

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2004-523232
(P2004-523232A)**

(43) 公表日 **平成16年8月5日(2004.8.5)**

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00		4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00		4 C O 8 4
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/50	P	
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/53	D	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 112 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-559626 (P2002-559626)	(71) 出願人	503199043
(86) (22) 出願日	平成14年1月23日 (2002.1.23)		プリマゲン ホールディング ベー. フェー.
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月18日 (2003.7.18)		PRIMAGEN HOLDING B. V.
(86) 国際出願番号	PCT/NL2002/000051		オランダ国 アムステルダム メイベルグ
(87) 国際公開番号	W02002/059558		ドリーフ 59
(87) 国際公開日	平成14年8月1日 (2002.8.1)		Meibergdreef 59 Amsterdam Netherlands
(31) 優先権主張番号	01200228.3	(74) 代理人	100075557
(32) 優先日	平成13年1月23日 (2001.1.23)		弁理士 西教 圭一郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100072235
(31) 優先権主張番号	01203703.2		弁理士 杉山 毅至
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001.9.28)	(74) 代理人	100101638
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 廣瀬 峰太郎
(31) 優先権主張番号	60/325,722		
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001.9.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療評価の手段と方法

(57) 【要約】

本発明は、個体中の、たとえば癌細胞のような一群の標的細胞状態を変えるのに、治療が有効であるかどうかを測定する方法を提供する。この方法は、治療を開始後に患者から検体を採取することそして該検体が少なくとも1つのマーカー遺伝子の発現産物を含んでいるかどうかを測定することを含む。好ましくは、該検体は血液検体である。1つの局面で当該発現産物は末梢血単細胞によって発現される。該マーカー遺伝子は、血管の生成、維持および/または損傷(新脈管形成)に関与する遺伝子でありえる。本発明の方法は、カポジ肉腫に対する特定の治療が成功かどうか数日以内に測定するのに非常に適している。さらにこの方法は、新脈管形成および/または癌細胞の患者内での存在を測定するのに適している。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体中の特定の一群の標的細胞状態を変えるのに治療が有効であるかどうかを測定する方法であって、

- ・治療開始後に該個体から検体を採取すること、および
- ・該検体が少なくとも1つのマーカー遺伝子の発現産物を含んでいるかどうかを測定すること

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

標的細胞が癌細胞を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

検体が少なくとも1つの標的細胞を含むことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

検体が該治療開始の1週間以内に採取されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

【請求項 5】

検体が該治療開始の2日以内に採取されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

【請求項 6】

マーカー遺伝子が血管の生成、維持および/または損傷に関与する遺伝子を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

20

【請求項 7】

マーカー遺伝子が表 1 または 2 に示される配列を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

【請求項 8】

マーカー遺伝子が図 1 ~ 18 に示される配列、もしくはそれらの一部分またはそれら配列の類似体を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

【請求項 9】

マーカー遺伝子の発現が定量されることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

30

【請求項 10】

マーカー遺伝子の発現を対照と比較することをさらに含むことを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

【請求項 11】

癌がカボジ肉腫を含むことを特徴とする請求項 2 ~ 10 のいずれか1つの請求項に記載の方法。

【請求項 12】

発現生成物の検出方法において、図 1 ~ 18 および/または表 1 または 2 に示される配列もしくはそれらの一部分または類似体を含むことを特徴とする核酸の使用。

40

【請求項 13】

検出方法において、図 1 ~ 18 および/または表 1 または 2 に示される配列もしくはそれらの一部分または類似体を含む核酸によってエンコードされた蛋白質に特異的に結合する能力を有する蛋白様分子の使用。

【請求項 14】

個体中の癌細胞の存在を測定するための請求項 12 または請求項 13 に記載の使用。

【請求項 15】

個体中の新脈管形成部位の存在を測定するための請求項 12 または請求項 13 に記載の使用。

【請求項 16】

50

個体中の特定の一群の標的細胞状態を変えるのに治療が有効であるかどうかを決定するための請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 7】

個体中の癌を打ち消すのに治療が有効であるかどうかを決定するための請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 つの請求項に記載の使用。

【請求項 1 8】

癌がカボジ肉腫を含むことを特徴とする請求項 1 4 または請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 1 9】

個体が癌細胞および / または新脈管形成部位を含んでいるかどうかを測定する方法であって、

10

- ・該個体から検体を採取すること、および
- ・該検体が少なくとも 1 つのマーカー遺伝子の発現産物を含んでいるかどうかを測定すること

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 0】

マーカー遺伝子が、表 1 または 2、および / または図 1 ~ 1 8 に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含むことを特徴とする請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

個体が非造血性癌細胞および / または新脈管形成部位を含むかどうかを測定する方法であって、

20

患者からの造血細胞が、対照値と比較して変化したマーカー遺伝子発現産物量を含んでいるかどうかを測定することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 2】

マーカー遺伝子が新脈管形成に関与する遺伝子を含むことを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

マーカー遺伝子が、表 1 または 2、および / または図 1 ~ 1 8 に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含むことを特徴とする請求項 2 1 または請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

造血細胞が末梢血単核細胞を含むことを特徴とする請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つの請求項に記載の方法。

30

【請求項 2 5】

個体中の脈管形成過程を変化させるのに治療が有効かどうか測定する方法であって、

- ・該治療を開始後に該個体から検体を採取すること、および
- ・該検体が少なくとも 1 つのマーカー遺伝子の発現産物を含んでいるかどうかを測定すること

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 6】

治療が該患者中の新脈管形成を妨害することを含むことを特徴とする請求項 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

マーカー遺伝子が、表 1、表 2 または図 1 ~ 1 8 に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含むことを特徴とする請求項 2 5 または請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

治療が少なくとも以下の薬剤：

2 M E 2、アンジオスタチン (Angiostatin)、アンジオザイム (Angiozyme)、抗 - V E G F (Anti - VEGF) R h u M A b、アプラ (Apra (C T - 2 5 8 4))、アピシン (Avicine)、ベネフィン (Benefin)、B M S 2 7 5 2 9 1、カルボキシアミドトリアゾール、C C 4 0 4 7、C C 5 0 1 3、C C 7 0 8 5、C D C 8 0 1、C G P - 4 1 2 5 1 (P

