であるオリゴヌクレオチドにより表される。オリゴヌクレオチドは、典型的には一本鎖であり、一般に10~100塩基を含む。本発明に包含されるオリゴヌクレオチドの具体例は、表1に提供される。本発明のオリゴヌクレオチド及び/又は核酸プローブは、例えば放射性マーカー、酵素マーカー、蛍光マーカー又は発光マーカー等によって標識され得る。

10

**【0033】**

本発明の別の目的は、本明細書において既に定義されたような核酸又はそのような核酸の(特定の)一部の(選択的)増幅を可能にする核酸プローブに関する。増幅される部分は、好ましくは、本明細書に既に記載されたバリエーションのいずれかに特徴的な改変、特に前立腺癌に関連した改変を含有している。本発明に係るプライマーは、典型的には一本鎖であり、有利には3~50塩基、好ましくは3~40塩基、より好ましくは3~35塩基から構成される。特定のプライマーは、PSA遺伝子もしくはKLK2遺伝子又はそれらの対応するRNAの少なくとも1つの領域に相補的である。

**【0034】**

20

好ましい実施態様は、配列番号:1~49の配列又はそれらの相補鎖のうちの1つの少なくとも一部に相補的な、3~50ヌクレオチドを含む一本鎖核酸から構成されたプライマーにある。そのような核酸プライマーの例は、実験セクションに見出され得る。

**【0035】**

本発明は、センス配列及び逆方向配列を含むプライマー対(該対のプライマーは、前記定義のような核酸のある領域にハイブリダイズし、該核酸の少なくとも一部の増幅を可能にする)にも関する。

**【0036】**

本発明に係る特定のプライマー対は、表2に提供される。

**【0037】**

30

本願の別の目的は、前記定義のような核酸を含むベクターに関する。それは、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ウイルス、ファージ等であり得る。pUC、pCDNA、pBR等のような、様々な市販のプラスミドが挙げられ得る。ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス等が挙げられ得る。

**【0038】**

本明細書において既に定義されたような核酸又はベクターを含有している組換え細胞を提供することが、本発明の別の目的である。細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。原核細胞としては、E.coliのような細菌を特に挙げ得る。真核細胞としては、酵母細胞、又は哺乳動物、昆虫もしくは植物の細胞を挙げ得る。それらは、初代培養物又は細胞系であり得る。COS、CHO、3T3、HeLa等の細胞が挙げ得る。

40

**【0039】**

本発明の別の目的は、マトリックス(支持体)上に固定化された、前記定義のような核酸を含む組成物に関する。本発明は、特に、本明細書において既に定義されたような核酸を少なくとも1つ含む、可溶性の、又はマトリックス上に固定化された、複数個の混合された核酸を含む組成物に関する。

**【0040】**

本発明の別の目的は、本明細書において既に定義されたような核酸1個又は数個が固定化されているマトリックス(を含む生成物)に関する。マトリックスは、例えばナイロン、ガラス、プラスチック、金属、繊維、セラミック材料、シリカ、ポリマー等、又はその

50

他の任意の適合性の材料のような、固体で、平坦又はそうでない、均一又はそうでないものであり得る。核酸は、好ましくは、分子がハイブリダイゼーション反応に到達可能になるような条件の下で、一方の末端で固定化される。核酸は、マトリックス上に正確に配置することができ、数回にわたり沈着させることができる。

#### 【0041】

特定のバリエーションにおいて、1個又は数個の特定のオリゴヌクレオチドを、各オルタナティブスプライシング事象を特徴決定するために使用することができる(図9参照)。とりわけ、長型の定量を可能にする、排除されたエキソンに特異的なオリゴヌクレオチド；及び/又は長型及び短型のRNAを定量するために使用し得るスプライシングに關与していない隣接エキソンのうちの1つに特異的なオリゴヌクレオチド；及び/又は使用し得るジャンクションに特異的な1個又は数個(例えば、3個)のオリゴヌクレオチド(そのうちの1個は、スプライシングの後に生成する新たな配列に特異的であり、スプライシングを受けた型の定量を可能にする)を使用することが可能である。当然、その他のオリゴヌクレオチドの組み合わせ、特に1個又は2個のオリゴヌクレオチドのみの使用が企図され得る。より具体的にジャンクションオリゴヌクレオチドに関しては、それらは、理想的にはジャンクションの中央に存在するべきであるが、ジャンクションに対してシフトしたオリゴヌクレオチドも使用し得る。有利には、ハイブリダイズする能力に干渉し得る二次構造を有していないオリゴヌクレオチドが使用されよう。一般に、作成されたオリゴの全てが均一な熱力学的プロファイル、即ち $T_m$ (65)及び長さ(24又は25マー)を有する場合、それはチップにとって好ましい。さらに、合成中、オリゴヌクレオチドは、柔軟性を促進し、マトリックスをコーティングするために使用されるポリマーとの共有結合の形成を可能にする $NH_2$ -C6基の5'末への付加により修飾され得る。

10

20

#### 【0042】

本発明の別の目的は、本明細書において既に定義されたような組換え細胞1個又は数個が固定化又は培養されているマトリックス(を含む生成物)に関する。マトリックスは、例えばナイロン、ガラス、プラスチック、金属、繊維、セラミック材料、シリカ、ポリマー等、又はその他の任意の適合性の材料のような、固体の、平坦又はそうでない、均一又はそうでないものであり得る。細胞は、例えばマイクロタイタープレートのウェルに分配されるか、又はゲル内もしくは適当なマトリックス上に固定化される。

30

#### 【0043】

本発明は、アイソフォームK L K 2 - E H T 0 0 2 ~ K L K 2 - E H T 0 1 1及びP S A - E H T 0 0 1 ~ P S A - E H T 0 2 7又はK L K 2 - E H T b ~ K L K 2 - E H T l及びP S A - E H T a ~ P S A - E H T u、特に配列番号：50~167の配列に記載されたものの全部又は一部によりコードされたペプチド及びタンパク質配列、並びに癌、特に前立腺癌、特にその良性型BHPの診断、検出又はモニタリングのための方法を実行するためのそれらの使用にも属する。

#### 【0044】

本願の具体的な目的は、配列番号：50~167の中から選択された配列の全部又は特定の一部を含むポリペプチドに関する。特定のポリペプチドは、遺伝子又は対応するメッセージャーの改変によって作製された配列又はその配列の一部から構成されるか又はそれらを含む。本発明において使用されるように、「一部」という用語は、少なくとも5個、好ましくは少なくとも8個、より好ましくは少なくとも10個、さらに好ましくは少なくとも15個の連続残基をさす。本明細書において既に説明されたように、P S A遺伝子又はK L K 2遺伝子のスプライシング改変は、新たに作出された配列(標的配列)を含有している突然変異型タンパク質の生成をもたらす。それらは、新たな配列(例えば、フレームシフト翻訳、挿入)又は新たなジャンクション等であり得る。本発明の特定のペプチドは、配列番号：53、56、59、62、65、67(残基146~150)、70、71、73、76、79、81、93、95、98、106、108、110、112、117、119(残基66~70又は74~79)、121(残基117~121)、123(残基25~29、51~55又は105~111)、126、131、133、13

40

50

4、135（残基64～68）及び155の配列の全部又は特定の一部に相当するか又はそれらを含む。

【0045】

本明細書において既に定義されたようなポリペプチド1個又は数個が固定化されているマトリックス（を含む生成物）を提供することが、本発明の別の目的である。マトリックスは、例えばナイロン、ガラス、プラスチック、金属、繊維、セラミック材料、シリカ、ポリマー等、又はその他の任意の適合性材料のような、固体で、平坦又はそうでない、均一又はそうでないものであり得る。ポリペプチドは、好ましくは、分子が、抗体のような特異的リガンドとの相互作用を含む反応に到達可能（accessible）になるような条件の下で、一方の末端で固定化されている。ポリペプチドは、マトリックス上に正確に配置され得、数回にわたり沈着させられ得る。

10

【0046】

物質（核酸、ポリペプチド、抗体等のような）をマトリックス上に固定化するための技術は、文献、特に出願又は特許、欧州特許第619 321号、WO91/08307、米国特許第4,925,785号及び英国特許第2,197,720号に記載されている。

【0047】

特異的リガンド

本発明は、K L K 2 - E H T 0 1 1 及び P S A - E H T 0 0 1 ~ 0 2 7 又は K L K 2 - E H T b ~ K L K 2 - E H T l 及び P S A - E H T a ~ P S A - E H T u（保持されたイントロンドメイン又は特異的に作製されたジャンクションによりコードされている）によりコードされたタンパク質に特徴的なペプチド領域に特異的な、特異的リガンド、好ましくはペプチドリガンド、特に抗体（ポリクローナル又はモノクローナル）及びそれらの断片、並びに癌、特に前立腺癌の検出、診断又はモニタリングのためのそれらの使用に関する。特に、それは、BPH型の診断、その前立腺癌からの鑑別に適している。

20

【0048】

これと関連して、本発明の別の目的は、本明細書において既に定義されたようなポリペプチドと、好ましくは選択的に、結合することができる抗体に関する。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得る。それは、実質的に同一の抗原特異性を有する抗体の断片及び誘導体、特に抗体断片（例えば、F a b、F（a b'）<sub>2</sub>、C D R）、ヒト化抗体、多機能性抗体、単鎖（S c F v）抗体等の形態であってもよい。抗体は、動物を免疫感作すること、及びその血清（ポリクローナル）又は脾細胞（適切な細胞系との融合によりハイブリドーマを作製するため）を収集することを含む、従来の方法を使用して、作製され得る。

30

【0049】

様々な種を使用したポリクローナル抗体の作製のための方法が、既に記述されている。典型的には、抗原は、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント）と組み合わせられ、典型的には皮下注射により、動物へ投与される。反復投与が実施され得る。血液試料が収集され、免疫グロブリン又は血清が分離される。モノクローナル抗体を作製するための従来の方法は、動物を抗原で免疫感作すること、続いて、脾細胞を回収し、次いでそれを骨髓腫細胞のような不死化細胞と融合させることを含む。得られたハイブリドーマは、モノクローナル抗体を産生し、それが、個々のクローンを単離するため限界希釈によって選択され得る。F a b断片又はF（a b'）<sub>2</sub>断片は、従来技術に従い、プロテアーゼを使用した消化によって作製され得る。

40

【0050】

本発明は、本明細書において既に定義されたようなポリペプチド又はその免疫原性断片を非ヒト動物へ注射すること、抗体又は抗体産生細胞を回収すること、を含む、抗体を作製する方法にも関する。好ましい抗体は、本願において記載されたP S A及びK L K 2のアイソフォームに特異的であって、野生型に対しては本質的に非特異的である抗体である。

50

## 【 0 0 5 1 】

本発明は、前記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該抗体を作製するためのそれらの使用に関する。

## 【 0 0 5 2 】

抗体は、毒素、標識、医用生成物又はその他の任意の治療剤のような異種断片と、共有結合的又は非共有結合的に、直接又はカップリング剤によって、カップリングさせられ得る。標識は、放射標識、酵素、蛍光剤、磁性粒子等の中から選択され得る。

## 【 0 0 5 3 】

本発明の抗体は、対象から採取された試料、典型的には哺乳動物、例えばヒトから採取された生物学的液体における、P S A及びK L K 2のアイソフォームの存在又は量を検出又は定量するためのスクリーニング剤として使用され得る。

10

## 【 0 0 5 4 】

本明細書において既に定義されたような抗体（又は断片もしくは誘導体）1個又は数個が固定化されているマトリックス（を含む生成物）を提供することが、本発明の別の目的である。マトリックスは、例えばナイロン、ガラス、プラスチック、金属、繊維、セラミック材料、シリカ、ポリマー等、又はその他の任意の適合性材料のような、固体の、平坦又はそうでない、均質又はそうでないものであり得る。抗体は、好ましくは、分子が、特異的抗体との相互作用を含む反応に到達可能になるような条件の下で、一方の末端で固定化される。抗体は、マトリックス上に正確に配置され得、数回にわたり沈着させられ得る。

20

## 【 0 0 5 5 】

## 検出 / 診断の方法

本願は、本明細書において既に定義されたような核酸、遺伝学的改変体又はタンパク質又はポリペプチドの、対象からの試料における存在を決定することを含む、対象における疾患又は疾患の素因を検出するための新たな手法を記載する。

## 【 0 0 5 6 】

決定は、配列決定、選択的ハイブリダイゼーション及び / 又は増幅のような様々な技術を使用して実施され得る。タンパク質の存在を決定するために使用され得る方法は、例えばE L I S A、R I A、E I A等のような免疫酵素反応に基づく。改変された遺伝子又はR N Aの存在を決定するために使用され得る技術は、例えばP C R、R T - P C R、リガ

30

ーゼ連鎖反応（L C R）、P C E技術、T M A（「転写介在増幅（Transcriptional Mediated Amplification）」）、ゲル移動、電気泳動、特にD G G E（「変性濃度勾配ゲル電気泳動（denaturing gel gradient electrophoresis）」）等である。

## 【 0 0 5 7 】

増幅工程が実施される場合、それは、好ましくは、本明細書において既に定義されたようなプライマー又はプライマー対を使用して達成される。

## 【 0 0 5 8 】

本発明の具体的な目的は、癌、特に前立腺癌、特にその良性型B H Pを検出するための、K L K 2 - E H T 0 0 2 ~ 0 1 1及びP S A - E H T 0 0 1 ~ 0 2 7又はK L K 2 - E H T b ~ K L K 2 - E H T l及びP S A - E H T a ~ P S A - E H T uの遺伝子又はメッ

40

センジャーの断片（例えば、保持されたイントロドメイン、特異的に作製されたジャンクション、特定の突然変異等）に相補的であり特異的である核酸の使用に関する。癌検出は、特に、D N Aチップを使用して、又は血液（とりわけ、血清又は精製された循環血中上皮細胞）、尿もしくは精液等のような生物学的液体に対してP C Rを実施することにより、達成され得る。

## 【 0 0 5 9 】

本発明は、本明細書において既に記載されたような抗体又はそれらの断片1個又は数個を含有している免疫学的テストの開発及び使用にもある。これらのアッセイは、特異的抗体を使用して個々にバリエーションを検出及び / もしくは測定するため、又は適当な特異的抗体を使用してパラレルに数個のバリエーションを検出及び / もしくは測定するため、又は本明

50

細書において既に記載されたようなアイソフォーム間の、もしくは該アイソフォームとカリクレイン2及びPSAのその他の記載された型との間の1個もしくは数個の比率を検出及び/もしくは測定するため、使用され得る。

【0060】

特定の方法は、対象から採取された試料を、本明細書において既に定義されたような核酸プローブと接触させること、及びハイブリダイゼーションを証明すること、を含む。

【0061】

別の特定の方法は、対象から採取された試料を、本明細書において既に定義されたようなプライマー又はプライマー対と接触させること、及び増幅産物を証明すること、を含む。

10

【0062】

別の特定の方法は、対象から採取された試料を、本明細書において既に定義されたような抗体と接触させること、及び抗原-抗体複合体を証明すること、を含む。

【0063】

典型的には、数個の試料を使用して、かつ/又は数個のプローブ、プライマー及び/もしくは抗体を使用して、数個のテストが平行に実施され得る。従って、特定の実施態様において、本発明の手法は、患者から採取された試料において、本明細書において既に記載されたようにして、平行に数個のバリエーション又は遺伝学的変異体の存在を決定することを含む。本発明の手法は、例えば、多様な生物学的試料、特に生物学的液体（例えば、血液、血漿、尿、血清、唾液等）、組織生検材料又は細胞培養物を使用して、より一般には核酸又はタンパク質（又はポリペプチド）を含有している可能性が高い任意の試料を使用して、実施され得る。生物学的試料は、手法を容易にするため、又はそれが含有しているポリペプチドもしくは核酸をより到達可能にするため、予め処理されてもよい。試料は、精製、遠心分離、固定等されてもよいし、又は使用前に凍結もしくは保存されてもよい。

20

【0064】

特定の実施態様において、本発明は、対象からの試料を、*in vitro*又は*ex vivo*で、本明細書において既に定義されたようなプローブ、プライマー又は特異的リガンドと接触させること、及びそれぞれ変異型の存在の指標となるハイブリッド、増幅産物又は複合体の形成を決定することを含む、対象におけるKLK2又はKLK3の変異型の存在を検出するための方法に関する。

30

【0065】

i) 本明細書において既に定義されたようなプライマー対又はプローブ又は抗体、及びii) 増幅又はハイブリダイゼーション又は免疫学的反応に必要な試薬、を含む、本明細書において既に定義されたような方法を実施するために使用され得るキットを提供することが、本発明の別の目的である。

【0066】

本発明は、これらのバリエーション又はそれらの断片のうちの1個又は数個を、血液（特に、血清）、尿又は精液のような試験すべき生物学的液体へ添加することにより、これらのバリエーションのうちの1個又は数個の特異的パートナーを検出及び/又は測定することを可能にする方法の開発にもある。

40

【0067】

活性化化合物のスクリーニング

本発明の特定のKLK2及びKLK3のバリエーションは、疾患を有する対象から同定され単離されたものであり、従って、癌、特に前立腺癌の処置のための特に興味深い治療標的となる。

【0068】

これに関して、本明細書において既に定義されたようなポリペプチドの発現又は活性を調整するテスト化合物の能力を決定する工程を含む、活性化化合物を選択、同定、特徴決定、最適化又は作製するための方法を提供することが、本発明の特定の目的である。

50

## 【0069】

化合物は、より具体的には、本明細書において既に定義されたようなポリペプチドの合成（即ち、特に、対応するRNA分子の産生もしくは成熟、又はそれらの翻訳）又はそのようなポリペプチドの活性（即ち、特に、それらの成熟もしくは輸送、又は細胞内もしくは細胞外の標的との相互作用）を調整する能力に基づき選択される。

## 【0070】

特定の変形実施態様において、本方法は、*in vitro*又は*ex vivo*で、本明細書において既に定義されたようなポリペプチド又はそのようなポリペプチドをコードする核酸（例えば、遺伝子、cDNA、RNA）とテスト化合物を接触させること、及び該ポリペプチド又は核酸と結合する化合物を選択すること、を含む。ポリペプチド、遺伝子又は対応するRNAとの結合は、標識リガンドの置換、ゲル移動、電気泳動等のような様々な技術により測定され得る。それは、*in vitro*で、例えばマトリックス上に固定化されたポリペプチド又は核酸を使用して実施され得る。

10

## 【0071】

別の特定の変形実施態様において、本方法は、*in vitro*又は*ex vivo*で、本明細書において既に定義されたようなポリペプチドを発現している細胞とテスト化合物を接触させること、及び該ポリペプチドの発現又は活性を調整する化合物を選択又は同定すること、を含む。発現の調整は、RNAもしくはタンパク質をアッセイすることにより、又は指示系により決定され得る。

## 【0072】

使用される細胞は、任意の適合性細胞、特に本明細書において既に定義されたような原核細胞又は真核細胞であり得る。典型的には、該分子を発現するよう修飾された細胞、特に組換え細胞が使用される。そのような組換え細胞は、ポリペプチドを発現する組換え核酸又はそれを含有しているベクターの導入により調製され得る。そのような組換え細胞は、本発明の具体的な目的を構成する。

20

## 【0073】

本法は、PSA又はKLK2の特異抗原の発現又は活性の活性化剤又は阻害剤を選択又は同定するために実施され得る。選択法は、例えば多数の候補化合物がパラレルにテストされ得るマルチウェルプレートのような様々な形式を使用して実施され得る。

## 【0074】

特定の実施態様において、化合物は、記載されたバリエーションの発現を阻害することができるアンチセンス核酸である。アンチセンス核酸は、記載されたバリエーションの特定の配列の全部又は一部を含み得る。アンチセンス配列は、とりわけ、同定されたスプライス型（例えば、標的配列）に相補的な領域を含み、そのタンパク質への翻訳を阻害し得る（又は低下させ得る）。

30

## 【0075】

もう1つの実施態様によると、化合物は、本明細書において既に記載されたバリエーションのうちの1個又は数個の発現又は活性を調整することができる、天然又は合成起源の化学化合物、特に、植物、細菌、ウイルス、動物、真核生物、合成又は半合成の起源の有機又は無機の分子である。

40

## 【0076】

特異的な化合物、即ち野生型の発現又は活性に顕著な影響を与えることなく、バリエーションの発現又は活性を調整し得るものが、好ましい。

## 【0077】

このようにして同定された化合物は、前立腺癌を処置するための組成物を調製するために使用され得る。

## 【0078】

本発明の別の目的は、癌、特に前立腺癌の処置を目的とした組成物を調製するための、本明細書において既に記載された1個又は数個のバリエーションの発現を調整し得る、即ち刺激するか、阻害するか又は低下させることができる化合物の使用にある。

50

## 【0079】

本発明に関して、「処置」という用語は、予防的、治癒的又は緩和的な処置、並びに患者の管理（苦痛の減少、平均余命の改善、疾患進行の遅延化）等をさす。処置は、さらに、他の活性薬剤と合わせて実施されてもよい。

## 【0080】

本発明の別の目的は、1個又は数個のテスト化合物を、本発明において記載されたタンパク質を発現している細胞抽出物又は精製された形態の該タンパク質と接触させることを含む、癌性状態を処置するための組成物を調製するために使用され得る活性化合物を選択、同定又は特徴決定するための方法に関する。

## 【0081】

本発明は、(i)前記の方法に従い活性化合物を選択すること、及び(ii)該化合物又はその機能的アナログを、薬学的に許容される担体の存在下で準備すること、を含む、癌、特に前立腺癌を処置するための医薬を生産するための方法にも関する。機能的アナログは、典型的には、特に、活性もしくは薬物動態を改良すること、又は毒性を低下させることを目標として、化学的修飾により、同定された活性化合物から誘導された化合物である。機能的アナログは、同定された化合物の「プロドラッグ」であり得る。機能的アナログを調製するための技術、例えば分子モデリング、NO基のカップリング等は、当業者に周知である。本方法は、これに関して、選択された化合物又はその機能的アナログを合成する中間工程を含む。

