

(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2012-510813**(P2012-510813A)**(43) 公表日 **平成24年5月17日(2012.5.17)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-539528 (P2011-539528)	(71) 出願人	510149460 ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシティ ・リサーチ・ファウンデーション アメリカ合衆国オハイオ州43212, コ ロンバス, キニアー・ロード 1216
(86) (22) 出願日	平成21年3月25日 (2009. 3. 25)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(85) 翻訳文提出日	平成23年6月30日 (2011. 6. 30)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/038214	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開番号	W02010/065156	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
(87) 国際公開日	平成22年6月10日 (2010. 6. 10)	(74) 代理人	100128750 弁理士 廣瀬 しのぶ
(31) 優先権主張番号	61/120, 123		
(32) 優先日	平成20年12月5日 (2008. 12. 5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵巣癌の診断および治療のためのマイクロRNAに基づく方法および組成物

(57) 【要約】

卵巣癌の診断、予後および/または治療のための方法および組成物を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体が卵巣関連障害を有するかまたは該障害を発展させるリスクを有するかどうかを診断し、卵巣関連障害を持つ被験体の予後を決定し、そして/または卵巣関連障害を有する被験体において卵巣関連障害を治療する方法であって

被験体由来の血清の試験試料において、少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを測定する

ここで、対照試料における対応するバイオマーカーのレベルに比較して、試験試料におけるバイオマーカーのレベルにおける変化が、被験体が該障害を有するかまたは該障害を発展させるリスクを有するかいずれかである指標となる

工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

少なくとも1つのバイオマーカーが腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上である、請求項1の方法。

【請求項 3】

試験試料中の少なくとも1つのバイオマーカーのレベルが、対照試料中の対応するバイオマーカーのレベルより大きい、請求項1の方法。

【請求項 4】

少なくとも1つのバイオマーカーが腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上である、請求項3の方法。

【請求項 5】

少なくとも1つのバイオマーカーが腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上である、請求項3の方法。

【請求項 6】

試験試料中の少なくとも1つのバイオマーカーのレベルが、対照試料中の対応するバイオマーカーのレベルより小さい、請求項1の方法。

【請求項 7】

少なくとも1つのバイオマーカーが腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上である、請求項5の方法。

【請求項 8】

被験体において卵巣癌に関する1以上のバイオマーカーに関してスクリーニングする方法であって：

被験体から血清試料を得て、

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を実行して、そして

腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現される1以上のバイオマーカーを定量化する、ここで、該バイオマーカーがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、

工程を含む、前記方法。

【請求項 9】

試料が血液試料を含む、請求項1の方法。

【請求項 10】

試料が血清または血漿血液試料の1以上を含む、請求項10の方法。

【請求項 11】

腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現される少なくとも1つのバイオマーカーを

10

20

30

40

50

含む、卵巣癌に関するバイオマーカーであって、miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、前記バイオマーカー。

【請求項12】

腫瘍マイクロRNAプロセッシングを制御する1以上のバイオマーカーの発現における改変を含む、卵巣腫瘍中の特徴的なマイクロRNA発現シグネチャーであって、該バイオマーカーがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、前記マイクロRNA発現シグネチャー。

【請求項13】

ターゲットmRNAの転写物量および/またはタンパク質発現に影響を及ぼす必要がある被験体の卵巣において、ターゲットmRNAの転写物量および/またはタンパク質発現に影響を及ぼすための方法であって、miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される1以上のマイクロRNAを調節解除する工程を含む、前記方法。

【請求項14】

癌関連遺伝子のタンパク質発現を阻害する工程を含む、先行する請求項の方法。

【請求項15】

miR-21、miR-92、miR-93、miR-126およびmiR-129aの1以上の発現を改変して癌関連遺伝子のタンパク質発現を阻害する工程を含む、先行する請求項の方法。

【請求項16】

ヒト卵巣腫瘍中で起こるマイクロRNA機能の改変を同定するための、マイクロRNAおよび/またはタンパク質コードRNAの大規模遺伝子発現プロファイリングの使用。

【請求項17】

卵巣に関してスクリーニングする必要がある被験体において、卵巣に関してスクリーニングするための方法であって、被験体由来の血清試料に対してリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を実行する工程を含む、前記方法。

【請求項18】

miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣関連障害に関する腫瘍遺伝子シグネチャー。

【請求項19】

上方制御される、miR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体；ならびに下方制御される、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣関連障害に関する腫瘍遺伝子シグネチャー。

【請求項20】

miR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣関連障害に関する腫瘍遺伝子シグネチャー。

【請求項21】

バイオマーカーが、卵巣腫瘍において増加する、卵巣腫瘍中の宿主遺伝子発現を含む、請求項1の方法。

【請求項22】

バイオマーカーに：miR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上が含まれる、先行する請求項の方法。

【請求項23】

卵巣癌細胞における少なくとも1つの遺伝子に関するターゲットとしてのmiR-21、miR92および/またはmiR-93、またはその機能的変異体の使用、ならびに/

10

20

30

40

50

あるいはこうした遺伝子のタンパク質発現を阻害する際の使用。

【請求項 24】

卵巣癌細胞によって発現される遺伝子の 1 以上を制御するための方法であって、卵巣癌細胞において miR-21、miR92 および / または miR-93 の発現を改変する工程を含む、前記方法。

【請求項 25】

哺乳動物卵巣癌細胞においてターゲティングされる mRNA の分解および / または集積を導くための、3' UTR 配列へのマイクロ RNA の結合の使用。

【請求項 26】

卵巣癌に関するマイクロ RNA ターゲット遺伝子を予測する、ヒト組織におけるマイクロ RNA および mRNA 間の逆相関および / または正相関の使用。

10

【請求項 27】

miR-21、miR92、miR-93、miR-126 および miR-29a、またはその機能的変異体の 1 以上を含む、miR 発現阻害剤。

【請求項 28】

miR-21、miR92 および / または miR-93、またはその機能的変異体の 1 以上を含む、miR 発現阻害剤。

【請求項 29】

miR-155、miR-127 および miR-99b、またはその機能的変異体の 1 以上を含む、miR 発現アンチセンス阻害剤。

20

【請求項 30】

miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127 および miR-99b、またはその機能的変異体の 1 以上を含む、卵巣障害または疾患の癌 miR バイオマーカー。

【請求項 31】

miR-21、miR92 および miR-93、またはその機能的変異体の 1 以上を含む、卵巣障害または疾患の癌 miR バイオマーカー。

【請求項 32】

卵巣癌細胞において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127 および miR-99b、またはその機能的変異体の 1 以上の発現を調節する工程を含む、卵巣癌細胞においてタンパク質発現を制御するための方法。

30

【請求項 33】

卵巣癌細胞において：miR-21、miR92 および miR-93、またはその機能的変異体の 1 以上の発現を調節する工程を含む、卵巣癌細胞においてタンパク質発現を制御するための方法。

【請求項 34】

卵巣癌細胞において 1 以上の遺伝子の発現を抑制するための組成物であって：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127 および miR-99b、またはその機能的変異体の 1 以上を含む、前記組成物。

40

【請求項 35】

卵巣癌細胞において 1 以上の遺伝子の発現を抑制するための組成物であって：miR-21、miR92 および miR-93、またはその機能的変異体の 1 以上を含む、前記組成物。

【請求項 36】

miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127 および miR-99b、またはその機能的変異体の 1 以上を用いる工程を含む、卵巣癌を有する被験体において 1 以上のタンパク質レベルを制御するための方法。

50

【請求項 37】

miR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上を用いる工程を含む、卵巣癌を有する被験体において1以上のタンパク質レベルを制御するための方法。

【請求項 38】

卵巣癌を有する被験体の予後を決定するための方法であって、被験体由来の血清の試験試料において少なくとも1つのバイオマーカのレベルを測定する、

ここで、バイオマーカはmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上から選択され、そして

i) 該バイオマーカは卵巣癌における予後不良と関連付けられ、そしてii) 対照試料における対応するバイオマーカのレベルに比較して、試験試料における少なくとも1つのバイオマーカのレベルにおける変化が、予後不良の指標となる

工程を含む、前記方法。

【請求項 39】

被験体が卵巣癌を有するかまたは発展させるリスクがあるかどうかを診断する方法であって：

a) 被験体から得た血清の試験試料から、RNAを逆転写して、ターゲットオリゴデオキシヌクレオチドセットを提供し；

b) miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイに、ターゲットオリゴデオキシヌクレオチドをハイブリダイズさせて、試験試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；そして

c) 対照試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルに、試験試料ハイブリダイゼーションプロファイルを比較する、ここで、少なくとも1つのmiRNAのシグナルの変化が、被験体が卵巣癌を有するかまたは発展させるリスクがあるかいずれかである指標となる

工程を含む、前記方法。

【請求項 40】

対照試料から生じたシグナルに比較して、少なくとも1つのmiRNAのシグナルが下方制御されており、そして/または対照試料から生じたシグナルに比較して、少なくとも1つのmiRNAのシグナルが上方制御されている、先行する請求項の方法。

【請求項 41】

少なくとも1つのバイオマーカ、miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体のシグナルにおける変化が、被験体が予後不良を伴う卵巣癌を有するかまたは発展させるリスクがあるかいずれかである指標となる、先行する請求項の方法。

【請求項 42】

少なくとも1つのバイオマーカが、対照細胞に比較して被験体の癌細胞において下方制御されているかまたは上方制御されている、卵巣癌を有する被験体において、卵巣癌を治療する方法であって：

a) 少なくとも1つのバイオマーカが癌細胞において下方制御されている場合、被験体において癌細胞の増殖が阻害されるように、被験体に、少なくとも1つの単離されたバイオマーカ、または単離されたその変異体もしくは生物学的活性断片の有効量を投与するか；あるいは

b) 少なくとも1つのバイオマーカが癌細胞において上方制御されている場合、被験体において癌細胞の増殖が阻害されるように、被験体に、少なくとも1つのバイオマーカの発現を阻害するための少なくとも1つの化合物の有効量を投与する；

ここで、バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその

10

20

30

40

50

機能的変異体の1以上より選択される
工程を含む、前記方法。

【請求項43】

被験体において卵巣癌を治療する方法であって：

a) 対照細胞に比較して、卵巣癌細胞における少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し；そして

b)

(i) 癌細胞で発現されるバイオマーカの量が、対照細胞で発現されるバイオマーカの量より少ない場合、被験体に、少なくとも1つの単離されたバイオマーカの有効量を投与するか；あるいは

(ii) 癌細胞で発現されるバイオマーカの量が、対照細胞で発現されるバイオマーカの量より多い場合、被験体に、少なくとも1つのバイオマーカの発現を阻害するための少なくとも1つの化合物の有効量を投与する

ことによって、卵巣癌細胞で発現されるバイオマーカの量を改変する；

ここで、バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される

工程を含む、前記方法。

【請求項44】

少なくとも1つの単離バイオマーカ、および薬学的に許容されうるキャリアーを含む、卵巣癌を治療するための薬学的組成物であって、バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、前記薬学的組成物。

【請求項45】

少なくとも1つの単離バイオマーカが、対照細胞に比較して、卵巣癌細胞中で上方制御されているバイオマーカに対応する、先行する請求項の薬学的組成物。

【請求項46】

少なくとも1つのmiR発現阻害剤化合物および薬学的に許容されうるキャリアーを含む、先行する請求項の薬学的組成物。

【請求項47】

抗卵巣癌剤を同定する方法であって、細胞に試験剤を提供し、そして卵巣癌細胞における発現レベル増加と関連する少なくとも1つのバイオマーカのレベルを測定する、

ここで、対照細胞に比較して、細胞におけるバイオマーカのレベルが減少していると、試験剤が抗卵巣癌剤である指標となり；そして

バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上より選択される

工程を含む、前記方法。

【請求項48】

抗卵巣癌剤を同定する方法であって、試験剤を細胞に提供し、そして卵巣癌細胞における発現レベル減少と関連する少なくとも1つのバイオマーカのレベルを測定する、

ここで、対照細胞に比較して、細胞におけるバイオマーカのレベルが増加していると、試験剤が抗卵巣癌剤である指標となり；そして

バイオマーカがmiR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される

工程を含む、前記方法。

【請求項49】

卵巣癌関連疾患を防止し、診断し、そして/または治療するための療法の有効性を評価する方法であって：

a) 有効性を評価しようとする療法に、動物を供し、そして

10

20

30

40

50

b) miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、少なくとも1つのバイオマーカーを評価することによって、疾患を治療するかまたは防止することについて試験されている治療の有効性のレベルを決定する工程を含む、前記方法。

【請求項50】

候補療法剤が：薬学的組成物、栄養補助食品組成物、およびホメオパシー組成物の1以上を含む、先行する請求項の方法。

【請求項51】

評価している療法が、ヒト被験体で使用するためのものである、先行する請求項の方法

10

【請求項52】

miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む卵巣癌関連疾患のマーカーに結合する少なくとも1つの捕捉試薬を含む、製品。

【請求項53】

卵巣癌関連疾患を治療するための療法剤のための候補化合物に関してスクリーニングするためのキットであって：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、少なくとも1つのバイオマーカーの1以上の試薬、ならびに少なくとも1つのバイオマーカーを発現する細胞を含む、前記キット。

20

【請求項54】

少なくとも1つのバイオマーカーと特異的に結合する抗体または抗体断片を含む試薬を用いて、バイオマーカーの存在を検出する、先行する請求項のキット。

【請求項55】

個体における合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限するための薬剤を製造するための、卵巣癌関連疾患反応シグナル伝達経路に干渉する剤の使用であって、該剤が：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む、前記使用。

30

【請求項56】

卵巣癌関連合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限する必要がある個体において、卵巣癌関連合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限する方法であって：

少なくとも卵巣癌関連疾患反応カスケードに干渉する剤を、個体に投与する、

ここで、該剤が：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む

工程を含む、前記方法。

40

【請求項57】

個体において、卵巣癌関連合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限するための薬剤を製造するための、少なくとも卵巣癌関連疾患反応カスケードに干渉する剤の使用であって、該剤が：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、少なくとも1つのバイオマーカーを含む、前記使用。

【請求項58】

miR-21、miR-92およびmiR-93の1以上の阻害剤を含む、組成物。

【請求項59】

50

卵巣障害を治療する必要がある被験体において、該障害を治療する方法であって、被験体に、先行する請求項の組成物の療法的有効量を投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 60】

組成物を予防的に投与する、先行する請求項の方法。

【請求項 61】

組成物の投与が、障害の 1 以上の症状の開始を遅延させる、先行する請求項の方法。

【請求項 62】

ペプチドの投与が卵巣癌の発症を阻害する、先行する請求項の方法。

【請求項 63】

ペプチドの投与が腫瘍増殖を阻害する、先行する請求項の方法。

10

【請求項 64】

生物学的試料における卵巣癌の存在を検出するための方法であって：

a) 卵巣癌を含有すると推測される生物学的試料を、卵巣癌マーカーに曝露し；そして

b) あるとすれば、試料中のマーカーの存在または非存在を検出する；

ここで、バイオマーカーが miR - 21、miR 92、miR - 93、miR - 126、miR - 29a、miR - 155、miR - 127 および miR - 99b、またはその機能的変異体の 1 以上より選択される

工程を含む、前記方法。

【請求項 65】

マーカーが検出可能標識を含む、先行する請求項の方法。

20

【請求項 66】

被験体由来の生物学的試料中のマーカーの量を、正常被験体由来の対応する生物学的試料中のマーカーの量に比較する工程をさらに含む、先行する請求項の方法。

【請求項 67】

異なる時点で、被験体から複数の生物学的試料を収集し、そして各生物学的試料中のマーカーの量を比較して、被験体において、マーカーの量が時間とともに増加しているかまたは減少しているかを決定する工程をさらに含む、先行する請求項の方法。

【請求項 68】

被験体において、卵巣癌を治療するための方法であって：

miR - 21、miR 92、miR - 93、miR - 126 および miR - 29a、またはその機能的変異体の 1 以上の阻害剤

を含む、卵巣受容体アゴニストの療法的有効量を必要とする被験体に投与する

工程を含む、前記方法。

30

【請求項 69】

被験体において、卵巣癌を治療するための方法であって：

miR - 155、miR - 127 および miR - 99b、またはその機能的変異体の 1 以上のアンチセンス阻害剤

を含む、卵巣癌受容体アゴニストの療法的有効量を必要とする被験体に投与する

工程を含む、前記方法。

40

【請求項 70】

miR の中で：miR - 21、miR 92、miR - 93、miR - 126、miR - 29a、miR - 155、miR - 127 および miR - 99b、またはその機能的変異体の 1 以上より選択される核酸分子で構成される、卵巣癌の治療のための薬剤を製造するための使用。

【請求項 71】

薬剤が、miR の中で：miR - 21、miR 92、miR - 93、miR - 126、miR - 29a、miR - 155、miR - 127 および miR - 99b、またはその機能的変異体の 1 以上より選択される配列を提示する核酸分子を含む、先行する請求項記載の使用。

【請求項 72】

50

卵巣癌細胞の分化を誘導するのに有効な療法剤または療法剤の組み合わせを同定する、
in vitro法であって：

- i) 卵巣腫瘍由来の細胞を培養し、
 - ii) 細胞株の培地に少なくとも1つの化合物を添加し、
 - iii) 工程(i)および(ii)の間で少なくとも1つのmiRの発現レベルの発展
(evolution)を分析し、そして
 - iv) 工程(i)および(ii)の間のmiRの発現レベルの変化を誘導する化合物ま
たは化合物の組み合わせを同定する
- 工程を含む、前記方法。

【請求項73】

10

工程(iii)が少なくとも1つのmiRの発現レベルの分析を含む、先行する請求項記載の方法。

【請求項74】

工程(iv)が少なくとも1つのmiRの発現レベルを調節する化合物または化合物の組み合わせの同定を含む、先行する請求項記載の方法。

【請求項75】

工程(iv)が少なくとも1つのmiRの発現レベルを減少させる化合物または化合物の組み合わせの同定を含む、先行する請求項記載の方法。

【請求項76】

化合物が癌の治療のための療法剤である、先行する請求項記載の方法。

20

【請求項77】

被験体由来の卵巣組織を分類するための方法であって：

- a) 試験細胞集団におけるmiRの中で：miR-21、miR92、miR-93、
miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99
b、またはその機能的変異体の1以上の発現を測定し、

ここで、試験細胞集団中の少なくとも1つの細胞が、miRの中で：miR-21、m
iR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-
127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を発現可能である；

- b) 該miR(単数または複数)の発現を、卵巣癌分類が知られている少なくとも1つ
の細胞を含む参照細胞集団中のmiR(単数または複数)の発現に比較し；そして

30

- c) 存在する場合、試験細胞集団および参照細胞集団における1以上のmiR(単数ま
たは複数)の発現レベルの相違を同定し、それによって、被験体における卵巣癌を分類す
る