50

K C 4 1 2)、C M 1 0 1、コンプレタスタチン (Combretastatin) A - 4 プロドラッグ、E M D 1 2 1 9 7 4、エンドスタチン (Endostatin)、フラボピリドール (Flavopiridol)、ゲニステイン (Genistein (G C P))、緑茶抽出物、I M - 8 6 2、イムザー (Imm Ther)、インターフェロンアルファ、インターロイキン - 1 2、イレッサ (Z D 1 8 3 9)、マリマスタート (Marimastat)、メタスタート (Metastat (C o l - 3))、ネオバスタート (Neovastat)、オクトレオチド (Octreotide)、パクリタクセル (Paclitaxel)、ペニシラミン、フォトフリン (Photofrin)、フォトポイント (Photopoint)、P I - 8 8、プリノマスタート (Prinomastat (A G - 3340))、P T K 7 8 7 (Z K 2 2 5 8 4)、R O 3 1 7 4 5 3、ソリマスタート (Solimastat)、スクアラミン (Squalamin)、S U 1 0 1、S U 5 4 1 6、S U - 6 6 6 8、スラジスタ (Suradista (FCE26644))、スラミン (Suramin (メタレット (Metaret)、テトラチオモリブデイト (Tetrathiomolybdate)、サリドマイド、T N P - 4 7 0、ビタキシン (Vitaxin)

10

の少なくとも一種を使用することを特徴とする請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 つの請求項に記載の方法。

【請求項 2 9】

検体が血液検体である請求項 1 ~ 1 1、1 9 ~ 2 0 または 2 3 ~ 2 6 のいずれか 1 つの請求項に記載の方法。

【請求項 3 0】

検体が末梢血単核細胞を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 1 1、1 9 ~ 2 0 または 2 4 ~ 2 7 のいずれか 1 つの請求項に記載の方法。

20

【請求項 3 1】

発現産物が、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 8 または 1 7 に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 1 1 または 1 9 ~ 3 0 のいずれか 1 つの請求項に記載の方法。

【請求項 3 2】

ケラチン 1 4 配列、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 2、8 または 1 7 に示される配列もしくはこれらの一部分または類似体が発現された P B M C の、新脈管形成の指標としての使用。

【請求項 3 3】

ケラチン 1 4 配列、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 2、8 または 1 7 に示される配列もしくはこれらの一部分または類似体が発現された P B M C の、個体中の癌細胞の存在を測定するための使用。

30

【請求項 3 4】

診断方法で使用するための、単離されたケラチン 1 4 配列、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 2、8 または 1 7 に示される配列もしくはこれらの一部分または類似体。

【請求項 3 5】

図 1 ~ 1 8 および / または表 1 または 2 もしくはこれらの一部分または類似体を含む核酸、および / または該核酸または該一部分または類似体によってエンコードされた蛋白質に特異的に結合する能力のある蛋白様分子を含むことを特徴とする診断キット。

40

【請求項 3 6】

ケラチン 1 4 配列および / または T I E 1 配列、および / またはサリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック 1 (Siglec 1) 配列、および / または図 2、8 または 1 7 に示される配列もしくはこれらの一部分または類似体を含むことを特徴とする請求項 3 5 に記載の診断キット。

【請求項 3 7】

個体中の特定の一群の標的細胞状態を変えるのにおよび / または個体中の脈管形成過程を変えるのに治療が有効であるかどうかを測定するための、請求項 3 5 または請求項 3 6 に記載の診断キットの使用。

50

【請求項 38】

個体が癌細胞または新脈管形成部位を含むかどうかを測定するための請求項 35 または請求項 36 に記載の診断キットの使用。

【請求項 39】

図 1 ~ 18、表 1 または表 2 に示される配列を含む遺伝子発現産物の薬剤標的としての使用。

【請求項 40】

サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック 1 (Siglec 1)、T I E 1、ケラチン 14 の活性を変える能力がある、および / または細胞中のサリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック 1 (Siglec 1)、T I E 1 および / またはケラチン 14 の発現を変える能力がある物質。

10

【請求項 41】

薬剤調製のための、請求項 40 に記載の物質の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、医薬の分野に関する。特に、本発明は分子生物学と検出方法の分野に関する。

【0002】

細胞内分子の変化の知識とこれら分子変化の研究技術の最近の進歩は、改善された、病態の決定方法とその治療方法をもたらした。癌の内在する分子多様性を理解することによって、たとえば、形態学的に類似した癌の治療への対応の多様性が一層良好に理解ができるようになった。

20

【0003】

改良された病態決定法は、治療を受けている癌患者の治療方法に影響を与える。現在の治療法の短所は、しかしながら、患者への治療方法が現実には有効か否かを決定するまでに比較的長い時間を要することである。このことが投与量および / または治療計画の最適化を遅らせている。さらに、このことが一緒になって、療養法の適正化の可能性を遅らせている。たとえば、治療の適正化は、現在、施された治療法が体内の癌細胞の肉眼による分析で有効でないと認められたときにのみ可能である。肉眼での変化は、通常はそれがはっきりと現れるのに数週間を要し、そのような変化を測定する機器はしばしば使用の準備ができていないことがある。

30

【0004】

本発明は、個体中の特定の一群の標的細胞状態を変えるのに治療が有効であるかどうかを測定する方法を提供するものであり、該治療開始後に患者から検体を採取することおよび該検体が少なくとも 1 つのマーカー遺伝子の発現産物を含んでいるかどうかを測定することを含んでいる。本発明の 1 つの実施形態では、該一群の標的細胞が癌細胞を含んでいる。一群の標的細胞の状態変化とは、ここでは該一群の標的細胞の少なくとも 1 つの特性が変化することを意味する。たとえば、該標的細胞の数量が変化するかも知れない。かかる数量は増加または減少するかもしれない。あるいはまた、当該標的細胞の活性が変化するかもしれない。該活性は複写活性であってもよい。他の例として、該活性は新脈管形成に伴う活性でありえる。あるいはアポプティック (apoptotic) 活性でもよい。

40

【0005】

分子レベルで癌細胞および / または周囲組織は有効な治療に分子レベルですばやく反応することが発見された。この反応は、マーカー遺伝子の発現産物を測定することによって検出することができる。マーカー遺伝子の発現産物は治療への応答を示している。マーカー遺伝子は、通常、該一群の標的細胞、たとえば、癌細胞および / または周辺組織によって発現される遺伝子である。しかしながらマーカー遺伝子はまた体内の他部分の非癌細胞、たとえば赤血球および / または心臓血管細胞においても発現される。