10

## 【0082】

薬学的に許容される担体又は賦形剤は、緩衝溶液、溶媒、結合剤、安定剤、乳化剤等の中から選択され得る。緩衝溶液又は希釈剤は、特に、第二リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、乳糖、セルロース、カオリン、マンニトール、塩化ナトリウム、デンプン、粉糖及びヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）（徐放のため）である。結合剤は、例えば、デンプン、ゼラチン、及びショ糖、グルコース、デキストロース、乳糖等のような増量溶液である。天然又は合成のゴム、特に、アルギネート、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等も使用され得る。その他の賦形剤は、例えば、セルロース及びステアリン酸マグネシウムである。例えば多糖（アラビアゴム、寒天、アルギン酸、グアーゴム及びトラガカント、キチン又はその誘導体及びセルロースエーテル）のような安定剤が、製剤中に取り込まれ得る。溶媒又は溶液は、例えば、リン

20

30

## 【0083】

本発明の別の目的は、癌性細胞、特に前立腺癌性細胞の表面に局在している、本明細書において既に記載されたような1個又は数個のバリエーションに特異的な細胞毒性リガンドの使用に属する。

## 【0084】

本発明のその他の面及び利点は、例示的かつ非制限的なものと見なされるべきである以下の実施例を参照することにより明らかとなる。これらの実施例は、同定されたアイソフォームが、組織及び血清においてRNAレベル及びタンパク質レベルの両方で生物学的

40

## 【0085】

図及び表の説明

表1：特異的オリゴヌクレオチドの配列（配列番号：168～220）。カラム1：オリゴヌクレオチドの名称。カラム2：オリゴヌクレオチドの配列。カラム3：特許請求の範囲に記載されたヌクレオチドの配列番号。

## 【0086】

表2：PSA及びKLK2のアイソフォームを増幅するために使用されたプライマー対。

## 【0087】

50

表 3 : ヒト組織 (Clontech) の、配列番号 : 168 ~ 220 のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドマイクロアレイとのハイブリダイゼーションにより得られた蛍光シグナルの値。カラム 1 : オリゴヌクレオチドの名称。カラム 2 : 配列番号。カラム 3 ~ 4 : 前立腺 / 心臓に対応する値。カラム 5 ~ 6 : 前立腺 / 腎臓に対応する値。カラム 7 ~ 8 : 前立腺 / 前立腺に対応する値。カラム 9 ~ 10 : 前立腺 / 小腸に対応する値。記号 # N / A は、値がバックグラウンドノイズの 2 倍より低かったことを示す。

【0088】

表 4 : 細胞系の、配列番号 : 168 ~ 220 のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドマイクロアレイとのハイブリダイゼーションにより得られた蛍光シグナルの値。カラム 1 : オリゴヌクレオチドの名称。カラム 2 : 配列番号。カラム 3 ~ 4 : Mda2b / BT549 に対応する値。カラム 5 ~ 6 : Mda2 / MCF7 に対応する値。カラム 7 ~ 8 : Mda2b / Mda231 に対応する値。カラム 9 ~ 10 : Mda2b / T47D に対応する値。記号 # N / A は、値がバックグラウンドノイズの 2 倍より低かったことを示す。

10

【0089】

表 5 : 前立腺癌を有する患者からの良性組織及び腫瘍性組織の、配列番号 : 168 ~ 220 のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドマイクロアレイとのハイブリダイゼーションにより得られた蛍光シグナルの値。カラム 1 : オリゴヌクレオチドの名称。カラム 2 : 配列番号。カラム 3 ~ 4 : 患者 15068 からの腫瘍性組織 / 良性組織に対応する値。カラム 5 ~ 6 : 患者 9648 からの腫瘍性組織 / 良性組織に対応する値。カラム 7 ~ 8 : 患者 8827 からの腫瘍性組織 / 良性組織に対応する値。カラム 9 ~ 10 : 患者 10063 からの腫瘍性組織 / 良性組織に対応する値。記号 # N / A は、値がバックグラウンドノイズの 2 倍より低かったことを示す。

20

【0090】

図面の簡単な説明

図 1 : 特異的オリゴヌクレオチドの位置。長方形が付されたオリゴヌクレオチドが、スプライシング事象 : イントロンの保持、エキソンの欠失、3' 及び 5' のクリプティック部位の使用の場合と特異的にハイブリダイズするよう設計された。

【0091】

図 2 : 特異的オリゴヌクレオチドの位置。5つのオリゴヌクレオチド (線が付されたもの) が、3つのエキソンを含有している長型及び2つのエキソンを含有している短型の発現を分析するために設計され得る。

30

【0092】

図 3 : 長合成型及び短合成型の標識。対応する cDNA を発現している直鎖化されたプラスミドを使用して、合成 RNA が生成される。長型からの RNA はシアニン 3 で標識され、短型からの RNA はシアニン 5 で標識される。

【0093】

図 4 : オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの特異性の証明。等量で混合された短型から長型を識別するため、5つのオリゴヌクレオチドを使用した。2つの例が示される : 遺伝子 A 及び遺伝子 B。

40

【0094】

図 5 : 長型と短型の比率の定量的測定。長型 (wt) の割合を、0、20、40、60、80 及び 100% に設定した (3つの例を示す、遺伝子 A、B 及び C)。

【0095】

図 6 : PSA 及び K L K 2 のオリゴヌクレオチドマイクロアレイの特異性。PSA 特異的オリゴヌクレオチドが、シアニン 3 で標識された PSA アイソフォームにより明らかとなった。K L K 2 特異的オリゴヌクレオチドが、シアニン 5 で標識された K L K 2 アイソフォームにより示された。

【0096】

図 7 : 線状 RNA 増幅の概略。

50

## 【0097】

図8：単一の患者からの腫瘍性組織及び正常組織からのプローブを使用したP S A / K L K 2スライドのハイブリダイゼーションの例。

## 【0098】

図9：対応する識別オリゴヌクレオチドにより、同一患者からの腫瘍性組織及び正常組織を分析することによる、P S A及びK L K 2のある種のアイソフォームの差次的発現の測定。カラム1：アイソフォームの性質、カラム2：対応する識別オリゴヌクレオチド、カラム3～6：log<sub>2</sub>（腫瘍性発現 / 正常発現の比率）。

## 【0099】

図10：対応する識別オリゴヌクレオチドにより、前立腺癌細胞系（M d a - 2 b及びL N C a p）及び乳癌細胞系（T 4 7 D）を分析することによる、P S A及びK L K 2のある種のアイソフォームのディファレンシャル発現の測定。カラム1：アイソフォームの性質、カラム2：対応する識別オリゴヌクレオチド、カラム3、4：log<sub>2</sub>（前立腺癌細胞系発現 / 乳癌細胞系発現の比率）。前立腺癌細胞系において相対的に過剰発現していたアイソフォームが橙色で示される。乳癌細胞系において相対的に過剰発現していたアイソフォームが青色で示される。

## 【0100】

図11：対応する識別オリゴヌクレオチドにより、様々なヒト組織を分析することによる、P S A及びK L K 2のある種のアイソフォームの差次的発現の測定。カラム1：アイソフォームの性質、カラム2：対応する識別オリゴヌクレオチド、カラム3、4、5及び6：log<sub>2</sub>（前立腺組織発現 / 心臓、腎臓、小腸及び前立腺それぞれにおける発現の比率）。前立腺組織において相対的に過剰発現していたアイソフォームが橙色で示される。他の組織において相対的に過剰発現していたアイソフォームが青色で示される。

## 【0101】

図12：正常組織を用いてある種のアイソフォームに関して得られた蛍光シグナルを示すグラフ。

## 【0102】

図13：3つのP S AアイソフォームA) P S A - E H T 0 0 3 B) P S A - E H T 0 2 3及びC) P S A - E H T 0 1 2の特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用したP C R増幅。

## 【0103】

図14：作製された3つのポリクローナル抗体のアノテーション。この図は、抗体S E 3 9 6 2、S E 3 9 6 3及びS E 4 1 0 1に関する情報、選択されたエピトープ、合成されたペプチド、K L Hコンジュゲーション及びこれらの抗体により認識される可能性が高いアイソフォームを示す。

## 【0104】

図15：E L I S Aを使用した3つの抗体の力価。A) S E 3 9 6 2、B) S E 3 9 6 3及びC) S E 4 1 0 1の力価の決定。P P I：免疫前血清。P P：最初の採集からの血清。G P：第二の採集からの血清。

## 【0105】

図16：抗体E H T - S E 3 9 6 2並びにA) 低濃度の全P S Aを含有している血清、B) 中程度の濃度の全P S Aを含有している血清及びC) 高濃度の全P S Aを含有している血清を使用したウェスタンブロットの結果。K L K 2 - E H T 0 0 4及びK L K 2 - E H T 0 0 6の予想分子量に対応する2本のバンドが観察される。シグナルが、増加する濃度の特異的合成エピトープ（1～50 µg）により置換されるが、これが高用量（250 µg）の非特異的ペプチドでは観察されないという事実により、この抗体の特異性が証明される。

## 【0106】

図17：前立腺組織における抗体E H T - S E 3 9 6 3を使用したウェスタンブロットの結果。P S A - E H T 0 1 2の予想分子量に対応するバンドが観察される。より高分子

量の他の2本のバンドも明らかとなっている。

【0107】

実施例

A - P S A 及び K L K 2 のバリエーションの単離

腫瘍性前立腺組織及び正常前立腺組織から抽出されたポリアデニル化 (ポリA+) RNA を使用して、定性的鑑別分析を実施した。ポリA+ RNA は、当業者に既知の技術を使用して調製した。特に、それは、チオシアン酸グアニジニウムのようなカオトロピック剤による処理、それに続く溶媒 (例えば、フェノール又はクロロホルム) による全 RNA の抽出を含み得た。そのような方法は、当業者に周知であり (Maniatisら、Chomczynskiら、Anal. Biochem. 162 (1987) 156)、商業的に入手可能なキットを使用して容易に実施され得る。ポリA+ RNA は、当業者に既知の、商業的キットの形態で利用可能な従来の方法に従い、この全 RNA より調製した。このポリA+ RNA を、逆転写酵素を使用した逆転写反応のための鋳型として使用した。有利には、使用される逆転写酵素は、RNase H 活性を有していないべきである。これらを用いて、従来逆転写酵素を用いた場合よりも長い相補 DNA 鎖が得られた。そのような RNase H 活性を有しない逆転写酵素調製物は、商業的に入手可能である。

10

【0108】

DATAS 技術に従い、mRNA (C) と cDNA (T) との間のハイブリダイゼーションが、動力学的各時点について実施され、mRNA (T) と cDNA (C) との間の逆のハイブリダイゼーション (reciprocal hybridization) も同様である。

20

【0109】

これらの mRNA / cDNA 異種二重鎖を、次いで、DATAS 技術プロトコルに従い精製した。RNase H は非対形成 RNA 配列を分解するため、相補 DNA と対形成していない RNA 配列を、この酵素の作用によってこれらの異種二重鎖から除去した。これらの非対形成配列は、他の点では相同な RNA 分子間に存在する定性的な違いを表す。これらの定性的な違いは、RNA 分子の配列内の任意の位置、5'、3' 又は配列内のいずれか、特にコーディング配列内に局在し得た。その位置によっては、これらの配列は、スプライシングによる修飾であるのみならず、転移又は欠失の結果でもあり得た。定性的な違いを表す RNA 配列を、次いで、当業者に既知の技術、特に DATAS 技術特許に記載されたものに従い、クローニングした。これらの配列を、定性的差次的ライブラリーを構成する cDNA ライブラリーへと類別した。これらのライブラリーのうちの一方は、健全な状況に特異的なエキソン及びイントロンを含有しており；他方のライブラリーは、病理学的状態に特徴的なスプライシング事象を含有していた。ヒト K L K 2 遺伝子及び K L K 3 遺伝子に由来する断片は、これらのライブラリーから得られた。4個の腫瘍性組織を混合して、腫瘍「プール」を形成させた。この RNA プールを Ambion 社の「DNA フリー (free)」キット (カタログ番号 1906) を使用して DNase により処理した。次いで、この RNA 分子を Applied Biosystems の “High capacity cDNA Archive” キット (カタログ番号 4322171) に供給された逆転写酵素を使用して逆転写する。それにより作製された cDNA を、以下のプロトコルに従い、ヒトカリクレイン 2 及びカリクレイン 3 に由来するメッセンジャー RNA 分子の特異的に異なる領域を増幅するための、PCR 反応のための鋳型として使用した。

30

40

【0110】

## 【表 1】

インビトロジェン10Xバッファー:	2 $\mu$ l		
DNTPs 2mM:	2 $\mu$ L		
MgCl <sub>2</sub> 50mM:	0.6 $\mu$ L		
上流プライマー 10 $\mu$ M:	0.4 $\mu$ L		
下流プライマー 10 $\mu$ M:		0.4 $\mu$ L	
Taq ポリメラーゼ:	0.2 $\mu$ L		10
H <sub>2</sub> O:	13.4 $\mu$ L		
cDNA	1 $\mu$ L		
	-----		
最終容量:	19 $\mu$ L		

## 使用したPCR条件:

94°C	3分		20
94°C	30秒	)	
55°C	1分	)	35サイクル
72°C	3分	)	
72°C	6分		

## 【0111】

PCRプライマーとして使用されたオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

## 【0112】

## 【表 2】

KLK2用:

163	KLK2-1-S	GGTTCTCTCCATCGCCTTG	
164	KLK2-1-AS	CTCCTTTAGTCTGAAGCCTCACC	
165	KLK2-2-S	TGTATTTACCCACGACTATATCTCCC	
166	KLK2-2-AS	GCTCTAGCACACATGTCATTGGA	10
167	KLK2-3-S	CAGTCATGGATGGGCACACT	
168	KLK2-3-AS	CTCAGACCCAGGCATCTGG	
169	KLK2-4-S	GCCAGATGGTGTAGCTGGG	
170	KLK2-4-AS	CATGATGTGATACCTTGAAGCACC	
171	KLK2-5-S	CCCTATCCAATTCTTTTGGGT	
172	KLK2-5-AS	GCTTTGATGCTTCAGAAGGC	
173	KLK2-6-S	CCTGCCAAGATCACAGATGTTG	20
174	KLK2-6-AS	TGGTTAGCTTTCAGATTGCAGC	
212	KLK2-7-S	tggaagaagaacaacgagca	
213	KLK2-7-AS	ttagggaatcagagaactggcc	
214	KLK2-8-S	agctcaatgtgtgtgcatgtgag	
215	KLK2-8-AS	aaaggatgcgggaagtcaga	
216	KLK2-9-S	cagcataattcaccattc	
217	KLK2-9-AS	tctacctgttactgctgcttcc	30
218	KLK2-10-S	ggagtgacgatgaggatgacc	
219	KLK2-10-AS	gtcagttcagtgatcagaatgac	
220	KLK2-11-AS	gctacagctgaaaccagcc	
221	KLK2-12-S	ccactacagagccctcactcca	
222	KLK2-13-AS	aatgcttctcacactcccagc	
249	klk2 start	CCTGTGTCAGCATGTGGGACC	
250	klk2 stop	TGGGACAGGGGCACTCAGGG	40
251	klk2e spe	cctgggggtatagttgccactat	

PSA用：

175	PSA-1-S	CGTGACGTGGATTGGTGAGA	
176	PSA-1-AS	GCTGGCCTTAGAGGTTATCCTG	
177	PSA-2-S	GGCCTGAACTGTGTCTTCCC	
178	PSA-2-AS	GTGAACTTGCGCACACACG	
179	PSA-3-S	TGGCAGGTGCTTGTGGC	10
180	PSA-3-AS	CTCCTCCCTCAGACCCAGG	
181	PSA-4-S	GTCCAGCCCACAACAGTG	
182	PSA-4-AS	CCTTGAAGCACACCATTACAGAC	
183	PSA-5-S	CCTAAATCCATCTCCTATCCGAGTC	
184	PSA-5-AS	CAGGATGAAACAGGCTGTGC	
185	PSA-6-S	TGCTGTGAAGGTCATGGACC	
186	PSA-6-AS	GACGCCTTGTTGGCTTCTAGAC	20
200	PSA-7-S	tcccagagacctgatgctt	
201	PSA-7-AS	gtttgcaggttggtggctg	
202	PSA-8-S	gtcccggttgtcttctcac	
203	PSA-8-AS	gaccatttgtgtctcaggc	
204	PSA-9-S	ctgaacacacgcacgggat	
205	PSA-9-AS	ccaaagcccttcttttctca	
206	PSA-10-S	ttggaaaccacgcaaaa	30
207	PSA-10-AS	cctcagagtggtcagctgtag	
208	PSA-11-S	tgactccctcaaggcaataggta	
209	PSA-11-AS	tgtttgctcactcccaccttct	
210	PSA-12-S	tgctggacagaagcaggaca	
211	PSA-12-AS	atcatcactccctccacatcc	
247	PSA start	GGAGAGCTGTGTCACCATGTGG	
248	PSA stop	ATAGGGGTGCTCAGGGGTTGG	40

【 0 1 1 3 】

次いで、増幅された産物を、供給されたプロトコルに従い、Invitrogen社の“Topo”システム(カタログ番号K4600)にクローニングした。ライゲーション産物を“Top10”コンピテント細胞に形質転換した。コロニーを、アンピシリンが補足された寒天/LB培地で同定した。これらのコロニーに存在するcDNA分子を、以下のプロトコルに従い、プライマーSp6及びT7を使用したPCR増幅により個々に増幅した。

【 0 1 1 4 】

## 【表 3】

プライマー-T7 10 $\mu$ M:	2 $\mu$ L
プライマー-Sp6 10 $\mu$ M	2 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50mM:	1.2 $\mu$ L
DNTPs 2mM:	4 $\mu$ L
10x バッファー	4 $\mu$ L
Taq ポリメラーゼ:	0.2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O:	25.6 $\mu$ L
コロニー:	1 $\mu$ L
	-----
最終容量	40 $\mu$ L

10

## 使用したPCR条件:

94°C	5分	
94°C	30秒	
55°C	30秒	30 サイクル
72°C	1分	
72°C	5分	

20

## 【0115】

次いで、増幅産物を、この供給元により提供されたプロトコルに従い、Applied Biosystems社の“Big Dye Terminator”キットを使用して、配列決定のため、P100を用いて精製した。配列決定反応を、Applied Biosystemsのシーケンサー3100を使用して分析した。表2は、様々なcDNA、及び試料中のそれらを手し増幅するために使用されたオリゴヌクレオチドプライマー対を示す。

30

## 【0116】

B - バリエーションの同定及び説明  
K L K 2 バリエーション

ヌクレオチドの番号付けは、特に断りない限り、GenBank登録番号M18157に関するものである。参照タンパク質は、シグナルペプチドを備えたK L K 2である。

## 【0117】

配列K L K 2 - E H T 0 0 2 ~ K L K 2 - E H T 0 1 1 (配列番号: 1 ~ 7) は、オープンリーディングフレーム並びに翻訳のための開始コドン及び終止コドンを有する配列に相当した。配列K L K 2 - E H T b ~ K L K 2 - E H T l (配列番号: 8 ~ 15) は、翻訳のための開始コドン又は終止コドンを含む又は含まない1個、2個又は3個のリーディングフレームを有し得る発現「EST」配列に相当した。

40

## 【0118】

K L K 2 - E H T 1 0 2 (配列番号: 1) :

このアイソフォームは、i) イントロン2の5'部分(nt 1935 ~ 2020)の部分的保持、並びにii) エキソン3の3'部分(nt 3728)及びエキソン4の5'部分(nt 3937)の2個のクリプティック(cryptic)スプライス部位の使用を示した。これらの2つの事象は、コンセンサス(consensus)スプライス部位に

50

対応した。K L K 2 - E H T 0 0 2 アイソフォームは、エキソン 2 の後に終止コドンを有し、従って 6 9 番目の残基の後で短縮されたタンパク質 ( K L K 2 - E H T 0 0 2 p r o t a / 配列番号 : 5 0 ) をコードした。5 4 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T 0 0 2 p r o t b / 配列番号 : 5 1 が形成され得た。配列番号 : 1 における G e n b a n k ( M 1 8 1 5 7 ) 1 8 2 1 位及び 3 5 8 1 位に相当するヌクレオチドは C 及び A であることが分かるが、G e n b a n k 参照配列は、これらの位置にそれぞれ T 及び G を示した。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。いずれの変化も、翻訳されたタンパク質の配列には影響を与えなかった。

#### 【 0 1 1 9 】

10

K L K 2 - E H T 0 0 3 ( 配列番号 : 2 ) :

このアイソフォームは、i ) エキソン 2 の完全な欠失、及び i i ) イントロン 4 の 5 ' 部分 ( n t 4 0 6 1 ~ 4 0 9 7 ) の保持を示した。両事象は、コンセンサスプライス部位に対応する。K L K 2 - E H T 0 0 3 アイソフォームは、1 5 番目のトレオニン残基を超えて 3 4 個の付加的なアミノ酸を有するタンパク質 ( K L K 2 - E H T 0 0 3 p r o t a / 配列番号 : 5 2 ) をコードした。これらの 3 4 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T 0 0 3 p r o t b / 配列番号 : 5 3 が形成され得た。配列番号 : 2 における G e n b a n k ( M 1 8 1 5 7 ) 3 7 7 4 位及び 5 4 8 6 位に相当するヌクレオチドは C 及び T と見てとれるが、G e n b a n k 参照配列は、これらの位置にそれぞれ T 及び G を示した。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。いずれの変化も、翻訳されたタンパク質の配列には影響を与えなかった。

20

#### 【 0 1 2 0 】

K L K 2 - E H T 0 0 4 ( 配列番号 : 3 ) :

このアイソフォームは、エキソン 3 の完全な欠失を有した。K L K 2 - E H T 0 0 4 アイソフォームは、1 5 番目のトレオニン残基を超えて 7 0 個の付加的なアミノ酸を有するタンパク質 ( K L K 2 - E H T 0 0 4 p r o t a / 配列番号 : 5 4 ) をコードした。これらの 7 0 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T 0 0 3 p r o t b / 配列番号 : 5 5 が形成され得た。最後の 1 6 アミノ酸 K L K 2 - E H T 0 0 4 p r o t c / 配列番号 : 5 6 は新しく、このアイソフォームの特異エピトープのうちの 1 個以上を含有し得る。配列番号 : 3 における G e n b a n k ( M 1 8 1 5 7 ) 4 0 9 7 位に相当するヌクレオチドは A と見てとれるが、G e n b a n k 参照配列は、この位置に G を示した。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、翻訳されたタンパク質の配列には影響を与えなかった。