工程を含む、前記方法。

【請求項78】

参照細胞集団に比較した際の試験細胞集団における発現の相違が、試験細胞集団が、参
照細胞集団由来の細胞と異なる分類を有する指標となる、請求項77の方法。

【請求項79】

参照細胞集団に比較した際の試験細胞集団における類似の発現パターンが、試験細胞集
団が、参照細胞集団由来の細胞と同じ分類を有する指標となる、請求項77の方法。

40

【請求項80】

参照細胞集団が複数の細胞またはデータベースである、請求項77の方法。

【請求項81】

参照細胞集団が：正常卵巣組織由来の細胞集団と分類される参照細胞集団、良性卵巣組
織由来の細胞集団と分類される参照細胞集団、および悪性卵巣組織由来の細胞集団と分類
される参照細胞集団からなる群より選択される、請求項80の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対するクロスリファレンス

50

[0001]本出願は、その全開示が本明細書に明確に援用される、2008年12月28日出願の米国仮出願第61/120,123号の優先権を請求する。

【0002】

連邦が支援する研究に関する言及

[0002]本発明は、政府の援助を受けて行われておらず、そして米国政府は本発明にまったく権利を持たない。

【0003】

発明の技術分野および産業適用性

[0003]本発明は、一般的に、分子生物学の分野に関する。本発明の特定の側面には、卵巣癌関連障害の診断、療法、および予後における適用が含まれる。

【背景技術】

【0004】

[0004]本セクションに開示される背景技術が法的に先行技術を構成することは承認されない。

[0005]2008年、20,180人の女性が卵巣癌と診断され、そして15,310人がこの疾患で死亡すると予測されている[1]。卵巣癌は、20%の患者しか病期I疾患で診断されない、悲惨な疾病である[2]。卵巣癌に関連する、予後が劣る要因は複数あり；最小限に侵襲性の早期検出試験がないこと、症状発現が捉えにくいこと、および腫瘍が化学療法剤耐性であることなどがある。化学療法剤耐性アッセイが出現したにもかかわらず、薬剤耐性を予測するのはなお困難であり、そして最初の細胞傷害療法後、長期の寛解に留まるのは、患者のわずか10~15%である。

【0005】

[0006]毎年の骨盤検査が広く実施されているが、卵巣癌に関するスクリーニング戦略に用いられるには感度が低い[3]。卵巣癌に関して高いリスクを持つ女性は、典型的には、経膈超音波および血清CA-125でのスクリーニングを経ることも可能である。しかし、CA-125は、依然、初期疾患の劣ったマーカーであり、実証された感度は40%である[4、5]。さらに、リスクが高く、スクリーニングされた集団においてさえなお、起こりがちな症例は、進行した病期である可能性がより高いことが示されてきている[6]。この患者集団においては、治療計画および化学療法転帰の予測を補助しうるバイオマーカーの同定が非常に望ましい。

【0006】

[0007]固形および血液学的悪性腫瘍の両方を含む、多様な病理学的状態における、マイクロRNAの役割に関する研究が出現してきている。マイクロRNA(miRNA)は、小さい22~25ヌクレオチドのノンコーディングRNA配列である。これらの配列は、3'UTRをターゲティングした後のメッセンジャーRNA転写物の翻訳抑制または分解のいずれかによって遺伝子発現を調節する。線虫(Caenorhabditis elegance)を用いた初期の研究によって、非常に多数のこれらの配列が、すべての種に渡って非常に保存されていることが示され、miRNAが細胞分化、増殖および細胞周期調節において重要な役割を果たしていることが立証された[7]。現在、miRNAは、しばしば、悪性腫瘍において調節解除されていると認識されている。肺癌におけるlet-7および白血病におけるmir-15/16などの過小発現されるmiRNAは、それぞれ、RasおよびBCL2を抑制する腫瘍抑制因子遺伝子である[8、9]。mir-21およびクラスターmir-17-92などの過剰発現されるmiRNAは癌遺伝子(癌mir)であり、それぞれ、固形および血液学的悪性腫瘍において、腫瘍抑制因子PTENおよびE2F1をターゲティングする[10、11]。婦人科悪性腫瘍におけるmiRNA研究はまだ初期段階であるが、卵巣癌のmiRNAシグネチャープロファイルが最近公表されてきている[12~14]。

【0007】

[0008]良性および悪性状態両方における循環RNAの診断および予後有用性が近年明らかになってきている。胎盤関連循環miRNAは妊娠進行と相関する[15]。悪性状態

10

20

30

40

50

において、腎細胞癌患者における循環mRNA [16]、ならびにびまん性大細胞型B細胞リンパ腫患者の血清由来のmiRNA [17]は、悪性疾患ならびに生存を安定してそして高い予測性で予測することが示されてきている。最近、卵巣癌患者の循環腫瘍エキソソームのmiRNAシグネチャーは、原発性腫瘍のmiRNA発現と高い相関を示すことが立証されてきている [18]。卵巣癌は、改善された非侵襲性の血清スクリーニング試験が非常に望ましい疾患のままである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

[0009]これらの疾患を治療する療法に関して、かなりの研究がなされているにもかかわらず、これらを有効に診断しそして治療するのは困難なままであり、そして患者において観察される死亡率は、卵巣癌の診断、治療および防止において改善が必要であることを示す。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

[0010]第一の広い側面において、本明細書において、被験体が卵巣関連障害を有するかまたは発展させるリスクを有するかどうかを診断し、卵巣関連障害を持つ被験体の予後を決定し、そして/または卵巣関連障害を有する被験体において卵巣関連障害を治療する方法であって：被験体由来の血清の試験試料において、少なくとも1つのバイオマーカのレベルを測定する、ここで、対照試料における対応するバイオマーカのレベルに比較して、試験試料におけるバイオマーカのレベルにおける変化が、被験体が該障害を有するかまたは該障害を発展させるリスクを有するかどうかである指標となる、工程を含む、前記方法を提供する。

20

【0010】

[0011]特定の態様において、少なくとも1つのバイオマーカは腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上である。

【0011】

[0012]特定の態様において、試験試料中のバイオマーカのレベルは、対照試料中の対応するバイオマーカのレベルより大きい。

30

[0013]特定の態様において、バイオマーカは腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上である。

【0012】

[0014]特定の態様において、バイオマーカは腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上である。

【0013】

[0015]特定の態様において、試験試料中の少なくとも1つのバイオマーカのレベルは、対照試料中の対応するバイオマーカのレベルより小さい。特定の態様において、バイオマーカは腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現され、そしてmiR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上である。

40

【0014】

[0016]別の広い側面において、本明細書において、被験体において卵巣癌に関する1以上のバイオマーカに関してスクリーニングする方法であって：被験体から血清試料を得て、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を実行して、そして腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現される1以上のバイオマーカを定量化する、ここで、該バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその

50

機能的変異体の1以上より選択される、工程を含む、前記方法を提供する。特定の態様において、試料は血液試料を含む。

【0015】

[00017]特定の態様において、試料は血清または血漿血液試料の1以上を含む。

[00018]別の広い側面において、本明細書において、腫瘍組織および非腫瘍組織間で示差的に発現される少なくとも1つのバイオマーカを含む、卵巣癌に関するバイオマーカであって、miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、前記バイオマーカを提供する。

【0016】

[00019]別の広い側面において、本明細書において、腫瘍マイクロRNAプロセッシングを制御する1以上のバイオマーカの発現における改変を含む、卵巣腫瘍中の特徴的なマイクロRNA発現シグネチャーであって、該バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、前記マイクロRNA発現シグネチャーを提供する。

【0017】

[00020]別の広い側面において、本明細書において、ターゲットmRNAの転写物量および/またはタンパク質発現に影響を及ぼす必要がある被験体の卵巣において、ターゲットmRNAの転写物量および/またはタンパク質発現に影響を及ぼすための方法であって、miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される1以上のマイクロRNAを調節解除する、前記方法を提供する。

【0018】

[00021]特定の態様において、該方法には、癌関連遺伝子のタンパク質発現を阻害する工程がさらに含まれる。

[00022]特定の態様において、該方法には、miR-21、miR-92、miR-93、miR-126およびmiR-129aの1以上の発現を改変して癌関連遺伝子のタンパク質発現を阻害する工程が含まれる。

【0019】

[00023]別の広い側面において、本明細書において、ヒト卵巣腫瘍中で起こるマイクロRNA機能の改変を同定するための、マイクロRNAおよび/またはタンパク質コードRNAの大規模遺伝子発現プロファイリングの使用を提供する。

【0020】

[00024]別の広い側面において、本明細書において、卵巣に関してスクリーニングする必要がある被験体において、卵巣に関してスクリーニングするための方法であって、被験体由来の血清試料に対してリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を実行する工程を含む、前記方法を提供する。

【0021】

[00025]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣関連障害に関する腫瘍遺伝子シグネチャーを提供する。

【0022】

[00026]別の広い側面において、本明細書において：上方制御される、miR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体；ならびに下方制御される、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣関連障害に関する腫瘍遺伝子シグネチャーを提供する。

【0023】

10

20

30

40

50

[00027]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣関連障害に関する腫瘍遺伝子シグネチャーを提供する。

【0024】

[00028]特定の態様において、バイオマーカーは、卵巣腫瘍において増加する、卵巣腫瘍中の宿主遺伝子発現を含む。特定の態様において、バイオマーカーには：miR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上が含まれる。

【0025】

[00029]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌細胞における少なくとも1つの遺伝子に関するターゲットとしてのmiR-21、miR92および/またはmiR-93、またはその機能的変異体の使用、ならびに/あるいはこうした遺伝子のタンパク質発現を阻害する際の使用を提供する。

10

【0026】

[00030]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌細胞によって発現される遺伝子の1以上を制御するための方法であって、卵巣癌細胞においてmiR-21、miR92および/またはmiR-93の発現を改変する工程を含む、前記方法を提供する。

【0027】

[00031]別の広い側面において、本明細書において、哺乳動物卵巣癌細胞においてターゲットされるmRNAの分解および/または集積を導くための、3'UTR配列へのマイクロRNAの結合の使用を提供する。

20

【0028】

[00032]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌に関するマイクロRNAターゲット遺伝子を予測する、ヒト組織におけるマイクロRNAおよびmRNA間の逆相関および/または正相関の使用を提供する。

【0029】

[00033]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上を含む、miR発現阻害剤を提供する。

【0030】

[00034]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92および/またはmiR-93、またはその機能的変異体の1以上を含む、miR発現阻害剤を提供する。

30

【0031】

[00035]別の広い側面において、本明細書において：miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を含む、miR発現アンチセンス阻害剤を提供する。

【0032】

[00036]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣障害または疾患の癌miRバイオマーカーを提供する。

40

【0033】

[00037]別の広い側面において、本明細書において、miR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上を含む、卵巣障害または疾患の癌miRバイオマーカーを提供する。

【0034】

[00038]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌細胞において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上の発現を調節する

50

工程を含む、卵巣癌細胞においてタンパク質発現を制御するための方法を提供する。

【0035】

[00039]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌細胞において：miR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上の発現を調節する工程を含む、卵巣癌細胞においてタンパク質発現を制御するための方法を提供する。

【0036】

[00040]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌細胞において1以上の遺伝子の発現を抑制するための組成物であって：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を含む、前記組成物を提供する。

10

【0037】

[00041]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌細胞において1以上の遺伝子の発現を抑制するための組成物であって：miR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上を含む、前記組成物を提供する。

【0038】

[00042]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を用いる工程を含む、卵巣癌を有する被験体において1以上のタンパク質レベルを制御するための方法を提供する。

20

【0039】

[00043]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92およびmiR-93、またはその機能的変異体の1以上を用いる工程を含む、卵巣癌を有する被験体において1以上のタンパク質レベルを制御するための方法を提供する。

【0040】

[00044]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌を有する被験体の予後を決定するための方法であって、被験体由来の血清の試験試料において少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを測定する、ここで、バイオマーカーはmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上から選択され、そして：i) 該バイオマーカーは卵巣癌における予後不良と関連付けられ；そしてii) 対照試料における対応するバイオマーカーのレベルに比較して、試験試料における少なくとも1つのバイオマーカーのレベルにおける変化が、予後不良の指標となる、工程を含む、前記方法を提供する。

30

【0041】

[00045]別の広い側面において、本明細書において、被験体が卵巣癌を有するかまたは発展させるリスクがあるかどうかを診断する方法であって：被験体から得た血清の試験試料から、RNAを逆転写して、ターゲットオリゴデオキシヌクレオチドセットを提供し；miRNA特異的プローブオリゴデオキシヌクレオチドを含むマイクロアレイに、ターゲットオリゴデオキシヌクレオチドをハイブリダイズさせて、試験試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；そして対照試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルに、試験試料ハイブリダイゼーションプロファイルを比較する、ここで、少なくとも1つのmiRNAのシグナルの変化が、被験体が卵巣癌を有するかまたは発展させるリスクがあるかいずれかである指標となる、工程を含む、前記方法を提供する。

40

【0042】

[00046]特定の態様において、対照試料から生じたシグナルに比較して、少なくとも1つのmiRNAのシグナルは下方制御されており、そして/または対照試料から生じたシグナルに比較して、少なくとも1つのmiRNAのシグナルは上方制御されている。

【0043】

[00047]特定の態様において、少なくとも1つのバイオマーカー、miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-1

50

27およびmiR-99b、またはその機能的変異体のシグナルにおける改変は、被験体が予後不良を伴う卵巣癌を有するかまたは発展させるリスクがあるかいずれかである指標となる。

【0044】

[00048]別の広い側面において、本明細書において、少なくとも1つのバイオマーカが、対照細胞に比較して被験体の癌細胞において下方制御されているかまたは上方制御されている、卵巣癌を有する被験体において、卵巣癌を治療する方法であって：少なくとも1つのバイオマーカが癌細胞において下方制御されている場合、被験体において癌細胞の増殖が阻害されるように、被験体に、少なくとも1つの単離されたバイオマーカ、または単離されたその変異体もしくは生物学的活性断片の有効量を投与するか；あるいは、少なくとも1つのバイオマーカが癌細胞において上方制御されている場合、被験体において癌細胞の増殖が阻害されるように、被験体に、少なくとも1つのバイオマーカの発現を阻害するための少なくとも1つの化合物の有効量を投与する；ここで、バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、工程を含む、前記方法を提供する。

10

【0045】

[00049]別の広い側面において、本明細書において、被験体において卵巣癌を治療する方法であって：対照細胞に比較して、卵巣癌細胞における少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し；そして癌細胞で発現されるバイオマーカの量が、対照細胞で発現されるバイオマーカの量より少ない場合、被験体に、少なくとも1つの単離されたバイオマーカの有効量を投与するか；あるいは癌細胞で発現されるバイオマーカの量が、対照細胞で発現されるバイオマーカの量より多い場合、被験体に、少なくとも1つのバイオマーカの発現を阻害するための少なくとも1つの化合物の有効量を投与することによって、卵巣癌細胞で発現されるバイオマーカの量を改変する；ここで、バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、工程を含む、前記方法を提供する。

20

【0046】

[00050]別の広い側面において、本明細書において、少なくとも1つの単離バイオマーカ、および薬学的に許容されうるキャリアーを含む、卵巣癌を治療するための薬学的組成物であって、バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、前記薬学的組成物を提供する。特定の態様において、バイオマーカは、対照細胞に比較して、卵巣癌細胞中で上方制御されているバイオマーカに対応する。特定の態様において、薬学的組成物は、少なくとも1つのmiR発現阻害剤化合物および薬学的に許容されうるキャリアーを含む。

30

【0047】

[00051]別の広い側面において、本明細書において、抗卵巣癌剤を同定する方法であって、細胞に試験剤を提供し、そして卵巣癌細胞における発現レベル増加と関連する少なくとも1つのバイオマーカのレベルを測定する、ここで、対照細胞に比較して、細胞におけるバイオマーカのレベルが減少していると、試験剤が抗卵巣癌剤である指標となり；そしてバイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上より選択される、工程を含む、前記方法を提供する。

40

【0048】

[00052]別の広い側面において、本明細書において、抗卵巣癌剤を同定する方法であって、試験剤を細胞に提供し、そして卵巣癌細胞における発現レベル減少と関連する少なくとも1つのバイオマーカのレベルを測定する、ここで、対照細胞に比較して、細胞におけるバイオマーカのレベルが増加していると、試験剤が抗卵巣癌剤である指標となり；

50

そしてバイオマーカーがmiR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、工程を含む、前記方法を提供する。

【0049】

[00053]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌関連疾患を防止し、診断し、そして/または治療するための療法の有効性を評価する方法であって：有効性を評価しようとする療法に、動物を供し、そして：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、少なくとも1つのバイオマーカーを評価することによって、疾患を治療するかまたは防止することについて試験されている治療の有効性のレベルを決定する工程を含む、前記方法を提供する。

10

【0050】

[00054]特定の態様において、候補療法剤は：薬学的組成物、栄養補助食品組成物、およびホメオパシー組成物の1以上を含む。

[00055]特定の態様において、評価している療法は、ヒト被験体で使用するためのものである。

【0051】

[00056]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む卵巣癌関連疾患のマーカーに結合する少なくとも1つの捕捉試薬を含む、製品を提供する。

20

【0052】

[00057]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌関連疾患を治療するための療法剤のための候補化合物に関してスクリーニングするためのキットであって：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、少なくとも1つのバイオマーカーの1以上の試薬、ならびに少なくとも1つのバイオマーカーを発現する細胞を含む、前記キットを提供する。特定の態様において、少なくとも1つのバイオマーカーと特異的に結合する抗体または抗体断片を含む試薬を用いて、バイオマーカーの存在を検出する。

30

【0053】

[00058]別の広い側面において、本明細書において、個体における合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限するための薬剤を製造するための、卵巣癌関連疾患反応シグナル伝達経路に干渉する剤の使用であって、該剤が：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む、前記使用を提供する。

【0054】

[00059]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌関連合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限する必要がある個体において、卵巣癌関連合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限する方法であって：少なくとも卵巣癌関連疾患反応カスケードに干渉する剤を、個体に投与する、ここで、該剤が：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む、工程を含む、前記方法を提供する。

40

【0055】

[00060]別の広い側面において、本明細書において、個体において、卵巣癌関連合併症を治療するか、防止するか、逆転させるか、またはその重症度を制限するための薬剤を製造するための、少なくとも卵巣癌関連疾患反応カスケードに干渉する剤の使用であって、

50

該剤が：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、少なくとも1つのバイオマーカを含む、前記使用を提供する。

【0056】

[00061]別の広い側面において、本明細書において、miR-21、miR-92およびmiR-93の1以上の阻害剤を含む、組成物を提供する。

[00062]別の広い側面において、本明細書において、卵巣障害を治療する必要がある被験体において、該障害を治療する方法であって、被験体に、組成物の療法的有効量を投与する工程を含む、前記方法を提供する。特定の態様において、組成物は予防的に投与される。特定の態様において、組成物の投与は、障害の1以上の症状の開始を遅延させる。