【0006】

あるいは、マーカー遺伝子の発現は個体に治療を行ったときに開始されうる。マーカー遺伝子発現産物は患者に施された治療に応答する。応答は発現産物の比較量の変化でありえ

50

る。しかしながら、それはまたRNAおよび/または蛋白質のような発現産物が絶対的に存在するか非存在であるかという変化でもありえる。

【0007】

本発明に従えば、患者から取得した検体は少なくとも1つの前述の標的細胞を含む。これは癌から遊離して患者の血中で循環している循環癌細胞を検出するのに特に好ましい。あるいは、該標的細胞を非癌細胞とすることもできる。本発明の他の実施形態では、該検体はいかなる標的細胞も含まない。しかしながら、該検体はもう一つの非標的細胞を含むことができる。この非標的細胞による少なくとも1つのマーカー遺伝子の発現または発現の変化は、特定の一群の標的細胞の状態を示している。該非標的細胞は、好ましくは以下に記載するような末梢血単核細胞を含んでいる。さらに他の態様では、上記の検体はいかなる細胞をも含まない。たとえば、それぞれの個体の他の場所で標的細胞または非標的細胞によって生産されたマーカー遺伝子の発現産物も上記検体で検出できるレベルで存在しえる。

10

【0008】

本発明の方法によって該個体に治療が有効かどうかを測定することが可能である。これは、治療中あるいは該治療の短時間の後であることができる。このようにして、たとえば治療計画、投与量と病態(type)を個々の患者ごとに適正化することができる。該検体は治療開始の1週間内に採取することが好ましい。さらに好ましくは、該検体は治療開始の2日以内に採取される。本発明の方法によって、当該治療の開始後ほとんど直ぐに治療効果を評価することができる。従って、本発明の方法は治療の適正化が必要か否かの決定に良好な機会を提供する。

20

【0009】

マーカー遺伝子は、好ましくは血管の新生、維持および/または損傷(新脈管形成)に関する遺伝子を含む。新脈管形成の過程にかかわる遺伝子類には他の受容体、リガンドおよびシグナル分子が包含される。癌細胞は、癌塊の増大維持のために新血管の成長に依存している。一方、血管には癌部位へ栄養を輸送することが必要とされており、これに対して老廃物は癌から輸送されることが必要である。本発明で、血管の新生、維持および/または損傷に関する遺伝子の発現産物が、なかんずく、抗癌治療に应答することが示された。従ってそのような遺伝子は本発明の非常に好ましいマーカー遺伝子である。1つの実施形態として、該マーカー遺伝子は、表1または2に記載された配列を含む。他の実施形態では、該マーカー遺伝子は、図1~18に示される配列もしくはこれら配列の一部分または類似体を含む。好ましい実施形態では、該マーカーはTIE1配列、サリオアドヘシン(Saliadhesin)またはシグレック1(Siglec 1)配列、図8または17に示される配列、もしくはこれら的一部分または類似体を含む。

30

【0010】

マーカー遺伝子の発現産物のレベルの変化は、治療が有効かそうでないかを示すものである。たとえば、マーカー遺伝子の発現産物のレベルは、治療が有効であるときは高くなり、そうでない場合はマーカー遺伝子の発現産物のレベルは低くなる。従って、好ましくは、マーカー遺伝子の発現産物は定量される。検体中の発現産物のレベルは、マーカー遺伝子の発現変化によって変化する。しかしながら、該検体中の該発現産物を含む細胞型の変化、たとえば、治療に関連する検体が採取された体の部位での細胞の死滅によって発現産物レベルは変化する可能性がある。マーカー遺伝子の発現産物のレベル患者ごとに異なることを考えて、本発明の方法はさらに、当該マーカー遺伝子の発現産物のレベルを対照と比較することを含む。好ましくは、該対照は、治療の前のまたは治療が施されていない同型の癌細胞を含む。好ましくは、該癌細胞は同じ患者から得られる。有効な治療と有効でない治療において、マーカー遺伝子の発現産物レベルの差は非常に大きい。極端な場合には、発現産物のレベルは、検出可能から検出不可能までの範囲で変動する。本発明では、発現産物でそのような0対1関係を表すマーカー遺伝子が好ましい。0対1関係は比較的単純な検査システムに使用することができる。もちろん、0対1関係はマーカー遺伝子の発現産物を検出するために使用される検出システムに依存する。非常に感度のよい発現産

40

50

物検出システムは、低感度の検出システムが発現産物を検出しない場合でも発現産物を通常に検出するであろう。発現産物は、該マーカ―遺伝子から転写されたRNAまたはその一部分、もしくは翻訳された蛋白質またはその一部であることができる。この分野における通常の技術者は、この好適な本発明実施形態を実施するために最も適切な発現検出システムを十分に設計することができるであろう。

【0011】

RNAまたはDNA分子の一部分とは、ここでは少なくとも50のヌクレオチドを含むRNAまたはDNA配列と定義される。ここでは、発現産物の一部分および/または類似体とは、検出感度は異なるかもしれないが、該発現産物と実質的に同一種類の検出方法を使用して検出可能な発現産物の一部分および/または類似体と定義される。RNAまたはDNA分子の類似体とは、ここでは、その配列が実質的に特定のRNAまたはDNA配列と同一のRNAまたはDNA配列と定義される。しかしながら、実質的に該特定のRNAまたはDNA配列の検出と比較して該類似体の検出を変えることなく、ヌクレオチド変異、置換、変質、付加および/または欠失が天然および/または人工的に起こってもよい。この分野における通常の技術者は、この技術分野で知られた技術を使用して、提起されたRNAまたはDNAが特定のRNAまたはDNA類似体であるかどうかを十分に決定することができる。

10

【0012】

好ましい実施形態では、前述の癌はカポジ肉腫 (Kaposi's Sarcoma) を含む。カポジ肉腫は増殖性血管の疾病で、従って、新脈管形成に關与するマーカ―遺伝子を同定するのに適している。本発明に従えば、新脈管形成因子の変化は、なかならず、治療の結果としてマーカ―に起こる事象である。カポジ肉腫 (KS) は臨床的には赤みを帯びた皮膚病変として出現する。