30

#### 【 0 1 2 1 】

K L K 2 - E H T 0 0 6 ( 配列番号 : 4 ) :

このアイソフォームは、エキソン 3 の 3 ' 部分 ( n t 3 7 2 8 ) 及びエキソン 4 の 5 ' 部分 ( n t 3 9 3 7 ) の 2 個のクリプティックプライス部位を使用した。この事象は、コンセンサスプライス部位に対応した。K L K 2 - E H T 0 0 6 アイソフォームは、1 4 9 アミノ酸長のタンパク質 ( K L K 2 - E H T 0 0 6 p r o t a / 配列番号 : 5 7 ) をコードした。1 3 4 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T 0 0 2 p r o t b / 配列番号 : 5 8 が形成され得た。最後の 1 6 アミノ酸 K L K 2 - E H T 0 0 4 p r o t c / 配列番号 : 5 9 は新しく、このアイソフォームの特異エピトープのうちの 1 個以上を含有し得た。配列番号 : 4 における G e n b a n k ( M 1 8 1 5 7 ) 3 6 8 9 位に相当するヌクレオチドは T と見てとれるが、G e n b a n k 参照配列は、この位置に C を示した。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、翻訳されたタンパク質の配列には影響を与えなかった。

40

#### 【 0 1 2 2 】

50

K L K 2 - E H T 0 0 7 ( 配列番号 : 5 ) :

K L K 2 - E H T 0 0 7 は、イントロン 4 の 5 ' 部分の保持を示した。K L K 2 - E H T 0 0 7 アイソフォームは、2 2 4 アミノ酸長のタンパク質 ( K L K 2 - E H T 0 0 7 p r o t a / 配列番号 : 6 0 ) をコードした。2 0 9 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T 0 0 7 p r o t b / 配列番号 : 6 1 が形成され得た。最後の 1 4 アミノ酸 K L K 2 - E H T 0 0 4 p r o t c / 配列番号 : 6 2 は新しく、このアイソフォームの 1 個以上の特異エピトープを提示しているかもしれない。

【 0 1 2 3 】

K L K 2 - E H T 0 0 9 ( 配列番号 : 6 ) :

K L K 2 - E H T 0 0 9 は、i ) エキソン 3 内の配列 ( n t 3 6 7 1 ~ 3 7 9 3 ) の欠失、及び i i ) エキソン 4 の 5 ' 部分 ( n t 3 9 3 7 ) のクリプティックスプライス部位 ( コンセンサススプライス部位 ) の使用を示した。K L K 2 - E H T 0 0 9 アイソフォームは、1 2 3 アミノ酸のタンパク質 ( K L K 2 - E H T 0 0 9 p r o t a / 配列番号 : 6 3 ) をコードした。1 0 8 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T 0 0 9 p r o t b / 配列番号 : 6 4 が形成され得た。最後の 5 アミノ酸 K L K 2 - E H T 0 0 4 p r o t c / 配列番号 : 6 5 は新しく、このアイソフォームの特異的エピトープのうちの 1 個以上の一部を形成し得た。

【 0 1 2 4 】

K L K 2 - E H T 0 1 1 ( 配列番号 : 7 ) :

このアイソフォームは、エキソン 4 の 5 ' 部分 ( n t 4 0 4 1 ) のクリプティックスプライス部位を使用した。この事象は、コンセンサススプライス部位に対応した。K L K 2 - E H T 0 1 1 アイソフォームは、1 6 5 アミノ酸のタンパク質 ( K L K 2 - E H T 0 1 1 p r o t a / 配列番号 : 6 6 ) をコードした。1 5 0 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T 0 1 1 p r o t b / 配列番号 : 6 7 が形成され得た。最後のアミノ酸位置において、フェニルアラニン残基がトリプトファン残基に交換されており、このアイソフォームの特異エピトープの一部を形成し得た。

【 0 1 2 5 】

K L K 2 - E H T b ( 配列番号 : 8 ) :

このアイソフォームは、イントロン 1 の 5 ' 部分の保持、それに続く 7 0 1 位 ~ 1 0 5 8 位 ( 両端を含む ) の欠失を示した。K L K 2 - E H T b アイソフォームは、1 5 番目のトレオニン残基を超えて 1 0 4 個の付加的なアミノ酸を有するタンパク質 ( K L K 2 - E H T b 1、配列番号 : 6 8 ) をコードした。これらの 1 0 4 アミノ酸が切断され、配列 K L K 2 - E H T b 2、配列番号 : 6 9 が形成され得た。最後の 5 9 アミノ酸 ( K L K 2 - E H T b 3、配列番号 : 7 0 ) は、既に記載されたアイソフォーム K - L M ( D a v i d ら ( 2 0 0 2 ) ) と比較して新しい配列を表した。配列番号 : 8 の 9 7 位、2 1 4 位及び 2 4 9 位のヌクレオチドはそれぞれ G、C 及び T と見てとれるが、G e n b a n k 参照配列はそれぞれ C、T 及び C を示した。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。突然変異 9 7 及び 2 1 4 は、翻訳されたタンパク質の配列には影響を与えなかった。突然変異 2 4 9 は、セリン残基をフェニルアラニン残基へと変換した。G e n b a n k 参照におけるヌクレオチド 1 1 9 2 ~ 1 1 9 9、G A A G A A C A が、配列番号 : 8 においてはヌクレオチド 3 0 3 ~ 3 0 6、A A A C に交換されていることも見てとれる。従って、K L K 2 - E H T b 1 の最後の 1 5 アミノ酸は、K L K 2 - E H T b 4、配列番号 : 7 1 を構成する 1 7 アミノ酸を含むオープン配列に取って代わっていた。

【 0 1 2 6 】

K L K 2 - E H T c ( 配列番号 : 9 ) :

このアイソフォームは、イントロン 1 内の 1 1 5 7 位のクリプティック部位を使用した。K L K 2 - E H T c アイソフォームは、1 5 番目のトレオニン残基を超えて 6 個の付加的なアミノ酸を有するタンパク質 ( K L K 2 - E H T c 1、配列番号 : 7 2 ) をコードし

10

20

30

40

50

た。これらの6アミノ酸が切断され、配列K L K 2 - E H T c 2、配列番号：73が形成され得た。Genbank参照配列におけるヌクレオチド1192～1199、G A A G A A C Aが、配列番号：9においてはヌクレオチド71～74、A A A Cに交換されていることが見てとれた。この変化は、終止コドンの後で起こった。

【0127】

K L K 2 - E H T d (配列番号：10)：

このアイソフォームは、イントロン1の5'部分の保持、それに続く657位～1209位(両端を含む)の欠失を示した。K L K 2 - E H T dアイソフォームは、少なくとも41個の付加的なアミノ酸を含むタンパク質(K L K 2 - E H T d 1、配列番号：74)をコードした。これらの41アミノ酸が切断され、配列K L K 2 - E H T d 2、配列番号：75が形成され得た。最後の11個の付加的なアミノ酸(K L K 2 - E H T d 3、配列番号：76)は、既に記載されたアイソフォームK - L M (Davidら(2002))と比較して新しい配列を表した。イントロン1の継続された翻訳により予測される配列は、切断の後、83アミノ酸のタンパク質：K L K 2 - E H T d 4、配列番号：77を生成させた。

10

【0128】

K L K 2 - E H T e (配列番号：11)：

K L K 2 - E H T eは、3'末が短縮されたエキソン2及びエキソン3を含む、140ヌクレオチドの未知の配列を示した。K L K 2 - E H T eアイソフォームは、52番目の位置を占めるグリシン残基を超えて19個の付加的なアミノ酸を有するタンパク質(K L K 2 - E H T e 1、配列番号：78)をコードした。これらの19アミノ酸は、配列K L K 2 - E H T e 2、配列番号：79を表した。

20

【0129】

K L K 2 - E H T f (配列番号：12)：

このアイソフォームは、2個のクリプティックスプライス部位(第一の部位はエキソン2の3'部分(1876位)、第二の部位はエキソン4(3349位)にある)を使用した。K L K 2 - E H T fアイソフォームは、49位のヒスチジン残基と70位のアスパラギンとの間の57個の付加的なアミノ酸を有するタンパク質(K L K 2 - E H T f 1、配列番号：80)をコードした。これらの57アミノ酸は、K L K 2 - E H T f 2、配列番号：81を表した。配列番号：12の269位のヌクレオチドはCと見てとれるが、Genbank参照配列はこの位置にTを示した。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。突然変異269は、フェニルアラニン残基をロイシン残基へと置換した。

30

【0130】

K L K 2 - E H T j (配列番号：13)：

このアイソフォームは、イントロン2内の2473位～3001位の欠失を有した。K L K 2 - E H T jは、K L K 2 - E H T j 1(配列番号：82)又はK L K 2 - E H T j 2(配列番号：83)に相当する2つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードした。

40

【0131】

K L K 2 - E H T k (配列番号：14)：

このアイソフォームは、2個のクリプティックスプライス部位(第一の部位はイントロン4の5049位、第二の部位はエキソン5の5469位にある)を使用した。K L K 2 - E H T kは、K L K 2 - E H T k 1(配列番号：84)又はK L K 2 - E H T k 2(配列番号：85)に相当する2つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードした。

【0132】

K L K 2 - E H T l (配列番号：15)：

このアイソフォームは、2991位を占めるイントロン2内のクリプティック部位を使

50

用する。K L K 2 - E H T k は、K L K 2 - E H T 1 1 ( 配列番号 : 8 6 ) 又は K L K 2 - E H T 1 2 ( 配列番号 : 8 8 ) に相当する 2 つのリーディングフレームのうちの 1 つを有するタンパク質をコードした。

【 0 1 3 3 】

P S A ( 又は K L K 3 ) バリエーション

ヌクレオチドの番号付けは、特に断りない限り、G e n B a n k 登録番号 M 2 7 2 7 4 に関するものである。参照タンパク質は、シグナルペプチドを備えた P S A である。

【 0 1 3 4 】

配列 P S A - E H T 0 0 1 ~ P S A - E H T 0 2 7 ( 配列番号 : 1 6 ~ 3 4 ) は、オープンリーディングフレーム並びに翻訳のための開始コドン及び終止コドンを有する配列に相当した。配列 P S A - E H T a ~ P S A - E H T u ( 配列番号 : 3 5 ~ 4 9 ) は、翻訳のための開始コドン又は終止コドンを含む又は含まない 1 個、2 個又は 3 個のリーディングフレームを有し得る発現「E S T」配列に相当した。

10

【 0 1 3 5 】

P S A - E H T 0 0 1 ( 配列番号 : 1 6 )

このアイソフォームは、イントロン 1 の欠失断片 ( n t 7 2 1 ~ 8 1 1 、次いで 9 7 1 ~ 1 2 7 2 ) の保持を示した。P S A - E H T 0 0 1 アイソフォームは、5 1 アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 0 1 p r o t a / 配列番号 : 8 9 ) をコードした。3 6 アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 0 1 p r o t b / 配列番号 : 9 0 が形成され得る。配列番号 : 1 6 における G e n b a n k ( M 2 7 2 7 4 ) 7 3 8 位に相当するヌクレオチドは G と見てとれるが、G e n b a n k 参照配列は T を示した。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、トリプトファン残基をグリシン残基に置換した。

20

【 0 1 3 6 】

P S A - E H T 0 0 3 ( 配列番号 : 1 7 ) :

このアイソフォームは、イントロン 1 の欠失断片 ( n t 7 2 1 ~ 8 7 4 、次いで 9 2 0 ~ 1 2 7 2 ) の保持を示した。P S A - E H T 0 0 3 アイソフォームは、8 9 アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 0 3 p r o t a / 配列番号 : 9 1 ) をコードした。7 4 アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 0 3 p r o t b / 配列番号 : 9 2 が形成され得た。最後の 2 0 アミノ酸 ( P S A - E H T 0 0 3 p r o t c / 配列番号 : 9 3 ) は、イントロン 1 の完全な保持を有する既に記載されたアイソフォームと比較して新しい情報を表した。

30

【 0 1 3 7 】

P S A - E H T 0 0 4 ( 配列番号 : 1 8 ) :

このアイソフォームは、イントロン 1 内の 1 1 4 2 位の 3 ' クリプティックスプライス部位 ( コンセンサス部位 ) を使用した。P S A - E H T 0 0 4 アイソフォームは、4 7 アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 0 4 p r o t a / 配列番号 : 9 4 ) をコードする。3 2 アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 0 4 p r o t b / 配列番号 : 9 5 が形成され得た。

40

【 0 1 3 8 】

P S A - E H T 0 0 5 ( 配列番号 : 1 9 ) :

このアイソフォームは、イントロン 1 の欠失断片 ( n t 7 2 1 ~ 7 9 2 、次いで 1 1 4 9 ~ 1 2 7 2 ) の保持を示した。P S A - E H T 0 0 5 アイソフォームは、6 8 アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 0 5 p r o t a / 配列番号 : 9 6 ) をコードした。5 3 アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 0 5 p r o t b / 配列番号 : 9 7 が形成され得た。最後の 2 8 アミノ酸 ( P S A - E H T 0 0 5 p r o t c / 配列番号 : 9 8 ) は、イントロン 1 の完全な保持を有する既に記載されたアイソフォームと比較して新しい情報を表した。

【 0 1 3 9 】

50

PSA-EHT007 (配列番号: 20):

このアイソフォームは、イントロン1内の693位に位置する5'クリプティックスプライス部位及びイントロン1内の1149位に位置する3'クリプティックスプライス部位を使用した。このPSA-EHT007アイソフォームは、23アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT007 prota / 配列番号: 99) をコードした。

【0140】

PSA-EHT008 (配列番号: 21):

このアイソフォームは、イントロン1内の1202位の3'クリプティックスプライス部位 (コンセンサス部位) を使用した。このPSA-EHT008アイソフォームは、27アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT008 prota / 配列番号: 100) をコードした。12アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT008 protb / 配列番号: 101が形成され得た。配列番号: 21におけるGenbank (M27274) 679位に相当するヌクレオチドはTと見てとれるが、Genbank参照配列はGを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もある。この変化は、トリプトファン残基をロイシン残基に置換した。

10

【0141】

PSA-EHT009 (配列番号: 22):

このアイソフォームは、イントロン2の欠失断片 (nt 2119 ~ 2447、次いで2988 ~ 3226) の保持を示した。このPSA-EHT009アイソフォームは、69アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT009 prota / 配列番号: 102) をコードした。54アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT009 protb / 配列番号: 103が形成され得る。配列番号: 22におけるGenbank (M27274) 1966位に相当するヌクレオチドはAと見てとれるが、Genbank参照配列はGを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もある。この変化は、タンパク質の配列には影響を与えない。その他の点突然変異は終止コドンの後に同定された。

20

【0142】

PSA-EHT012 (配列番号: 23):

このアイソフォームは、イントロン2の2426位の3'クリプティックスプライス部位 (コンセンサス部位) を使用した。このPSA-EHT012アイソフォームは、83アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT012 prota / 配列番号: 104) をコードした。68アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT004 protb / 配列番号: 105が形成され得た。最後の14アミノ酸 (PSA-EHT012 protc / 配列番号: 106) は、野生型PSAと比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうち1個以上を含む可能性が高かった。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もある。いずれの変化も、翻訳されたタンパク質の配列には影響を与えなかった。

30

40

【0143】

PSA-EHT013 (配列番号: 24):

このアイソフォームは、イントロン1内の1945位の3'クリプティックスプライス部位 (コンセンサス部位) を使用した。このPSA-EHT013アイソフォームは、75アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT013 prota / 配列番号: 107) をコードした。60アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT013 protb / 配列番号: 108が形成され得た。これらの60アミノ酸は、野生型PSAと比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうち1個以上を含む可能性が高かった。

【0144】

50

PSA-EHT015 (配列番号: 25):

このアイソフォームは、エキソン1内の703位に位置する5'クリプティックスプライス部位及びエキソン2内の2030位に位置する3'クリプティック部位を使用した。PSA-EHT015アイソフォームは、41アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT015 prota / 配列番号: 109) をコードする。最後の30アミノ酸 (PSA-EHT015 protb / 配列番号: 110) は、野生型PSAと比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうちの1個以上を含む可能性が高かった。配列番号: 25におけるGenbank (M27274) 2094位に相当するヌクレオチドはCであったが、Genbank参照配列はTを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、セリン残基をプロリン残基に置換した。

10

【0145】

PSA-EHT016 (配列番号: 26):

このアイソフォームは、エキソン2内の2053位に位置する3'クリプティックスプライス部位 (コンセンサス部位) を使用した。このPSA-EHT016アイソフォームは、39アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT016 prota / 配列番号: 111) をコードした。24アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT016 protb / 配列番号: 112が形成され得た。これらの24アミノ酸は、野生型PSAと比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうちの1個以上を含む可能性が高かった。

20

【0146】

PSA-EHT018 (配列番号: 27):

このアイソフォームは、イントロン2の欠失断片 (nt 2119 ~ 2588、次いで3114 ~ 3226) の保持を示した。このPSA-EHT018アイソフォームは、69アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT018 prota / 配列番号: 113) をコードした。54アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT018 protb / 配列番号: 114が形成され得る。配列番号: 27におけるGenbank (M27274) 2545位に相当するヌクレオチドはTであったが、Genbank参照配列はAを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、タンパク質の配列には影響を与えなかった。

30

【0147】

PSA-EHT019 (配列番号: 28):

このアイソフォームは、エキソン3内に位置する断片 (ヌクレオチド3828 ~ 3933) の欠失を有した。このPSA-EHT019アイソフォームは、100アミノ酸のタンパク質 (PSA-EHT019 prota / 配列番号: 115) をコードした。85アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT019 protb / 配列番号: 116が形成され得た。最後の6アミノ酸 (PSA-EHT019 protb / 配列番号: 117) は、野生型PSAと比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうちの1個以上を含む可能性が高かった。配列番号: 28におけるGenbank (M27274) 3786位及び3943位に相当するヌクレオチドはT及びAであったが、Genbank参照配列はそれぞれC及びCを示す。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。第一の変化は、タンパク質の配列には影響を与えなかった。第二のものは、セリン残基をアルギニン残基に置換した。

40

【0148】

PSA-EHT021 (配列番号: 29):

このアイソフォームは、エキソン3内の3885位に位置する3'クリプティックスプライス部位 (コンセンサス部位) を使用し、エキソン3の3'部分 (ヌクレオチド390

50

3 ~ 4025) の欠失も有した。P S A - E H T 0 2 1 アイソフォームは、177アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 2 1 p r o t a / 配列番号 : 118 ) をコードした。162アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 2 1 p r o t b / 配列番号 : 119 が形成され得た。残基69及び76の周辺に作出された新たなジャンクションは、野生型 P S A と比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうちの1個以上を含む可能性が高い。配列番号 : 29における G e n b a n k ( M 2 7 2 7 4 ) 1966位に相当するヌクレオチドはAであったが、G e n b a n k 参照配列はGを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、タンパク質の配列には影響を与えなかった。

10

## 【0149】

P S A - E H T 0 2 2 ( 配列番号 : 30 ) :

このアイソフォームは、エキソン3の3'部分(ヌクレオチド3903~4025)の欠失を有した。P S A - E H T 0 2 2 アイソフォームは、220アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 2 2 p r o t a / 配列番号 : 120 ) をコードした。205アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 2 2 p r o t b / 配列番号 : 121 が形成され得た。残基119の周辺に作出された新たなジャンクションは、野生型 P S A と比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうちの1個以上を含む可能性が高かった。配列番号 : 30における G e n b a n k ( M 2 7 2 7 4 ) 1966位に相当するヌクレオチドはAであったが、G e n b a n k 参照配列はGを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、タンパク質の配列には影響を与えなかった。P S A - E H T 0 2 2 ( 配列番号 : 30 ) は、2002年10月24日に G e n b a n k に寄託された P S A バリエーション ( 登録番号 : A J 4 5 9 7 8 2 ) に相当する。

20

## 【0150】

P S A - E H T 0 2 3 ( 配列番号 : 31 ) :

このアイソフォームは、エキソン2の断片(ヌクレオチド1990~2040)の欠失、エキソン3内の3885位の3'クリプティック部位(コンセンサス部位)の使用、及びイントロン3の5'断片(ヌクレオチド4043~4060)(コンセンサス部位)の保持を有する。このアイソフォームは、207アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 2 3 p r o t a / 配列番号 : 122 ) をコードした。192アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 2 3 p r o t b / 配列番号 : 123 が形成され得た。残基27及び53の周辺及び領域105~111に作出された新たなジャンクションは、野生型 P S A と比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうちの1個以上を含む可能性が高かった。配列番号 : 31における G e n b a n k ( M 2 7 2 7 4 ) 2060位及び5731位に相当するヌクレオチドはG及びGであったが、G e n b a n k 参照配列はそれぞれT及びTを示す。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。第一の変化は、システイン残基をグリシン残基に置換した。第二のものは、タンパク質の配列には影響を与えなかった。

30

40

## 【0151】

P S A - E H T 0 2 5 ( 配列番号 : 32 ) :

このアイソフォームは、エキソン3を欠失していた。このアイソフォームは、85アミノ酸のタンパク質 ( P S A - E H T 0 2 5 p r o t a / 配列番号 : 124 ) をコードした。70アミノ酸が切断され、配列 P S A - E H T 0 2 5 p r o t b / 配列番号 : 125 が形成され得た。最後の16アミノ酸 ( P S A - E H T 0 2 5 p r o t c / 配列番号 : 126 ) は、野生型 P S A と比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうちの1個以上を含む可能性が高かった。配列番号 : 32における G e n b a n k ( M 2 7 2 7 4 ) 2118~4186位及び5791位に相当するヌクレオチドは