10

【0057】

[00063]特定の態様において、ペプチドの投与は卵巣癌の発展を阻害する。

[00064]特定の態様において、ペプチドの投与は腫瘍増殖を阻害する。

[00065]別の広い側面において、本明細書において、生物学的試料における卵巣癌の存在を検出するための方法であって：卵巣癌を含有すると推測される生物学的試料を、卵巣癌マーカーに曝露し；そしてあるとすれば、試料中のマーカーの存在または非存在を検出する；ここで、バイオマーカがmiR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される、工程を含む、前記方法を提供する。特定の態様において、マーカーには検出可能標識が含まれる。

20

【0058】

[00066]特定の態様において、方法は、被験体由来の生物学的試料中のマーカーの量を、正常被験体由来の対応する生物学的試料中のマーカーの量に比較する工程をさらに含む。特定の態様において、方法は、異なる時点で、被験体から複数の生物学的試料を収集し、そして各生物学的試料中のマーカーの量を比較して、被験体において、マーカーの量が時間とともに増加しているかまたは減少しているかを決定する工程をさらに含む。

【0059】

[00067]別の広い側面において、本明細書において、被験体において、卵巣癌を治療するための方法であって：miR-21、miR92、miR-93、miR-126およびmiR-29a、またはその機能的変異体の1以上の阻害剤を含む、卵巣受容体アゴニストの療法的有効量を必要とする被験体に投与する工程を含む、前記方法を提供する。

30

【0060】

[00068]別の広い側面において、本明細書において、被験体において、卵巣癌を治療するための方法であって：miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上のアンチセンス阻害剤を含む、卵巣癌受容体アゴニストの療法的有効量を必要とする被験体に投与する工程を含む、前記方法を提供する。

【0061】

[00069]別の広い側面において、本明細書において：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される核酸分子で構成される、卵巣癌の治療のための薬剤を製造するための使用を提供する。特定の態様において、薬剤は：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上より選択される配列を提示する核酸分子を含む。

40

【0062】

[00070]別の広い側面において、本明細書において、卵巣癌細胞の分化を誘導するのに有効な療法剤または療法剤の組み合わせを同定する、*in vitro*法であって：i) 卵巣腫瘍由来の細胞を培養し、ii) 細胞株の培地に少なくとも1つの化合物を添加し、iii) 工程(i)および(ii)の間で少なくとも1つのmiRの発現レベルの発展(*evolution*)を分析し、そしてiv) 工程(i)および(ii)の間のmiRの

50

発現レベルの変化を誘導する化合物または化合物の組み合わせを同定する工程を含む、前記方法を提供する。特定の態様において、工程(iii)は少なくとも1つのmiRの発現レベルの分析を含む。特定の態様において、工程(iv)は少なくとも1つのmiRの発現レベルを調節する化合物または化合物の組み合わせの同定を含む。特定の態様において、工程(iv)は少なくとも1つのmiRの発現レベルを減少させる化合物または化合物の組み合わせの同定を含む。特定の態様において、化合物は癌の治療のための療法剤である。

【0063】

[00071]別の広い側面において、本明細書において、被験体由来の卵巣組織を分類するための方法であって：試験細胞集団におけるmiRの中で：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上の発現を測定し、ここで、試験細胞集団中の少なくとも1つの細胞が、miRの中で：miR-21、miR92、miR-93、miR-126、miR-29a、miR-155、miR-127およびmiR-99b、またはその機能的変異体の1以上を発現可能である；該miR(単数または複数)の発現を、卵巣癌分類が知られている少なくとも1つの細胞を含む参照細胞集団中のmiR(単数または複数)の発現に比較し；そして存在する場合、試験細胞集団および参照細胞集団における1以上のmiR(単数または複数)の発現レベルの相違を同定し、それによって、被験体における卵巣癌を分類する工程を含む、前記方法を提供する。

10

【0064】

[00072]特定の態様において、参照細胞集団に比較した際の試験細胞集団における発現の相違は、試験細胞集団が、参照細胞集団由来の細胞と異なる分類を有する指標となる。

20

[00073]特定の態様において、参照細胞集団に比較した際の試験細胞集団における類似の発現パターンは、試験細胞集団が、参照細胞集団由来の細胞と同じ分類を有する指標となる。

【0065】

[00074]特定の態様において、参照細胞集団は複数の細胞またはデータベースである。特定の態様において、参照細胞集団は：正常卵巣組織由来の細胞集団と分類される参照細胞集団、良性卵巣組織由来の細胞集団と分類される参照細胞集団、および悪性卵巣組織由来の細胞集団と分類される参照細胞集団からなる群より選択される。

30

【0066】

[00075]本発明の多様な目的および利点は、付随する図を踏まえて読むと、好ましい態様の以下の詳細な説明から、当業者には明らかとなるであろう。

[00076]特許または出願ファイルは、カラーおよび/または1以上の写真で作成される1以上の図を含有してもよい。カラーの図(単数または複数)および/または写真(単数または複数)を含む本特許または特許出願刊行物のコピーは、要望があり、そして必要な料金の支払いがあれば、特許局によって提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】[00077]公表されるmiRNAプロファイルおよび卵巣癌患者血清由来の示差的に発現されるmiRNAの比較。

40

【図2】[00078]患者および対照血清間で示差的に発現されるmiRNAの倍変化相違中央値。

【発明を実施するための形態】

【0068】

[00079]本開示全体で、同定する引用によって、多様な刊行物、特許および公開特許明細書に言及する。これらの刊行物、特許および公開特許明細書の開示は、本発明が属する技術分野の到達水準をより詳細に記載するため、本開示内に援用される。

【0069】

[00080]本発明を詳細に記載する前に、配合物またはプロセスパラメータは、もちろん

50

、多様でありうるため、本発明は特定のこうしたものに限定されないことが理解されるものとする。本明細書で用いる専門用語は、本発明の特定の態様を記載する目的のみのためのものではなく、そして限定されるように意図されないこともまた、理解されるものとする。

【0070】

[00081]本明細書に記載するものと類似であるかまたは同等であるいくつかの方法および材料を、本発明を実施する際に用いてもよいが、好ましい材料および方法を本明細書に記載する。

【0071】

[00082]マイクロRNAは、タンパク質をコードする遺伝子の発現を制御する、小分子ノンコーディングRNAである。マイクロRNA発現は、卵巣癌の発展および進行とともに改変されるようになる。これらのマイクロRNAのいくつかは、卵巣癌細胞において、癌関連遺伝子の発現を制御する。本明細書において、「miR遺伝子産物」、「マイクロRNA」、「miR」、または「miRNA」は、交換可能であり、miR遺伝子からプロセッシングされないまたはプロセッシングされたRNA転写物を指す。

10

【0072】

[00083]本明細書において、「バイオマーカー」には、「miR遺伝子産物」、「マイクロRNA」、「miR」、または「miRNA」、あるいはタンパク質をコードするRNAの1以上が含まれてもよい。

【0073】

[00084]活性19~25ヌクレオチドRNA分子は、天然プロセッシング経路（例えば損なわれていない（intact）細胞または細胞溶解物を用いる）を通じて、または合成プロセッシング経路（例えば単離プロセッシング酵素、例えば単離ダイサー、アルゴノート、またはRNAアーゼIIIを用いる）によって、miR前駆体から得られうる。活性19~25ヌクレオチドRNA分子はまた、miR前駆体からプロセッシングされる必要を伴わずに、生物学的または化学的合成によって直接産生可能であることが理解される。本明細書において、マイクロRNAを名称で呼ぶ場合、名称は、別に示さない限り、前駆体および成熟型の両方に対応する。

20

【0074】

[00085]本発明は、被験体が卵巣関連障害を有するかまたは該障害を発展させるリスクを有するかどうか診断する方法を含む。本明細書において、「被験体」は、卵巣癌を有するかまたは有すると推測される任意の哺乳動物であってもよい。

30

【0075】

[00086]本発明者らは、卵巣癌患者の血清からのmiRNA抽出、患者および健康な対照間のこれらのmiRNAのいくつかの示差的発現、ならびに新規リアルタイムPCRマイクロアレイ検出法の説明を提供する。

【0076】

[00087]

[00088]

[00089]本発明は、以下の実施例においてさらに説明され、ここで、別に言及しない限り、すべての部分および割合は重量であり、そして度は摂氏である。これらの実施例は、本発明の好ましい態様を示すが、例示目的のためだけに提供されることを理解しなければならない。上記議論およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特徴を確認可能であり、そして本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の多様な変化および修飾を作製して、多様な使用および条件に適応させることが可能である。本明細書において言及される特許および非特許文献を含むすべての刊行物は、本明細書に完全に援用される。

40

【実施例】

【0077】

[00090]実施例1

50

[00091]方法

[00092]オハイオ州立大学医学部の施設内倫理委員会より認可を受けた後、本発明者らは、新規に診断された卵巣癌を有する28人の患者および15人の正常対照由来の血清試料を分析した。これらの血清試料を、最終的な外科処置および/またはアジュバント療法の前に、最初の診察時に収集した。前向き組織および血清獲得研究の一部として血清を得て、そして-80℃で保存した。対照の役目を果たすために志願した15人の健康な女性から、新鮮な血清を得た。凍結血清を融解し、そして患者および対照集団から同時にRNAを抽出した。健康な対照はいずれも、以前、悪性腫瘍と診断されたことはなかった。

【0078】

[00093]製造者に記載されるように、Tri-Reagent BD (Molecular Research Center, Inc., オハイオ州シンシナティ)を用いて、250μlの血清からRNAを抽出した。ThermoScientific NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., マサチューセッツ州ウォルサム)でRNA品質を評価した。総量400ng用のポートあたり50ngのRNAを用いて、TaqManアレイ・ヒト・マイクロRNAパネル(v.1, Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスターシティ)を利用して、4人の対照および9人の癌患者でマイクロRNA発現プロファイリングを行った。このアレイは、365のmiRNAターゲット、ならびに内因性対照を含有する。小分子核RNA (snRNA) U44およびU48で標準化を行った。これらのsnRNAは、TaqManアッセイにおいて標準化因子として使用するのに適した、安定して発現される参照遺伝子である。

【0079】

[00094]マイクロアレイパネル上で示差的に発現されるmiRNAを同定するのに加えて、第二の目的は、被験体に関する公表されたデータが欠如していることを考慮して、標準化因子として働きうるmiRNAを同定することであった。対照および患者血清(11人の対照および19人の患者)において、さらに検査するために、発現プロファイル由来の21のmiRNAを経験的に選択した。これらは、対照および患者間の4サイクル以上の見かけのCt相違に基づいて選択された。すべての患者および対照試料に渡って発現が一貫していると仮定して、2つのmiRNA(142-3pおよび16)が潜在的な標準化因子と同定された。関心対象のmiRNAに関して、単一試験管TaqManマイクロRNAアッセイを用いた。Applied Biosystems (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスターシティ)から、すべての試薬、プライマーおよびプローブを得た。試料あたり1ナノグラムのRNAをアッセイに用いた。miRNA-142-3pを標準化因子として用いた。テンプレートを含まない(cDNAを含まない)対照およびマイナス対照(逆転写酵素を含まない)を含むすべてのRT反応を、GeneAmp PCR 9700サーモサイクラー(Applied Biosystems)中で行った。ABI Prism 7900HT配列検出系(Applied Biosystems)を用いて、遺伝子発現レベルを定量化した。非テンプレート対照を含む、比較リアルタイムPCRを3つ組で行った。

【0080】

[00095]比較Ct法を利用して、マイクロRNAの発現を計算した。STAT v.10(テキサス州カレッジステーション)で統計分析を行った。Mann-Whitney検定を用いて、発現を比較した。>0.05のP値を統計的に有意と見なした。

【0081】

[00096]結果

[00097]上皮卵巣癌を有する28人の患者が本研究に含まれた。病期概要は以下の通りであった:病期I-8(28.5%)、病期II-2(7.1%)、病期III-8(28.5%)、病期IV-10(35.7%)。組織学的概要は以下の通りであった:漿液性(60%)、明細胞(21.2%)、類内膜(12%)、粘液性(6%)。年齢中央値は57歳であった(年齢範囲34~79歳)。卵巣癌のほとんどの群と同様に、大部分(

10

20

30

40

50

66%)は、病期IIIまたはIVの疾患を有し、そして主に(60%)漿液性組織像であった。

【0082】

[00098]マイクロアレイを用いた一次miRNA発現プロファイリングは、関心対象の23のmiRNA(2つの標準化因子を含む)を同定した。本発明者らは、本発明者らの最初の試験セット由来の関心対象の23のmiRNAを、既知のmiRNAシグネチャープロファイルと比較するため、ベン図を生成した。卵巣癌のmiRNAシグネチャーの一部として文献に公表されているmiRNAと共通である群には、関心対象の10のmiRNAがあった(図1)。

【0083】

[00099]21のmiRNAの追跡定量的RT-PCRに際して、対照と比較して、卵巣癌患者の血清において、5つのmiRNAが過剰発現されており(miRNA-21、29a、92、93および126、 $p = .0002$ 、 $p = .003$ 、 $p = .0001$ 、 $p = .0003$ 、 $p = .007$)、そして、3つのmiRNAが過小発現されていた(miR-127、155および99b、 $p = .0001$ 、 $p = .0003$ 、 $p = .0001$)。対照に対して患者におけるmiRNAの発現中央値の倍相違を図2に示す。

【0084】

[00100]3人の患者が、 $< 35 \text{ U/ml}$ の術前CA-125を有すると同定された。次いで、本発明者らは、miRNAパターンがCA-125パターンを模倣するかどうかを決定するため、正常CA-125を有する患者において、発現パターンに関して、最高血清発現を有する3つのmiRNAであるmiR-21、92および93を調べた。患者集団における発現中央値を対照と比較すると、これらの3つのmiRNAは、これらの患者において有意に過剰発現されることが見出された(表1)。

【0085】

【表1】

正常術前CA-125を有する患者におけるmiRNA過剰発現。					
ID	FIGO 病期	CA-125 (u/ml)	miR-21 患者 ^a / 対照 ^b	miR-92 患者/ 対照 ^c	miR-93 患者/ 対照 ^d
1050133	IIC	34	1.89/.79	27.5/4.3	2.37/.76
1050130	IV	13.4	1.54/.79	13.8/4.3	14/.76
1010026	IA	16.9	1.46/.79	16.1/4.3	3.5/.76
a 個々の患者血清miRNA発現を2 (ΔCt)と定義する。 b 対照におけるmiR-21の発現中央値に関する四分位範囲 (.68-.93). c 対照におけるmiR-92の発現中央値に関する四分位範囲 (2.9-8.7). d 対照におけるmiR-93の発現中央値に関する四分位範囲 (.36-1.3).					

【0086】

[00101]miRNA状態および悪性度、病期または組織学的サブタイプ間には相関はなかった。試料サイズが小さく、そして疾患の診断が最近であったため、本発明者らは、miRNA状態と無進行間隔または生存を相関させようとは試みなかった。

【0087】

[00102]考察

[00103]本発明者らは、卵巣癌と診断された個体血清からのRNAの抽出およびmiRNAの同定が実用的であることを立証する。

【0088】

[00104]本発明者らは、本明細書において、必要なRNA量を最小限にしつつ、多数の

10

20

30

40

50

miRNAをスクリーニングする、マイクロアレイプラットフォームであるリアルタイムPCRを用いた、最初の記述を示す。

【0089】

[00105]さらに、本発明者らは、本明細書において、正常CA-125を有する患者において、miRNAが早期検出バイオマーカーとなり得ることを示す。

[00106]プロファイルを生成し、続いて、19人の患者および11人の健康な対照のセットに対して調べた。選択した関心対象の21のmiRNAのうち、10のmiRNAは公表された卵巣癌プロファイルと共通であった。本発明者らが発見した5つの過剰発現miRNAの中に、3つの潜在的な癌miR: miR-21、92および93があった。miR-21の過剰発現は、神経膠芽腫、乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌、膵臓癌および胃癌において示されてきている[19、20]。これは、肝細胞癌におけるPTEN[10]、ならびに浸潤および転移の制御に関与する2つの遺伝子であるPDCD4およびmapsin[21、22]の発現を調節することが示されている。

10

【0090】

[00107]患者由来の血清において最も一貫して過剰発現されるmiRNAはmiR-92であった。mir-92a-1は、染色体13q13上に位置するmir-17-92ポリシストロンの一部である。既知の癌mirであるmir-17-92発現をリンパ腫のトランスジェニックマウスモデルにおいて強いると、リンパ腫進行の加速が明確に示された[23]。miR-93の過剰発現は、卵巣癌患者における無進行および全体の生存の減少と関連した[13]。胃腫瘍において、このクラスターは、TGF腫瘍抑制因子活性を負に制御した[24]。miR-92およびmiR-93両方について提唱される発癌活性は、本発明者らの血清の知見と一致する。

20

【0091】

[00108]公表される卵巣癌プロファイルとは逆に、本発明者らは、本明細書において、ここで、卵巣癌患者由来の血清において、miR-29aおよびmiR-126の有意な過剰発現を立証した。miR-126およびmiR-29aの両方に関して、いくつかの腫瘍抑制因子活性が提唱されてきている。mir-126は、劣った転帰と関連する喪失を伴い、乳癌における「転移抑制因子」と暗示されてきている[25]。mir-29aは、肺癌において過小発現されることが見出されてきており；肺癌で見られるメチル化パターンの調節に関連付けられてきている[26]。これらのmiRNAの過剰発現は、これらが癌mirとして振る舞うことを示唆する傾向があるが、TargetScan(4.2)は、PTENをmiR-29aの潜在的なターゲットと予測している。

30

【0092】

[00109]卵巣癌細胞株において、31の下方制御されるmiRNAのうちの1つとして、mir-127が同定されてきている[14]。これは最近、CpGアイランドに包埋されていて、そして大部分の癌細胞株において、完全にサイレンシングされていることが示されてきている。この同じ研究において、細胞株を5-アザ-2'-デオキシシチジンで処理すると、miR-127発現が回復するだけでなく、癌原遺伝子BCL6の発現も減少することが示された[27]。これらの結果を総合すると、miR-127は腫瘍抑制因子遺伝子と同定され、患者血清において発現が減少する、本発明者らの知見を裏付ける。

40

【0093】

[00110]血清由来の高品質のmiRNAの抽出に関しては、限定された量の公表データしかないことに注目すべきである。RNA分解ならびにゲノムDNA混入を経験したものの(結果は未提示)、本発明者らは、TaqManアレイ・ヒト・マイクロRNAには、400ngの総RNAしか必要でないことを見出した。さらに、関心対象のアンプリコンがおよそ25~30ヌクレオチドであるという前提で、本発明者らは、RNAのある程度の分解は許容されうると決定した。

【0094】

[00111]また、本発明者らは、ここで、リアルタイムPCRで用いた対照は、試薬(テ

50

ンプレート不含対照)による交差混入ならびにゲノムDNA混入(RTマイナス対照)のどちらも計上すると決定した。

【0095】

[000112]マイクロアレイチップは、典型的には、試料を最大約5 μ gしか利用しないため、本明細書に記載するリアルタイムに基づく方法は、血清から純粋なRNAを多量に抽出することを必要としない。本発明者らは、本明細書において、初めて、リアルタイムPCR法を用いて、血清RNAに関するmiRNAプロファイルを得ることが可能であることを示す。