20

【0013】

カポジ肉腫は、青みがかった赤色の皮膚団塊が通常、下肢に、もっと頻繁には足指と脚に発現し、そしてゆっくりと大きさと数が増えてもっと基部に近い領域に広がることに特徴づけられる、多中心性の悪性腫瘍性の血管増殖である。癌は内皮連結経路と紡錘型細胞の種々の大きさの集合体が混ざり合った血管空間を有しており、しばしば皮膚と皮下組織に限定して留まっているが、広範囲な内蔵の關与が起こり得る。カポジ肉腫はヨーロッパとアメリカ合衆国のユダヤ人男性とイタリア男性に自然発生する。幼児における悪性変種がアフリカのいくつかの地域に特有である。第3の型が腎臓移植患者の約0.04%に発生する。またエイズ (AIDS) 患者に高い頻度の発生がある。(From Dorland, 27th ed & Hollandet. al., Cancer Medicine, 3d ed. pp 2105 - 7)

30

【0014】

カポジ肉腫はHIV感染者で悪性である。損傷を引き起こしている新脈管形成機構は、ウイルスと細胞遺伝子発現との相互作用から生じ、どの遺伝子が關与し何がそれらの発現を制御しているのかということについてはよく理解されていない。KSにおける新脈管形成の増殖には、新脈管形成に共通らしい機構が關与している。カポジ肉腫の主要役割はこの癌のフランス名: angiosarcomatose kaposi)、によって明瞭に説明されている。カポジ肉腫においては新脈管形成が主要役割であるので、新脈管形成に關与するマーカ―遺伝子の測定は、カポジ肉腫の治療が有効かどうかを測定するために非常に好適である。

40

【0015】

本発明で、カポジ肉腫の遺伝子発現パターンは、遺伝子発現の連続分析 (serial analysis of gene expression (SAGE)) (Velculescu et. al., (1995) Science 270;484 - 487) と呼ばれる方法で試験された。この方法は、多数の転写体の定量的で連続的な分析を可能にする。SAGEは2つの原理に基づいている。第1に、短いヌクレオチド配列タグ (TAG) (14塩基対) は、もしそれが転写体内の限定された位置から単離されれば、転写体を固有に同定するための十分な情報を含んでいる。第2に、短配列タグ (TAG's) の鎖状体化により、単一クローン内での多種多様のタグ (TAG's) の配列決定法によって連続的に転写体の効率的な分析が可能になる。

50

【0016】

要するに、この方法ではビオチン化されたオリゴ(dT)プライマーがmRNAからのcDNA合成に使用され、そして制限酵素での消化の後に、最端の3'末端(ポリ-A末端に近い)が単離される。このcDNAの3'断片はリンカーに結合され、そしてタイプI制限酵素で切断されて原型のcDNAの短鎖配列(14塩基対)を遊離する。そのタグ(TAG's)は、ジタグ(di-TAG's)に結合されPCR法で増幅される。このジタグ(di-TAG's)はリガーゼで結合され鎖状体(concatamers)を形成し、この鎖状体(concatamers)はクローン化されその配列が決定される。このようにして、1つの配列決定反応が、多数の異なるRNAの分布に関する情報を与える。最後に、必要なコンピュータソフトウェアを使用して多数の異なるタグについての計算と遺伝子バンク(Genbank)タグ(TAG's)との照合が実施される。

10

【0017】

もう1つの実施形態において、本発明は、図1~18および/または表1または2に示された配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む核酸の発現産物の検出法での使用を提供する。好ましくは、該核酸は、TIE1配列、サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)配列、図8または17に表示された配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む。個体中のマーカー遺伝子の発現は、該核酸もしくはその一部分または類似体が、該個体の検体中の核酸、好ましくはRNAとハイブリッド形成するかどうかを測定することによって検出することができる。もし、ハイブリッド形成が起これば、当該個体でマーカー遺伝子が発現していることを示す。もちろん、この分野の通常技術を有する者に知られているように、DNA/RNAのコーディングストランド(coding strand)は、対応する2重鎖核酸配列の相補的な鎖とハイブリッド形成をすることができる。従って、特定のコーディングストランド(coding strand)の相補的ストランドが該コーディングストランド(coding strand)の発現の検出に特に好ましい。たとえば、図1~18および/または表1または2に示されるコーディングストランド(coding strand)の相補的ストランドが、該コーディングストランド(coding strand)を含む遺伝子発現の検出に適している。

20

【0018】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、図1~18および/または表1または2に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む核酸によってエンコードされた(encoded)蛋白質に特異的に結合する蛋白性分子の検出法における使用を提供する。好ましくは、該蛋白性分子は、TIE1配列、サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)配列、図8または17に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む核酸によってエンコードされた蛋白質に特異的に結合する能力を有する。本発明のもう1つの実施形態において、該使用は、個体の新脈管形成の部位の存在を測定することに向けられる。本発明のもう1つの実施形態では、該使用は、個体中の癌細胞の存在を測定することに向けられる。個体中の癌細胞の存在は、該癌細胞が発現産物検出法によって検出することのできるマーカー遺伝子を典型的に発現するので、測定することができる。たとえば、該マーカー遺伝子の発現産物に対して特異的に指向された抗体またはその類似体を生成させることができる。該抗体またはその類似体は、検体中で該マーカー遺伝子の発現産物の測定に好適である。個体中の癌細胞の存在を測定するために個体から得られた検体は該抗体とインキュベートされる。もし該検体が該マーカー遺伝子の発現産物を含んでいるならば、該抗体は結合するであろう。結合は、当該分野で既知の技術、たとえばエンザイムイムノアッセイ(ELISA)によって証明することができる。もし該抗体の結合が証明されると、該検体は該マーカー分子の発現産物を含有していると結論づけることができる。該マーカー分子は癌細胞によって発現されるので、該マーカー分子の発現産物の存在によって、個体中の癌細胞の存在を示すことができる。もちろん、蛋白性結合分子の使用によって発現産物を検出するためにもっと多くの代替技術があるが、それらはこの技術分野でよく知られており、ここでさらに論ずる必要はない。すなわち、癌細胞によって発現された蛋白質は、図1~18および/または表1または2、たとえば

30

40

50

T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) および / またはシグレック1 (Siglec 1) 配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む核酸によってエンコードされた蛋白質に特異的な結合能力を有する蛋白性分子で検出することができる。同様に、個体中の新脈管形成部位の存在はマーカー遺伝子の発現産物を検出することによって測定することができる。