50

G及びGであったが、Genbank参照配列はそれぞれAT及びCを示す。この違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。エキソン2の3'部位とエキソン4の5'部位の一致は、この領域におけるポリメラーゼによって導入された突然変異を示唆する。最後の变化は、タンパク質の配列には影響を与えなかった。

#### 【0152】

PSA-EHT026 (配列番号: 33):

このアイソフォームは、エキソン3内に位置する断片(ヌクレオチド3781~4025)の欠失を有する。このPSA-EHT026アイソフォームは、78アミノ酸のタンパク質(PSA-EHT026 prota / 配列番号: 127)をコードした。63アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT026 protb / 配列番号: 128が形成され得た。

10

#### 【0153】

PSA-EHT027 (配列番号: 34):

このアイソフォームは、エキソン3の5'末の3780位に位置するクリプティックスプライス部位を使用し、エキソン4を欠失している。このPSA-EHT027アイソフォームは、114アミノ酸のタンパク質(PSA-EHT027 prota / 配列番号: 129)をコードした。129アミノ酸が切断され、配列PSA-EHT027 protb / 配列番号: 130が形成され得た。最後の67アミノ酸(PSA-EHT027 protc / 配列番号: 131)は、野生型PSAと比較して新しい情報を表し、従って、このアイソフォームの特異エピトープのうち1個以上を含む可能性が高かった。配列番号: 34におけるGenbank(M27274)1966位に相当するヌクレオチドはAであったが、Genbank参照配列はGを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この変化は、タンパク質の配列には影響を与えなかった。

20

#### 【0154】

PSA-EHTa (配列番号: 35):

このアイソフォームは、イントロン1の5'部分の91ヌクレオチドの欠失、それに続く次の152ヌクレオチドの欠失(次いで、イントロン1に戻る)を示した。PSA-EHTaアイソフォームは、90アミノ酸のタンパク質(PSA-EHTa1、配列番号: 132)をコードし、その最後の75アミノ酸が切断され得た(配列PSA-EHTa2、配列番号: 133)。それは、PSAと異なる情報を表し、最後の44アミノ酸(配列PSA-EHTa3、配列番号: 134)は、既に記載されたイントロン1の完全な保持(Davidら(2002))と比較して新しい情報を示した。最後の74アミノ酸の26位において、PがQに置換されていた。配列番号: 35の90位及び234位のヌクレオチドはA及びCであったが、Genbank参照配列はC及びTを示す。243位及び293位のG及びCヌクレオチドも、Genbank参照と異なっていた。しかしながら、これらの2つのヌクレオチドは、実際、発表されているゲノム配列に相当していた(Genbank登録番号: NT\_011190)。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。従って、プロリン残基がグルタミン残基に置換され(突然変異90)、イソロイシン残基がトレオニン残基に置換されている(突然変異234)。

30

40

#### 【0155】

PSA-EHTd (配列番号: 36):

このアイソフォームは、エキソン2の最後の9ヌクレオチド及びエキソン3の最初の243ヌクレオチドの欠失を有した。このPSA-EHTdアイソフォームは、84アミノ酸欠失を有するタンパク質(PSA-EHTd1、配列番号: 135)をコードした。システイン残基66とトレオニン残基151との間に新たなドメインが形成されていた。

50

## 【0156】

PSA-EHTf (配列番号: 37):

このアイソフォームは、105ヌクレオチドの長さの欠失イントロン3(2420~2526)の保持を示す。PSA-EHTfアイソフォームは、リジン残基で置換された69番目のアスパラギン酸残基の後で短縮されたタンパク質(PSA-EHTf1、配列番号: 136)をコードしていた。配列番号: 37の56位のヌクレオチドはGであったが、Genbank参照配列はAを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。この突然変異は、ヒスチジン残基をアルギニン残基に置換する。

10

## 【0157】

PSA-EHTh (配列番号: 38):

このアイソフォームは、イントロン4内のクリプティックスプライス部位(5472位)の使用に起因した。このPSA-EHThアイソフォームは、PSA-EHTh1(配列番号: 137)又はPSA-EHTh2(配列番号: 138)に相当する2つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。配列番号: 38の79位、199位及び258位のヌクレオチドはC、C及びGであったが、Genbank参照配列はT、T及びAを示す。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。

20

## 【0158】

PSA-EHTj (配列番号: 39):

このアイソフォームは、イントロン4内の(5257位の)クリプティックスプライス部位の使用に起因した。このPSA-EHTjアイソフォームは、PSA-EHTj1(配列番号: 139)、PSA-EHTj2(配列番号: 140)又はPSA-EHTj3(配列番号: 141)に相当する3つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。

## 【0159】

PSA-EHTk (配列番号: 40):

このアイソフォームは、イントロン3の3'部分の保持、次いで短縮されたイントロン4(4337位~5516位)の保持を示した。このアイソフォームは、PSA-EHTk1(配列番号: 142)、PSA-EHTk2(配列番号: 144)又はPSA-EHTk3(配列番号: 144)に相当する3つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。

30

## 【0160】

PSA-EHTl (配列番号: 41):

このアイソフォームは、イントロン4内の4274位のクリプティック部位及びイントロン4内の4538位のもう一つのクリプティック部位を使用した。配列番号: 41の79位のヌクレオチドはCであったが、Genbank参照配列はTを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。PSA-EHTlは、PSA-EHTl1(配列番号: 145)、PSA-EHTl2(配列番号: 146)又はPSA-EHTl3(配列番号: 147)に相当する3つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。PSA-EHTl3において、この突然変異は、イソロイシン残基をトレオニン残基に置換した。

40

## 【0161】

PSA-EHTm (配列番号: 42):

このアイソフォームは、短縮されたイントロン1(1214~1755)の保持を示した。PSA-EHTmは、PSA-EHTm1(配列番号: 148)、PSA-EHTm2(配列番号: 149)又はPSA-EHTm3(配列番号: 150)に相当する3つの

50

リーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。

【0162】

PSA-EHTn (配列番号: 43):

このアイソフォームは、短縮されたイントロン1 (1366~1736)の保持を示した。PSA-EHTmは、PSA-EHTn1 (配列番号: 151)、PSA-EHTn2 (配列番号: 152)又はPSA-EHTn3 (配列番号: 153)に相当する3つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。

【0163】

PSA-EHTp (配列番号: 44):

このアイソフォームは、イントロン1内の(1240位の)クリプティックスプライス部位の使用に起因した。PSA-EHTpは、15位のイソロイシン残基を超えて付加的な27アミノ酸を有するタンパク質(PSA-EHTp1、配列番号: 154)をコードし得た。配列PSA-EHTp2 (配列番号: 155)を表す、これらの27アミノ酸は、切断後に放出され得た。

10

【0164】

PSA-EHTq (配列番号: 45):

このアイソフォームは、短縮されたイントロン2 (2740~3167位)の保持を示した。KLK2-EHTkは、KLK2-EHTq1 (配列番号: 156)又はKLK2-EHTq2 (配列番号: 157)に相当する2つのリーディングフレームのうちの1つを含むタンパク質をコードしていた。

20

【0165】

PSA-EHTr (配列番号: 46):

このアイソフォームは、短縮されたイントロン2 (2589~3199位)の保持を示した。PSA-EHTmは、PSA-EHTr1 (配列番号: 158)、PSA-EHTr2 (配列番号: 159)又はPSA-EHTr3 (配列番号: 160)に相当する3つのリーディングフレームのうちの1つを含むタンパク質をコードしていた。

【0166】

PSA-EHTs (配列番号: 47):

このアイソフォームは、短縮されたイントロン4 (4516~4889位)の保持を示した。配列番号: 47の54位、93位及び201~208位のヌクレオチドはC、A及びTGCCGCTGであったが、Genbank参照配列はT、G及びAG--GTGTを示すことが分かる。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。このアイソフォームは、PSA-EHTs1 (配列番号: 161)又はPSA-EHTs2 (配列番号: 162)に相当する2つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。PSA-EHTs1における54位の突然変異は、ロイシン残基をプロリン残基に置換した。

30

【0167】

PSA-EHTt (配列番号: 48):

このアイソフォームは、短縮されたイントロン4 (4727~5111位)の保持を示した。配列番号: 48の137位及び239位のヌクレオチドはG及びAであったが、Genbank参照配列はA及びGを示す。これらの違いは、これらの位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。このアイソフォームは、PSA-EHTt1 (配列番号: 163)又はPSA-EHTt2 (配列番号: 164)に相当する2つのリーディングフレームのうちの1つを有するタンパク質をコードしていた。

40

【0168】

PSA-EHTu (配列番号: 49):

このアイソフォームは、イントロン4内の(5056位の)クリプティック部位の使用に起因した。配列番号: 49の48位のヌクレオチドはTであったが、Genbank参

50

照配列はCを示す。この違いは、この位置における多形の存在、又は参照された配列におけるエラーによって説明され得るが、ポリメラーゼによって誘導された突然変異の可能性もあった。P S A - E H T mは、P S A - E H T u 1 (配列番号：165)、P S A - E H T u 2 (配列番号：166)又はP S A - E H T u 3 (配列番号：167)に相当する3つのリーディングフレームのうちの一つを有するタンパク質をコードしていた。P S A - E H T u 2における突然変異48は、アラニン残基をバリン残基に置換した。

#### 【0169】

C - ジャンクションオリゴヌクレオチドのマイクロアレイを使用したP S A及びK L K 2のアイソフォームの発現のバリデーション

本発明において記載されたP S A及びK L K 2のバリエーションの発現を、これらのバリエーションと特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドのマイクロアレイを使用して確立した。配列に基づき、P S A及びk l k 2のスプライスバリエーションは、異なる型の事象から生じる(図1)。

- ・「エキソスキッピング」：特異的(例えば、識別)オリゴヌクレオチドを、エキソン1 - エキソン3ジャンクションにより作出された配列と相補的であるよう設計した。
- ・イントロン保持：特異的オリゴヌクレオチドは、イントロン配列内に位置していた。
- ・オルタナティブ5'又は3'スプライス部位が使用される場合、識別オリゴヌクレオチドは、これらの新たなジャンクションのうちの一つと相補的である(即ち、それと対合する)よう設計された。
- ・オリゴヌクレオチドは、野生型のk l k 2及びP S Aのエキソン及びジャンクションにおいても作製された。

#### 【0170】

C1 - ジャンクションオリゴヌクレオチドのマイクロアレイの説明

この研究は、24及び25マーのオリゴヌクレオチド149個を作製することからなっていた。それらの配列を添付書類(表1)に示す。記載されたバリエーションにより作出された特異的ジャンクションからの付加的な「識別」オリゴヌクレオチド(配列番号：168 ~ 配列番号：220)が、特許請求の範囲に記載される。

#### 【0171】

各オルタナティブスプライシングを特徴決定するため、5個のオリゴヌクレオチドを使用した(図2参照)。1個のオリゴヌクレオチドは排除されるエキソンに特異的であり、長型の定量を可能にした。第二のオリゴヌクレオチドは、スプライシング事象に関与しない隣接エキソンのうちの一つに特異的であり、長型及び短型のRNAの定量を可能にした。最後に、3個のオリゴヌクレオチドはジャンクションに特異的であり；そのうち1個はスプライシング後に作成される新たな配列に特異的であり、スプライシングを受けた型の定量を可能にした。当然、その他のオリゴヌクレオチドの組み合わせ、とりわけ1個又は2個のオリゴヌクレオチドのみの使用も企図され得る。オリゴヌクレオチドの設計に関して、プローブが古典的に使用されるPCR産物プローブより短い場合には、これらのプローブが、設計の基となった遺伝子ではない遺伝子に非特異的にハイブリダイズしないことをチェックする必要がある。さらに、オリゴヌクレオチドが、ハイブリダイズする能力に干渉する可能性のある二次構造を有していないことを保証することが不可欠である。一般に、作成されたオリゴ全てが均一な熱力学的プロファイル、即ちT<sub>m</sub>(65)及び長さ(24又は25マー)を有する場合、それはチップにとって好ましい。さらに、合成中、オリゴヌクレオチドを、5'末へのNH<sub>2</sub>-C6基の付加により修飾し、柔軟性を促進し、ガラススライドをコーティングするために使用されるポリマーとの共有結合の形成を可能にすることができた。

#### 【0172】

ジャンクションオリゴヌクレオチドをより特異的に解明するため、それらは、理想的にはジャンクションの中央に存在するべきであるが、ジャンクションに関してシフトしたオリゴヌクレオチドの可能性も考慮した。

#### 【0173】

10

20

30

40

50

プライマーファインダー (Primer Finder) ソフトウェアを、オリゴヌクレオチドを設計するために選択した。選択した基準は、以下の通りである：

- %GC : 24マー及び30マーの場合40~60%、40マーの場合30~60%
- オリゴヌクレオチド濃度 : 50nM
- 塩濃度 : 50mM
- 「ヘアピン」二次構造又はホモダイマーを形成する傾向を有するオリゴヌクレオチドを無視

#### 【0174】

まず、本発明者らの技術をバリデートするため、クローニングされたアイソフォームを取り扱った(図3参照)。長アイソフォーム及び短アイソフォームを含有しているプラスミドを直鎖化した後、*in vitro*転写を行った。反応培地は、蛍光色素と化学的相互作用を形成するアミノアシル-UTPを含有していた。本発明者らは、Cy3で長アイソフォームを標識し、Cy5で短アイソフォームを標識することを選択した。RNAはハイブリダイゼーションを作成し得る多数の二次構造を有するため、化学的断片化工程がプロトコルに導入されることが要求された。精製後、アイソフォームを混合し、次いでガラススライド(3D Link、Motorola又はCodelink、Amersham)上にハイブリダイズさせた。

#### 【0175】

図4は、異なる遺伝子に対応するクローンのうちの2個で得られた結果を示す。この実験は、本発明者らのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの特異性をチェックするために実施された。本発明者らは、*in vitro*転写を使用してショウジョウバエ(*Drosophila*) RNAを増幅した。スライドを読み取るためのスキャナーを較正するため、外因性シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)コントロールをRNAへ導入した。次いで、ショウジョウバエRNAが、標的がハイブリダイズする配列を含有していないと仮定して、標識されたアイソフォーム(各アイソフォーム5ng)をショウジョウバエcRNAで希釈して、ハイブリダイゼーションの特異性をチェックすることを可能にする複雑な環境を作出した(バイオコンピュータ(biocomputational)分析)。ハイブリダイゼーション後、スライドをCy3チャンネル及びCy5チャンネルの両方で読み取った。各スポットの蛍光強度を測定し、中央値を計算することにより値を規準化した。各オリゴヌクレオチドを四つ組でスポットした。エキソン2、ジャンクション1-2及び2-3に相当するオリゴヌクレオチドを、クアントアレイ(Quant Array)により作成された画像上に赤色で出現する理由である、長型にのみハイブリダイズするよう設計した。ジャンクション1-3に特異的なオリゴヌクレオチドは、短型にのみハイブリダイズし、従って緑色で出現すると想像される。長アイソフォームと短アイソフォームの当モル混合物を使用したため、両画像の重ね合わせは、橙色スポットを示す。(アイソフォームを26pgに希釈することにより、チップの感度を決定するための類似の実験を実施した)。この実験は、規準化後、共通エキソンを考慮した場合、ハイブリダイゼーションの50%が長型によるものであったことを示している。エキソン2、ジャンクション1-2及び2-3を考慮した場合、ハイブリダイゼーションの90~100%が長型によるものであった。ジャンクション1-3に関しては、ハイブリダイゼーションの7%未満が、長型によるものであった。これらの実験は、オリゴの設計及びハイブリダイゼーションの特異性をバリデートする。この高度の特異性は、アイソフォームを定量するためにこの道具を使用することを可能するために重大である。

#### 【0176】

先の結果は、長アイソフォームと短アイソフォームの当モル混合物を使用して得られた。従って、次の段階の目標は、その道具が定量的であることを示すことであった(図5)。このため、本発明者らは、長型と短型を異なる蛍光色素で標識し、試料中の長型の量を20%ずつ増加させ0~100%に変動させた(x軸)。蛍光強度を規準化した後、共通エキソンで得られた値に基づき長型の%を測定し、それをy軸にプロットした。グラフに示されるように、測定された値は理論値に極めて近かった。

10

20

30

40

50

## 【0177】

これらの研究は、全て、スプライシングを受けたエクソン又はイントロン保持の発現を定性的にも定量的にも画定するために、オリゴアレイツールを使用することが可能であると予想され得ることを意味している。

## 【0178】

マイクロアレイを作るため、149個のオリゴヌクレオチド(24及び25マー)を設計した。これらのオリゴヌクレオチドを、150mMリン酸ナトリウムバッファーに25µMの濃度で取り上げた。次いで、オリゴヌクレオチドをガラススライド(Codelink、Amersham)上に担荷させ、そのスライドをNaCl中で加湿チャンバー内で16時間インキュベートした。次に、未使用の反応部位を、50mMエタノールアミン、0.1Mトリス、0.1%SDS(pH9)の溶液を使用してブロッキングした。次いで、それらを4×SSC/0.1%SDSの溶液で洗浄した。標的を、5×SSC、0.1%SDS、0.1mg/mlサケ精子DNAのバッファー中で、50の温度で、16時間ハイブリダイズさせた。次いで、増加するストリンジェンシーの洗浄条件を使用して、それらを洗浄した。

カバースリップを除去するため4×SSC  
2×SSC/0.1%SDS、50で5分間  
0.2×SSC、室温で5分間  
0.1×SSC、室温で5分間

## 【0179】

C2 - オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション能の決定

PSAとk1k2を識別するために使用されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション能及び特異性をチェックした。これを達成するため、本発明者らは、シアニン5で標識されたk1k2に対応するいくつかのアイソフォーム、及びシアニン3で標識されたPSAのいくつかのアイソフォームをプールした(図6)。次いで、cRNAを単一スライド上に共ハイブリダイズさせ、それを2つのチャンネルで読み取った。2つの画像を重ね合わせたところ、四つ組で適用され後に再設計された1つのオリゴを除き、PSAオリゴヌクレオチドとk1k2オリゴヌクレオチドとの間のクロスハイブリダイゼーションは存在しないことが明らかとなった。

## 【0180】

C3 - 患者からの腫瘍性試料及び健康試料における研究

通常不十分な生物学的材料が存在したため、本発明者らは、RNA増幅を活用した(図7)。第一工程は、スーパースクリプト(Superscript)IIを使用したオリゴdTの存在下でのmRNAの逆転写からなっていた。鋳型として用いられたRNAをRNaseHで分解し、第二鎖cDNA合成のためDNAポリメラーゼIにより使用され得るプライマーを残した。合成された断片をDNAリガーゼにより組み立てた。この工程の終了後、T7 DNAポリメラーゼにより認識される二本鎖DNA構造が形成された。この酵素は、メッセンジャーの配列に対応する鎖を増幅し、相補配列のプローブとハイブリダイズするcRNAの分子を合成する(mRNAセンス)。各患者について、2つの異なる蛍光色素で標識された(腫瘍性試料及び健康試料に対応する)標的8µgを単一スライド上で共ハイブリダイズさせた。蛍光強度を両チャンネルで測定し、ガラススライドの蛍光を読み取るための分析ソフトウェア(GeneTraffic)の全強度法(global intensity method)を使用して規準化した。図8は、患者のうちの1人から得られた2つの重ね合わせられた画像を示す。分析された他の患者3人についても類似の評価がなされ得る。蛍光シグナルは高品質であり、強度は一般に1,500より大きい。4人の患者からの腫瘍性試料及び良性試料から得られたシグナルの分析は、いくつかのアイソフォームがいくつかの患者においてディファレンシャルに発現されていることを証明した(図9)。

## 【0181】

C4 - 前立腺癌及び乳癌に由来する細胞系における研究

いくつかの実験において、前立腺癌細胞系及び乳癌細胞系におけるP S A及びK L K 2のアイソフォームの発現プロファイルを比較した。このため、本発明者らは、2個の前立腺癌細胞系(M d a 2 b及びL n C A P)及び4個の乳癌細胞系(M d a 2 3 1、T 4 7 D、M c f 7及びB T 5 4 9)からR N Aを増幅した。次いで、M d a 2 b系及びL n C A P系をシアニン3で、乳癌系をシアニン5で標識した後、各前立腺癌系を様々な乳癌系と共ハイブリダイズさせた。スライドを両チャンネルで読み取り、全強度法を使用してジーントラフィック(G e n e T r a f f i c)で蛍光強度を規準化した。研究を2つのハイブリダイゼーション群(各前立腺癌細胞系に1つずつ)に分割した。次いで、単一のハイブリダイゼーション群から少なくとも1つのハイブリダイゼーションにおいて脱制御された発現を有する識別オリゴヌクレオチドのリストを同定した。本発明者らは、0.66未満又は1.5超(即ち、 $-0.58 < \text{平均} \log_2 \text{比率} > 0.58$ )の計算された比率を有するオリゴを選択した。最も多数の識別オリゴヌクレオチドを含む最も顕著なディファレンシャル発現が観察されたM d a 2 b対T 4 7 D及びL n C A P対T 4 7 Dの分析の結果を提示することを選択した。ディファレンシャル発現は、15個のアイソフォームで観察され、そのうち3個(即ち、P S A - E H T 0 1 9、P S A - E H T j及びP S A - E H T l)が、乳癌由来系と比較して前立腺癌由来系において過剰発現していた。他の12個は、前立腺癌において過少発現していた(図10)。

10

## 【0182】

## C5 - 組織研究

これらの実験は、P S Aアイソフォーム及びK L K 2アイソフォームの組織特異的発現をチェックすることからなっていた。このため、本発明者らは、4つの組織：前立腺、心臓、腎臓及び腸を選択した。これらの4つの組織からR N Aを増幅し、前立腺からのシアニン3標識c R N Aを他の組織からのシアニン5標識c R N Aと共ハイブリダイズさせた。前立腺からのシアニン3標識c R N Aを、シアニン5標識前立腺c R N Aとも共ハイブリダイズさせた。スライドを両チャンネルで読み取り、全強度法を使用してジーントラフィック(G e n e T r a f f i c)で蛍光強度を規準化した。次に、これらの4つのハイブリダイゼーションのハイブリダイゼーション群において、少なくとも1つのハイブリダイゼーションにおいて脱制御された発現を有していた識別オリゴヌクレオチドのリストを同定した。本発明者らは、計算された比率が0.66未満又は1.5超(即ち、 $-0.58 < \text{平均} \log_2 \text{比率} > 0.58$ )であるオリゴヌクレオチドを選択した。それにより、試験された健康組織(前立腺、心臓、小腸及び腎臓)に依る、いくつかのP S A及びK L K 2のアイソフォームの脱制御された発現を示した。これらは、P S A - E H T 0 0 3、P S A - E H T 0 0 5、P S A - E H T 0 1 3、k l k 2 - E H T b、k l k 2 - E H T d、k l k 2 - E H T j、k l k 2 - E H T f及びk l k 2 - E H T l、P S A - E H T 0 1 9及びk l k 2 - E H T eであった(図11及び12)。