【0096】

[000113]使用例およびその定義

[000114]本発明の実施は、別に示さない限り、当該技術分野の技術範囲内の薬理学、化学、生化学、組換えDNA技術および免疫学の慣用的方法を使用するであろう。こうした技術は、文献に完全に説明される。例えば、Handbook of Experimental Immunology, 第I~IV巻(D.M. WeirおよびC.C. Blackwell監修, Blackwell Scientific Publications); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 現行版); Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989); Methods In Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan監修, Academic Press, Inc.)を参照されたい。

10

20

【0097】

[000115]こうしたものとして、本明細書の定義は、さらなる説明のために提供され、そして限定と見なされないものとする。

[000116]冠詞「a」および「an」は、本明細書において、1つまたは1より多い(すなわち少なくとも1つの)その冠詞の文法的対象を指す。例えば、「要素(an element)」は、1つの要素または1より多い要素を意味する。

【0098】

[000117]「マーカー」および「バイオマーカー」は、遺伝子および/またはタンパク質および/またはその機能的変異体であって、正常のまたは健康な組織または細胞における発現レベルから改変された組織または細胞中の発現レベルが、障害および/または疾患状態と関連している、前記遺伝子および/またはタンパク質および/またはその機能的変異体である。

30

【0099】

[000118]マーカー発現の「正常」レベルは、障害および/または疾患状態に罹患していないヒト被験体または患者の細胞におけるマーカーの発現レベルである。

[000119]マーカーの「過剰発現」または「発現の有意により高いレベル」は、発現を評価するのに使用されるアッセイの標準誤差より大きい試験試料中の発現レベルを指し、そして特定の態様において、対照試料(例えばマーカーに関連する障害および/または疾患状態を持たない健康な被験体由来の試料)中のマーカーの発現レベル、そして特定の態様において、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベルの少なくとも2倍、そして他の態様において、3倍、4倍、5倍または10倍である。

40

【0100】

[000120]マーカーの「発現の有意により低いレベル」は、対照試料(例えばマーカーに関連する障害および/または疾患状態を持たない健康な被験体由来の試料)中のマーカーの発現レベル、そして特定の態様において、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベルの少なくとも2倍、そして特定の態様において、3倍、4倍、5倍または10倍低い試験試料中の発現レベルを指す。

【0101】

[000121]キットは、マーカーの発現を特異的に検出するための少なくとも1つの試薬、

50

例えばプローブを含む、任意の製品（例えばパッケージまたは容器）である。キットを、本発明の方法を実行するための単位として、販売促進し、流通させ、または販売してもよい。

【0102】

[000122]「タンパク質」は、マーカートンパク質およびその断片；変異体マーカートンパク質およびその断片；マーカまたは変異体マーカートンパク質の少なくとも15アミノ酸のセグメントを含むペプチドおよびポリペプチド；ならびにマーカまたは変異体マーカートンパク質、あるいはマーカまたは変異体マーカートンパク質の少なくとも15アミノ酸のセグメントを含む融合タンパク質を含む。

【0103】

[000123]本明細書記載の組成物、キットおよび方法は、以下の限定されない使用、とりわけ：

- 1) 被験体が障害および/または疾患状態に罹患しているかどうかの評価；
- 2) 被験体における障害および/または疾患状態の病期の評価；
- 3) 被験体における障害および/または疾患状態の悪性度の評価；
- 4) 被験体における障害および/または疾患状態の性質の評価；
- 5) 被験体において障害および/または疾患状態を進展させる潜在的可能性の評価；
- 6) 被験体における障害および/または疾患状態と関連する細胞の組織学的タイプの評価；
- 7) 被験体における障害および/または疾患状態を治療するのに有用な、抗体、抗体断片、または抗体誘導体の作製；
- 8) 被験体の細胞における障害および/または疾患状態の存在の評価；
- 9) 被験体における障害および/または疾患状態を阻害するための1以上の試験化合物の有効性の評価；
- 10) 被験体における障害および/または疾患状態を阻害するための療法の有効性の評価；
- 11) 被験体における障害および/または疾患状態の進行の監視；
- 12) 被験体における障害および/または疾患状態を阻害するための組成物または療法の選択；
- 13) 障害および/または疾患状態に罹患した被験体の治療；
- 14) 被験体における障害および/または疾患状態の阻害；
- 15) 試験化合物の潜在的有害性の評価；ならびに
- 16) リスクがある被験体における障害および/または疾患状態の開始の予防を有する。

【0104】

[000124]スクリーニング法

[000125]動物モデルを生成して、被験体における障害および/または疾患状態を治療するかまたは防止するのに有用な療法剤のスクリーニングを可能にしてもよい。したがって、方法は、被験体において、障害および/または疾患状態を治療するかまたは防止するための療法剤を同定するのに有用である。方法は、本明細書記載の方法によって作製された動物モデルに候補剤を投与し、そして候補剤を投与していない対照動物モデルに比較した際の、動物モデルにおける少なくとも1つの反応を評価する工程を含む。少なくとも1つの反応の症状が減少しているか、またはその開始が遅延している場合、候補剤は、疾患を治療するかまたは予防するための剤である。

【0105】

[000126]候補剤は、当該技術分野にすでに知られている薬理的剤であってもよいし、またはいかなる薬理的活性を有することも以前は知られていなかった剤であってもよい。剤は、天然に生じてもよいし、または実験室で設計されてもよい。剤を微生物、動物または植物から単離してもよいし、あるいは組換え的に産生してもよいし、あるいは任意の適切な化学的方法によって合成してもよい。剤は、小分子、核酸、タンパク質、ペプチド

10

20

30

40

50

またはペプチド模倣体であってもよい。特定の態様において、候補剤は、50ダルトンより大きく、そして約2,500ダルトン未満の分子量を有する、小有機化合物である。候補剤は、タンパク質との構造的相互作用に必要な官能基を含む。候補剤はまた、限定されるわけではないが：ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造的類似体またはその組み合わせを含む生体分子の中にも見出される。

【0106】

[000127] 候補剤は、合成または天然化合物のライブラリーを含む非常に多様な供給源から得られる。例えば、非常に多様な有機化合物および生体分子のランダムおよび有向 (directed) 合成のために利用可能な多くの手段があり、これには、ランダム化オリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現が含まれる。あるいは、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形の天然化合物ライブラリーが入手可能であるか、または容易に産生される。さらに、天然のまたは合成的に産生されるライブラリーおよび化合物は、慣用的な化学的、物理的および生化学的手段によって容易に修飾され、そしてこれを用いてコンビナトリアルライブラリーを産生することも可能である。特定の態様において、コンビナトリアルライブラリー法の技術分野における多くのアプローチのいずれを用いて候補剤を得てもよく、限定されない例として：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相または液相ライブラリー；デコンボリューションを要する合成ライブラリー法；「1ピーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティクロマトグラフィ選択を用いる合成ライブラリー法が含まれる。

10

【0107】

[000128] 特定のさらなる態様において、特定の薬理的剤を、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化 (amidification) 等の、有向またはランダム化学修飾に供して、構造的類似体を産生してもよい。

20

【0108】

[000129] また、被験体における障害および/または疾患状態を治療するための療法剤を同定するのと同じ方法を用いて、in vitro 研究から生じたリード化合物/剤を検証してもよい。

【0109】

[000130] 候補剤は、被験体反応経路において、1以上の障害および/または疾患状態を上方制御するかまたは下方制御する剤であってもよい。特定の態様において、候補剤は、こうした経路に影響を及ぼすアンタゴニストであってもよい。

30

【0110】

[000131] 障害および/または疾患状態を治療するための方法

[000132] 本明細書において、障害および/または疾患状態反応を治療するか、阻害するか、軽減させるかまたは逆転させるための方法を提供する。本明細書記載の方法において、シグナル伝達カスケードに干渉する剤を、限定されるわけではないが、こうした合併症がまだ明らかでない被験体、および少なくとも1つのこうした反応をすでに有する被験体などの、必要がある個体に投与する。

【0111】

[000133] 前者の場合、こうした治療は、こうした反応の発生を防止し、そして/またはそれらが起こる度合いを減少させるのに有用である。後者の場合、こうした治療は、こうした反応が起こる度合いを減少させるか、反応のさらなる発展を防止するか、または反応を逆転させるのに有用である。

40

【0112】

[000134] 特定の態様において、反応カスケードに干渉する剤は、こうした反応に特異的な抗体であってもよい。

[000135] バイオマーカー (単数または複数) の発現

[000136] マーカーの発現を多くの方式で阻害してもよく、限定されるわけではないが、例えば、マーカー (単数または複数) の転写、翻訳、または両方を阻害するために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを疾患細胞に提供してもよい。あるいは、タンパク質の機能

50

または活性を阻害するであろう細胞内抗体を生成するために、マーカータンパク質に特異的に結合し、そして適切なプロモーター/制御因子領域に機能可能であるように連結された、抗体、抗体誘導体、または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを、細胞に提供してもよい。また、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体、抗体誘導体または抗体断片で疾患細胞を治療することによって、マーカーの発現および/または機能を阻害してもよい。本明細書記載の方法を用いて、マーカーの発現を阻害するか、またはマーカータンパク質の機能を阻害する分子を同定するため、多様な分子、特に細胞膜を横断可能なほど十分に小さい分子を含む分子をスクリーニングしてもよい。被験体の疾患細胞を阻害するために、こうして同定された化合物を被験体に提供してもよい。

【0113】

[000137] 任意のマーカーまたはマーカーの組み合わせ、ならびにマーカーと組み合わせた任意の特定のマーカーを、本明細書に記載する組成物、キットおよび方法で用いてもよい。一般的に、疾患細胞中のマーカーの発現レベルおよび正常系細胞における同じマーカーの発現レベルの間の相違が可能な限り大きいマーカーを使用することが望ましい。この相違は、マーカーの発現を評価するための方法の検出限界と同程度に小さくてもよいが、少なくとも、評価法の標準誤差より大きいことが望ましく、そして特定の態様において、正常組織中の同じマーカーの発現レベルより、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、100、500、1000倍またはそれより大きい相違が望ましい。

【0114】

[000138] 特定のマーカータンパク質は、細胞を取り巻く細胞外空間に分泌されることが認識されている。組織生検試料よりもヒト被験体からより容易に収集されうる体液試料中で、こうしたマーカータンパク質が検出可能であるという事実から、これらのマーカーを組成物、キットおよび方法の特定の態様で用いる。さらに、マーカータンパク質の検出のための *in vivo* 技術には、該タンパク質に対して向けられる標識抗体を被験体内に導入する工程が含まれる。例えば、被験体における存在および位置を標準的画像技術によって検出可能である放射性マーカーで、抗体を標識してもよい。

【0115】

[000139] 任意の特定のマーカータンパク質が分泌タンパク質であるかどうかを決定するため、マーカータンパク質を、例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞株で発現し、細胞外液を収集し、そして細胞外液中のタンパク質の存在または非存在を評価する（例えばタンパク質に特異的に結合する標識抗体を用いる）。

【0116】

[000140] こうした細胞を含有する被験体試料を本明細書記載の方法で用いてもよいことが認識されるであろう。これらの態様において、試料中のマーカーの量（例えば絶対量または濃度）を評価することによって、マーカーの発現レベルを評価してもよい。細胞試料は、もちろん、試料中のマーカー量を評価する前に、多様な収集後調製および保存技術（例えば核酸および/またはタンパク質抽出、固定、保存、凍結、限外ろ過、濃縮、蒸発、遠心分離等）に供してもよい。

【0117】

[000141] マーカーが細胞から、例えば呼吸器系、消化器系、血流および/または間質空間内に脱落してもよいこともまた認識されるであろう。脱落したマーカーを、例えば、痰、BAL、血清、血漿、尿、糞便等を調べることによって、試験してもよい。

【0118】

[000142] 組成物、キットおよび方法を用いて、発現される細胞表面上にディスプレイされる少なくとも1つの部分を有するマーカータンパク質の発現を検出してもよい。例えば、免疫学的方法を用いて、細胞全体の上のこうしたタンパク質を検出してもよいし、またはコンピュータに基づく配列分析法を用いて、少なくとも1つの細胞外ドメインの存在を予測してもよい（すなわち、分泌タンパク質および少なくとも1つの細胞表面ドメインを有するタンパク質の両方を含む）。必ずしも細胞を溶解することなく（例えばタンパク質

10

20

30

40

50

の細胞表面ドメインと特異的に結合する標識抗体を用いて)、発現される細胞の表面上にディスプレイされる少なくとも1つの部分を有するマーカータンパク質の発現を検出することも可能である。

【0119】

[000143] 転写された核酸またはタンパク質の発現を検出するための非常に多様な方法のいずれによって、マーカー発現を評価してもよい。こうした方法の限定されない例には、分泌、細胞表面、細胞質または核タンパク質の検出のための免疫学的方法、タンパク質精製法、タンパク質機能または活性アッセイ、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法および核酸増幅法が含まれる。

【0120】

[000144] 特定の態様において、通常の翻訳後修飾のすべてまたは一部を経たマーカータンパク質を含むマーカータンパク質またはその断片と特異的に結合する、抗体(例えば放射標識、発色団標識、蛍光体標識または酵素標識抗体)、抗体誘導体(例えば基質と、あるいはタンパク質-リガンド対のタンパク質またはリガンドとコンジュゲート化された抗体)、または抗体断片(例えば一本鎖抗体、単離抗体超可変ドメインなど)を用いて、マーカーの発現を評価する。

【0121】

[000145] 別の特定の態様において、被験体試料中の細胞からmRNA/cDNA(すなわち転写されたポリヌクレオチド)を調製することによって、そしてマーカー核酸の相補体またはその断片である参照ポリヌクレオチドとmRNA/cDNAをハイブリダイズさせることによって、マーカーの発現を評価する。場合によって、参照ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーション前に、多様なポリメラーゼ連鎖反応法のいずれかを用いて、cDNAを増幅させてもよく;好ましくは増幅されない。定量的PCRを用いて、1以上のマーカーの発現を同様に検出して、マーカー(単数または複数)の発現レベルを評価してもよい。あるいは、マーカーの突然変異または変異体(例えば一塩基多型、欠失等)を検出する多くの方法のいずれを用いて、被験体におけるマーカーの存在を検出してもよい。

【0122】

[000146] 関連する態様において、試料から得られる転写ポリヌクレオチドの混合物を、マーカー核酸の少なくとも部分(例えば、少なくとも7、10、15、20、25、30、40、50、100、500、またはそれより多いヌクレオチド残基)と相補的なまたは相関的なポリヌクレオチドが固定された支持体と接触させる。相補的なまたは相関的なポリヌクレオチドが、支持体上で示差的に検出可能であれば(例えば、異なる発色団または蛍光体を用いて検出可能であるか、あるいは選択された異なる位置に固定されている)、単一の支持体(例えば選択された位置で固定されたポリヌクレオチドの「遺伝子チップ」マイクロアレイ)を用いて、複数のマーカーの発現レベルを同時に評価することも可能である。1つの核酸と別の核酸のハイブリダイゼーションを伴うマーカー発現を評価する方法を用いる場合、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイゼーションを行うことが望ましい。

【0123】

[000147] 特定の態様において、質量分析または表面プラズモン共鳴を用いて、バイオマーカーアッセイを行ってもよい。多様な態様において、被験体における障害および/または疾患状態に対して活性である剤を同定する方法には:a)1以上のマーカーまたはその誘導体を含む細胞の試料を提供する工程;b)こうした細胞から抽出物を調製する工程;c)抽出物を、マーカー結合部位を含む標識核酸プローブと混合する工程;およびd)試験剤の存在下または非存在下で、マーカーおよび核酸プローブ間の複合体の形成を決定する工程の1以上が含まれてもよい。決定工程には、前記抽出物/核酸プローブ混合物を、電気泳動移動度シフトアッセイに供する工程が含まれてもよい。

【0124】

[000148] 特定の態様において、決定工程は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、蛍光に基づくアッセイおよび超ハイスループットアッセイ、例えば表面プラズモン共鳴

10

20

30

40

50

(SPR)または蛍光相関分光法(FCS)アッセイから選択されるアッセイを含む。こうした態様において、SPRは、金属誘電体表面でわずかな屈折率の変化に感受性であるため、SPRセンサーは、生体分子相互作用の直接リアルタイム観察に有用である。SPRは、およそ200nmのSPRセンサー/試料界面内で、 $10^5 \sim 10^6$ の屈折率(RI)単位の変化に感受性である、表面技術である。したがって、SPR分光法は、センシング層に沈着する薄い有機フィルムの成長を監視するのに有用である。

【0125】

[000149]組成物、キット、および方法は、1以上のマーカーの発現レベルの相違の検出に頼るため、マーカーの発現レベルが、正常細胞および癌罹患細胞の少なくとも1つにおいて、発現を評価するのに用いる方法の最小検出限界より有意により大きいことが望ましい。

10

【0126】

[000150]1以上のマーカーを用いた、さらなる被験体試料のルーチンのスクリーニングによって、特定のマーカーが、被験体において、特定の障害および/または疾患状態を含む、多様なタイプの細胞において過剰発現されることが認識されるであろうことが理解される。

【0127】

[000151]さらに、より多くの被験体試料を、マーカーの発現に関して評価し、そして試料を得た個々の被験体の転帰を相関させるにつれて、特定のマーカーの改変された発現が、被験体における障害および/または疾患状態に強く相関し、そして他のマーカーの改変された発現が、他の疾患と強く相関することもまた確認されるであろう。したがって、組成物、キット、および方法は、被験体における障害および/または疾患状態の病期、悪性度、組織学的タイプ、および性質の1以上を特徴付けるのに有用である。

20

【0128】

[000152]被験体における障害および/または疾患状態の病期、悪性度、組織学的タイプ、および性質の1以上を特徴付けるために組成物、キットおよび方法を用いる場合、対応する病期、悪性度、組織学的タイプ、または性質の障害および/または疾患状態に罹患した被験体の少なくとも約20%で、そして特定の態様において、少なくとも約40%、60%、または80%で、そして実質的にすべてで、陽性結果が得られるように、マーカーまたは一団のマーカーを選択することが望ましい。約10%より大きい陽性の予測値が一般集団で得られるように、本発明のマーカーまたは一団のマーカーを選択してもよい(限定されない例において、80%を超えるアッセイ特異性と組み合わせられる)。

30

【0129】

[000153]複数のマーカーを、組成物、キットおよび方法で用いる場合、被験体試料中の各マーカーの発現レベルを、単一反応混合物(すなわち各マーカーに関する異なる蛍光プローブなどの試薬を用いて)または1以上のマーカーに対応する個々の反応混合物中のいずれかで、同じ種類の非障害および/または非疾患試料中の複数のマーカー各々の発現の正常レベルと比較してもよい。1つの態様において、対応する正常レベルと比較した、試料中の複数のマーカーの1より多くの発現レベルが有意に増加していると、被験体が障害および/または疾患状態に罹患している指標となる。複数のマーカーを用いる場合、2、3、4、5、8、10、12、15、20、30、または50またはそれより多い個々のマーカーを用いてもよく;特定の態様において、より少ないマーカーの使用が望ましい可能性もある。