【0019】

本発明のもう1つの実施形態では、図1～18および / または表1または2に示される配列を含む核酸の使用、または、図1～18および / または表1または2に示される配列を含む核酸もしくはそれらの一部分または類似体によってエンコードされた蛋白質に特異的に結合能力を有する蛋白性分子の使用は、治療が個体中標的細胞の一定セットの状況変化に有効かどうかを決定するのに好適である。好ましい実施形態には、該核酸はT I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック1 (Siglec 1) 配列、図8または17に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む。もう1つの好ましい実施形態では、該蛋白性分子は、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック1 (Siglec 1) 配列、図8または17に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む核酸によってエンコードされた蛋白質に特異的に結合する能力を有する。さらに好ましくは、該使用は、治療が個体中で癌細胞を打ち消すのに有効かどうかを決めるのに好適である。本発明の1つの実施形態において、該癌細胞はカポジ肉腫を含む。

10

【0020】

本発明の一態様において、表1または2および / または図1～18に示される配列を含む核酸の、新脈管形成のための指標としての使用を提供する。好ましい実施形態で本発明は、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) またはシグレック1 (Siglec 1) 配列、図8または17に示される配列、もしくはそれらの一部分または類似体を含む核酸の、新脈管形成に関する指標としての使用を提供する。たとえば、図1～18および / または表1または2に示される配列を含む核酸は、再生治療のコースでの新脈管形成過程に関する検出マーカーとして使用することができる。検出マーカーの発現レベルの変化は、再生治療コースで誘導された活性化血管の成長 (すなわち、新脈管形成) を示す。好ましい実施形態で、そのような応用は心臓と冠状動脈疾病の分野で、新生血管によって影響を受けた臓器への新しい血液供給の生成を目的としている。同様に、抗新脈管形成薬による治療は、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) および / またはシグレック1 (Siglec 1) 配列のような、図1～18および / または表1または2に示される検出マーカーの発現レベルの変化によってモニターすることができる。

20

30

【0021】

もう1つの態様において、本発明は、図1～18および / または表1または2に示される配列を含む核酸の癌細胞の検出マーカーとしての使用を提供する。さらにもう1つの態様において、本発明は、図1～18および / または表1または2に示される配列を含む核酸によりエンコードされた蛋白様分子、もしくは図1～18および / または表1または2に示されるような配列を含む核酸によりエンコードされた蛋白質に結合能力を有する蛋白様分子の、癌細胞の検出マーカーとしての使用を提供する。

40

【0022】

本発明の方法で、個体の特別な状態をモニターすることが可能である。疾病の存在、または進行中の病変は、個体の検体がマーカー遺伝子の発現産物を含んでいるかどうか測定することによって決定することができる。このことは、また、検体にマーカー遺伝子が存在しないと、疾病の存在または疾病の進行の危険性があることも意味している。このことは、疾病に少なくとも1つのマーカー遺伝子の変化した発現パターンが関与する限り、どんな疾病にも可能性がある。好ましくは、検体中のマーカー遺伝子の存在が測定される。

【0023】

さらに治癒過程も追跡することができる。たとえば、損傷を受けた組織の回復にはその期間を通してマーカー遺伝子発現産物の量の増加が伴うことがありえる。しかしながら、損

50

傷した組織の回復にはその期間を通してマーカー遺伝子発現産物の量の減少が伴う可能性がある。異なる時間間隔で採取された検体は、異なった時間間隔で生成される発現産物の量について情報を提供する。その間に検体中に見出された特定の発現産物の変化量は、生成した組織の量を示す。同様に、検体中に特定期間中に見出された発現産物の減少量は、ある種の、有益か有害かいずれかの過程を示す。たとえば、該過程は疾病の進行または治療に参与しているかもしれない。重要な応用は、心臓と冠状動脈疾病の治療である。本発明の方法は、新心筋組織の生成のモニターリングに極めて適している。

【0024】

すなわち、本発明の1つの態様は、診断方法、特に個体が癌細胞および/または新脈管形成部位を含んでいるかどうかを測定する方法を提供し、個体から検体を採取すること、そして該検体が少なくとも一つのマーカー遺伝子の発現産物を含有しているかどうかを測定することを含む。好ましくは、該マーカー遺伝子は、表1または2および/または図1~18、もしくはこれらの一部分または類似体を含む。さらに好ましくは、該マーカー遺伝子は、TIE1配列、サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)配列、図8または17に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を含む。本発明の方法で、癌から遊離して体内の他の場所に存在する癌細胞を検出することが可能である。好ましい実施形態でかかる検出方法は、循環している癌細胞を人の血中で検出することにより実施される。これら循環癌細胞は、他の人体部分での予備検出のために使用することができ、また当初の人体部位に隣接する人体の他部位への癌転移リスクの検出のためにも使用することが可能である。同様に、本発明の方法は、個体中の新脈管形成部位を測定するためにも好適である。たとえば、新脈管形成の増加したレベルは、癌細胞の存在を示すか、または、たとえば、心臓と冠動脈疾病の回復のように損傷組織の治療をしめす。

【0025】

新脈管形成過程はいまや本発明の方法によって容易にモニターできるので、ある特定の治療が新脈管形成過程を変えるのに有効かどうかを測定するのと同様に容易である。たとえば、もしある特定の治療が新脈管形成過程を妨害するのに有効ならば、新脈管形成に参与しているマーカー遺伝子の発現産物量もその期間を通じて減少する。当該技術分野で、新脈管形成治療のための多くの薬剤が知られている。したがって、本発明の1つの実施形態は、治療が個体中の新脈管形成過程を変化させるのに有効かどうかを測定するための方法を提供し、該治療を開始後に該個体から検体を採取すること、そして、該検体が少なくとも一つのマーカー遺伝子を含有しているかどうかを測定することを含む。好ましくは、該マーカー遺伝子は、表1、2、および/または図1~18に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を含む。さらに好ましくは、該マーカー遺伝子は、TIE1配列、サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)配列、図8または17に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を含む。1つの実施形態で上記の治療は、該個体中の新脈管形成を妨害することを含む。さらにもう1つの実施形態では、該治療は、次の薬剤の少なくとも1種の使用を含む：2ME2、アンジオスタチン(Angiostatin)、アンジオザイム(Angiozyme)、抗-VEGF(Anti-VEGF)Rhumb, アブラ(Apra(CT-2584))、アビシン(Avicine)、ベネフィン(Benefin)、BMS275291、カルボキシアミドトリアゾール、CC4047, CC5013, CC7085, CDC801, CGP-41251(PKC412), CM101、コンプレタスタチン(Combretastatin)A-4プロドラッグ、EMD121974、エンドスタチン(Endostatin)、フラボピリドール(Flavopiridol)、ゲニステイン(Genistein(GCP))、緑茶抽出物、IM-862、イムザー(ImmTher)、インターフェロンアルファ、インターロイキン-12、イレッサ(ZD1839)、マリマスタート(Marimastat)、メタスタート(Metastat(Col-3))、ネオバスタート(Neovastat)、オクトレオチド(Octreotide)、パクリタクセル(Paclitaxel)、ペニシラミン、フォトフリン(Photofrin)、フォトポイント(Photopoint)、PI-88、プリノマスタート(Prinomastat(AG-3340))、PTK787(ZK22584)、RO31745