20

30

## 【0183】

## C6 - 得られたハイブリダイゼーションシグナルの要約

表3、4及び5は、健康組織(表3)、細胞系(表4)及び前立腺癌を有する患者からの組織(表5)を使用してオリゴヌクレオチドマイクロアレイで得られたハイブリダイゼーションシグナルを示す。バックグラウンドノイズの値の2倍より大きい値が示される(有意なハイブリダイゼーションを表す)。バックグラウンドノイズの値の2倍より小さい値は、略号# N Aにより表される。オリゴヌクレオチド配列番号：184、215及び220を除く識別オリゴヌクレオチド全てが、研究された系の少なくとも1つにおいて、有意なシグナルを生じたようである。従って、本発明において記載されたアイソフォームの発現は、このアプローチにより確認される。オリゴヌクレオチド配列番号：184と関連したP S A - E H T 0 2 3アイソフォームも、より高感度のP C Rアプローチを使用して検出されたことに注目すべきである(下記セクションD参照)。

40

## 【0184】

結論として、本発明において記載されたアイソフォームの大部分が、実際に、研究されたモデルのうちの1つにおいて発現しているようである。組織特異的発現及び腫瘍特異的

50

発現も証明された。

【0185】

D - PCRによるPSA及びKLK2のアイソフォームの発現のバリデーション

PCRジャンクション法を使用して、いくつかのアイソフォームの存在を示した。原理は、既に記載されたオルタナティブスプライシング事象に起因する新たなジャンクションに特異的に向けられたオリゴヌクレオチドを使用したアイソフォームの特異的増幅に基づく。増幅は、各患者の前立腺からの良性エリア及び腫瘍性エリアの両方からのRNAを使用して、そしてプラスミドコントロールも使用して実施される。

【0186】

PCR増幅の結果は、図13に示される。矢印は、予想サイズのバンドを示す。所望の結果は、wtコントロールは陰性である、即ち野生型プラスミドを使用した場合にはアイソフォームのサイズの特異的増幅が存在しない、T（腫瘍）プール及びN（正常）プールにおけるアイソフォームの特異的増幅である。クローニングされたアイソフォームを有するプラスミドを、増幅のための陽性コントロールとして使用する。

【0187】

【表4】

アイソフォーム	図面の番号	結論
PSA-EHT003	A	PSA-003プラスミドを使用した、予想されたサイズ及び配列のアンプリコン 予想されるアイソフォームのサイズに相当しないwtプラスミドの非特異的増幅 両プールにおける、アイソフォームについて予想されるサイズのみ陽性増幅
PSA-EHT023	B	PSA-023プラスミドを使用した、予想されたサイズ及び配列のアンプリコン 予想されるアイソフォームのサイズに相当しないwtプラスミドの非特異的増幅 両プールにおける、アイソフォームについて予想されるサイズのみならず、wtプラスミドで得られるサイズも陽性増幅
PSA-EHT012	C	予想されるアイソフォームのサイズに相当しないwtプラスミドの非特異的増幅 両プールにおける、アイソフォームについて予想されるサイズのみ陽性増幅

【0188】

結論として、この方法も、前立腺組織におけるいくつかのアイソフォームの存在を証明するために使用され得る。PCRは、マイクロアレイ技術より高感度であり、とりわけ、PSA-EHT012の発現を明らかにした。

【0189】

E - 抗体作製及びタンパク質発現

いくつかのアイソフォームに特異的なポリクローナル抗体を、本発明において記載されたバリエーションのうちいくつかによりコードされたタンパク質の存在を決定するため、作製した。これらの抗体を、対応するタンパク質の発現を検出するためウェスタンブロットにおいて使用した。

【0190】

抗体作製及びタンパク質発現

全てのペプチド及び抗体が、ユーロジェンテック（Eurogentec）（ベルギー）により作製された。図14に記載された配列に相当するペプチド20～30mgが、70

%超の純度で、Fmoc化学を使用して合成された。免疫応答を誘導するため、MBS (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)又はグルタルアルデヒドを使用して、KLHが各ペプチド5mgとコンジュゲートさせられた。2匹のウサギ (SPFニュージーランドホワイトウサギ)が、コンジュゲートしたペプチド200mgで免疫感作された。最初の注射は、フロイント完全アジュバントを用いて実施され、その後の注射はフロイント不完全アジュバントで実施された。0、14、28及び56日目の注射及び0、38及び66日目の血清収集を含む、標準的なプロトコルが使用された。最後の採血は87日目に行われた。血清中の抗体力価がELISAにより測定された(図15)。抗原、合成ペプチド又はKLHが、ELISAプレートのウェルに担荷させられた(PBS中100ng、4、16時間)。飽和(BSA1mg/ml、25、2時間)の後、血清の段階希釈物(免疫前: PPI、最初の採集からの血清: PPI及び第二の採集からの血清: GP)を25で2時間インキュベートした。HRP/OPD系を使用して抗体結合を示し、492nmにおける光学密度を測定した。選択されたエピトープについて得られた力価は、満足のゆくものであった。

10

20

30

40

#### 【0191】

##### ウェスタンブロット分析

溶解バッファー(50mMトリスpH=7.5、5mM EGTA、150mM NaCl、1%トリトン50mM NaF、プロテアーゼ阻害剤(Roche))を使用して、組織及び細胞系からタンパク質抽出物を調製した。抽出物をブラッドフォード法を使用して定量した。組織を使用した場合には、抽出物20µgをポリアクリルアミド-SDSゲルに担荷させた。血清を使用した場合には、非精製血清の50分の1希釈物又は精製血清の8分の1希釈物15µlを使用した(Aurum BioRadキット、番号732-6701)。変性条件下での電気泳動の後、分離されたタンパク質をPVDFメンブレンに移した。次いで、メンブレンの、特異的に作製されたポリクローナル抗体(先のセクション参照)とのインキュベーションにより、PSA及びKLK2のバリエーションを検出した。洗浄後、メンブレンを、ペルオキシダーゼHRPで標識された二次抗免疫グロブリン抗体(希釈率1/5000)と共にインキュベートした。次いで、バンドを、ECL検出(Amersham)を使用して可視化した。

#### 【0192】

##### EHT-SE3962抗体

この抗体は、KLK2-EHT004バリエーション及びKLK2-EHT006バリエーションに共通のエピトープから作成された。これらの2つのバリエーションについて予想されるサイズは、17kD(KLK2-EHT006)及び10kD(KLK2-EHT004)であった。血清試料を使用したところ、予想サイズに移動する2つのバンドが観察され得た(図16)。増加する用量の、選択されたエピトープに相当する合成ペプチドにより置換されたため、抗体はこれらのバンドを特異的に認識するようである(図16D)。異なる血清試料間には不均一性が観察された。全PSA濃度との明白な相関は観察されなかった(図16A)、B)及びC))

#### 【0193】

##### EHT-SE3963抗体

この抗体は、PSA-EHT021に対応するジャンクションエピトープに対して産生された(予想サイズ: 20kD)。およそ22、25及び40kDの分子量を有する3つのバンドが、前立腺組織を使用して観察された(図17)。最低分子量を有するバンドが、PSA-EHT021に対応するかもしれない。25kDバンドは、PSA-EHT021に関連した2つのスプライシング事象のうちの一つを有するものとして既に記載されたバリエーションに対応し得る(Tanakaら、2000)。

#### 【0194】

## 【表 5】

## 参考文献

David et al. (2002) *J. Biol. Chem*

Riegman et al (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 181-188.

Riegman et al (1991) *Mol. Cell. Endocrinol.* **76**, 181-190.

Liu et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 833-839

10

Heuze et al. (1999) *Cancer Res.* **59**, 2820-2824.

Heuzé-Vourc'h et al. (2001) *Eur J Biochem.* **268**, 4408-4413.

Heuzé-Vourc'h et al. (2003) *Eur J Biochem.* **270**, 706-714

Meng et al. (2002) *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **11**, 305-309.

Tanaka et al (2000) *Cancer Res.* **60**, 56-59.

Young et al. (1992) *Biochemistry* **31**, 818-824.

20

【 0 1 9 5 】

【表 6】

表 1

名称 :	配列 (5' - 3')	配列番号 :
PSA-exon1- wt	GTTGTCTTCCTCACCCCTGTCCGTG	
PSA-exon2- wt	AGTGCGAGAAGCATTCCCAACCCT	
PSA-exon2bis- wt	AGGTGCTTGTGGCCTCTCGTGGCA	
PSA-exon3- wt	ACGATATGAGCCTCCTGAAGAATC	
PSA-exon4- wt	CTTGACCCCAAAGAACTTCAGTG	
PSA-exon5- wt	AATGGTGTGCTTCAAGGTATCACG	
PSA-jctex1-2- wt	TGACGTGGATTGGCGCTGCGCCCC	
PSA-jctex2-3- wt	CTGCATCAGGAACAAAAGCGTGAT	
PSA-jctex3-4- wt	AACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAA	
PSA-jctex4-5- wt	AGCACCTGCTCGGGTGATTCTGGG	
PSA-jct-ex-int1wt	TGACGTGGATTGGTGAGAGGGGCC	
PSA-jct-ex-int2wt	CCCCCTCTGCAGGCGCTGCGCCCC	
PSA-jct-ex-int3wt	CTGCATCAGGAAGTGAGTAGGGGC	
PSA-jct-ex-int4wt	CTTCCTCCCCAGCAAAGCGTGAT	
PSA-jct-ex-int5wt	AACCAGAGGAGTGTACGCCTGGGC	
PSA-jct-ex-int6wt	CCTGGCCCCGTAGTCTTGACCCCAA	
PSA-jct-ex-int7wt	AGCACCTGCTCGGTGAGTCATCCC	
PSA-jct-ex-int8wt	TTTTACCCTTAGGGTGATTCTGGG	
PSA-intron 1	CTCTTTTCTGTCTCTCCAGCCCC	
PSA-intron 2	AGAGAGGGAAAGTTCTGGTTCAGG	
PSA-intron 2bis	GGGAGCGAAGTGGAGGATAACAAC	
PSA-intron 4	CCGTGTCTCATCTCATTCCCTCCT	
PSA-001-int-int	CCAGCACCCAGCTCCAGCTGCT	168
PSA-001-int3'	CCAACCTATCCCAGAGACCTTGA	
PSA-001-int3'bis	AGGATACCCAGATGCCAACCAGAC	
PSA-003-int-int	CCATACCCAGCCCCCTCCACTT	169
PSA-003-int3'	GCCCCCAATCCTATCACAGTCTA	
PSA-004-jctex1-int	GTGACGTGGATTGCTGTGAGTGTC	170
PSA-004intron1	GACACCTCCTTCTTCCTAGCCAGG	
PSA-005-jct-int1-int1	AGGCTCTTCCCCCAACCCTATC	171
PSA-008-jctex1-int	GTGACGTGGATTGGATACCCAGAT	172
PSA-009-jct-int2-int2	TCCGCCCTTATTCCATTCTTTCT	173
PSA-009-int3'	GAGGCGCAGAGAAGGAGTGGTTCC	
PSA-009-int3'bis	GAGACACAGAGAAGGGCTGGTTCC	
PSA-010-jct-ex1-ex2	TGACGTGGATTGGTGCTGCACCCC	
PSA-0012-jctex2-int2	GCATCAGGAATCTCCATATCCCC	174

10

20

30

40

PSA-012-int3'	TCACCTGTGCCTTCTCCCTACTGA	
PSA-013-jct-int1-ex1	TGACGTGGATTGCACCCCTCTGC	175
PSA-013-int3'	GGCATTTCCTCCAGGATAACCTCT	
PSA-014-int3'	GGACTGGGGGAGAGAGGGAAAGTT	
PSA-015-ex1-ex2	GTCTTCCTCACCTGAGCTTGTGG	176
PSA-015-ex1-ex2bis	CTTCCTCACCTGAGCTTGTGGCC	177
PSA-016-ex1-ex2	TGACGTGGATTGGGCAGTCTGCGG	178
PSA-018-jct-int2-int2	GAGAAAAGAAAGGACCTGGGGAG	179
PSA-018-jct-ex1-ex2	TGACGTGGATTGGAGCTGCGCCCC	
PSA-018-int3'	GAAGTGGAGGATAACAACCTTGGGC	
PSA-019-ex3	CAGTCTGTTTCATCCTGAAGACAC	
PSA-019-jct-ex4-5	AGCACCTGCTGGGGTGATTCTGGG	
PSA-019-jct-ex3	ATTTTCAGGTCAGCCTGCCGAGATC	180
PSA-020-jct-ex3	CTGCATCAGGAAGCCAGGTGATGA	
PSA-020-jct-ex4-ex5	AGCACCTGCTAGGGTGATTCTGGG	
PSA-020-ex3	GTGATGACTCCAGCCACGACCTCA	
PSA-021-jct-ex3	CTGCATCAGGAAGCCAGGTGATGA	181
PSA-021-jct-ex3-2	GTGATGACTCCAGCATTGAACCAG	182
PSA-022-ex3	TGATGACTCCAGCATTGAACCAGA	
PSA-023-jct-ex2	GTCTCGGATTGTCTCTCGTGGCAG	183
PSA-023-jct-ex5	AATGGGGTGCTTCAAGGTATCACG	
PSA-023-jct-in3-ex4	CTGGGCCAGATGTCTTGACCCCAA	184
PSA-025-jct-ex2-ex4	TGCATCAGGAATCTTGACCCCAAAG	185
PSA-026-jct-ex3	TTGCTGGGTCAGCATTGAACCAGA	186
PSA-027-jct-ex3-ex5	ATCTTGCTGGGTCCGGTGATTCTG	187
PSA-027-jct-ex3-ex5bis	CTTGCTGGGTCCGGTGATTCTGGG	188
PSA-001-jct-int1	CCAGCACCCAGCTCCCTGCTCCC	
PSA-d-jct-ex2-ex3	CTGCCACTGCACCTGCTACGCCT	189
PSA-d-exon3	GGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGT	
PSA-f-jct-int5'	TTGGTAACTGGCTTCGGTTGTGTC	
PSA-f-jct-int2	CCCTCTCTTCTCTGTCTCACCTGTG	190
PSA-g-jct-ex2-int2	CTGCATCAGGAATCTCCATATCTC	
PSA-g-jct-ex2-int2bis	GCATCAGGAATCTCCATATCTCCC	
PSA-h-jct-ex4-int4	AGCACCTGCTCGGAGCTGGACCCT	191
PSA-h-jct3'	GGAAGTCTATCTGTTATCTGCCTG	
PSA-h-exon5bis	TGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGG	
PSA-j-jct-ex4-int4	AAGCACCTGCTCGTGGGTCAATTCT	192
PSA-k-jct-ex4-int4	CACCTGCTCGGTGAGTCATCCCTA	193
PSA-k-jct-int4	GAGTCATCCCTACCCCTCTGTGG	
PSA-l-jct-ex4-int4	AGAAGGTGACCAAGTTCAGCACAC	194

10

20

30

40

PSA-l-jct-int3'	AGGAACAGGGACCACAACACAGAA	
PSA-m-int1-5'	GATGCTTGGCCTCCCAATCTTGCC	
PSA-m-jct-int1	ACCCAGATGCCACCAGCCACCAAC	195
PSA-n-int1-5'	GCCAACCAGACACCTCCTTCTTCC	
PSA-n-jct-int1	CCTTAGGAAAAACATGAAGCCTCT	196
PSA-p-jct-ex1-int1	GTGACGTGGATTGCCAGGCTATCT	197
PSA-q-jct-int5'	CCAAC TGGTGAAACCCCATCTCTA	
PSA-q-jct-int2	AAAATTAGCCAGGCTACCTACCCA	198
PSA-r-jct-int2	CCCTGAGAAAAGCCGCATCTACAG	199
PSA-r-jct-int3'	CATCTACAGCTGAGCCACTCTGAG	
PSA-s-jct-int4	GGTTATTCTTACAGCAGAGAGGAGG	200
PSA-s-jct-int3'	GAGTCAGGAAC TGTGGATGGTGCT	
PSA-t-jct-int5'	TGGGACATAGCAGTGAACAGACAG	
PSA-t-jct-int4	GCTCTCAGGGAGGGCAGCAGGGAT	201
PSA-u-jct-int4-ex5	GGCCTGGCTCAGGGTGATTCTGGG	202
KLK-2-exon1-wt	GTTCTCTCCATCGCCTTGTCTGTG	
KLK-2-exon2-wt	AGTGTGAGAAGCATTCCCAACCCT	
KLK-2-exon2bis-wt	GTACAGTCATGGATGGGCACACTG	
KLK-2-exon3-wt	CTGAAGCATCAAAGCCTTAGACCAG	
KLK-2-exon4-wt	CCAGGAGTCTTCAGTGTGTGAGCC	
KLK-2-exon5-wt	CACTTGTCTGTAATGGGGTGCTTC	
KLK2-jctex1-2- wt	TGGGGTGC ACTGGTGCCGTGCCCC	
KLK2-jctex2-3- wt	ATTGCCTAAAGAAGAATAGCCAGG	
KLK2-jctex3-4- wt	AACCAGAGGAGTCTTGCGCCCCA	
KLK2-jctex4-5- wt	AGACACTTGTGGGGTGATTCTGG	
KLK2-intron1-wt	ACAGTTCAGCCCAGACAATGTGCC	
KLK2-intron2-wt	AGACACAGGGAGGGCTGGTTTCAG	
KLK2-intron3-wt	AGCCCAGTTTTTCTCTGACCCATA	
KLK2-intron4-wt	GGGAAGCAGCAGTGAACAGGTAGA	
KLK2-jct-ex-int1wt	TGGGGTGC ACTGGTGAGATTGGGG	
KLK2-jct-ex-int2wt	CCCCCTCCGCAGGTGCCGTGCCCC	
KLK2-jct-ex-int3wt	TTGCC TAAAGAAGTAAGTAGGACC	
KLK2-jct-ex-int4wt	CTTCTCCCCAGGAATAGCCAGGT	
KLK2-jct-ex-int6wt	TCTGACCCATAGTCTTGCGCCCCA	
KLK2-jct-ex-int7wt	GACACTTGTGGGGTGAGTCATCCC	
KLK2-jct-ex-int8wt	CTTTACCCTTAGGGTGATTCTGGG	
KLK2-002-jct-int2-ex3	TCACTTCTCAGGAATAGCCAGGTC	203
KLK2-002-jct-ex3-ex4	GATGTTGTGAAGGAGTCTTCAGTG	204

10

20

30

40

KLK2-002-ex4	AGCCTCCATCTCCTGTCCAATGAC	
KLK2-003-exon5	CACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTC	
KLK2-003-jct-ex1-ex3	TGGGGTGCCTGGAATAGCCAGGT	205
KLK2-003-jct-int4-ex5	CTGGAGGGGAAAGGGTGATTCTGG	206
KLK2-004-jct-ex2-ex4	TTGCCTAAAGAATCTTGCGCCCA	207
KLK2-004-int4	AACATCTGGAGGGGAAAAGTGAGT	
KLK2-005-int4	AACATCTGGAGGGGAAAAGTGAGT	
KLK2-008-ex4	ATCCTCCATCTCCTGTCCAATGAC	
KLK2-008-jct-ex3-ex4	GAACCAGAGGAGTGAGTCTTCAGC	
KLK2-009-jct-ex3-ex4	GAACCAGAGGAGTGAGTCTTCAGT	208
KLK2-009-jct-ex3	TGAAGACTCCAGCATCGAACCAGA	209
KLK2-009-ex4	CTTCAGTGTGTGAGCCTCCATCTC	
KLK2-011-jct-ex3-ex4	AACCAGAGGAGTGGTAAAGACACT	210
KLK2-011-jct-ex4-int4	AGACACTTGTGGGGTGAGTCATCC	
KLK2-a-exon3	ATGAGCCTTCTGAAGCATCAAAGC	
KLK2-a-exon3bis	CCCACACCCGCTCTACAATATGAG	
KLK2-b-jct-int1	CTGACTCTTCCCCCGAGGCTATCT	211
KLK2-b-jct-int3'	ACTCTTTGCCCCAGACCCGTCATT	
KLK2-c-jct-int1	TGGGGTGCCTGACCCGTCATTCA	212
KLK2-d-jct-int5'	GCGGGTTCTGACTCTTATGCTGAA	
KLK2-d-jct-int1	CAGCCTCGTCCCCCAACCACAAC	213
KLK2-e-ex2	CAGTCATGGATGGGCACACTGTGG	
KLK2-e-ex2-140nt?	TAGTGGAAACCCTGCTATCTGCCGA	214
KLK2-e-jct-140nt?-ex3	TTTTCTCAGGAATAGCCAGGTCTG	215
KLK2-f-jct-ex2-int2	GATGGGCACACTCCTGTTTTCTAA	216
KLK2-f-jct3'	CCTTTCCCCATTTTCTCTCTCCTC	
KLK2-g-ex5	CACTTGTCTGTAATGGGTGCTTCA	
KLK2-g-int4	AGTCATCCCTACTCCCAACATCTG	
KLK2-h-jct3'	GAGTCTTCAGTGTGTGAGCCTCCA	
KLK2-h-jct3'bis	GTCCAATGACATGTGTGCTAGAGC	
KLK2-i-ex4	ACAGGTGGTAAAGACACTTGTGGG	
KLK2-j-jct-int3'	CTGCTACTCCACACTCCTCAGATG	
KLK2-j-jct-int2	ACATCCCTCCACCTCATGCCTCT	217
KLK2-k-jct-int5'	AGTCTCTCCCTCCACTCCATTCT	218
KLK2-k-jct-int5'-6nt-ex5	CCTGCCGATGGCCACTTGTCTGT	219
KLK2-l-jct-int2-ex3	CCCCAGCTGCAGGAAATAGCCAGGT	220