40

【0130】

[000154]組成物、キット、および方法の感受性を最大にするため(すなわち被験体試料中の系起源の細胞に起因しうる干渉による)、そこで用いるマーカーが、限定された組織分布を有する、例えば非系組織で通常は発現されないことが望ましい。

【0131】

[000155]組成物、キットおよび方法が、被験体において障害および/または疾患状態を進展させるリスクが増進している被験体、およびその医学的アドバイザーに特に有用であ

50

ることが認識される。障害および/または疾患を発展させるリスクが増進していると認識される被験体には、例えば、こうした障害または疾患の家族歴を有する被験体が含まれる。

【0132】

[000156]正常ヒト系組織におけるマーカー発現レベルを多様な方式で評価してもよい。1つの態様において、正常であるように見える系細胞部分におけるマーカーの発現レベルを評価し、そして異常であると推測される系細胞部分における発現レベルと、この正常発現レベルを比較することによって、この正常発現レベルを評価する。あるいは、そして特に、本明細書に記載する方法のルーチンの実行の結果として、さらなる情報が入手可能になるにつれて、マーカーの正常発現に関する集団平均値を用いてもよい。他の態様において、マーカーの「正常」発現レベルは、非罹患被験体から、被験体における障害および/または疾患状態の開始が推測される前の被験体から得た被験体試料から、保存された被験体試料から得た被験体試料などの中のマーカーの発現を評価することによって、決定してもよい。

10

【0133】

[000157]本明細書において、試料（例えば保存された組織試料または被験体から得た試料）中の障害および/または疾患状態細胞の存在を評価するための組成物、キット、および方法も提供する。これらの組成物、キット、および方法は、必要な場合、組成物、キット、および方法を、被験体試料以外の試料で使用するために適応させることを除いて、上述のものと実質的に同じである。例えば、用いようとする試料がパラフィン包埋された保存ヒト組織試料である場合、試料中のマーカー発現のレベルを評価するのに用いる組成物、キット、または方法において、組成物中の化合物の比を調整することが必要でありうる。

20

【0134】

[000158]キットおよび試薬

[000159]キットは、疾患細胞の存在を評価するのに有用である（例えば被験体試料などの試料中）。キットは、複数の試薬を含み、その各々がマーカー核酸またはタンパク質と特異的に結合可能である。マーカータンパク質に結合するのに適した試薬には、抗体、抗体誘導体、抗体断片等が含まれる。マーカー核酸（例えばゲノムDNA、mRNA、スプライシングmRNA、cDNA等）に結合するのに適した試薬には、相補核酸が含まれる。例えば、核酸試薬には、支持体に固定されたオリゴヌクレオチド（標識または非標識）、支持体に結合していない標識オリゴヌクレオチド、PCRプライマー対、分子ビーコンプローブ等が含まれてもよい。

30

【0135】

[000160]キットは、場合によって、本明細書記載の方法を実行するのに有用なさらなる構成要素を含んでもよい。例えば、キットは、相補核酸がアニーリングするのに、または抗体に特異的に結合するタンパク質と抗体が結合するのに適した液体（例えばSSC緩衝液）、1以上の試料区画、方法の実行を記載する取扱説明資料、正常系細胞の試料、癌関連疾患細胞の試料等を含んでもよい。

【0136】

40

[000161]抗体を産生する方法

[000162]本明細書において、被験体が障害および/または疾患状態に罹患しているかどうかを評価するのに有用な抗体を産生する単離ハイブリドーマを作製する方法もまた提供する。この方法において、マーカータンパク質の全体またはセグメントを含むタンパク質またはペプチドを合成するかまたは単離する（例えば発現される細胞からの精製によって、あるいは*in vivo*または*in vitro*でタンパク質またはペプチドをコードする核酸の転写または翻訳によって）。タンパク質またはペプチドを用いて、脊椎動物、例えば哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、またはヒツジを、免疫する。場合によって（そして好ましくは）、脊椎動物を、該タンパク質またはペプチドで少なくともさらに1回免疫して、こうして脊椎動物が該タンパク質またはペプチドに頑強な免疫反応を示

50

すようにしてもよい。多様な方法のいずれかを用いて、免疫した脊椎動物から脾臓細胞を単離し、そして不死化細胞株と融合させてハイブリドーマを形成する。次いで、この方式で形成されたハイブリドーマを、標準法を用いてスクリーニングして、マーカータンパク質またはその断片に特異的に結合する抗体を産生する、1以上のハイブリドーマを同定する。この方法によって作製されるハイブリドーマおよびこうしたハイブリドーマを用いて作製される抗体もまた、本明細書に提供する。

【0137】

[000163]有効性を評価する方法

[000164]疾患細胞を阻害するための試験化合物の有効性を評価する方法もまた、本明細書に提供する。上述のように、マーカーの発現レベルの相違は、被験体細胞の異常な状態と相関する。特定のマーカーの発現レベルの変化は、おそらく、こうした細胞の異常な状態を生じるようであることが認識されるが、他のマーカーの発現レベルの変化が、これらの細胞の異常な状態を誘導し、維持し、そして促進することが同様に認識される。したがって、被験体において、障害および/または疾患状態を阻害する化合物は、1以上のマーカーの発現レベルを、そのマーカーの発現の正常レベル（すなわち正常細胞におけるマーカーの発現レベル）により近いレベルに変化させるであろう。

10

【0138】

[000165]本方法は、したがって、第一の細胞試料中にあり、そして試験化合物の存在下で維持されるマーカーの発現、および第二の細胞試料中にあり、そして試験化合物の非存在下で維持されるマーカーの発現を比較する工程を含む。試験化合物の存在下で、マーカーの発現が有意に減少していると、試験化合物が関連疾患を阻害する指標となる。細胞試料は、例えば、被験体から得られる正常細胞の単一試料のアリコット、被験体から得られる正常細胞のプールした試料、正常細胞株の細胞、被験体から得られる関連疾患細胞の単一試料のアリコット、被験体から得られる関連疾患細胞のプールした試料、関連疾患細胞株の細胞等であってもよい。

20

【0139】

[000166]1つの態様において、試料は、被験体から得られる癌関連疾患細胞であり、そして被験体において癌関連疾患を最適に阻害するようである化合物を同定するために、多様な癌関連疾患を阻害するのに有効であると考えられる複数の化合物を試験する。

【0140】

[000167]本方法を同様に用いて、被験体における関連疾患を阻害するための療法の有効性を評価してもよい。本方法において、試料対（一方は療法に供し、他方は療法に供さない）中の1以上のマーカーの発現レベルを評価する。試験化合物の有効性を評価する方法と同様、療法がマーカー発現の有意により低いレベルを誘導する場合、療法は、癌関連疾患を阻害するのに有効である。上述のように、選択した被験体由来の試料を本方法で用いる場合、被験体において、癌関連疾患を阻害するのに有効である可能性が最も高い療法を選択するために、*in vitro*で代替療法を評価してもよい。

30

【0141】

[000168]本明細書に記載するように、ヒト細胞の異常な状態は、マーカーの発現レベルの変化に相関する。試験化合物の有害な潜在能力を評価するための方法もまた提供する。この方法は、試験化合物の存在下および非存在下で、ヒト細胞の別個のアリコットを維持する工程を含む。各アリコット中のマーカーの発現を比較する。試験化合物の存在下で維持されるアリコット中のマーカーの発現レベルが有意により高い場合（試験化合物の非存在下で維持されるアリコットに比較して）、試験化合物が有害な潜在能力を所持する指標となる。関連するマーカーの発現レベルの増進または阻害の度合いを比較することによって、発現レベルが増進しているかまたは阻害されているマーカーの数を比較することによって、または両方を比較することによって、多様な試験化合物の相対的な有害な潜在能力を評価してもよい。以下のサブセクション中に、さらに詳細に、多様な側面を記載する。

40

【0142】

[000169]単離タンパク質および抗体

50

[000170] 1つの側面は、単離マーカータンパク質およびその生物学的活性部分、ならびにマーカータンパク質またはその断片に対して向けられる抗体を作製するための免疫原として使用するのに適したポリペプチド断片に関する。1つの態様において、標準的タンパク質精製技術を用いた、適切な精製スキームによって、細胞または組織供給源から、天然マーカータンパク質を単離してもよい。別の態様において、組換えDNA技術によって、マーカータンパク質の全体またはセグメントを含むタンパク質またはペプチドを産生する。組換え発現の代替法として、標準的ペプチド合成技術を用いて、こうしたタンパク質またはペプチドを化学的に合成してもよい。

【0143】

[000171] 「単離」または「精製」タンパク質またはその生物学的活性部分は、タンパク質が由来する細胞または組織供給源由来の細胞成分または他の混入タンパク質を実質的に含まず、あるいは化学的に合成した場合、化学的前駆体または他の化学薬品を実質的に含まない。用語「細胞成分を実質的に含まない」には、タンパク質が単離されるかまたは組換え的に産生された細胞の細胞構成要素からタンパク質が分離されている、タンパク質調製物が含まれる。したがって、細胞成分を実質的に含まないタンパク質には、約30%、20%、10%、または5%（乾燥重量）の異種タンパク質（本明細書において、「混入タンパク質」とも称される）を有するタンパク質調製物が含まれる。

【0144】

[000172] タンパク質またはその生物学的活性部分を組換え的に産生する場合、該タンパク質は、好ましくは、培地を実質的に含まず、すなわち培地は、タンパク質調製物体積の約20%、10%、または5%未満に相当する。タンパク質を化学的合成によって産生する場合、タンパク質は、好ましくは、化学的前駆体または他の化学薬品を実質的に含まず、すなわち、化学的前駆体またはタンパク質合成に関与する他の化学薬品から分離されている。したがって、タンパク質のこうした調製物は、約30%、20%、10%、5%（乾燥重量）未満の関心対象のポリペプチド以外の化学的前駆体または化合物を有する。

【0145】

[000173] マーカータンパク質の生物学的活性部分には、マーカータンパク質のアミノ酸配列に十分に同一であるか、またはこうした配列に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれ、全長タンパク質より少ないアミノ酸を含み、そして対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を示す。典型的には、生物学的活性部分は、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を持つドメインまたはモチーフを含む。マーカータンパク質の生物学的活性部分は、例えば、長さ10、25、50、100またはそれより多いアミノ酸であるポリペプチドであってもよい。さらに、組換え技術によって、マーカータンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的活性部分を調製して、そしてマーカータンパク質の天然型の機能的活性の1以上に関して評価してもよい。特定の態様において、有用なタンパク質は、これらの配列の1つに実質的に同一（例えば少なくとも約40%、そして特定の態様において、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%）であり、そして対応する天然存在マーカータンパク質の機能的活性を保持しながらも、天然アレル変動または突然変異誘発のため、アミノ酸配列が異なる。

【0146】

[000174] さらに、マーカータンパク質セグメントのライブラリーを用いて、変異体マーカータンパク質またはそのセグメントのスクリーニングおよびそれに続く選択のため、ポリペプチドの変化に富んだ集団を生成してもよい。

【0147】

[000175] 予測医学

[000176] 本明細書において、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノミクス、および監視臨床試験を、予後（予測）目的のために用いて、それによって個体を予防的に治療する、予測医学の分野における、動物モデルおよびマーカーの使用も提供する。したがって、本明細書において、個体が特定の障害および/または疾患を発展させるリスクがあるかどうかを決定するため、1以上のマーカータンパク質または核酸の発現レベルを決定するた

10

20

30

40

50

めの診断アッセイも提供する。こうしたアッセイを、予後または予測目的のために用いて、それによって、障害および/または疾患の開始前に個体を予防的に治療してもよい。

【0148】

[000177]別の側面において、同じ個体を少なくとも定期的にスクリーニングして、個体とその発現パターンを変化させる化学薬品または毒素に曝露されたかどうかを見る方法が有用である。

【0149】

[000178]さらに別の側面は、障害および/または疾患を阻害するか、あるいは任意の他の障害を治療するかまたは防止するために（例えばこうした治療が有しうるいかなる系の影響も理解するために）投与した剤（例えば薬剤または他の化合物）が、臨床試験においてマーカーの発現または活性に対して及ぼす影響を監視することに関する。

10

【0150】

[000179]薬学的組成物

[000180]化合物は、適切な薬学的キャリアー中の、局所、局部または全身投与するための配合物中であってもよい。E. W. Martin (Mark Publishing Company, 1975)によるRemington's Pharmaceutical Sciences, 第15版は、典型的なキャリアーおよび調製法を開示する。また、細胞をターゲティングするための生物分解性または非生物分解性ポリマーまたはタンパク質またはリポソームで形成された、適切な生物適合微小カプセル、微小粒子または微小球体中に、化合物を被包してもよい。こうした系は、当業者に周知であり、そして適切な核酸とともに使用するために最適化してもよい。

20

【0151】

[000181]核酸送達のための多様な方法が、例えばSambrookら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク;およびAusubelら, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨークに記載される。こうした核酸送達系は、例えば、そして限定ではなく、「裸の」核酸としての「裸の」型であるか、または送達に適したビヒクル中、例えば陽イオン性分子またはリポソーム形成脂質を含む複合体中で配合されるか、あるいはベクターの構成要素、または薬学的組成物の構成要素として、所望の核酸を含む。核酸送達系を細胞に、直接、例えば細胞と系を接触させることによって、または間接的に、例えば任意の生物学的プロセスの作用を通じて、提供してもよい。

30

【0152】

[000182]局所投与の配合物には、軟膏、ローション、クリーム、ジェル、ドロップ、座薬、スプレー、液体および粉末が含まれてもよい。慣用的な薬学的キャリアー、水性、粉末または油性基剤、あるいは増粘剤を望ましいように用いてもよい。

【0153】

[000183]例えば、関節内（関節中）、静脈内、筋内、皮内、腹腔内、および皮下経路による、非経口投与に適した配合物には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および意図されるレシピエントの血液と配合物を等張にする溶質を含有してもよい、水性および非水性の等調性無菌注射溶液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、分散剤、安定化剤、および保存剤を含んでもよい、水性および非水性無菌懸濁物、溶液またはエマルジョンが含まれる。注射用配合物を単位投薬型で、例えば保存剤を添加したアンプル中または多用量容器中で、提示してもよい。当業者は、過剰な実験に頼ることなく、組成物を調製しそして配合するための多様なパラメーターを容易に決定可能である。化合物を単独で、または他の適切な構成要素と組み合わせて用いてもよい。

40

【0154】

[000184]一般的に、核酸を含む化合物を投与する方法は、当該技術分野に周知である。特に、現在使用されている配合物を伴う、核酸療法のためにすでに使用されている投与経

50

路は、投与の好ましい経路を提供し、そして選択される核酸の配合物は、もちろん、特定の配合物、治療される被験体の状態の重症度、および療法的有効性に必要な投薬量などの要因に応じるであろう。本明細書に一般的に用いられるように、「有効量」は、化合物を投与されていないマッチした被験体に比較した際、配合物を投与された被験体において、障害の1以上の症状を治療するか、障害の1以上の症状の進行を逆転させるか、障害の1以上の症状の進行を停止するか、または障害の1以上の症状の発生を防止することが可能な量である。化合物の実際の有効量は、利用する特定の化合物またはその組み合わせ、配合される特定の組成物、投与様式、および個体の年齢、体重、状態、ならびに治療中の症状または状態の重症度によって多様でありうる。

【0155】

[000185]一般の当業者に知られる任意の許容されうる方法を用いて、被験体に配合物を投与してもよい。投与は、治療する状態に応じて、局在化していても（すなわち、特定の領域、生理学的系、組織、臓器、または細胞種に）、または全身性でもよい。

【0156】

[000186]薬理ゲノミクス

[000187]マーカーはまた、薬理ゲノミクスマーカーとしても有用である。本明細書において、「薬理ゲノミクスマーカー」は、その発現レベルが被験体において特定の臨床薬剤反応または感受性と相関する、客観的な生化学的マーカーである。薬理ゲノミクスマーカー発現の存在または量は、特定の薬剤または薬剤クラスでの療法に対する、被験体の予期される反応、そしてより詳細には、被験体の腫瘍の反応に関連する。被験体における1以上の薬理ゲノミクスマーカーの発現の存在または量を評価することによって、被験体に最も適しているか、またはより大きい度合いの成功を有すると予測される薬剤療法を選択可能である。

【0157】

[000188]臨床試験の監視

[000189]マーカーの発現レベルに対する剤（例えば薬剤化合物）の影響の監視は、基本的薬剤スクリーニングにおいてだけでなく、臨床試験においても適用可能である。例えば、剤がマーカー発現に影響を及ぼす有効性を、癌関連疾患のための治療を受けている被験体の臨床試験において監視してもよい。

【0158】

[000190]1つの限定されない態様において、本発明は、剤（例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣体、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬剤候補）での被験体の治療の有効性を監視するための方法であって：

- i) 剤の投与前に、被験体から投与前試料を得て；
 - ii) 投与前試料における1以上の選択されるマーカーの発現レベルを検出し；
 - iii) 被験体から1以上の投与後試料を得て；
 - iv) 投与後試料におけるマーカー（単数または複数）の発現レベルを検出し；
 - v) 単数または複数の投与後試料におけるマーカー（単数または複数）の発現レベルと、投与前試料におけるマーカー（単数または複数）の発現レベルを比較し；そして
 - vi) 被験体への剤の投与を適宜、改変する
- 工程を含む、前記方法を提供する。

【0159】

[000191]例えば、治療経過中のマーカー遺伝子（単数または複数）の発現が増加していれば、投薬量が無効であり、そして投薬量を増加させることが望ましいことが示されうる。逆に、マーカー遺伝子（単数または複数）の発現が減少していれば、治療が有効であり、そして投薬量を変化させる必要がないことが示されうる。

【0160】

[000192]電子装置読み取り可能媒体、系、アレイ、およびこれらを用いる方法

[000193]本明細書において、「電子装置読み取り可能媒体」は、電子装置によって直接読み取り、そしてアクセスすることも可能である、データまたは情報を記憶するか、保持

10

20

30

40

50

するかまたは含有する、任意の適切な媒体を指す。こうした媒体には、限定されるわけではないが：磁気記憶媒体、例えばフロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ；光学記憶媒体、例えばコンパクトディスク；電子記憶媒体、例えばRAM、ROM、EPROM、EEPROM等；ならびに一般的なハードディスクおよび磁気／光学記憶媒体などのこれらのカテゴリーのハイブリッドが含まれる。本明細書に記載するようなマーカーを記録するように、媒体を適応させ、または構成してもよい。

【0161】

[000194]本明細書において、用語「電子装置」は、任意の適切な計算またはプロセッシング装置、あるいはデータまたは情報を記憶するよう構成されるかまたは適応された他のデバイスを含むよう意図される。本発明で使用するのに適した電子装置の例には、独立型計算装置；ローカルエリアネットワーク（LAN）、広域ネットワーク（WAN）インターネット、イントラネット、およびエクストラネットを含むネットワーク；携帯情報端末（PDA）、携帯電話、ポケットベル等などの電子アプライアンス；ならびにローカルおよび分散処理システムが含まれる。