3、ソリマスタート (Solimastat)、スクアラミン (Squalamin)、SU101、SU5416、SU-6668、スラジスタ (Suradista (FCE26644))、スラミン (Suramin (メタレット (Metaret))、テトラチオモリブデイト (Tetrathiomolybdate)、サリドマイド、TNP-470 および / または ビタキシン (Vitaxin)。しかしながら熟練者は該治療中に使用し得るさらに多種の薬剤を思いつくことができる。

【0026】

好ましい実施形態では、本発明の方法の検体は血液検体である。たとえば新脈管形成過程の部位は、癌または皮膚の一部である可能性があるが、血液検体は採取に容易であるのでとりわけ好ましい。血液検体はまた多くの場合検査するのが容易であり、高価なそして / または特別な装置を必要としない。極めて驚くべきことに、我々は、末梢血単核細胞 (P B M C) のような造血細胞 (hemopoietic cell) によるある種のマーカー遺伝子の発現が、個体のどこか他の部位で起こっている一連の変化を表示し得ることを見出した。たとえば、P B M C 中のマーカー分子発現産物の存在または量変化は、身体どこかに癌細胞が存在することを示し得る。実施例 10 では、たとえば T I E 1 配列 (タグ 15、表 3) または サリオアドヘシン (Salioadhesin) または シグレック 1 (Siglec 1) 配列 (タグ 32、表 4) はともに皮膚癌とカポジ肉腫患者の P B M C 細胞で高く制御されていることが示されている。さらに、癌細胞ではケラチン 14 配列は過剰発現されているのに対して、該患者の血液検体中のケラチン 14 (タグ 7、表 3) 配列の発現産物が存在しないということは、該検体は癌細胞で汚染されていないことを示すということを実施例 8 は表している。同様に、P B M C によるある種のマーカー遺伝子の発現はもう 1 つの診断の指標を提供し得る。P B M C 中のマーカー遺伝子発現産物の存在または非存在は、異なった側面および / または個々の身体の一連変化について適切な情報を提供する。好ましくは、非造血細胞での発現産物の量は、対照値と比較される。このように該造血細胞中の発現の増加または減少について指標が得られる。

【0027】

それゆえ 1 つの態様において本発明は、個体が非造血癌細胞および / または新脈管形成部位を含むかどうかを測定する方法を提供し、該方法は該患者からの造血細胞が対照値と比べてマーカー遺伝子の発現産物の変化量を含んでいるかどうかを含む。好ましくは、該マーカー遺伝子は、新脈管形成に関与する遺伝子を含む。さらに好ましくは、該遺伝子は表 1 または 2、および / または図 1 ~ 18 に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を含む。最も好ましくは、該遺伝子は、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) または シグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 8 または 17 に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を含む。本発明の 1 つの実施形態では、該造血細胞は末梢血単核細胞を含む。

【0028】

1 つの態様において、本発明は本発明の測定方法を提供し、ここで該発現産物は P B M C によって発現される。好ましくは、該発現産物は、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) または シグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 8 または 17 に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を含む。これら配列は新脈管形成に関与するので、本発明は、ケラチン 14 配列、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) または シグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 2、8 または 17 に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体の新脈管形成の指標としての使用を提供する。同様に、これら配列は癌細胞の存在に関与する。したがって、ケラチン 14 配列、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) または シグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 2、8 または 17 に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を発現した P B M C の、個体中の癌細胞の存在を測定するための使用も提供される。さらに、本発明は、また、診断方法での使用のための、単離されたケラチン 14 配列、T I E 1 配列、サリオアドヘシン (Salioadhesin) または シグレック 1 (Siglec 1) 配列、図 2、8 または 17 に示される配列、もしくはこれらの一部分または類似体を提供する。診断方法は診断キットを使用して実施される。したがって、図 1 ~ 18 および / または表 1 または 2 もしくはこれらの一部分または類

似体を含む核酸、および/または該核酸または該一部分または類似体によってエンコードされた蛋白質に特異的に結合する能力のある蛋白様分子を含む診断キットもまた、ここで提供される。好ましくは、該キットは、適切な検出手段を含む。1つの実施形態で、本発明の、ケラチン14配列および/またはTIE1配列、および/またはサリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)配列、および/または図2、8または17に示される配列もしくはこれらの一部分または類似体を含む診断キットも提供される。本発明の診断キットは、本発明の方法を実施するのに特に有用である。もう1つのさらなる実施形態で、したがって、個体中の特定の一群の標的細胞状態を変えるのに、および/または個体中の脈管形成過程を変えるのに治療が有効であるかどうかを測定するための、本発明診断キットの使用を提供する。さらに、本発明は個体が癌細胞および/または新脈管形成部位を含んでいるのかのかどうかを測定するための本発明診断キットの使用を提供する。

10

【0029】

本発明のマーカー遺伝子によって該マーカー遺伝子が示唆する疾病に対する薬剤のスクリーニングが可能である。特異的な薬物活性をスクリーニングする技術で多種の利用可能な方法がある。たとえば、細胞を種々の異なる薬剤候補化合物とインキュベートし、該細胞中のマーカー遺伝子の発現パターンを、薬剤候補化合物へ該細胞を曝す前と後で比較することができる。薬剤候補化合物へ該細胞を曝したのちの特異的な発現パターンの差異は、該化合物が医薬開発の適切な候補物であることを示す。従って、本発明は、図1~18、表1または表2に示される配列を含む遺伝子の発現産物の薬剤標的としての使用を提供する。

20

【0030】

好ましくは、該配列は、サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)、TIE1、および/またはケラチン14配列である。

【0031】

サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)、TIE1、ケラチン14の活性を変える能力がある、および/または細胞中のサリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1)、TIE1および/またはケラチン14の発現を変える能力がある物質もここで提供される。該物質は特に薬剤の調製に好適である。