10

20

30

40

【表 7】

表 2

アイソフォーム	オリゴヌクレオチド対
KLK2-EHT002	249 / 166
KLK2-EHT003	249 / 170
KLK2-EHT004	249 / 174
KLK2-EHT006	249 / 166
KLK2-EHT007	249 / 174
KLK2-EHT009	249 / 166
KLK2-EHT011	249 / 174
KLK2-EHTb	163/213
KLK2-EHTc	163/213
KLK2-EHTd	163/213
KLK2-EHTe	167/172
KLK2-EHTf	167/172
KLK2-EHTj	214/215
KLK2-EHTk	218/170
KLK2-EHTl	221/172
PSA-EHT001	247 / 203
PSA-EHT003	247 / 203
PSA-EHT004	247 / 203
PSA-EHT005	247 / 203
PSA-EHT007	247 / 203
PSA-EHT008	247 / 203
PSA-EHT009	247 / 207
PSA-EHT012	247 / 205
PSA-EHT013	247 / 176
PSA-EHT015	247 / 176
PSA-EHT016	247 / 176
PSA-EHT018	247 / 207
PSA-EHT019	247 / 248
PSA-EHT021	247 / 248
PSA-EHT022	247 / 182
PSA-EHT023	247 / 182
PSA-EHT025	247 / 248
PSA-EHT026	247 / 248
PSA-EHT027	247 / 182
PSA-EHTa	175/203
PSA-EHTd	179/178
PSA-EHTf	179/205
PSA-EHTh	181/182
PSA-EHTj	181/182
PSA-EHTk	181/182

10

20

30

40

PSA-EHTI	181/209
PSA-EHTm	200/201
PSA-EHTn	200/201
PSA-EHTp	202/203
PSA-EHTq	204/207
PSA-EHTr	204/207
PSA-EHTs	208/211
PSA-EHTt	208/211
PSA-EHTu	210/182

【 0 1 9 7 】

【表 8】

表 3

オリゴヌクレオチド	配列 番号	前立腺/心臓		前立腺/肝臓		前立腺/前立腺		前立腺/小腸	
		LEX.E - BG	LEX.R Norm.	LEX.E - BG	LEX.R Norm.	LEX.E - BG	LEX.R Norm.	LEX.E - BG	LEX.R Norm.
PSA-exon1- wt		10 136	9 449	7 214	7 071	8 719	7 071	8 437	9 909
PSA-exon2- wt		13 504	2 364	10 925	1 629	15 466	1 629	12 303	4 372
PSA-exon2bis- wt		5 494	2 823	3 518	3 028	7 242	3 028	5 181	4 738
PSA-exon3- wt		31 201	3 591	13 479	2 223	22 239	2 223	17 496	4 698
PSA-exon4- wt		#N/A	#N/A	7 992	804	9 684	804	9 986	2 222
PSA-exon5- wt		22 907	1 889	20 521	1 829	33 673	1 829	26 242	5 875
PSA-ictex1-2- wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1 485	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-ictex2-3- wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	7 965	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-ictex3-4- wt		#N/A	#N/A	19 379	950	25 253	950	23 869	3 585
PSA-ictex4-5- wt		14 547	4 663	12 590	3 938	17 187	3 938	14 546	7 193
PSA-ict-ex-int1wt		1 027	1 745	924	1 398	807	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-ict-ex-int2wt		#N/A	#N/A	677	1 804	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-ict-ex-int3wt		1 513	3 753	1 341	3 075	1 275	3 075	1 130	2 026
PSA-ict-ex-int4wt		1 598	1 817	1 088	1 573	842	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-ict-ex-int5wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1 087	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-ict-ex-int6wt		#N/A	#N/A	1 010	786	943	786	#N/A	#N/A
PSA-ict-ex-int7wt		#N/A	#N/A	3 902	830	4 030	830	#N/A	#N/A
PSA-ict-ex-int8wt		#N/A	#N/A	1 843	803	3 146	803	#N/A	#N/A
PSA-intron 1		6 634	15 678	3 658	6 958	2 399	#N/A	2 476	4 832
PSA-intron 2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-intron 2bis		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-intron 4		#N/A	#N/A	960	1 214	786	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-001-int-int	168	2 092	1 956	1 747	2 767	1 212	#N/A	1 221	1 993
PSA-001-int3'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	680	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-001-int3'bis		1 337	1 779	924	906	1 060	906	#N/A	#N/A

10

20

30

40

PSA-003-int-int	169	18 443	37 922	13 312	22 526	9 648	#N/A	#N/A	9 956	19 286
PSA-003-int3'		2 243	1 764	1 539	1 457	1 327	1 457	1 457	1 240	2 643
PSA-004-jctex1-int	170	#N/A	#N/A	822	954	879	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-004-intron1		6 720	25 324	3 446	11 026	2 074	11 026	11 026	2 771	6 330
PSA-005-jct-int1-int1	171	7 522	20 800	4 894	14 936	2 421	#N/A	#N/A	2 490	5 722
PSA-008-jctex1-int	172	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	710	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-009-jct-int2-int2	173	17 473	13 828	10 188	12 716	9 302	#N/A	#N/A	12 859	22 063
PSA-009-int3'		#N/A	#N/A	680	899	#N/A	899	899	#N/A	#N/A
PSA-009-int3'bis		#N/A	#N/A	863	1 180	765	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-010-jct-ex1-ex2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	2 617	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-0012-jctex2-int2	174	791	2 114	611	1 908	#N/A	2 189	2 189	#N/A	#N/A
PSA-012-int3'		47 778	120 575	17 806	65 227	18 078	65 227	65 227	22 707	67 915
PSA-013-jct-int1-ex1	175	15 653	95 691	10 657	48 699	7 936	#N/A	#N/A	6 554	22 783
PSA-013-int3'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	775	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-014-int3'		1 854	4 464	1 553	3 710	1 297	4 652	4 652	1 218	2 355
PSA-015-ex1-ex2	176	3 217	2 963	2 402	2 851	2 569	2 851	2 851	2 184	2 789
PSA-015-ex1-ex2bis	177	3 252	2 277	2 463	3 040	2 085	#N/A	#N/A	1 657	2 530
PSA-016-ex1-ex2	178	#N/A	#N/A	882	727	1 295	727	727	#N/A	#N/A
PSA-018-jct-int2-int2	179	#N/A	#N/A	659	780	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-018-jct-ex1-ex2		#N/A	#N/A	1 925	779	3 457	779	779	2 749	1 876
PSA-018-int3'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-019-ex3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	6 126	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-019-jct-ex4-5		8 830	3 451	3 594	2 166	6 349	2 166	2 166	5 830	2 743
PSA-019-jct-ex3	180	#N/A	#N/A	1 443	726	1 516	726	726	#N/A	#N/A
PSA-020-jct-ex3		#N/A	#N/A	1 160	774	1 187	774	774	#N/A	#N/A
PSA-020-jct-ex4-ex5		5 525	2 045	4 051	1 696	6 248	1 696	1 696	5 287	3 130
PSA-020-ex3		15 229	2 166	8 244	1 921	11 202	1 921	1 921	9 939	3 147
PSA-021-jct-ex3	181	#N/A	#N/A	1 160	774	1 187	774	774	#N/A	#N/A
PSA-021-jct-ex3-2	182	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1 286	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-022-ex3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	965	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-023-jct-ex2	183	#N/A	#N/A	824	814	938	814	814	#N/A	#N/A

PSA-023-jct-ex5		22 666	2 959	5 976	1 541	17 888	1 541	13 759	3 341
PSA-023-jct-in3-ex4	184	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	710	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-025-jct-ex2-ex4	185	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1 161	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-026-jct-ex3	186	#N/A	#N/A	1 217	980	1 218	980	#N/A	#N/A
PSA-027-jct-ex3-ex5	187	#N/A	#N/A	2 106	904	3 105	904	#N/A	#N/A
PSA-027-jct-ex3-ex5bis	188	3 506	5 270	2 711	3 814	4 271	3 814	3 798	3 896
PSA-001-jct-int1		9 313	12 287	7 218	9 436	4 266	#N/A	4 167	9 493
PSA-d-jct-ex2-ex3	189	12 726	7 316	8 521	8 517	6 923	8 517	5 764	5 523
PSA-d-exon3		22 046	2 136	6 998	1 321	17 960	1 321	17 581	3 395
PSA-f-jct-int5'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	585	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-f-jct-int2	190	2 322	1 741	1 677	2 099	1 292	#N/A	1 406	3 352
PSA-g-jct-ex2-int2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-g-jct-ex2-int2bis		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-h-jct-ex4-int4	191	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1 412	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-h-jct3'		#N/A	#N/A	2 564	674	2 855	674	#N/A	#N/A
PSA-h-exon5bis		20 025	1 950	12 838	1 304	21 421	1 304	12 938	2 485
PSA-j-jct-ex4-int4	192	10 828	4 375	3 320	4 091	5 871	#N/A	5 376	2 563
PSA-k-jct-ex4-int4	193	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	830	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-k-jct-int4		7 596	28 023	5 453	14 512	3 723	#N/A	3 299	6 639
PSA-l-jct-ex4-int4	194	#N/A	#N/A	4 924	700	5 261	700	#N/A	#N/A
PSA-l-jct-int3'		#N/A	#N/A	770	787	726	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-m-int1-5'		15 735	17 573	6 677	9 630	9 745	9 630	14 172	29 222
PSA-m-jct-int1	195	2 687	2 869	2 018	2 678	1 242	#N/A	1 130	1 896
PSA-n-int1-5'		5 205	23 386	3 269	9 307	2 014	#N/A	2 150	4 770
PSA-n-jct-int1	196	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-p-jct-ex1-int1	197	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-q-jct-int5'		54 860	24 878	56 601	58 160	53 021	#N/A	53 040	107 366
PSA-q-jct-int2	198	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-r-jct-int2	199	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	5 326	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-r-jct-int3'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A

PSA-s-jct-int4	200	1 297	2 262	1 276	2 275	1 138	#N/A	1 026	1 905
PSA-s-jct-int3'		#N/A	#N/A	895	825	1 021	825	#N/A	#N/A
PSA-t-jct-int5'		#N/A	#N/A	681	643	688	643	#N/A	#N/A
PSA-t-jct-int4	201	1 750	3 107	1 497	2 929	1 155	2 929	1 403	2 632
PSA-u-jct-int4-ex5	202	2 534	1 898	2 314	1 804	4 007	1 804	2 913	2 837
KLK-2-exon1-wt		3 774	1 867	2 501	1 499	3 298	1 499	2 533	2 440
KLK-2-exon2-wt		20 150	3 566	9 082	1 632	14 005	1 632	11 966	4 616
KLK-2-exon2bis-wt		#N/A	#N/A	2 062	850	3 789	850	3 381	1 878
KLK-2-exon3-wt		#N/A	#N/A	9 886	722	10 309	722	9 742	1 784
KLK-2-exon4-wt		#N/A	#N/A	2 337	755	3 191	755	#N/A	#N/A
KLK-2-exon5-wt		5 472	1 665	2 236	857	7 166	857	6 254	1 931
KLK2-jctex1-2-wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1 142	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-jctex2-3-wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	4 569	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-jctex3-4-wt		#N/A	#N/A	14 928	1 179	18 564	1 179	13 927	2 078
KLK2-jctex4-5-wt		4 945	1 842	1 999	927	5 223	927	3 967	2 031
KLK2-intron1-wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-intron2-wt		1 684	3 126	1 199	1 912	1 017	#N/A	1 181	2 105
KLK2-intron3-wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	682	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-intron4-wt		1 321	1 875	1 058	1 536	1 121	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-jct-ex-int1wt		1 120	2 973	874	1 844	1 165	1 844	997	1 748
KLK2-jct-ex-int2wt		2 065	2 380	1 441	2 309	1 399	#N/A	1 157	1 741
KLK2-jct-ex-int3wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-jct-ex-int4wt		1 403	1 869	796	1 194	771	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-jct-ex-int6wt		#N/A	#N/A	842	758	996	758	#N/A	#N/A
KLK2-jct-ex-int7wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1 530	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-jct-ex-int8wt		#N/A	#N/A	2 712	760	3 004	760	#N/A	#N/A
KLK2-002-jct-int2-ex3	203	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-002-jct-ex3-ex4	204	#N/A	#N/A	614	1 601	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-002-ex4		10 470	9 254	6 981	8 205	7 849	#N/A	7 018	6 964

10

20

30

40



KLK2-jct-int3'	1 630	3 787	841	1 623	807	1 623	#N/A	#N/A
KLK2-jct-int2	10 127	31 847	5 790	16 169	3 866	16 169	3 556	12 265
KLK2-k-jct-int5'	7 637	9 184	5 059	8 653	3 328	#N/A	3 431	6 262
KLK2-k-jct-int5'-6nt-ex5	6 410	8 657	2 982	1 814	7 068	1 814	4 115	2 751
KLK2-jct-int2-ex3	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A

【 0 1 9 8 】

10

20

30

40

【表 9】

表 4

オリゴヌクレオチド	配列番号	PSA-Mda2bvBT549		PSA-Mda2bvMcf7		PSAMda2bvMda231		PSA-Mda2bvT47D	
		LEX.E - BG	LEX.R Norm.	LEX.E - BG	LEX.R Norm.	LEX.E - BG	LEX.R Norm.	LEX.E - BG	LEX.R Norm.
PSA-exon1- wt		2 320	4 154	6 065	7 928	7 080	9 202	12 711	19 864
PSA-exon2- wt		3 143	1 508	10 772	4 176	11 062	5 691	13 314	6 169
PSA-exon2bis- wt		1 429	2 836	5 771	7 314	6 065	8 228	7 725	9 444
PSA-exon3- wt		5 517	2 617	20 290	7 155	26 160	8 914	36 486	13 025
PSA-exon4- wt		3 726	1 282	10 419	2 975	10 145	2 911	15 418	5 159
PSA-exon5- wt		7 179	2 515	27 572	7 422	25 909	8 475	29 812	9 715
PSA-jctex1-2- wt		#N/A	#N/A	1 098	1 069	2 732	1 148	1 187	1 203
PSA-jctex2-3- wt		2 439	1 116	9 486	3 247	9 972	4 105	12 558	4 693
PSA-jctex3-4- wt		6 978	1 454	18 534	3 273	20 632	4 338	25 548	5 645
PSA-jctex4-5- wt		3 772	2 871	13 605	8 888	13 291	8 859	16 245	12 156
PSA-jct-ex-int1wt		#N/A	#N/A	899	1 362	2 812	2 264	1 273	2 551
PSA-jct-ex-int2wt		1 493	903	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int3wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int4wt		#N/A	#N/A	925	1 173	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int5wt		#N/A	#N/A	1 350	1 078	1 913	1 383	1 581	1 447
PSA-jct-ex-int6wt		1 851	1 126	1 739	1 525	#N/A	#N/A	3 752	1 933
PSA-jct-ex-int7wt		#N/A	#N/A	1 197	1 049	2 280	886	1 578	1 109
PSA-jct-ex-int8wt		#N/A	#N/A	1 923	1 811	2 003	1 801	2 396	2 287
PSA-intron 1		#N/A	#N/A	958	2 411	2 531	4 361	3 067	1 730
PSA-intron 2		956	1 175	3 578	1 385	#N/A	#N/A	1 354	1 186
PSA-intron 2bis		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-intron 4		#N/A	#N/A	828	1 001	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-001-int-int	168	#N/A	#N/A	3 201	1 988	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-001-int3'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	2 679	2 594
PSA-001-int3'bis		#N/A	#N/A	1 046	1 053	#N/A	#N/A	1 214	1 374
PSA-003-int-int	169	975	4 292	2 609	8 642	3 883	10 966	4 673	14 015
PSA-003-int3'		#N/A	#N/A	1 088	5 502	4 148	3 522	#N/A	#N/A

10

20

30

40



PSA-025-jct-ex2-ex4	185	#N/A	#N/A	#N/A	4 913	2 868	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-026-jct-ex3	186	#N/A	#N/A	#N/A	2 703	1 801	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-027-jct-ex3-ex5	187	1 596	2 605	2 260	2 824	2 702	4 001	3 913	3 913
PSA-027-jct-ex3-ex5bis	188	1 066	1 511	2 501	2 414	3 802	2 260	3 981	3 981
PSA-001-jct-int1		#N/A	1 658	4 896	2 802	8 297	2 736	7 872	7 872
PSA-d-jct-ex2-ex3	189	899	2 381	3 067	3 075	3 513	3 981	5 169	5 169
PSA-d-exon3		4 358	19 202	5 982	14 850	4 686	22 661	8 002	8 002
PSA-f-jct-int5'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-f-jct-int2	190	#N/A	963	1 433	2 810	1 619	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-g-jct-ex2-int2		1 028	4 946	2 001	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-g-jct-ex2-int2bis		1 165	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-h-jct-ex4-int4	191	#N/A	973	1 048	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-h-jct3'		941	2 428	1 270	2 441	1 288	2 991	1 551	1 551
PSA-h-exon5bis		4 717	18 338	7 197	21 552	8 091	23 252	9 544	9 544
PSA-j-jct-ex4-int4	192	1 140	5 712	3 235	3 511	1 443	5 541	3 161	3 161
PSA-k-jct-ex4-int4	193	#N/A	985	967	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-k-jct-int4		900	1 672	3 283	2 098	3 747	2 135	4 933	4 933
PSA-l-jct-ex4-int4	194	916	2 584	1 125	2 846	1 154	3 852	1 395	1 395
PSA-l-jct-int3'		1 034	1 835	1 436	#N/A	#N/A	1 643	1 859	1 859
PSA-m-int1-5'		#N/A	1 212	2 706	2 626	6 088	1 920	5 380	5 380
PSA-m-jct-int1	195	#N/A	#N/A	#N/A	3 216	1 858	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-n-int1-5'		#N/A	945	1 174	1 752	1 284	1 180	1 923	1 923
PSA-n-jct-int1	196	1 519	3 073	1 209	#N/A	#N/A	3 994	3 765	3 765
PSA-p-jct-ex1-int1	197	2 449	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-q-jct-int5'		3 989	13 464	70 837	14 810	73 656	20 726	92 817	92 817
PSA-q-jct-int2	198	#N/A	#N/A	#N/A	2 067	1 333	1 514	1 283	1 283
PSA-r-jct-int2	199	3 628	1 555	1 144	#N/A	#N/A	2 579	1 504	1 504
PSA-r-jct-int3'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-s-jct-int4	200	1 189	942	1 749	#N/A	#N/A	1 440	2 759	2 759
PSA-s-jct-int3'		#N/A	864	1 117	#N/A	#N/A	1 340	1 477	1 477

10

20

30

40



KLK2-003-jct-int4-ex5	206	#N/A	1 023	1 622	1 492	1 665	1 352	2 662
KLK2-004-jct-ex2-ex4	207	#N/A	8 414	6 017	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-004-int4		#N/A	1 281	2 549	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-005-int4		#N/A	1 761	2 260	#N/A	#N/A	2 210	3 978
KLK2-008-ex4		906	2 407	1 407	2 597	1 464	1 980	1 377
KLK2-008-jct-ex3-ex4		#N/A	889	962	2 353	1 090	#N/A	#N/A
KLK2-009-jct-ex3-ex4	208	#N/A	978	925	#N/A	#N/A	1 189	1 316
KLK2-009-jct-ex3	209	#N/A	3 131	1 397	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-009-ex4		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-011-jct-ex3-ex4	210	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-011-jct-ex4-int4		759	1 324	1 107	1 622	1 173	1 739	1 374
KLK2-a-exon3		1 433	4 830	1 479	5 675	1 478	10 361	2 627
KLK2-a-exon3bis		7 899	13 296	2 765	17 883	4 913	19 143	5 485
KLK2-b-jct-int1	211	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-b-jct-int3'		#N/A	2 806	2 120	1 840	1 319	1 239	2 666
KLK2-c-jct-int1	212	#N/A	1 934	1 262	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-d-jct-int5'		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-d-jct-int1	213	1 147	948	2 135	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-e-ex2		844	1 709	1 516	2 332	1 838	2 333	1 720
KLK2-e-ex2-140nt?	214	3 609	2 066	1 262	#N/A	#N/A	1 439	2 081
KLK2-e-jct-140nt?-ex3	215	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-f-jct-ex2-int2	216	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	3 710	2 735
KLK2-f-jct3'		#N/A	2 013	2 496	#N/A	#N/A	1 465	2 138
KLK2-g-ex5		2 661	11 404	5 898	10 871	6 663	25 958	14 694
KLK2-g-int4		980	1 535	1 156	1 920	1 148	2 033	1 422
KLK2-h-jct3'		1 352	4 132	1 806	4 947	2 295	5 766	2 551
KLK2-h-jct3'bis		1 726	6 526	2 314	7 094	1 922	8 441	2 234
KLK2-i-ex4		#N/A	2 761	1 448	2 575	1 397	4 752	2 614
KLK2-j-jct-int3'		#N/A	895	1 452	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-j-jct-int2	217	1 914	1 048	2 856	1 631	4 416	1 424	4 402

10

20

30

40

KLK2-k-jct-int5'	218	#N/A	1 297	3 250	1 809	4 193	2 320	6 264
KLK2-k-jct-int5'-6nt-ex5	219	1 350	3 168	2 224	4 908	3 072	8 481	5 989
KLK2-l-jct-int2-ex3	220	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A