10

【0162】

[000195]本明細書において、「記録」は、電子装置読み取り可能媒体上に情報を記憶させるかまたはコード化するためのプロセスを指す。当業者は、媒体上に情報を記録するための任意の方法を容易に採用して、本明細書に記載するマーカーを含む資料を生成することも可能である。

20

【0163】

[000196]多様なソフトウェアプログラムおよびフォーマットを用いて、本発明のマーカー情報を電子装置読み取り可能媒体上に記憶させてもよい。マーカーを記録した媒体を得るかまたは生成するために、任意の数のデータプロセッサ構造フォーマット（例えばテキストファイルまたはデータベース）を使用してもよい。マーカーを読み取り可能形式で提供することによって、多様な目的のため、ルーチンにマーカー配列情報にアクセス可能である。例えば、当業者は、読み取り可能形式にあるヌクレオチドまたはアミノ酸配列を用いて、ターゲット配列またはターゲット構造モチーフを、データ記憶手段内に記憶された配列情報と比較することも可能である。検索手段を用いて、特定のターゲット配列またはターゲットモチーフとマッチする配列の断片または領域を同定する。

30

【0164】

[000197]したがって、被験体が癌関連疾患または癌関連疾患に対する素因を有するかどうかを決定するための方法であって、マーカーの存在または非存在を決定し、そしてマーカーの存在または非存在に基づいて、被験体が癌関連疾患または癌関連疾患に対する素因を有するかどうかを決定し、そして／または癌関連疾患または前癌関連疾患状態のための特定の治療を推奨する工程を含む、前記方法を実行するための指示を保持するための媒体もまた提供する。

【0165】

[000198]本明細書において、電子系および／またはネットワークにおいて、被験体がマーカーと関連した癌関連疾患または癌関連疾患に対する素因を有するかどうかを決定するための方法であって、マーカーの存在または非存在を決定し、そしてマーカーの存在または非存在に基づいて、被験体が特定の障害および／または疾患あるいはこうした障害および／または疾患に対する素因を有するかどうかを決定し、そして／またはこうした疾患または障害および／またはこうした前癌関連疾患状態のための特定の治療を推奨する工程を含む、前記方法もまた提供する。方法はさらに、被験体に関連する表現型情報を受け取り、そして／またはネットワークから被験体に関連する表現型情報を獲得する工程を含んでもよい。

40

【0166】

[000199]本明細書にやはり提供するの、ネットワークにおいて、被験体が、マーカーに関連する障害および／または疾患、あるいは障害および／または疾患に対する素因を有

50

するかどうかを決定するための方法であって、マーカーに関連する情報を受け取り、被験体に関連する表現型情報を受け取り、マーカーおよび/または障害および/または疾患に対応する情報をネットワークから獲得し、そして表現型情報、マーカー、および獲得した情報の1以上に基づいて、被験体が障害および/または疾患あるいはその素因を有するかどうかを決定する工程を含む、前記方法である。該方法は、障害および/または疾患あるいはその素因のために特定の治療を推奨する工程をさらに含んでもよい。

【0167】

[000200]被験体が障害および/または疾患あるいはその素因を有するかどうかを決定するためのビジネス方法であって、マーカーと関連する情報を受け取り、被験体に関連する表現型情報を受け取り、マーカーおよび/または障害および/または疾患に対応する情報をネットワークから獲得し、そして表現型情報、マーカー、および獲得した情報の1以上に基づいて、被験体が障害および/または疾患あるいはその素因を有するかどうかを決定する工程を含む、前記方法もまた本明細書に提供する。該方法は、そのために特定の治療を推奨する工程をさらに含んでもよい。

10

【0168】

[000201]アレイ中の1以上の遺伝子の発現をアッセイするのに使用可能なアレイもまた本明細書に提供する。1つの態様において、アレイを用いて、組織における遺伝子発現をアッセイして、アレイ中の遺伝子の組織特異性を解明してもよい。この方式で、最大約7000以上の遺伝子を、発現に関して同時にアッセイすることも可能である。これによって、1以上の組織中で特異的に発現される一連の遺伝子を示すプロファイルを発展させることが可能になる。

20

【0169】

[000202]こうした定性的決定に加えて、本明細書において、遺伝子発現の定量化を提供する。したがって、組織特異性だけでなく、組織中の一連の遺伝子の発現レベルが解明可能である。したがって、それ自体の組織発現およびその組織における発現レベルに基づいて、遺伝子をグループ分け可能である。これは、例えば、組織間または組織中の遺伝子発現の関連を解明する際に有用である。したがって、1つの組織を攪乱し、そして第二の組織中の遺伝子発現に対する影響を決定してもよい。これに関連して、生物学的刺激に反応した、別の細胞種に対する1つの細胞種の影響を決定可能である。

30

【0170】

[000203]こうした決定は例えば、遺伝子発現のレベルでの細胞-細胞相互作用の影響を知るのに有用である。1つの細胞種を治療するために剤を療法的に投与するが、別の細胞種に対して望ましくない影響がある場合、該方法は、望ましくない影響の分子的基础を決定するアッセイを提供し、そしてしたがって、相殺する剤を同時投与するかまたは別の方式で望ましくない影響を治療する機会を提供する。同様に、単一細胞種内であっても、望ましくない生物学的影響を分子レベルで決定可能である。したがって、ターゲット遺伝子以外の発現に対する剤の影響を解明しそして相殺することも可能である。

【0171】

[000204]別の態様において、アレイを用いて、アレイ中の1以上の遺伝子の発現の時間経過を監視してもよい。これは、本明細書に開示するように、多様な生物学的背景、例えば障害および/または疾患の発展、その進行、ならびにプロセス、例えばそれに関連する細胞性トランスフォーメーションで起こりうる。

40

【0172】

[000205]アレイはまた、同じ細胞または異なる細胞において、遺伝子の発現または他の遺伝子の発現の影響を解明するためにも有用である。これは、例えば、最終的なまたは下流のターゲットが制御不能である場合、療法的介入のための代替分子ターゲットの選択を提供する。

【0173】

[000206]アレイはまた、正常細胞および異常な細胞における1以上の遺伝子の示差発現パターンを解明するのにも有用である。これは、診断または療法的介入のための分子ター

50

ゲットとして働きうる一連の遺伝子を提供する。

【0174】

[000207]代理マーカー

[000208]マーカーは、1以上の障害または疾患状態、あるいはそれにつながる状態のための代理マーカーとして働きうる。本明細書において、「代理マーカー」は、疾患または障害の非存在または存在と、あるいは疾患または障害の進行と相関する客観的生化学的マーカーである。こうしたマーカーの存在または量は、疾患とは独立である。したがって、これらのマーカーは、特定の治療経過が、疾患状態または障害を和らげるのに有効であるかどうかを示すように働きうる。代理マーカーは、疾患状態または障害の存在または度合いを、標準的な方法論を通じて評価するのが困難である場合、あるいは潜在的に危険な臨床的終点に達する前に、疾患進行を評価することが望ましい場合に、特に有用である。

10

【0175】

[000209]マーカーはまた、薬理ダイナミクスマーカーとしても有用である。本明細書において、「薬理ダイナミクスマーカー」は、薬剤効果と特異的に相関する客観的生化学的マーカーである。薬理ダイナミクスマーカーの存在または量は、薬剤が投与されている疾患状態または障害に関連せず；したがって、マーカーの存在または量は、被験体における薬剤の存在または活性の指標である。例えば、薬理ダイナミクスマーカーは、生物学的組織中の薬剤濃度の指標となることも可能であり、ここでマーカーは、薬剤レベルに関連して、その組織中で発現されるかまたは転写されるか、あるいは発現されないかまたは転写されないかいずれかである。この方式で、薬理ダイナミクスマーカーによって、薬剤の分布または取り込みを監視してもよい。同様に、薬理ダイナミクスマーカーの存在または量は、マーカーの存在または量が、*in vivo*での薬剤の相対的分解速度の指標となるように、薬剤の代謝産物の存在または量に関連する可能性もある。

20

【0176】

[000210]薬理ダイナミクスマーカーは、薬剤効果の検出感度を増加させる際、特に、薬剤を低用量で投与する際に特に有用である。少量の薬剤であっても、多数周期のマーカー転写または発現を活性化するのに十分でありうるため、増幅されるマーカーは、薬剤自体よりもより容易に検出されうる量でありうる。また、マーカーは、マーカー自体の性質のため、より容易に検出されうる；例えば、本明細書記載の方法を用いて、タンパク質マーカーに関する免疫に基づく検出系で抗体を使用してもよいし、またはマーカー特異的放射標識プローブを用いて、mRNAマーカーを検出してもよい。さらに、薬理ダイナミクスマーカーの使用は、ありうる直接観察の範囲を超えて、薬剤治療によるリスクの、機構に基づく予測を提供しうる。

30

【0177】

[000211]試験のためのプロトコル

[000212]障害および/または疾患に関する試験法は、例えば、長期に渡って、被験体由来の生物学的試料中の各マーカー遺伝子の発現レベルを測定し、そしてそのレベルを、対照生物学的試料中のマーカー遺伝子のものと比較する工程を含んでもよい。

【0178】

[000213]マーカー遺伝子が、本明細書記載の遺伝子の1つであり、そして発現レベルが示差的に発現されている場合（例えば対照のものより高いかまたはより低い）、被験体は障害および/または疾患に罹患していると判断される。マーカー遺伝子の発現レベルが、許容されうる範囲内にある場合、被験体がこれに罹患している可能性は低い。

40

【0179】

[000214]発現レベルを比較するために、対照におけるマーカー遺伝子の発現レベルを測定することによって、対照に関する標準値をあらかじめ決定してもよい。例えば、対照中の上述のマーカー遺伝子の発現レベルに基づいて、標準値を決定してもよい。例えば、特定の態様において、許容されうる範囲は、標準値に基づいて、 $\pm 2 S . D .$ と解釈される。標準値を決定したら、被験体由来の生物学的試料中の発現レベルのみを測定し、そして対照に関して決定した標準値と値を比較することによって、試験法を実行してもよい。

50

【 0 1 8 0 】

[000215] マーカー遺伝子の発現レベルには、mRNAへのマーカー遺伝子の転写、およびタンパク質への翻訳が含まれる。したがって、マーカー遺伝子に対応するmRNAの発現強度、またはマーカー遺伝子にコードされるタンパク質の発現レベルの比較に基づいて、障害および/または疾患に関して試験する1つの方法を行う。

【 0 1 8 1 】

[000216] 障害および/または疾患に関して試験する際のマーカー遺伝子の発現レベルの測定は、多様な遺伝子分析法にしたがって実行可能である。特に、例えば、これらの遺伝子にプローブとしてハイブリダイズする核酸を用いたハイブリダイゼーション技術、またはマーカー遺伝子にプライマーとしてハイブリダイズするDNAを用いた遺伝子増幅技術を使用してもよい。

10

【 0 1 8 2 】

[000217] マーカー遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて、試験に用いるプローブまたはプライマーを設計してもよい。それぞれのマーカー遺伝子のヌクレオチド配列に関する識別番号を本明細書に記載する。

【 0 1 8 3 】

[000218] さらに、より高次の動物の遺伝子は、一般的に、高頻度で多型を伴うことが理解されるものとする。スプライシングプロセス中に、相互に異なるアミノ酸配列を含むアイソフォームを生じる多くの分子もまたある。マーカー遺伝子のもとの類似の活性を有する、癌関連疾患と関連する任意の遺伝子は、多型であるかまたはアイソフォームであるためにヌクレオチド配列相違を有する場合であってさえ、マーカー遺伝子中に含まれる。

20

【 0 1 8 4 】

[000219] マーカー遺伝子には、ヒトに加えて他の種の相同体が含まれてもよいこともまた理解されるものとする。したがって、別に明記しない限り、表現「マーカー遺伝子」は、種にユニークなマーカー遺伝子の相同体、または個体に導入されている外来の (f o r e i g n) マーカー遺伝子を指す。

【 0 1 8 5 】

[000220] また、「マーカー遺伝子の相同体」は、ストリンジェントな条件下で、プローブとしてのヒトマーカー遺伝子にハイブリダイズ可能な、ヒト以外の種に由来する遺伝子を指す。こうしたストリンジェントな条件は当業者に知られ、当業者は、実験的または経験的に、適切な条件を選択して、同等のストリンジェンシーを生じることも可能である。

30

【 0 1 8 6 】

[000221] マーカー遺伝子のヌクレオチド配列、またはマーカー遺伝子のヌクレオチド配列の相補鎖に相補的なヌクレオチド配列を含み、そして少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを、プライマーまたはプローブとして用いてもよい。したがって、「相補鎖」は、他方の鎖に関して二本鎖DNAの一方の鎖を意味し、そしてA:T (RNAではU) およびG:C塩基対で構成される。

【 0 1 8 7 】

[000222] さらに、「相補的」は、少なくとも15の連続ヌクレオチドの領域に完全に相補的なものだけでなく、特定の例では少なくとも40%、特定の例では50%、特定の例では60%、特定の例では70%、特定の例では80%、特定の例では90%、そして特定の例では95%またはそれより高い、ヌクレオチド配列相同性を有するものも意味する。ヌクレオチド配列間の相同性の度合いを、アルゴリズム、BLASTなどによって、決定してもよい。

40

【 0 1 8 8 】

[000223] こうしたポリヌクレオチドは、マーカー遺伝子を検出するプローブとして、またはマーカー遺伝子を増幅するプライマーとして有用である。プライマーとして用いる場合、ポリヌクレオチドは、通常、15bp~100bpであり、そして特定の態様において、ヌクレオチドの15bp~35bpである。プローブとして用いる場合、DNAは、マーカー遺伝子の全ヌクレオチド配列 (またはその相補鎖) 、または少なくとも15bp

50

ヌクレオチドを有する部分的配列を含む。プライマーとして用いる場合、3'領域は、マーカー遺伝子に相補的であればならず、一方、5'領域は、制限酵素認識配列またはタグに連結されていてもよい。

【0189】

[000224]「ポリヌクレオチド」は、DNAまたはRNAのいずれであってもよい。これらのポリヌクレオチドは、合成または天然存在のいずれであってもよい。また、ハイブリダイゼーションのためのプローブとして用いるDNAは、通常標識されている。当業者は、こうした標識法を容易に理解する。本明細書において、用語「オリゴヌクレオチド」は、比較的低い度合いの重合を伴うポリヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドはポリヌクレオチドに含まれる。

10

【0190】

[000225]例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、またはDNAマイクロアレイ技術を用いて、ハイブリダイゼーション技術を用いた障害および/または疾患に関する試験を行ってもよい。さらに、RT-PCR法などの遺伝子増幅技術を用いてもよい。RT-PCRにおける遺伝子増幅工程中に、PCR増幅監視法を用いることによって、マーカー遺伝子発現のより定量的な分析を達成することも可能である。

【0191】

[000226]PCR遺伝子増幅監視法において、検出ターゲット(DNA、またはRNAの逆転写物)を、蛍光色素、および蛍光を吸収する消光剤で標識されたプローブにハイブリダイズさせる。PCRが進行し、そしてTaqポリメラーゼが5'-3'エキソヌクレアーゼ活性でプローブを分解すると、蛍光色素および消光剤が互いに引き離され、そして蛍光が検出される。蛍光はリアルタイムで検出される。ターゲットのコピー数が知られている標準試料を同時に測定することによって、PCR増幅が線形であるサイクル数で、被験体試料中のターゲットのコピー数を決定することが可能である。また、当業者は、PCR増幅監視法が任意の適切な方法で実行可能であることを認識する。

20

【0192】

[000227]また、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質を検出することによって、癌関連疾患に関して試験する方法を実行してもよい。以下、マーカー遺伝子にコードされるタンパク質を「マーカータンパク質」として記載する。こうした試験法に関して、各マーカータンパク質に結合する抗体を用いる、例えば、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、およびELISA法を使用してもよい。

30

【0193】

[000228]マーカータンパク質に結合する、検出で用いる抗体は、任意の適切な技術によって産生可能である。また、マーカータンパク質を検出するため、こうした抗体を適切に標識してもよい。あるいは、抗体を標識する代わりに、抗体に特異的に結合する物質、例えばプロテインAまたはプロテインGを標識して、マーカータンパク質を間接的に検出してもよい。より具体的には、こうした検出法には、ELISA法が含まれてもよい。

【0194】

[000229]例えば、マーカー遺伝子またはその一部を発現ベクター内に挿入し、構築物を適切な宿主細胞内に導入して、形質転換体を産生し、形質転換体を培養して、組換えタンパク質を発現させ、そして発現された組換えタンパク質を、培養または培養上清から精製する工程によって、抗原として用いるタンパク質またはその部分的ペプチドを得てもよい。あるいは、遺伝子にコードされるアミノ酸配列、または全長cDNAにコードされるアミノ酸配列の一部を含むオリゴペプチドを化学的に合成して、免疫原として用いる。

40

【0195】

[000230]さらに、生物学的試料中のマーカー遺伝子の発現レベルだけでなく、マーカータンパク質の活性を、指標として用いて、癌関連疾患に関する試験を行ってもよい。マーカータンパク質の活性は、タンパク質に生得的な生物学的活性を意味する。各タンパク質の活性を測定するため、多様な方法を用いてもよい。

50

【0196】

[000231]これらの疾患を示唆する症状があるにもかかわらず、ルーチンの試験では、被験体が障害および/または疾患に罹患しているとは診断されない場合であっても、本明細書記載の方法にしたがって試験を実行することによって、こうした被験体が障害および/または疾患に罹患しているかどうかを容易に決定可能である。

【0197】

[000232]より具体的には、特定の態様において、マーカー遺伝子が本明細書記載の遺伝子の1つである場合、症状が、障害および/または疾患に対する感受性を少なくとも示唆する被験体において、マーカー遺伝子の発現レベルの増加または減少は、症状がそれによって一次的に引き起こされている指標となる。

10

【0198】

[000233]さらに、障害および/または疾患が被験体において改善されているかどうかを決定する試験が有用である。言い換えると、本明細書に記載する方法を用いて、治療の療法的効果を判断することも可能である。さらに、マーカー遺伝子が本明細書記載の遺伝子の1つである場合、罹患していると診断されている被験体において、マーカー遺伝子の発現レベルの増加または減少は、疾患がより進行していることを暗示する。

【0199】

[000234]障害および/または疾患の重症度および/またはこれに対する感受性もまた、発現レベルの相違に基づいて決定可能である。例えば、マーカー遺伝子が本明細書記載の遺伝子の1つである場合、マーカー遺伝子の発現レベルの増加の度合いは、障害および/または疾患の存在および/または重症度と相関する。

20

【0200】

[000235]動物モデル

[000236]1以上のマーカー遺伝子またはマーカー遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルが動物モデルにおいて上昇しているような、障害および/または疾患に関する動物モデルもまた作製してもよい。「機能的に同等な遺伝子」は、本明細書において、一般的に、マーカー遺伝子にコードされるタンパク質の既知の活性と類似の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である。機能的に同等な遺伝子の代表的な例には、動物に生得的な、被験体動物のマーカー遺伝子の対応物が含まれる。