【0032】

本発明はさらに以下の実施例によってさらに詳細に説明されるが、これは本発明を決して限定するものではない。

30

【0033】

実施例

実施例1

この実施例において発現プロファイルの分析のための検体の選定が実施される。31歳の男性が1997年2月にHIV-1血清陽性と判定された。初期のCD4細胞数は、 $25 \times 10^6 / l$ であった。この患者は2ヶ月以内に粘膜皮膚単純疱疹と肺外クリプトコックス症に感染を呈し、このため特別の薬物治療が行われた。HIV-1 RNA負荷は当初15,000コピー/mlで3ヶ月で33,000コピー/mlに増加した。そこで、抗ウイルス療法がジドブジン(zidovudine)、ラミブジン(lamivudine)およびインジナビル(indinavir)を使用して始められた。治療開始後直ぐに、HIV-1 RNA負荷は、検出限界以下に低下した。1997年11月、患者は増加する紫色の皮膚病変を徐々に示し、それは臨床的にカポジ肉腫に類似していた。診断は、病変の組織学的検査で確認された。化学療法(ブレオマイシン、ピンクリスチン、およびアドリアマイシンの静脈内投与)の初期に、KSは約150皮膚病変まで進行した。化学療法のコース中の休止期間は3週間であり、第5コースの後に中止された。3週間の治療でいくつかの病変は消失し、1年の後に、徐々に完全回復に近づいた。

40

【0034】

化学療法の間に、いくつかの生検が行われた。最初の生検試料は化学療法開始後24時間

50

に採取され (K S 1 と名づけられた) そして 2 番目の生検試料は 4 8 時間後に採取された (K S 2 と名づけられた) 。全ての生検試料は、外科的除去の後即座に液体窒素中で瞬間凍結され - 8 0 で保存された。カポジ肉腫の診断が組織学的に確定された。

【 0 0 3 5 】

対照 S A G E ライブラリ K S 3 と K S 4 は、いかなる形の化学療法もあるいは抗ウイルス治療も受けずに 1 9 8 6 年に死亡したカポジ肉腫を伴う 2 名のエイズ患者から検死時に採取された、凍結材料で作製された。

【 0 0 3 6 】

実施例 2

生検検体の発現プロファイルは、S A G E 技術を使用して決定された。全ての生検試料はミクロトームで 1 5 ~ 2 0 μ m の切片に切断され、トリゾール (TRIzol) を含有する試験管へ移された。製造者の説明書に従ってトリゾール (TRIzol) によって R N A の単離が行われた。ポリ (A) R N A はマイクロファーストトラックTM (Micro - FastTrackTM) 2 . 0 m R N A 分離キットを使用して得られた。c D N A の調製とそれに続くステップはベルクレスク (Velculescu) によって記載されたように実施された。配列決定結果の予備試験は、S A G E のために特別にアカデミックメディカルセンター、アムステルダム のバイオインフォマティクス研究所 (Bioinformatics Laboratory) によって設計されたソフトウェアを使用して実施された (van Kampen et al., U S A G E : S A G E データ分析へのウェブに基づくアプローチ、Bioinformatics、印刷中) 。ライブラリもまたヒト染色体に T A G を位置付ける A M C で開発されたプログラム、ヒューマン トランスクリプト ム マップ (Human Transcriptome Map (HTM)) で分析された (Caron et al., ヒューマン トランスクリプト ム マップは染色体ドメインで高度に発現された遺伝子のクラスタリングを明らかにする。投稿中) 。

10

20

【 0 0 3 7 】

我々は 4 つの生検資料から約 4 7 , 0 0 0 タグ (T A G ' s) 、 K S 1 ライブラリから 4 7 , 2 9 8 タグ (T A G ' s) 、 K S 2 ライブラリから 4 6 , 6 7 1 、 K S 3 ライブラリから 4 9 , 3 3 5 タグ (T A G ' s) をそして K S 4 ライブラリから 4 8 , 8 1 4 タグ (T A G ' s) の配列を決定した。タグ (T A G) リスト (すなわち、個々の T A G ' s プラス出現回数) は、互いに U S A G E で比較され、最も高いカウントを持つタグ (T A G) 配列は、U S A G E で利用可能な a m c t 2 g データベースで同定された (これは C G A P (GenBank で利用可能) の S A G E m a p データベースと比べて進歩した T A G 同定法である)) 。次に、タグ (T A G) リストは H T M プログラムで染色体位にマッピングされ、同時に特定の T A G リスト (たとえば血管内皮、公に利用可能) と比較され、S A G E m a p データベース (H T M で「全て」を指定) の全ての T A G と組み合わせ、K S 3 と K S 4 で特に昂進した遺伝子に属しているタグ (T A G ' s) が同定された (表 1) 。ヌクレオチド 1 5 は U S A G E の原本ジタグ (diTAG) リストから決定された。1 5 ヌクレオチド (1 5 nt.) の T A G 配列は、その同定を確認するために G e n B a n k (B L A S T) で照合された。1 5 番目のヌクレオチドでの不明確さのゆえにあるいは間違っ た同定のゆえに、少数のタグ (T A G ' s) が排除された。

30

【 0 0 3 8 】

実施例 3

K S 1 と K S 2 ライブラリに比較してカポジ肉腫 S A G E ライブラリ K S 3 と K S 4 で発現が増加している既知遺伝子由来の同定可能なタグ (T A G ' s) を示している分析結果。タグ (T A G) 数は、そのライブラリと公開された他のライブラリ間で比較できるようにまず、ライブラリ当たりの配列決定された 1 0 0 . 0 0 0 総タグ (T A G) レベルに標準化された。