10

20

30

40

【表 10】

表 5

オリゴヌクレオチド	患者15068		患者9648		患者8827		患者10063		
	配列番号	LEX. 腫瘍 -BG	LEX. 腫瘍 Norm.	LEX. 腫瘍 BG	LEX. 腫瘍 Norm.	LEX. 腫瘍 BG	LEX. 腫瘍 Norm.	LEX. 腫瘍 -BG	LEX. 腫瘍 Norm.
PSA-exon1- wt		4768	6273	3826	5600	2601	3458	10451	9383
PSA-exon2- wt		5779	7258	2278	5641	1104	2267	10212	10367
PSA-exon2bis- wt		2462	3383	1296	2122	807	961	4392	5049
PSA-exon3- wt		14805	17594	4881	12028	4606	10985	15573	14987
PSA-exon4- wt		7297	6707	2817	4635	1446	3054	12933	9720
PSA-exon5- wt		34320	26749	7839	15212	2364	5386	34033	27809
PSA-jctex1-2- wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-jctex2-3- wt		3245	3928	1106	2456	1209	2049	3145	2529
PSA-jctex3-4- wt		15637	16190	5606	13648	2961	7663	18472	14904
PSA-jctex4-5- wt		13083	12337	3532	6998	1549	3640	10098	8699
PSA-jct-ex-int1wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int2wt		1293	1758	#N/A	#N/A	1047	1077	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int3wt		1137	1290	1614	1458	1914	1944	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int4wt		#N/A	#N/A	793	1022	#N/A	#N/A	562	1142
PSA-jct-ex-int5wt		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int6wt		1353	1368	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1815	2154
PSA-jct-ex-int7wt		3232	3485	1916	3544	1128	2706	#N/A	#N/A
PSA-jct-ex-int8wt		2336	2241	1005	1244	#N/A	#N/A	2289	2175
PSA-intron 1		2093	3008	1790	2578	1314	1329	1254	1620
PSA-intron 2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-intron 2bis		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-intron 4		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
PSA-001-int-int	168	1101	1565	957	1185	917	806	#N/A	#N/A

10

20

30

40







KLK2-002-ex4	4957	5034	1849	3506	858	1317	2874	2736
KLK2-003-exon5	22655	18828	3405	6002	1056	2377	10645	9294
KLK2-003-jct-ex1-ex3	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	907	757	448	1913
KLK2-003-jct-int4-ex5	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-004-jct-ex2-ex4	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-004-int4	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-005-int4	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-008-ex4	5448	4354	2593	3290	1079	1557	3778	3065
KLK2-008-jct-ex3-ex4	#N/A	#N/A	1804	1416	1056	1081	#N/A	3253
KLK2-009-jct-ex3-ex4	1016	1849	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-009-jct-ex3	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	4034
KLK2-009-ex4	6561	6779	3494	5753	2088	2806	10429	8752
KLK2-011-jct-ex3-ex4	1883	4970	864	1915	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-011-jct-ex4-int4	2072	1988	681	1071	1138	802	1490	1520
KLK2-a-exon3	7550	8300	1727	3408	1109	1854	5606	4894
KLK2-a-exon3bis	12547	13954	4272	10033	2134	5350	12484	10192
KLK2-b-jct-int1	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	543	974
KLK2-b-jct-int3'	1048	1450	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-c-jct-int1	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-d-jct-int5'	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-d-jct-int1	1220	1971	1075	1462	654	752	534	895
KLK2-e-ex2	2903	3915	1033	1872	1356	2054	1997	1649
KLK2-e-ex2-140nt?	#N/A	#N/A	1313	33056	1312	4078	#N/A	#N/A
KLK2-e-jct-140nt?-ex3	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-f-jct-ex2-int2	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-f-jct3'	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
KLK2-g-ex5	19156	13670	3516	6837	1513	2972	10239	10753
KLK2-g-int4	2577	2656	1448	1651	#N/A	#N/A	2216	2696
KLK2-h-jct3'	4731	4807	1600	3254	#N/A	#N/A	4442	3777
KLK2-h-jct3'bis	9863	7729	1731	3213	858	1466	5392	4410
KLK2-i-ex4	5300	3761	1543	2050	840	1135	3321	3378

10

20

30

40

#N/A  
#N/A  
1465  
4249  
#N/A

#N/A  
#N/A  
1032  
4063  
#N/A

#N/A  
928  
1102  
2722  
#N/A

#N/A  
772  
874  
1320  
#N/A

#N/A  
1746  
2403  
4363  
#N/A

#N/A  
1197  
1532  
2056  
#N/A

#N/A  
2397  
3311  
7327  
#N/A

#N/A  
1593  
2326  
8177  
#N/A

KLK2-j-jct-int3'	
KLK2-j-jct-int2	217
KLK2-k-jct-int5'	218
KLK2-k-jct-int5'-6nt-ex5	219
KLK2-l-jct-int2-ex3	220

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0200】

【図1】 特異的オリゴヌクレオチドの位置。長方形が付されたオリゴヌクレオチドが、スプライシング事象：イントロンの保持、エキソンの欠失、3'及び5'のクリプティック部位の使用の場合と特異的にハイブリダイズするように設計された。

【図2】 特異的オリゴヌクレオチドの位置。5つのオリゴヌクレオチド（線が付されたもの）が、3つのエキソンを含有している長型及び2つのエキソンを含有している短型の発

現を分析するために設計され得る。

【図3】長合成型及び短合成型の標識。対応するcDNAを発現している直鎖化されたプラスミドを使用して、合成RNAが生成される。長型からのRNAはシアニン3で標識され、短型からのRNAはシアニン5で標識される。

【図4】オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの特異性の証明。等量で混合された短型から長型を識別するため、5つのオリゴヌクレオチドを使用した。2つの例が示される：遺伝子A及び遺伝子B。

【図5】長型と短型の比率の定量的測定。長型(wt)の割合を、0、20、40、60、80及び100%に設定した(3つの例を示す、遺伝子A、B及びC)。

【図6】PSA及びKLK2のオリゴヌクレオチドマイクロアレイの特異性。

10

【図7】線状RNA増幅の概略。

【図8】単一の患者からの腫瘍性組織及び正常組織からのプローブを使用したPSA/KLK2スライドのハイブリダイゼーションの例。

【図9】対応する識別オリゴヌクレオチドにより、同一患者からの腫瘍性組織及び正常組織を分析することによる、PSA及びKLK2のある種のアイスフォームの特質的な発現の測定。

【図10】対応する識別オリゴヌクレオチドにより、前立腺癌細胞系(Mda-2b及びLNCap)及び乳癌細胞系(T47D)を分析することによる、PSA及びKLK2のある種のアイスフォームの差次的発現の測定。

【図11】対応する識別オリゴヌクレオチドにより、様々なヒト組織を分析することによる、PSA及びKLK2のある種のアイスフォームの特質的な発現の測定。

20

【図12】正常組織を用いてある種のアイスフォームに関して得られた蛍光シグナルを示すグラフ。

【図13】3つのPSAアイソフォームA) PSA-EHT003 B) PSA-EHT023及びC) PSA-EHT012の特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用したPCR増幅。

【図14】作製された3つのポリクローナル抗体のアノテーション。

【図15A】ELISAを使用した3つの抗体の力価。A) SE3962の力価の決定。PPI: 免疫前血清。PP: 最初の採集からの血清。GP: 第二の採集からの血清。

【図15B】ELISAを使用した3つの抗体の力価。B) SE3963の力価の決定。PPI: 免疫前血清。PP: 最初の採集からの血清。GP: 第二の採集からの血清。

30

【図15C】ELISAを使用した3つの抗体の力価。C) SE4101の力価の決定。PPI: 免疫前血清。PP: 最初の採集からの血清。GP: 第二の採集からの血清。

【図16A】抗体EHT-SE3962及びA) 低濃度の全PSAを含有している血清を使用したウェスタンブロットの結果。

【図16B】抗体EHT-SE3962及びB) 中程度の濃度の全PSAを含有している血清を使用したウェスタンブロットの結果。

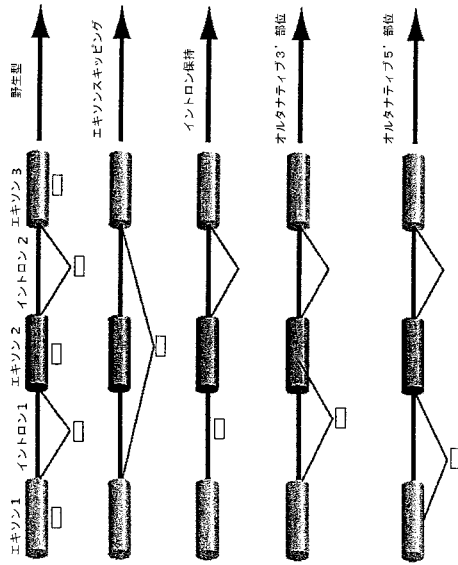
【図16C】抗体EHT-SE3962及びC) 高濃度の全PSAを含有している血清を使用したウェスタンブロットの結果。

【図16D】抗体EHT-SE3962及びD) 特異的ペプチドと非特異的ペプチドを使用したウェスタンブロットの結果。

40

【図17】前立腺組織における抗体EHT-SE3963を使用したウェスタンブロットの結果。

【 図 1 】

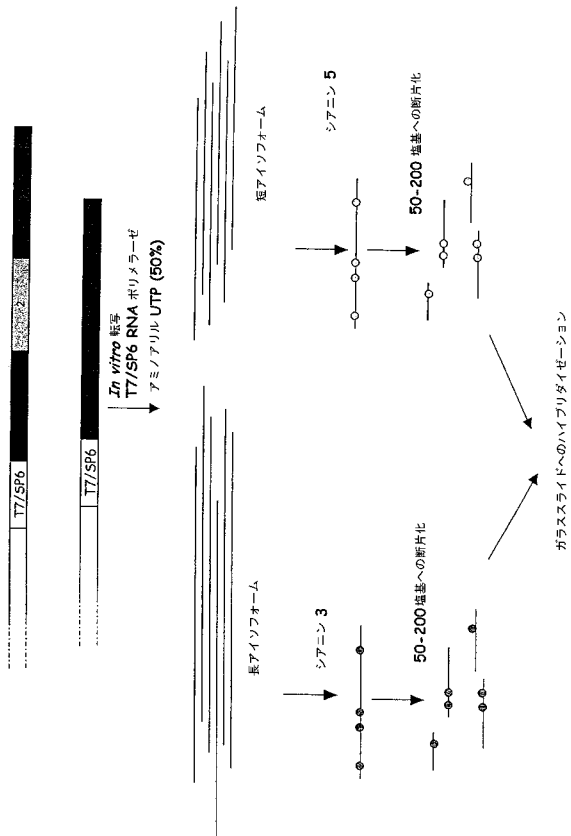


【 図 2 】

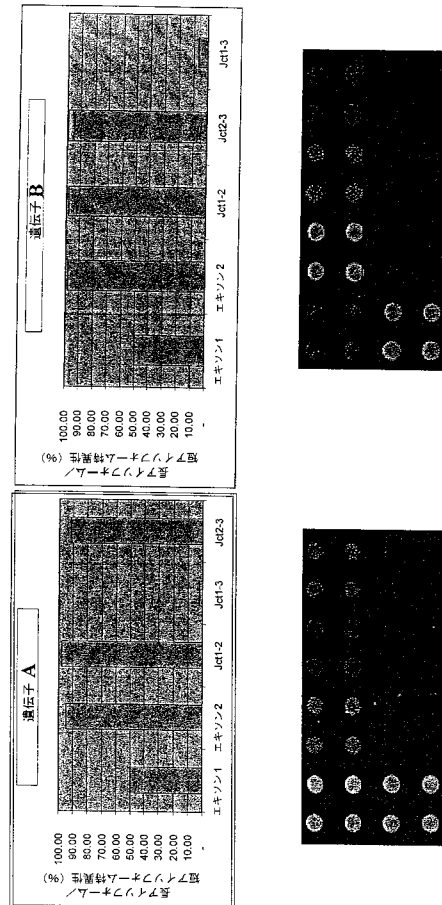
Figure 2



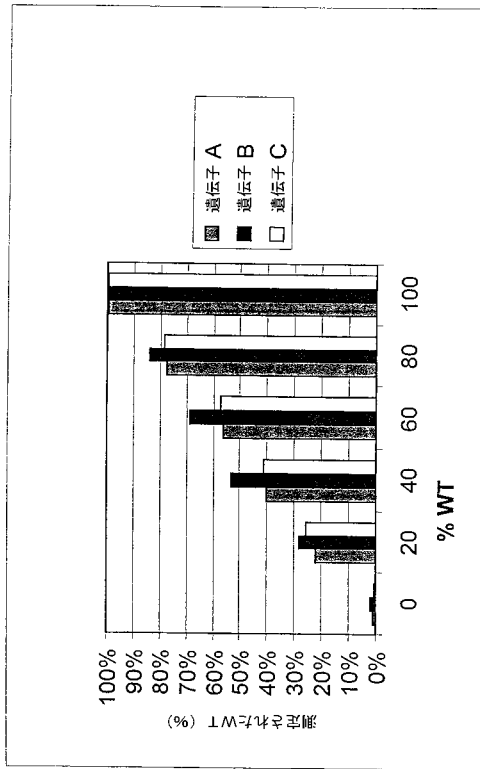
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

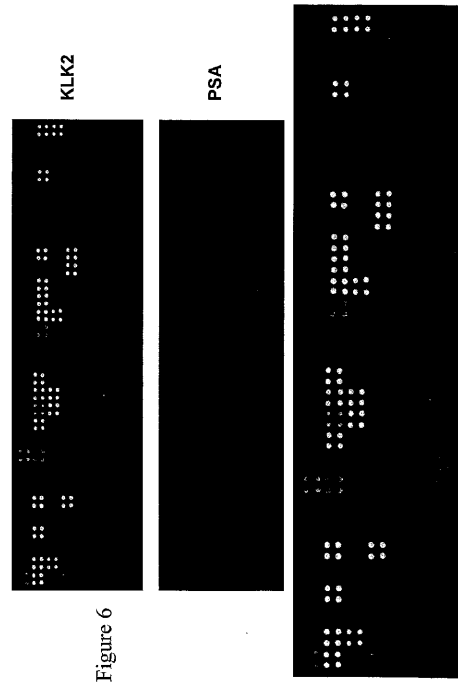
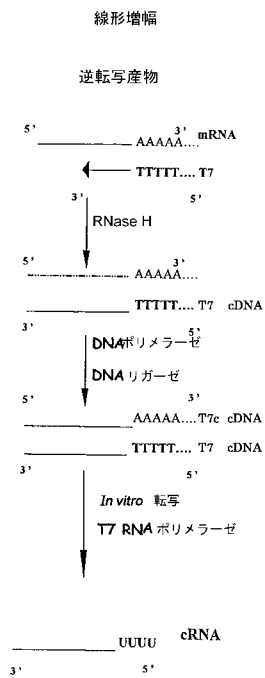


Figure 6

【 図 7 】



【 図 8 】

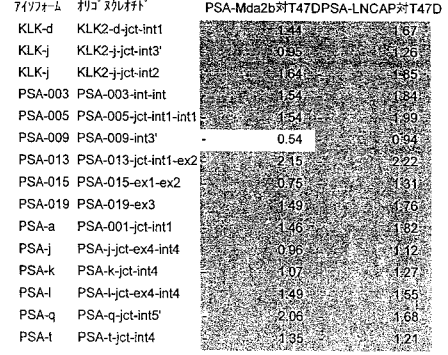


Figure 8

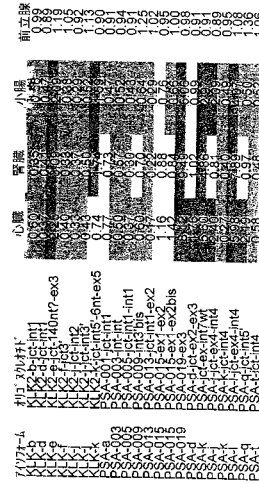
【 図 9 】

717774-L	ホリコ	患者 8827	患者 9648	患者 10063
KLK-a	KLK2-e-jct-140nt2-ex3	0.52	0.06	0.71
KLK-k	KLK2-k-jct-int5-5nt-ex5	0.19	0.95	0.09
PSA-003	PSA-003-int-int1	0.34	0.41	0.49
PSA-005	PSA-005-jct-int1-int1	0.40	0.42	0.32
PSA-009	PSA-009-jct-int2-int2	0.41	0.97	0.08
PSA-013	PSA-013-jct-int1-ex2	0.62	0.45	0.06
PSA-015	PSA-015-ex1-ex2	0.14	0.03	0.38
PSA-019	PSA-019-ex3	0.31	0.75	0.33
PSA-027	PSA-027-jct-ex3-ex5	0.43	0.80	0.22
PSA-j	PSA-j-jct-ex4-int4	0.03	0.62	0.11
PSA-k	PSA-k-jct-int4	0.17	0.30	0.01
PSA-q	PSA-q-jct-int5'	0.36	0.37	0.50
PSA-u	PSA-u-jct-int4-ex5	0.15	0.19	0.22

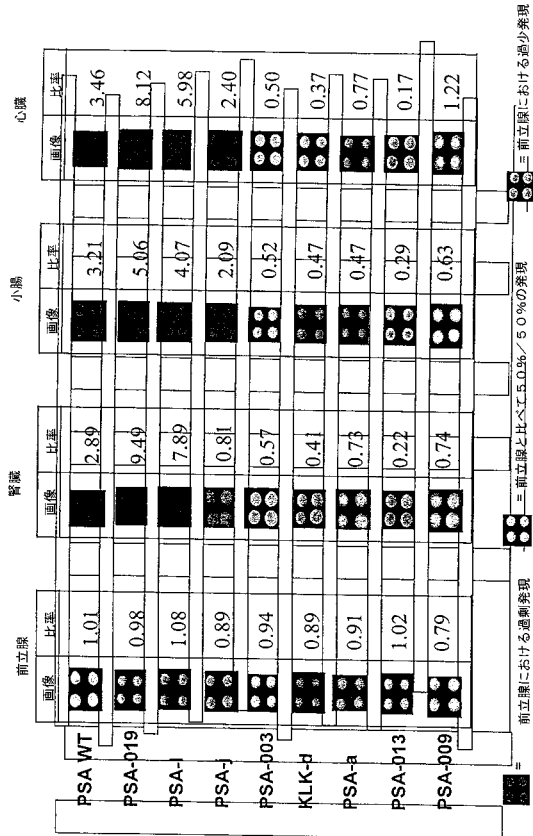
【 図 10 】



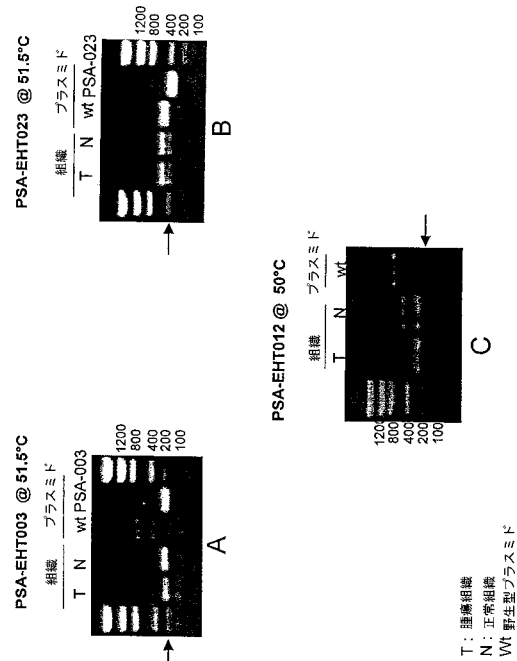
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 13 】

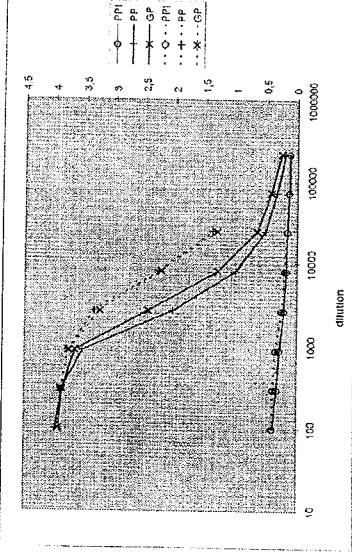


【 図 1 4 】

既知のY171-A	関連されたエピトープ	局在	契約番号	合成されたペプチド	かわりリグ	抗体の名称	ELISA 結果
PSA-321	CIRKPGDSSSHD	intrame	EF0204	H2N-CIRKPGDSSSHD-CONH2	MBS	SE3983	OK
KLK2-004	ESSVCEPPSPVQ	C-terminal	EF0203	H2N-ESSVCEPPSPVQ-COOH	GLU	SE362	OK
KLK2-006	LAPQESSVCEPPSPVQ	C-terminal	EF2043	H2N-LAPQESSVCEPPSPVQ-COOH	GLU	SE4101	OK

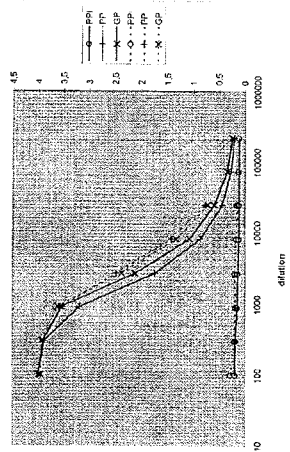
【 図 1 5 A 】

希釈率	ペプチド												
	PPI			PP			GP			組体			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
100	A	0.321	0.424	0.41	3.987	3.987	3.972	3.963	3.941	3.916	0.402	3.929	3.948
300	B	0.339	0.315	0.303	3.917	3.893	3.873	3.868	3.89	3.892	0.368	3.899	3.906
900	C	0.306	0.259	0.264	3.423	3.578	3.636	3.644	3.694	3.695	0.346	3.802	3.784
2700	D	0.254	0.241	0.117	1.94	2.156	2.038	2.469	2.349	2.53	0.248	3.352	3.261
8100	E	0.206	0.152	0.149	0.946	1.087	0.954	1.347	1.219	1.317	0.201	2.258	2.234
24300	F	0.162	0.124	0.157	0.5	0.597	0.467	0.701	0.808	0.651	0.156	1.38	1.306
72900	G	0.154	0.107	0.124	0.334	0.32	0.328	0.476	0.367	0.416	0.055	0.051	0.054
218700	H	0.127	0.108	0.116	0.196	0.211	0.165	0.286	0.207	0.274	1.624	1.627	1.619



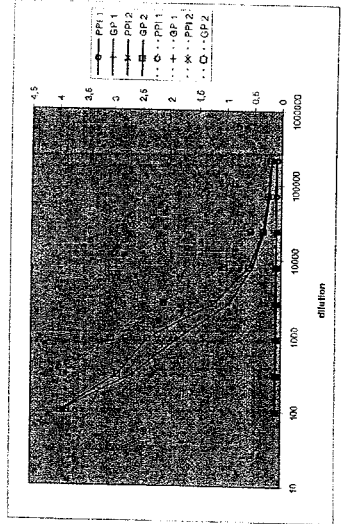
【 図 1 5 B 】

希釈率	ペプチド												
	PPI			PP			GP			組体			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
100	A	0.194	0.212	0.192	4	3.997	4	3.993	4	3.985	0.285	3.985	3.961
300	B	0.175	0.183	0.192	3.881	3.682	3.881	3.915	3.669	3.921	0.208	3.889	3.906
900	C	0.146	0.149	0.147	3.195	3.212	3.167	3.528	3.546	3.547	0.162	3.529	3.624
2700	D	0.15	0.141	0.13	1.751	1.674	1.999	2.014	2.18	2.156	0.194	2.483	2.371
8100	E	0.131	0.13	0.095	0.878	0.834	0.881	1.022	1.13	1.083	0.168	1.422	1.333
24300	F	0.122	0.13	0.106	0.42	0.442	0.449	0.525	0.633	0.619	0.157	0.776	0.72
72900	G	0.12	0.125	0.121	0.258	0.261	0.291	0.325	0.353	0.34	0.051	0.053	0.049
218700	H	0.129	0.11	0.113	0.187	0.211	0.189	0.245	0.247	0.24	1.617	1.614	1.62



【 図 1 5 C 】

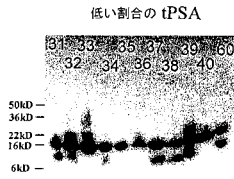
希釈率	ペプチド												
	PPI1			GP1			PPI2			GP2			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
100	A	0.066	0.103	3.968	3.905	0.107	0.108	3.979	3.925	0.072	3.666	0.067	3.84
300	B	0.06	0.126	2.65	2.632	0.087	0.108	2.788	3.025	0.069	3.843	0.066	3.892
900	C	0.06	0.088	1.832	1.862	0.094	0.088	2.322	2.42	0.073	3.094	0.059	3.092
2700	D	0.077	0.059	0.925	0.948	0.105	0.113	1.158	1.262	0.078	2.071	0.068	2.086
8100	E	0.068	0.099	0.523	0.521	0.104	0.081	0.544	0.618	0.069	1.077	0.069	1.026
24300	F	0.076	0.083	0.309	0.295	0.095	0.063	0.294	0.348	0.071	0.632	0.071	0.549
72900	G	0.084	0.085	0.224	0.219	0.108	0.122	0.223	0.254	0.041	0.048	0.071	0.044
218700	H	0.072	0.088	0.185	0.159	0.09	0.092	0.18	0.203	1.693	1.628	1.655	1.648



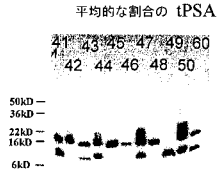
- contr.