【0201】

[000237]動物モデルは、障害および/または疾患による生理学的変化を検出するのに有用である。特定の態様において、動物モデルは、マーカー遺伝子のさらなる機能を明らかにし、そしてそのターゲットがマーカー遺伝子である薬剤を評価するのに有用である。

30

【0202】

[000238]対応物遺伝子の発現レベルを調節するかまたは対応物遺伝子を投与することによって、動物モデルを生成することも可能である。該方法には、本明細書記載の遺伝子群より選択される遺伝子の発現レベルを調節することによって、動物モデルを生成する工程が含まれてもよい。別の態様において、該方法には、本明細書記載の遺伝子によってコードされるタンパク質を投与するか、または該タンパク質に対する抗体を投与することによって、動物モデルを生成する工程が含まれてもよい。特定の他の態様において、マーカーが次いで、適切な方法を用いて測定可能であるように、マーカーを過剰発現させてもよいこともまた理解されるものとする。別の態様において、こうした遺伝子群から選択される遺伝子を導入することによって、またはこうした遺伝子によってコードされるタンパク質を投与することによって、動物モデルを生成してもよい。別の態様において、こうした遺伝子群から選択される遺伝子の発現またはこうした遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を抑制することによって、障害および/または疾患を誘導してもよい。アンチセンス核酸、リボザイム、またはRNAiを用いて、発現を抑制してもよい。活性を阻害する物質、例えば抗体を投与することによって、タンパク質活性を有効に調節することも可能である。

40

【0203】

50

[000239]動物モデルは、障害および/または疾患の根底にある機構を解明し、そしてまたスクリーニングによって得られた化合物の安全性を試験するのに有用である。例えば、動物モデルが、特定の障害および/または疾患の症状を発展させる場合、あるいは特定の障害および/または疾患に關与する測定値が動物において変化している場合、スクリーニング系を構築して、疾患を軽減させる活性を有する化合物を探索してもよい。

【0204】

[000240]本明細書において、表現「発現レベルの増加」は、以下のいずれか1つを指す：外来遺伝子として導入されたマーカー遺伝子が、人工的に発現される場合；被験体動物に生得的なマーカー遺伝子の転写、およびタンパク質へのその翻訳が増進している場合；または翻訳産物であるタンパク質の加水分解が抑制されている場合。

10

【0205】

[000241]本明細書において、表現「発現レベルの減少」は、被験体動物のマーカー遺伝子の転写、およびタンパク質へのその翻訳が阻害されている状態、または翻訳産物であるタンパク質の加水分解が増進している状態のいずれかを指す。例えばDNAチップ上のシグナル強度の相違によって、遺伝子の発現レベルを決定してもよい。さらに、正常状態のものと比較することによって、翻訳産物 - - タンパク質 - - の活性を決定してもよい。

【0206】

[000242]動物モデルには、例えばマーカー遺伝子が導入され、そして人工的に発現されている動物；マーカー遺伝子ノックアウト動物；および別の遺伝子がマーカー遺伝子を置換しているノックイン動物を含む、トランスジェニック動物が含まれてもよい。マーカー遺伝子のアンチセンス核酸、リボザイム、RNAi効果を有するポリヌクレオチド、またはデコイ核酸として機能するDNAなどが導入されているトランスジェニック動物を、トランスジェニック動物として用いてもよい。こうしたトランスジェニック動物にはまた、例えば、遺伝子のコード領域内に突然変異（単数または複数）を導入することによって、マーカータンパク質の活性が増進しているかまたは抑制されている動物、あるいは加水分解に耐性または感受性になるようにアミノ酸配列が修飾されている動物もまた含まれる。アミノ酸配列中の突然変異には、置換、欠失、挿入、および付加が含まれる。

20

【0207】

[000243]発現例

[000244]さらに、遺伝子の転写制御領域内に突然変異（単数または複数）を導入することによって、マーカー遺伝子の発現自体を調節してもよい。当業者は、こうしたアミノ酸置換を理解する。また、活性が維持される限り、突然変異されるアミノ酸の数は、特に制限されない。通常、これは50アミノ酸以内であり、特定の限定されない態様において、30アミノ酸以内、10アミノ酸以内、または3アミノ酸以内である。活性が維持される限り、突然変異の部位は、任意の部位であってもよい。

30

【0208】

[000245]さらに別の側面において、本明細書において、特定の障害および/または疾患を治療する療法剤のための候補化合物に関するスクリーニング法を提供する。1以上のマーカー遺伝子を本明細書記載の遺伝子群から選択する。マーカー遺伝子（単数または複数）の発現レベルを増加させるかまたは減少させることが可能な化合物を選択することによって、癌関連疾患のための療法剤を得てもよい。

40

【0209】

[000246]表現「遺伝子の発現レベルを増加させる化合物」は、遺伝子転写、遺伝子翻訳、またはタンパク質活性の発現の工程のいずれか1つを促進する化合物を指す。一方、表現「遺伝子の発現レベルを減少させる化合物」は、本明細書において、これらの工程のいずれか1つを阻害する化合物を指す。

【0210】

[000247]特定の側面において、障害および/または疾患のための療法剤に関してスクリーニングする方法を、*in vivo*または*in vitro*のいずれで行ってもよい。このスクリーニング法は、例えば：

50

- 1) 動物被験体に候補化合物を投与する工程；
- 2) 動物被験体由来の生物学的試料において、マーカー遺伝子（単数または複数）の発現レベルを測定する工程；あるいは
- 3) 候補化合物が接触していない対照におけるものと比較した際、マーカー遺伝子（単数または複数）の発現レベルを増加させるかまたは減少させる化合物を選択する工程によって実行可能である。

【0211】

[000248]さらに別の側面において、動物被験体を候補化合物と接触させ、そして動物被験体由来の生物学的試料中のマーカー遺伝子（単数または複数）の発現レベルに対する化合物の効果を監視することによって、マーカー遺伝子（単数または複数）の発現レベルに対する薬学的剤のための候補化合物の有効性を評価する方法を提供する。上述の試験法において使用するのと同じ技術を用いて、動物被験体由来の生物学的試料中のマーカー遺伝子（単数または複数）の発現レベルにおける変動を監視してもよい。さらに、評価に基づいて、スクリーニングによって、薬学的剤のための候補化合物を選択してもよい。

10

【0212】

[000249]本明細書に引用するすべての特許、特許出願および参考文献は、本明細書に完全に援用される。本発明は、本発明を作製し、そして使用する当業者のために十分に詳細に記載されそして例示されているが、本発明の精神および範囲から逸脱しない、多様な代替法、修飾および改善が、当業者には明らかであろう。当業者は、目的を実行するために、そして言及するものとともに本明細書に生得的な目標および利点を得るために、本発明がよく適応することを容易に認識する。

20

【0213】**[000250]特定の核酸塩基配列**

[000251]本明細書記載の成熟miRNAおよびその対応するステム-ループ配列の核酸塩基配列は、<http://microrna.sanger.ac.uk/>に見られるmiRNA配列および注釈のオンライン検索可能データベースであるmiRBaseに見られる配列である。miRBase配列データベース中のエントリーは、成熟miRNA配列の位置および配列に関する情報を含む、miRNA転写物（ステム-ループ）の予測されるヘアピン部分に相当する。データベース中のmiRNAステム-ループ配列は、厳密には前駆体miRNA（premiRNA）ではなく、そしていくつかの場合、premiRNAおよび推測される一次転写物由来のいくつかの隣接配列を含んでもよい。本明細書記載のmiRNA核酸塩基配列は、任意のバージョンのmiRNAを含み、miRBase配列データベースのRelease 10.0に記載される配列およびmiRBase配列データベースの任意の以前のReleaseに記載される配列が含まれる。配列データベースリリースは特定のmiRNAの改名を生じうる。配列データベースリリースは、成熟miRNA配列の変動を生じうる。こうした修飾オリゴヌクレオチドを含んでもよい化合物は、本明細書記載のmiRNAの任意の核酸塩基配列型に相補的であってもよい。

30

【0214】

[000252]本明細書に示す任意の核酸塩基配列は、糖部分、ヌクレオシド間連結、または核酸塩基に対するいかなる修飾からも独立である。Uを含む核酸塩基配列はまた、「U」を有する1以上の位で、「U」が「T」に交換されている同じ核酸塩基配列も含むことがさらに理解される。逆に、Tを含む核酸塩基配列もまた、「T」を有する1以上の位で、「T」が「U」に交換されている同じ核酸塩基配列も含むことが理解される。

40

【0215】

[000253]特定の態様において、修飾オリゴヌクレオチドは、miRNAまたはその前駆体に相補的な核酸塩基配列を有し、すなわち、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれより多い核酸塩基の領域に渡って、miRNAまたはその前駆体の相補体に、少なくとも60%、65%、70%、75%、8

50

0%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であるか、あるいは2つの配列は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。したがって、特定の態様において、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、そのターゲットmiRNAまたはターゲットmiRNA前駆体配列に関して、1以上のミスマッチ塩基対を有することも可能であるし、そしてターゲット配列にハイブリダイズ可能である。特定の態様において、修飾オリゴヌクレオチドは、miRNAまたはその前駆体に100%相補的である核酸塩基配列を有する。特定の態様において、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、miRNAに全長相補的である。

【0216】

[000254] miRNA (miR) 療法

[000255] いくつかの態様において、本発明は、被験体における1以上の遺伝子の発現を阻害するマイクロRNAを提供する。マイクロRNA発現プロファイルは、新規クラスの癌バイオマーカーとして働きうる。

【0217】

[000256] 1以上のMiRを用いて遺伝子発現および/または活性を阻害する方法が本明細書に含まれる。いくつかの態様において、miR (単数または複数) は、タンパク質発現を阻害する。他の態様において、miRNA (単数または複数) は、遺伝子活性 (例えば細胞侵襲活性) を阻害する。

【0218】

[000257] 一般の当業者に周知の多様な技術によって、miRNAを、細胞または組織から単離するか、組換え的に産生するか、あるいは*in vitro*で合成してもよい。1つの態様において、miRNAを細胞または組織から単離する。細胞または組織からmiRNAを単離するための技術は、一般の当業者に周知である。例えば、Ambion, Inc. のmirvana miRNA単離キットを用いて、総RNAからmiRNAを単離してもよい。別の技術は、小核酸のPAGE精製のため、flashPAGE™分画系 (Ambion, Inc.) を利用する。

【0219】

[000258] miRNA療法剤の使用のため、一般の当業者は、*in vivo*で投与される核酸が細胞および組織に取り込まれ、そして分配されることを理解する。

[000259] 剤および/または核酸送達系の組織特異的な取り込みを可能にするのに適した方式で、核酸を送達してもよい。本明細書記載の配合物は、限定されるわけではないが、抗体投与、ワクチン投与、細胞傷害剤、天然アミノ酸ポリペプチド、核酸、ヌクレオチド類似体、および生物学的反応修飾剤の投与を含む、任意の既知の慣用的療法によって、治療条件を補うことも可能である。2以上の組み合わせた化合物を一緒にまたは連続して用いてもよい。

【0220】

[000260] 本発明の特定の態様は、(a) 1以上の核酸または小分子化合物および(b) 1以上の他の化学療法剤を含有する薬学的組成物を提供する。

[000261] さらに有用な定義

[000262] 「被験体」は、治療または療法のために選択されるヒトまたは非ヒト動物を意味する。「有すると推測される被験体」は、障害、疾患または状態の1以上の臨床的指標を示す被験体を意味する。

【0221】

[000263] 「予防すること」または「予防」は、週、月、または年を含む期間で、状態または疾患の開始、発展または進行を、遅延させるかまたは未然に防ぐことを指す。「治療」または「治療する」は、障害および/または疾患の治療または軽減のために用いる1以上の特異的方法の適用を意味する。特定の態様において、特定の方法は、1以上の薬学的剤の投与である。

【0222】

[000264] 「軽減」は、状態または疾患の少なくとも1つの指標の重症度の減少を意味す

10

20

30

40

50

る。特定の態様において、軽減には、状態または疾患の1以上の指標の進行の遅延または遅滞が含まれる。当業者に知られる主観的または客観的測定値によって、指標の重症度を決定してもよい。

【0223】

[000265]「の必要がある被験体」は、療法または治療を必要とすると同定される被験体を意味する。

[000266]「投与すること」は、被験体に薬学的剤または組成物を提供することを意味し、そして限定されるわけではないが、医学的専門家による投与および自己投与が含まれる。

【0224】

[000267]「非経口投与」は、注射または注入を通じた投与を意味する。非経口投与には、限定されるわけではないが、皮下投与、静脈内投与、筋内投与、動脈内投与、および頭蓋内投与が含まれる。「皮下投与」は、皮膚のすぐ下への投与を意味する。

【0225】

[000268]「機能を改善する」は、正常なパラメーターに向けて機能を変化させることを意味する。特定の態様において、被験体の体液中に見られる分子を測定することによって、機能を評価する。「薬学的組成物」は、個体に投与するのに適した、薬学的剤を含む物質混合物を意味する。例えば、薬学的組成物は、修飾オリゴヌクレオチドおよび無菌水性溶液を含んでもよい。

【0226】

[000269]「ターゲット核酸」、「ターゲットRNA」、「ターゲットRNA転写物」および「核酸ターゲット」はすべて、アンチセンス化合物によってターゲティングされることが可能な核酸を意味する。「ターゲティング」は、ターゲット核酸にハイブリダイズして、そして所望の効果を誘導するであろう核酸塩基配列の設計および選択のプロセスを意味する。「ターゲティングされる」は、ターゲット核酸へのハイブリダイゼーションを可能にして、所望の効果を誘導する核酸塩基配列を有することを意味する。特定の態様において、所望の効果は、ターゲット核酸の減少である。

【0227】

[000270]「調節」は、機能または活性の攪乱を意味する。特定の態様において、調節は、遺伝子発現の増加を意味する。特定の態様において、調節は、遺伝子発現の減少を意味する。

【0228】

[000271]「発現」は、遺伝子のコードされる情報が、細胞に存在しそして機能する構造に変換される、任意の機能および工程を意味する。

[000272]「領域」は、核酸内の連結されたヌクレオシドの部分の意味する。特定の態様において、修飾オリゴヌクレオチドは、ターゲット核酸の領域に相補的な核酸塩基配列を有する。例えば、特定のこうした態様において、修飾オリゴヌクレオチドは、miRNAステム-ループ配列の領域に相補的である。特定のこうした態様において、修飾オリゴヌクレオチドは、miRNA配列の領域に100%同一である。

【0229】

[000273]「セグメント」は、領域のより小さいまたは下位部分を意味する。

[000274]「核酸塩基配列」は、任意の糖、連結、および/または核酸塩基修飾とは独立に、5'から3'方向の連続した核酸塩基の順序を意味する。

【0230】

[000275]「連続する核酸塩基」は、核酸において、互いに直接隣接する核酸塩基を意味する。

[000276]「核酸塩基相補性」は、2つの核酸塩基が、水素結合によって非共有的に対形成する能力を意味する。「相補的」は、第一の核酸塩基配列が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、

10

20

30

40

50

95、100またはそれより多い核酸塩基の領域に渡って、第二の核酸塩基配列の相補体に、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%同一であるか、または100%同一であるか、あるいは2つの配列がストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを意味する。特定の態様において、miRNAまたはその前駆体に100%相補的である核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドの全長に渡って、miRNAまたはその前駆体に100%相補的でなくてもよい。

【0231】

[000277]「相補性」は、第一の核酸および第二の核酸の間の核酸塩基対形成能を意味する。「全長相補性」は、第一の核酸の各核酸塩基が第二の核酸中の対応する位で各核酸塩基との対形成が可能であることを意味する。例えば、特定の態様において、各核酸塩基がmiRNA中の核酸塩基に相補性を有する修飾オリゴヌクレオチドは、miRNAに全長相補性を有する。

10

【0232】

[000278]「相補パーセント」は、核酸の長さで割った核酸中の相補核酸塩基の数を意味する。特定の態様において、修飾オリゴヌクレオチドの相補パーセントは、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基数で割った、ターゲット核酸に相補的である核酸塩基の数を意味する。特定の態様において、修飾オリゴヌクレオチドの相補パーセントは、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基数で割った、miRNAに相補的な核酸塩基数を意味する。

20

【0233】

[000279]「結合領域パーセント」は、オリゴヌクレオチド領域に相補的な領域のパーセントを意味する。結合領域パーセントは、ターゲット領域の長さで、オリゴヌクレオチドに相補的なターゲット領域の核酸塩基数を割ることによって計算される。特定の態様において、結合領域パーセントは、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%である。

【0234】

[000280]「同一性パーセント」は、第二の核酸中の対応する位の核酸塩基に同一である、第一の核酸中の核酸塩基数を、第一の核酸中の核酸塩基総数で割った値を意味する。

[000281]本明細書において、「実質的に同一である」は、第一および第二の核酸塩基配列が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれより多い核酸塩基の領域に渡って、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であるか、あるいは100%同一であることを意味する。

30

【0235】

[000282]「ハイブリダイズする」は、核酸塩基相補性を通じて生じる、相補核酸のアニーリングを意味する。

[000283]「ミスマッチ」は、第二の核酸の対応する位の核酸塩基との対形成が不可能である、第一の核酸の核酸塩基を意味する。

40

【0236】

[000284]「非相補核酸塩基」は、水素結合を通じて対形成することが不可能である、2つの核酸塩基を意味する。

[000285]「同一」は、同じ核酸塩基配列を有することを意味する。

【0237】

[000286]「miRNA」または「miR」は、コーディングRNAにハイブリダイズし、そしてその発現を制御する、長さ18~25核酸塩基の間のノンコーディングRNAを意味する。特定の態様において、miRNAは、酵素ダイサーによるプレmiRNAの切断産物である。miRNAの例は、miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)として知られるmiRNAデータベース中で見られる。

50

【0238】

[000287]「プレmiRNA」または「プレmiR」は、miRNAを含有するヘアピン構造を有するノンコーディングRNAを意味する。特定の態様において、プレmiRNAは、ドロージャとして知られる二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼによる、プリmiRの切断産物である。

【0239】

[000288]「ステム-ループ配列」は、ヘアピン構造を有し、そして成熟miRNA配列を含有するRNAを意味する。プレmiRNA配列およびステム-ループ配列は、重複していてもよい。ステム-ループ配列の例は、miRBase (microrna.sanger.ac.uk/)として知られるmiRNAデータベース中で見られる。

10

【0240】

[000289]「miRNA前駆体」は、ゲノムDNAから生じ、そして1以上のmiRNA配列を含むノンコーディング構造化RNAを含む、転写物を意味する。例えば、特定の態様において、miRNA前駆体はプレmiRNAである。特定の態様において、miRNA前駆体はプリmiRNAである。

【0241】

[000290]「アンチセンス化合物」は、ターゲット核酸へのハイブリダイゼーションを可能にするであろう核酸塩基配列を有する化合物を意味する。特定の態様において、アンチセンス化合物は、ターゲット核酸に相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである。