- contr.

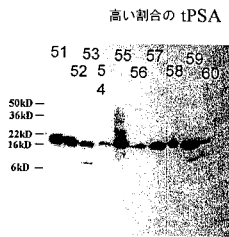
【 図 1 6 A 】



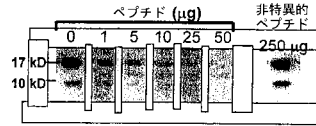
【 図 1 6 B 】



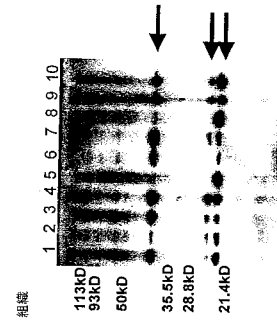
【 図 1 6 C 】



【 図 1 6 D 】



【 図 1 7 】



【 配 列 表 】

[2005519606000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N9/64 C12N5/10	C12N15/12 C07K16/40 C12Q1/68 G01N33/53
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOTECHNOLOGY ABS, GENSEQ, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 033 401 A (GENSET SA) 6 September 2000 (2000-09-06)  SEQ ID NO: 8650claims 1,14,44,55,56	1-3, 5-14,18, 22-24
X	WO 98/46795 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;MAYO FOUNDATION (US)) 22 October 1998 (1998-10-22) SEQ ID NO:22 page 43, line 3 - line 21 page 44, line 3 - line 5	1-3, 5-14,18, 22-24
Y	WO 99/46403 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); EXONHIT THERAPEUTICS S A (FR);) 16 September 1999 (1999-09-16) cited in the application page 1, line 30 - page 2, line 10	1-24
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 August 2003		09. 01. 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  ALCONADA RODRIG., A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/R 03/00833

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>EXONHIT THERAPEUTICS: "Exonhit Therapeutics and IDEC Pharmaceuticals announce collaborative agreement in target discovery"  EXONHIT: NEWS &amp; EVENTS, [Online]  1 July 2002 (2002-07-01), XP002222065  Retrieved from the Internet:  &lt;URL:http://www.exonhit.com/html/news/2002-01-07.htm&gt; [retrieved on 2002-11-15]  paragraphs [0001], [0004]</p>	1-24
A	<p>WO 01/053455 A (HYSEQ INC ;LIU CHENGHUA (US); TANG Y TOM (US); DRMANAC RADOJE T (U) 26 July 2001 (2001-07-26)  pages 1-7  page 269</p>	1-14,18, 22-24
A	<p>PORKKA KATI P ET AL: "Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array."  JOURNAL OF PATHOLOGY,  vol. 193, no. 1, January 2001 (2001-01),  pages 73-79, XP008010824  ISSN: 0022-3417  the whole document</p>	1-24
A	<p>LIU XIU FEN ET AL: "Identification of three new alternate human kallikrein 2 transcripts: Evidence of long transcript and alternative splicing."  BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,  vol. 264, no. 3,  2 November 1999 (1999-11-02), pages  833-839, XP002222066  ISSN: 0006-291X  cited in the application  figures 3,5</p>	
A	<p>TANAKA TSUTOMU ET AL: "A novel form of prostate-specific antigen transcript produced by alternative splicing."  CANCER RESEARCH,  vol. 60, no. 1, January 2000 (2000-01),  pages 56-59, XP002222067  ISSN: 0008-5472  cited in the application  figures 2,3</p>	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/R 03/00833

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MINTZ L ET AL: "Unusual alternative splicing within the human kallikrein genes KLK2 and KLK3 gives rise to novel prostate-specific proteins." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 69, no. 4 Supplement, October 2001 (2001-10), page 275, XP001109272 51st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics; San Diego, California, USA; October 12-16, 2001 ISSN: 0002-9297 abstract -----</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/FR03/00833**

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

**See Supplemental sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**1-24 (in Part)**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/FR03/00833**

## BOX II

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

## 1. Claims: 1-24 (in part)

KLK-EHT002 nucleic acid comprising the sequence of SEQ ID No: 1, as well as the polypeptides encoded by said nucleic acid and corresponding to the human kallikrein-2 KLK2-EHT002prota and KLK2-EHT002protb isoforms having the sequences of SEQ ID No: 50 and 51, variants of said nucleic acid resulting from the degeneration of the genetic code as well as fragments of said nucleic acid; probes comprising the sequence of the nucleic acid; complementary primers of the sequence of SEQ ID No: 1; specific antibodies of the polypeptide of SEQ ID No: 50 and 51; process for detecting a pathology in a patient comprising the determination in a sample from said patient of the presence of the nucleic acid of SEQ ID No: 1 or the polypeptide of SEQ ID No: 50 and 51; kit for implementing said process; method for selecting active compounds which modulate the expression or activity of the polypeptide according to the invention; vector comprising the nucleic acid according to the invention; recombinant cell comprising said vector and product comprising the nucleic acid, vector, polypeptide or antibody according to the invention.

## 2. Claims: 1-24 (in part)

Like invention 1, but applied to the KLK-EHT003 polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID No: 2 and the variants of human kallikrein-2 encoded by said polynucleotide and corresponding to the KLK2-EHT003prota and KLK2-EHT003protb isoforms of the sequences of SEQ ID No: 52 and 53.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

Information on patent family members

PCT/R 03/00833

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1033401	A	06-09-2000	EP 1033401 A2	06-09-2000
			JP 2001269182 A	02-10-2001
WO 9846795	A	22-10-1998	US 6479263 B1	12-11-2002
			AU 6958498 A	11-11-1998
			JP 2001520515 T	30-10-2001
			WO 9846795 A1	22-10-1998
			US 2003113743 A1	19-06-2003
WO 9946403	A	16-09-1999	FR 2775984 A1	17-09-1999
			AU 760656 B2	22-05-2003
			AU 2839999 A	27-09-1999
			CA 2323231 A1	16-09-1999
			EP 1062364 A1	27-12-2000
			WO 9946403 A1	16-09-1999
			JP 2002505887 T	26-02-2002
			US 6251590 B1	26-06-2001
			US 2003165931 A1	04-09-2003
WO 0153455	A	26-07-2001	US 6635742 B1	21-10-2003
			US 6586390 B1	01-07-2003
			AU 2292401 A	31-07-2001
			AU 2591801 A	31-07-2001
			AU 2593601 A	31-07-2001
			AU 2595501 A	31-07-2001
			AU 2596501 A	31-07-2001
			AU 2598301 A	31-07-2001
			AU 2728401 A	31-07-2001
			AU 2734401 A	31-07-2001
			AU 2734801 A	31-07-2001
			AU 2738501 A	31-07-2001
			AU 3265701 A	31-07-2001
			CA 2395443 A1	26-07-2001
			CA 2395731 A1	26-07-2001
			CA 2395736 A1	26-07-2001
			CA 2395749 A1	26-07-2001
			CA 2395763 A1	26-07-2001
			CA 2395770 A1	26-07-2001
			CA 2402563 A1	26-07-2001
			EP 1242596 A1	25-09-2002
			EP 1240178 A2	18-09-2002
			EP 1242580 A1	25-09-2002
			EP 1242443 A1	25-09-2002
			EP 1250346 A2	23-10-2002
			EP 1254256 A2	06-11-2002
			EP 1248848 A1	16-10-2002
			WO 0153312 A1	26-07-2001
			WO 0153453 A2	26-07-2001
			WO 0153326 A1	26-07-2001
			WO 0153454 A2	26-07-2001
			WO 0153455 A2	26-07-2001
			WO 0153456 A2	26-07-2001
			WO 0153466 A1	26-07-2001
			WO 0152616 A2	26-07-2001
			WO 0153500 A1	26-07-2001
			WO 0153515 A1	26-07-2001
			WO 0153485 A1	26-07-2001
			US 2003104529 A1	05-06-2003

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/R 03/00833

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0153455 A		US 2003219744 A1	27-11-2003
		US 2003211987 A1	13-11-2003
		US 2003224379 A1	04-12-2003
		US 6465620 B1	15-10-2002
		US 6569662 B1	27-05-2003
		US 2002146692 A1	10-10-2002
		US 6667391 B1	23-12-2003
		US 2003170818 A1	11-09-2003
		US 2003166152 A1	04-09-2003

---

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande Internationale No PC1/FR 03/00833
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N9/64 C12N15/12 C07K16/40 C12Q1/68 G01N33/53 C12N5/10		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOTECHNOLOGY ABS, GENSEQ, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 1 033 401 A (GENSET SA) 6 septembre 2000 (2000-09-06)  SEQ ID NO: 8650revendications 1,14,44,55,56	1-3, 5-14,18, 22-24
X	WO 98/46795 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;MAYO FOUNDATION (US)) 22 octobre 1998 (1998-10-22) SEQ ID NO:22 page 43, ligne 3 - ligne 21 page 44, ligne 3 - ligne 5	1-3, 5-14,18, 22-24
Y	WO 99/46403 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); EXONHIT THERAPEUTICS S A (FR);) 16 septembre 1999 (1999-09-16) cité dans la demande page 1, ligne 30 - page 2, ligne 10	1-24
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	"&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
29 août 2003	09. 07. 2004	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  ALCONADA RODRIG., A	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande Internationale No  
 PCT/FR 03/00833

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>EXONHIT THERAPEUTICS: "Exonhit Therapeutics and IDEC Pharmaceuticals announce collaborative agreement in target discovery"            EXONHIT: NEWS &amp; EVENTS, [Online]            1 juillet 2002 (2002-07-01), XP002222065            Extrait de l'Internet:            &lt;URL:http://www.exonhit.com/html/news/2002-01-07.htm&gt; [extrait le 2002-11-15]            alinéas [0001], [0004]</p>	1-24
A	<p>WO 01/053455 A (HYSEQ INC ;LIU CHENGHUA (US); TANG Y TOM (US); DRMANAC RADOJE T (U) 26 juillet 2001 (2001-07-26)            pages 1-7            page 269</p>	1-14,18, 22-24
A	<p>PORKKA KATI P ET AL: "Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array."            JOURNAL OF PATHOLOGY,            vol. 193, no. 1, janvier 2001 (2001-01),            pages 73-79, XP008010824            ISSN: 0022-3417            le document en entier</p>	1-24
A	<p>LIU XIU FEN ET AL: "Identification of three new alternate human kallikrein 2 transcripts: Evidence of long transcript and alternative splicing."            BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,            vol. 264, no. 3,            2 novembre 1999 (1999-11-02), pages            833-839, XP002222066            ISSN: 0006-291X            cité dans la demande            figures 3,5</p>	
A	<p>TANAKA TSUTOMU ET AL: "A novel form of prostate-specific antigen transcript produced by alternative splicing."            CANCER RESEARCH,            vol. 60, no. 1, janvier 2000 (2000-01),            pages 56-59, XP002222067            ISSN: 0008-5472            cité dans la demande            figures 2,3</p>	

-/--

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No  
 PCT/FR 03/00833

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MINTZ L ET AL: "Unusual alternative splicing within the human kallikrein genes KLK2 and KLK3 gives rise to novel prostate-specific proteins."            AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 69, no. 4 Supplement, octobre 2001 (2001-10), page 275, XP001109272            51st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics; San Diego, California, USA; October 12-16, 2001            ISSN: 0002-9297            abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale n°  
 PCT/FR 03/00833

**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n<sup>05</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2.  Les revendications n<sup>06</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
  
3.  Les revendications n<sup>06</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>08</sup>.
  
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>09</sup>  
 1-24 (partiellement)

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

## 1. revendications: 1-24 (partiellement)

Acide nucléique KLK-EHT002 comprenant la séquence SEQ ID NO:1, ainsi que les polypeptides codées par cet acide nucléique qui correspondent aux isoformes de la kallikrein 2 humaine KLK2-EHT002prota et KLK2-EHT002protb ayant les séquences SEQ ID NO:50 et 51, des variants dudit acide nucléique résultant de la dégénérescence du code génétique ainsi que des fragments dudit acide nucléique; des sondes comprenant la séquence de l'acide nucléique; des amorces complémentaires de la séquence SEQ ID NO:1; des anticorps spécifiques du polypeptide de SEQ ID NO:50 et 51; le procédé de détection d'une pathologie chez un sujet comprenant la détermination dans un échantillon dudit sujet de la présence de l'acide nucléique de SEQ ID NO:1 ou du polypeptide de SEQ ID NO:50 et 51; kit pour la mise en oeuvre dudit procédé; méthode de sélection de composés actifs qui modulent l'expression ou l'activité du polypeptide de l'invention; vecteur comprenant l'acide nucléique de l'invention; cellule recombinante comprenant ledit vecteur et produit comprenant l'acide nucléique, le vecteur, le polypeptide ou l'anticorps de l'invention.

---

## 2. revendications: 1-24 (partiellement)

Comme l'invention 1 mais appliqué au polynucleotide KLK-EHT003 comprenant la séquence SEQ ID NO:2 et aux variants de la kalikrein-2 humaine codées par le dit polynucleotide et qui correspondent aux isoformes KLK2-EHT003prota et KLK2-EHT003protb, comprenant les séquences SEQ ID NO:52 et 53.

---

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/00833

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1033401	A	06-09-2000	EP 1033401 A2	06-09-2000
			JP 2001269182 A	02-10-2001
WO 9846795	A	22-10-1998	US 6479263 B1	12-11-2002
			AU 6958498 A	11-11-1998
			JP 2001520515 T	30-10-2001
			WO 9846795 A1	22-10-1998
			US 2003113743 A1	19-06-2003
WO 9946403	A	16-09-1999	FR 2775984 A1	17-09-1999
			AU 760656 B2	22-05-2003
			AU 2839999 A	27-09-1999
			CA 2323231 A1	16-09-1999
			EP 1062364 A1	27-12-2000
			WO 9946403 A1	16-09-1999
			JP 2002505887 T	26-02-2002
			US 6251590 B1	26-06-2001
			US 2003165931 A1	04-09-2003
WO 0153455	A	26-07-2001	US 6635742 B1	21-10-2003
			US 6586390 B1	01-07-2003
			AU 2292401 A	31-07-2001
			AU 2591801 A	31-07-2001
			AU 2593601 A	31-07-2001
			AU 2595501 A	31-07-2001
			AU 2596501 A	31-07-2001
			AU 2598301 A	31-07-2001
			AU 2728401 A	31-07-2001
			AU 2734401 A	31-07-2001
			AU 2734801 A	31-07-2001
			AU 2738501 A	31-07-2001
			AU 3265701 A	31-07-2001
			CA 2395443 A1	26-07-2001
			CA 2395731 A1	26-07-2001
			CA 2395736 A1	26-07-2001
			CA 2395749 A1	26-07-2001
			CA 2395763 A1	26-07-2001
			CA 2395770 A1	26-07-2001
			CA 2402563 A1	26-07-2001
			EP 1242596 A1	25-09-2002
			EP 1240178 A2	18-09-2002
			EP 1242580 A1	25-09-2002
			EP 1242443 A1	25-09-2002
			EP 1250346 A2	23-10-2002
			EP 1254256 A2	06-11-2002
			EP 1248848 A1	16-10-2002
			WO 0153312 A1	26-07-2001
			WO 0153453 A2	26-07-2001
			WO 0153326 A1	26-07-2001
			WO 0153454 A2	26-07-2001
			WO 0153455 A2	26-07-2001
			WO 0153456 A2	26-07-2001
			WO 0153466 A1	26-07-2001
			WO 0152616 A2	26-07-2001
			WO 0153500 A1	26-07-2001
			WO 0153515 A1	26-07-2001
			WO 0153485 A1	26-07-2001
			US 2003104529 A1	05-06-2003

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00833

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0153455 A		US 2003219744 A1	27-11-2003
		US 2003211987 A1	13-11-2003
		US 2003224379 A1	04-12-2003
		US 6465620 B1	15-10-2002
		US 6569662 B1	27-05-2003
		US 2002146692 A1	10-10-2002
		US 6667391 B1	23-12-2003
		US 2003170818 A1	11-09-2003
		US 2003166152 A1	04-09-2003
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/64	A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 9/64	C 1 2 N 11/14	4 H 0 4 5
C 1 2 N 11/14	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	A

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

(72)発明者 ブリンクマン,ブリジッタ

フランス国、エフ - 9 2 1 4 0 クラマール、ウーエスカー・1, 2 ジェ、リュ・ピエール・コル  
ビー 3 4

(72)発明者 コワニャール,ファニー

フランス国、エフ - 7 5 0 1 4 パリ、リュ・ダゲール 8 7

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA14 CA04 CA09 CA20 DA01 DA02 DA06 DA12 EA02  
EA04 EA06 HA14  
4B029 AA07 BB16 BB20 CC08 FA15  
4B033 NA01 NA30 ND05  
4B050 CC03 DD11 LL03  
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ08 QQ36 QQ44 QQ52 QR16 QR40 QR55  
QR62 QR77 QS34 QS36 QX02  
4B064 AG27 CA19 CC24  
4B065 AA26X AA72X AA88X AA90X AA93X AB01 BA02 CA33 CA46  
4H045 AA11 DA75 DA76 EA50

专利名称(译)	人激肽释放酶-2和激肽释放酶-3的变体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005519606A</a>	公开(公告)日	2005-07-07
申请号	JP2003574817	申请日	2003-03-14
申请(专利权)人(译)	Eguzoni兵馬備治療, 興業ANONYME		
[标]发明人	ブラッコローラン ブリンクマンブリジッタ コワニャールファニー		
发明人	ブラッコ,ローラン ブリンクマン,ブリジッタ コワニャール,ファニー		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N11/14 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	C12N9/6445		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/40 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.A C12N11/14 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.F C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/EA06 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/BB20 4B029/CC08 4B029/FA15 4B033/NA01 4B033/NA30 4B033/ND05 4B050/CC03 4B050 /DD11 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ44 4B063/QQ52 4B063/QR16 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063 /QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065 /AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA33 4B065/CA46 4H045 /AA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2002003186 2002-03-14 FR 2002010975 2002-09-05 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及生物学, 遗传学和医学领域。特别地, 本发明涉及检测, 表征和/或治疗癌症病理学如前列腺癌的新方法。本发明还涉及鉴定和筛选在所述病理学中有活性的化合物的方法。此外, 本发明提供了用于执行该方法, 基因, 细胞的化合物, 涉及质粒或组合物。更具体地, 本发明概述了人激肽释放酶2和人激肽释放酶3的变体在上述病理学中的作用及其作为治疗, 诊断或实验的靶标的用途。

アイソフォーム	図面の番号	結論
PSA-EHT003	A	PSA-003プラスミドを使用した、予想されたサイズ及び配列のアンプリコン 予想されるアイソフォームのサイズに相当しないwtプラスミドの非特異的増幅 両プールにおける、アイソフォームについて予想されるサイズのみ陽性増幅
PSA-EHT023	B	PSA-023プラスミドを使用した、予想されたサイズ及び配列のアンプリコン 予想されるアイソフォームのサイズに相当しないwtプラスミドの非特異的増幅 両プールにおける、アイソフォームについて予想されるサイズのみならず、wtプラスミドで得られるサイズも陽性増幅
PSA-EHT012	C	予想されるアイソフォームのサイズに相当しないwtプラスミドの非特異的増幅 両プールにおける、アイソフォームについて予想されるサイズのみ陽性増幅