20

【0242】

[000291]「オリゴヌクレオチド」は、連結されたヌクレオシドのポリマーであって、各々が、互いに独立に、修飾されていてもまたは修飾されていなくてもよい。「天然存在ヌクレオシド間連結」は、ヌクレオシド間の3'から5'のホスホジエステル連結を意味する。「天然核酸塩基」は、天然存在型に比較して修飾されていない核酸塩基を意味する。「miRアンタゴニスト」は、miRNAの活性に干渉するかまたはこれを阻害するように設計された剤を意味する。特定の態様において、miRアンタゴニストは、miRNAをターゲットとするアンチセンス化合物を含む。特定の態様において、miRアンタゴニストは、miRNAの核酸塩基配列またはその前駆体に相補的な核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、miRアンタゴニストは、miRNAの活性に干渉するかまたはこれを阻害する小分子等を含む。

30

【0243】

[000292]本明細書記載の方法および試薬は、好ましい態様の代表であり、例示であり、そして本発明の範囲に対する限定としては意図されない。これらの修飾および他の使用が当業者には思い浮かぶであろう。これらの修飾は、本発明の精神内に含まれ、そして請求項の範囲によって定義される。また、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示する本発明に、多様な置換および修飾を行ってもよいことが、当業者には容易に明らかであろう。

【0244】

[000293]本発明は、好ましい態様および場合による特徴によって具体的に開示されてきているが、当業者が本明細書に開示する概念の修飾および変動に頼ることも可能であり、そしてこうした修飾および変動は、付随する請求項によって定義されるような本発明の範囲内であると見なされることが理解されるものとする。

40

【0245】

[000294]本発明は、多様なそして好ましい態様に言及して記載されてきているが、本発明の本質的な範囲を逸脱することなく、多様な変化を行ってもよく、そしてその要素を同等物で置換してもよいことが、当業者には理解されなければならない。さらに、本発明の本質的な範囲から逸脱することなく、本発明の解説に対して、特定の状況または物質を適応させるよう、多くの修飾を行ってもよい。

【0246】

50

[000295] 参考文献

[000296] 本発明を明らかにするかまたは本発明の実施に関するさらなる詳細を提供する、本明細書で用いる刊行物および他の資料は、本明細書に援用され、そして便宜上、以下の文献目録中に提供される。

【 0 2 4 7 】

[000297] 本明細書に列挙するいかなる文書の引用も、前述のいずれもが適切な先行技術であることの承認であるとは意図されない。日付に関するすべての言及、またはこれらの文書の内容に関する表明は、出願者が入手可能な情報に基づき、そしてこれらの文書の日付または内容の正確さに関するいかなる承認も構成しない。

【 0 2 4 8 】

10

【 化 1 - 1 】

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71-96.
2. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;351(24):2519-29.
3. Myers ER, Bastian LA, Havrilesky LJ, et al. Management of adnexal masses. *Evid Rep/ Technol Assess* 2006(130):1-145.
4. Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics* 2004;3(4):355-66.
5. Jacobs I, Davies AP, Bridge J, et al. Prevalence screening for ovarian cancer in post-menopausal women by CA-125 measurement and ultrasonography. *BMJ* 1993;306:1030-4.
6. Olivier RI, Lubsen-Brandsma MA, Verhoef S, van Beurden M. CA125 and transvaginal ultrasound monitoring in high-risk women cannot prevent the diagnosis of advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;100(1):20-6.
7. Jannot G, Simard MJ. Tumor-related microRNAs functions in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene* 2006;25(46):6197-201.
8. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005;120(5):635-47.
9. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(39): 13944-9.
10. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133(2):647-58.
11. Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008;133(2):217-22.
12. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67(18):8699-707.
13. Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(9):2690-5.

20

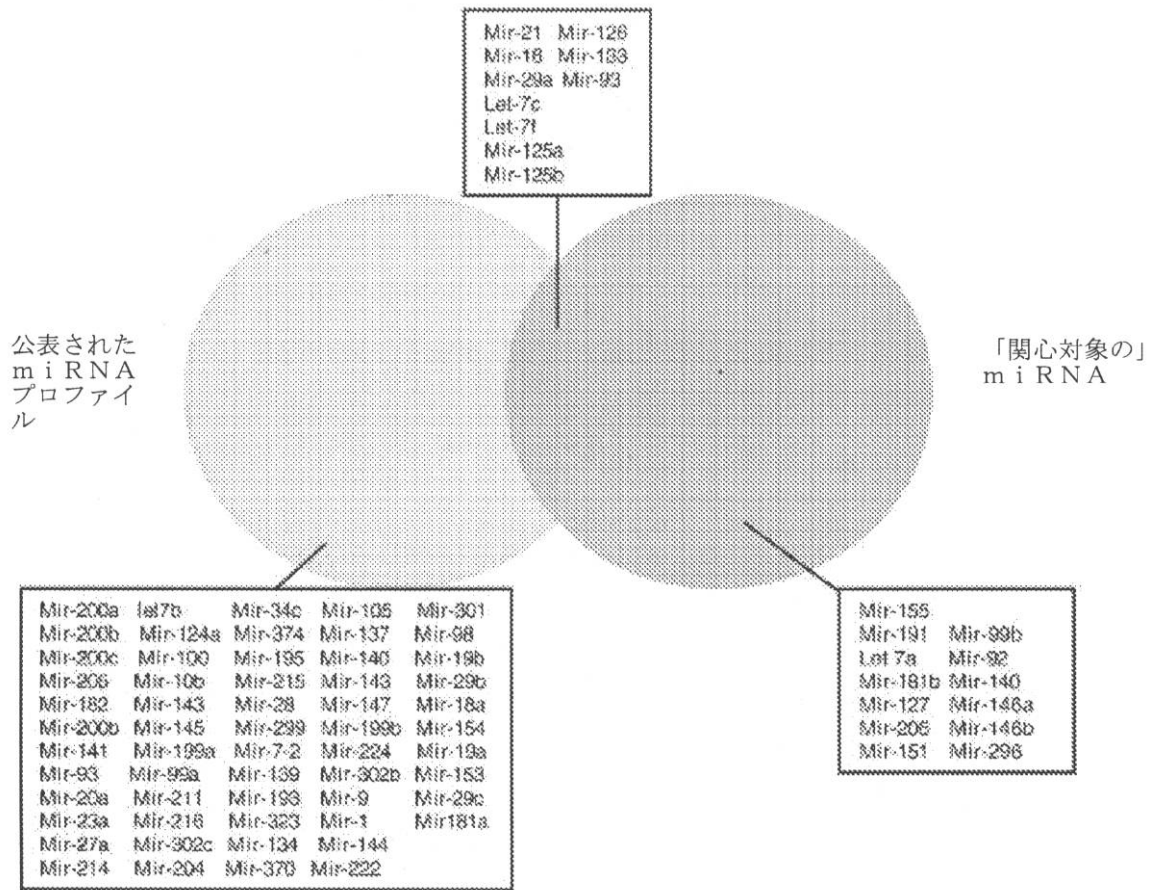
30

【 0 2 4 9 】

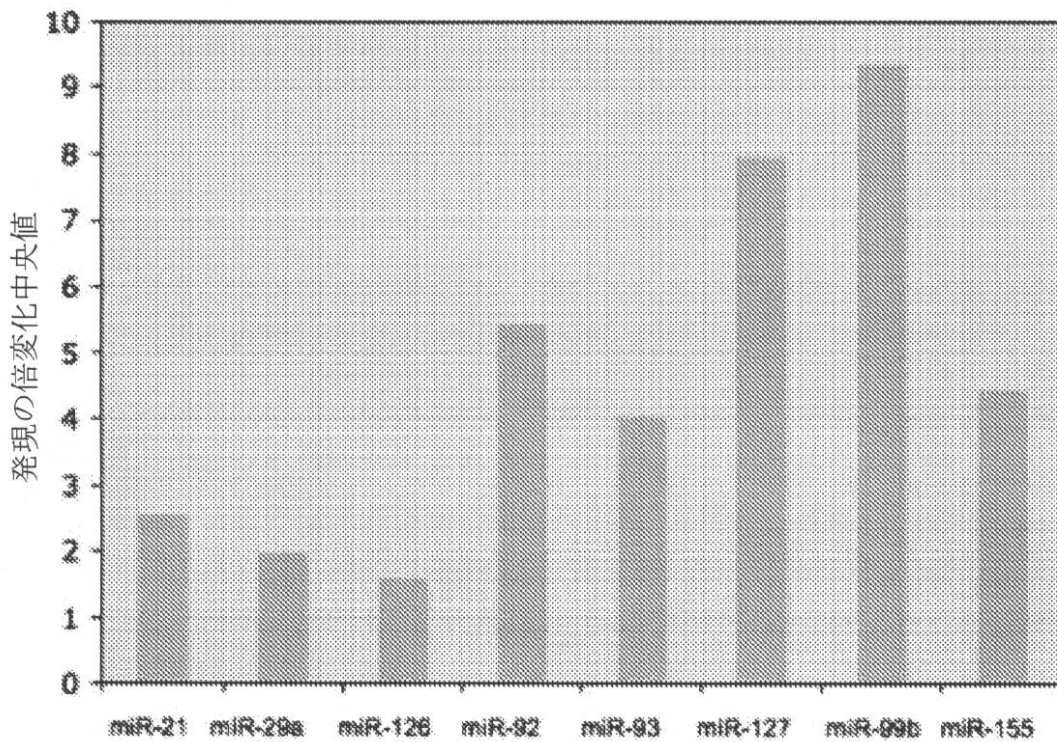
【化 1 - 2】

14. Zhang L, Volinia S, Bonome T, et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(19):7004–9.
15. Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54(3):482–90.
16. Feng G, Li G, Gentil-Perret A, Tostain J, Genin C. Elevated serum-circulating RNA in patients with conventional renal cell cancer. *Anticancer Res* 2008;28(1A):321–6.
17. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141(5):672–5. 10
18. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110(1):13–21.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(7):2257–61.
20. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an anti apoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65:6029–33.
21. Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008;18(3):350–9.
22. Secord AA, Lee PS, Darcy KM, et al, Gynecologic Oncology Group. Maspin expression in epithelial ovarian cancer and associations with poor prognosis: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 2006;101 (3):390–7. 20
23. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435(7043):828–33.
24. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008;13(3):272–86.
25. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008;451 (7175):147–52.
26. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(40):15805–10. 30
27. Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9(6):435–43.
28. Tili E, Michaille JJ, Calin GA. Expression and function of micro-RNAs in immune cells during normal or disease state. *Int J Med Sci* 2008;5(2): 73–9.

【 図 1 】



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/38214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68; C12P 19/34 (2009.01) USPC - 435/6, 435/91.2, 435/91.3 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) USPC: 435/6, 435/91.2, 435/91.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6, 91.1, 91.2, 91.3 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic Data Bases: (JPAB, EPAB, PGPB, USPT); Google Scholar Search Terms: ovarian cancer, biomarker, microRNA, serum																
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>ZHANG et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. IN: Cancer Res 15 August 2004 Vol 64 No 16 Pages 5882-90. Especially abstract.</td> <td>1,3,6 2,4,5,7-10,21,22</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>IORIO et al. MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. IN: Cancer Res 15 September 2007 Vol 67 No 18 Pages 8699-8707. Especially pg 8703 right col para 3, pg 8704 fig 3</td> <td>11,12 4,5,7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2008/0306006 A1 (CROCE et al). 11 December 2008 (11.12.2008). Especially [0024],[0046],[0047],[0056]</td> <td>2,9-10,21,22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MITCHELL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. IN: Proc Nat Acad Sci 29 July 2008 Vol 105 No 30 Pages 10513-10518.</td> <td>1-12,21,22</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	ZHANG et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. IN: Cancer Res 15 August 2004 Vol 64 No 16 Pages 5882-90. Especially abstract.	1,3,6 2,4,5,7-10,21,22	X — Y	IORIO et al. MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. IN: Cancer Res 15 September 2007 Vol 67 No 18 Pages 8699-8707. Especially pg 8703 right col para 3, pg 8704 fig 3	11,12 4,5,7	Y	US 2008/0306006 A1 (CROCE et al). 11 December 2008 (11.12.2008). Especially [0024],[0046],[0047],[0056]	2,9-10,21,22	A	MITCHELL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. IN: Proc Nat Acad Sci 29 July 2008 Vol 105 No 30 Pages 10513-10518.	1-12,21,22	<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.														
X — Y	ZHANG et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. IN: Cancer Res 15 August 2004 Vol 64 No 16 Pages 5882-90. Especially abstract.	1,3,6 2,4,5,7-10,21,22														
X — Y	IORIO et al. MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. IN: Cancer Res 15 September 2007 Vol 67 No 18 Pages 8699-8707. Especially pg 8703 right col para 3, pg 8704 fig 3	11,12 4,5,7														
Y	US 2008/0306006 A1 (CROCE et al). 11 December 2008 (11.12.2008). Especially [0024],[0046],[0047],[0056]	2,9-10,21,22														
A	MITCHELL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. IN: Proc Nat Acad Sci 29 July 2008 Vol 105 No 30 Pages 10513-10518.	1-12,21,22														
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>																
Date of the actual completion of the international search 27 July 2009 (27.07.2009)	Date of mailing of the international search report 14 AUG 2009															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/38214

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I Claims 1-12, 21, 22 are directed to a method of diagnosing whether a subject has, or is at risk for developing a ovarian-related disorder, determining a prognosis of a subject with ovarian related disorder, and/or treating a ovarian related disorder in a subject who has the ovarian related disorder and a method for screening for one or more biomarkers and the biomarkers.

Group II claims 13-15 are directed to a method for influencing transcript abundance and/or protein expression of target mRNAs in the ovary of a subject in need thereof.

Group III claim 16 is directed to the use of a large-scale gene expression profiling of microRNAs and/or protein encoding RNAs to identify alterations in microRNA function that occur in human ovarian tumors.

-----continued on Extra 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:
Group I: 1-12,21,22

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/38214

continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Group IV claim 17 are directed to a method for screening for ovarian in a subject in need thereof, comprising the step of performing real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) on a serum sample from the subject.

Group V claim 18-20 is directed to a tumor gene signature for an ovarian related disorder.

Group VI claim 23 is directed to the Use of miR-21, miR92 and/or miR-93, or functional variants thereof, as a target for at least one gene in ovarian cancer cells and/or use in inhibiting protein expression of such gene.

Group VII claim 24 is directed to a method for regulating one or more of genes expressed by ovarian cancer cells, comprising the step of altering expression of miR-21, miR92 and/or miR-93 in ovarian cancer cells.

Group VIII claim 25 is directed to the use of binding of microRNAs to 3'UTR sequences to lead to degradation and/or accumulation of targeted mRNA in mammalian ovarian cancer cells.

Group IX claim 26 is directed to the use of an inverse and/or a positive correlation between a microRNA and a mRNA in a human tissue predictive of a microRNA target gene for ovarian cancer.

Group X claims 27, 28 are directed to an miR-expression inhibitor comprising one or more of: miR-21, miR92, miR-93, miR-126 and miR-29a, or functional variants thereof.

Group XI claim 29 is directed to an miR-expression antisense inhibitor comprising one or more of: miR-155, miR-127 and miR-99b, or functional variants thereof.

Group XII claims 30-31 are directed to an oncomiR biomarker of an ovarian disorder or disease.

Group XIII claim 32-37 are directed to a method for regulating protein expression and expression of one or more genes in ovarian cancer cells.

Group XIV claims 38-41 are directed to a method for determining the prognosis of a subject with ovarian cancer.

Group XV claims 42-46 are directed to a method of treating ovarian cancer in a subject who has an ovarian cancer in which at least one biomarker is down-regulated or up-regulated in the cancer cells of the subject relative to control cells and a pharmaceutical composition.

Group XVI claims 47-51 are directed to a method of identifying an anti-ovarian cancer agent and method of determining the effectiveness of a therapy to prevent, diagnose and/or treat an ovarian cancer associated disease.

Group XVII claim 52 is directed to an article of manufacture.

Group XVIII claims 53, 54 are directed to a kit for screening for a candidate compound for a therapeutic agent to treat a ovarian cancer associated disease.

Group XIX claim 55 is directed to the use of an agent that interferes with an ovarian cancer associated disease response signaling pathway.

Group XX claims 56, 57 are directed to a method of treating, preventing, reversing or limiting the severity of an ovarian cancer associated disease complication in an individual in need thereof

Group XXI claim 58-63 is directed to a composition comprising an inhibitor of one or more of miR-21, miR-92 and miR-93 and its use

Group XXII claims 64-67 is directed to a method for detecting the presence of an ovarian cancer in a biological sample.

Group XXIII claim 68 is directed to a method for treating an ovarian cancer in a subject using miR-21, miR92, miR-93, miR-126 and miR-29a, or functional variants thereof.

Group XXIV claim 69 is directed to a method for treating an ovarian cancer in a subject using miR-155, miR-127 and miR-99b, or functional variants thereof.

Group XXV claims 70, 71 are directed to "a use, to manufacture a drug for the treatment of an ovarian cancer." [sic].

Group XXVI claims 72-76 are directed to an in vitro method to identify effective therapeutic agents or combinations of therapeutic agents to induce the differentiation of ovarian cancer cells.

Group XXVII claims 77-81 are directed to a method for classifying an ovarian tissue from a subject.

The shared technical feature of the Groups are various miRNAs and their association with the diagnosis, treatment, and development of treatments of cancers and cancerous cells. However, this is not an improvement over the prior art of WO2007081740 A2 to Croce et al. (19.07.2007) that teaches methods and compositions for the diagnosis and treatment of solid cancers as well as methods of identifying inhibitors of tumorigenesis (abstract). These include miRNAs for the identification and treatment of cancers associated with the ovaries (para [0055]), expression profiles, microarrays and the like (para [0072]) and include each of miR-29a, miR-155, miR-127, miR-99b (paras [0060], [0073], [0080], [0171], [0172], [0174], [0175] and elsewhere in the document).

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 コーン, ディヴィッド・イー
アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 2 0 9, ベックスリー, サウス・ドレクセル・アベニュー 4 1 5

(72) 発明者 レスニック, キンバリー
アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 0 0 4, ブラックリック, ラムジーズ・クロッシング・ドライブ
8 1 0 1

(72) 発明者 アルダー, ハンスユルグ
アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 2 1 2, コロンバス, アスキングー・ブルバード 2 7 0 4

(72) 発明者 クロース, カーロ・エム
アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 2 2 1, コロンバス, ケンブリッジ・ブルバード 2 1 4 0

F ターム (参考) 4B024 AA12 CA11 CA20 HA08 HA11
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ52 QR08 QR42 QR62 QS25 QS36 QX02
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 BA44 CA17 CA59 DA27 MA13 MA16
MA24 MA28 MA31 MA36 MA43 MA55 MA66 NA14 ZA81 ZB26
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 MA13 MA16 MA24 MA28 MA31
MA36 MA43 MA55 MA66 NA14 ZA81 ZB26