40

配列 c a t g は、表 1 の縦列 2 に示された各タグ (T A G) 配列に優先して起こる。

【 0 0 3 9 】

【 表 1 】

SAGEライブラリKS3とKS4で過剰発現した同定可能なタグ (TAG) の総覧

No.	タグ配列 (5' → 3')	エジン(Unigene) 番号	同定 (ID)	過剰発現ファクター ¹
1.	ccccagtggc	Hs171596	EphA2	3
2.	cttgacatacc	Hs171695	デュアル スペシフィシティ ホスファターゼ	3
3.	catcacggatc	Hs82112	IL1 リセプター, タイプ 1 ²	10-30
4.	ggccaaaggcc	Hs78436	EphB1	>2
5.	ttgcatatcag	Hs82237	AT グループ D 蛋白質	10 - 15
6.	ccctgttcagc	Hs78824	Tie 1 ²	2-5
7.	gatcaatcagt	Hs16530	スモール ind. サイトカイン A18	10-20
8.	gagggtgcaa	Hs898	相補物質 1Qβ	5-10
9.	taaacctgctg	Hs99923	ガレクテン 7 (galectin7)	3-10
10.	gtggccagagg	Hs1420	FGFR3	2-5
11.	tctggcccagc	Hs183	DARC (ダフィー血液グループ)	8-10
12.	caggtcgctac	Hs75066	トランスリン(Translin)	2-6
13.	gagcagcgccc	Hs112408	プソリアシン(Psoriasin(S100 A7))	> 20 特異的
14.	acttattatgc	Hs76152	デコリン(Decorin)	2-10
15.	caggcctggcc	Hs74649	サイトクロム C ホンダール サブユニット VIc	2-4
16.	gtgcgaggac	Hs181062	血清アミロイド A1	5-14
17.	acagcggcaat	Hs74316	デスモプラキン(Desmoplakin)	5-10
18.	gatgtgcacga	Hs117729	ケラチン 14 (Keratin14)	10-14
19.	caggtttcata	Hs24395	スモール ind. サイトカイン, B14 (BRAK)	5-10
20.	aactctgaccc	Hs93675	プロゲステロン ² によって誘導された脱落膜蛋白質	3-10

1. 出現TAG数は、100,000タグ (TAG's) のライブラリサイズに標準化された。
 2. エステイ. クロイツスらによってチンパンジー属 (Pan) 内皮マーカーと同定された。St. Croix et al., Gene expressed in human tumor endothelium, Science 289: 1197-1202, 2000.

【 0 0 4 0 】

実施例 4

KS1とKS2ライブラリに比較してカポジ肉腫SAGEライブラリKS3とKS4で発現が増加している未知因子を有する遺伝子のEST's由来の同定不可能なタグ (TAG's) を示す分析結果。

【 0 0 4 1 】

タグ (TAG) 数は、そのライブラリと公開された他のライブラリ間で比較できるように、ライブラリ当たりの、配列決定された 100,000 総 TAG レベルに標準化された。

配列 catg は表 2 の縦列 2 に示された各タグ (TAG) 配列に優先して起こる。

【0042】

【表 2】

SAGE ライブラリ KS 3 と KS 4 で過剰発現した同定可能な TAG の総覧

No.	タグ配列 (5' → 3')	ユニーク番号	同定	過剰発現ファクター ¹
1.	aaatcaataca	Hs94953	EST	4-10
2.	tggtactggc	Hs108741	EST	4-10
3.	tctgcactgag	Hs173789	EST	2-4
4.	caggetgctgg	Hs60440	EST	4-30
5.	atgacagatgg	Hs13775	EST	5-10
6.	gcacaacaaga	Hs236510	EST	3-10
7.	ccacaggagaa	Hs23579	EST	4-10
8.	ctgtgcggaac	Hs46987	EST	2-10
9.	gatggctgct	Hs18104	EST	4-20
10.	ctccattgcca	Hs31869	EST	2-10
11	acctccactgg	Hs112457	EST	特有である ²

10

20

30

1. 出現 TAG 数は、100,000 タグ (TAG's) のライブラリサイズに標準化された。
2. このタグ (TAG) は我々のライブラリ以外のいかなる SAGE ライブラリには出現しない。そして、これは新脈管形成のための独自の新しい標識遺伝子と思われる。

【0043】

実施例 5

カポジ肉腫の皮膚組織が実施例 1 に記載されたのと同じ 2 人のエイズ患者から採取され、その患者から KS 3 と KS 4 ライブラリが作成された。両患者とも同性愛の患者でヨーロッパで HIV - 1 が流行した初期に感染した。インドネシアで出生した患者 1 は、HIV - 1 陽性であると 1982 年に証明された。1985 年 2 月に組織学的な検査によってカポジ肉腫の診断が確認された。彼は 13 ヶ月後に死亡し、検死によって内蔵 KS の形態学的変種であることが判明した。患者 2 は、1984 年 2 月アカデミックメディカルセンター (Academic Medical Centre) で進行性 KS 皮膚病変を示した。追跡治療中に、KS は腸管、咽頭部、肺、舌、梨状陥凹およびリンパ節へ進行した。1986 年 3 月、この患者は死亡し、検死が行われた。上記 2 名の患者から採取した組織試料は、KS 3 と KS 4 と命名された。

40

【0044】

正常成人の胸部皮膚組織が、乳房形成での廃棄組織として採取された (我々の病院の形成手術部から得られた)。3 つの胸部整復手術からの単離 RNA は、正常皮膚発現プロファイルのライブラリに使用された。

【0045】

生検試料の発現プロファイルは、実施例 2 に記載したような SAGE 技術で決定された。

50

我々は4つの生検試料から約47,000タグ(TAG's)、KS3ライブラリから49,335タグ(TAG's)そしてKS4ライブラリから48,814タグ(TAG's)の配列を決定した。タグ(TAG)リスト(すなわち、個々のタグ(TAG's)プラス出現回数)はUSAGEで利用可能なamct2gデータベースで同定された(これはCGAP(GenBankで利用可能)からのSAGEmapデータベースと比較して進歩したタグ(TAG)同定法である)。次に、タグ(TAG)リストはHTMプログラムで染色体部位にマッピングされ、同時に特定のタグ(TAG)リスト(たとえば血管内皮、公に利用可能)と比較され、SAGEmapデータベース(HTMで「全て」を指定)の全てのタグ(TAG)リストと組み合わせて、KS3とKS4で特に昂進した遺伝子に属しているタグ(TAG's)が同定された(表1)。ヌクレオチド15はUSAGEの原本ジタグ(diTAG)リストから決定された。15ヌクレオチド(15nt.)のTAG配列は、その同定を確認するためにGenBank(BLAST)によって照合された。15番目のヌクレオチドでの不明確さのゆえにあるいは間違っただ同定のゆえに、少数のタグ(TAG)は排除された。

10

【0046】

実施例6

KS1とKS2ライブラリと比較してカボジ肉腫SAGEライブラリKS3とKS4で発現が増加している既知遺伝子由来の同定可能なタグ(TAG's)を示している分析結果。タグ(TAG)数は、そのライブラリと公開された他のライブラリ間で比較できるようにまず、ライブラリ当たりの配列決定された100,000総タグ(TAG)レベルに標準化された。

20

配列catgは、表3の縦列2に示された各TAG配列に優先して起こる。

【0047】

【表3】

SAGEライブラリKS3とKS4で過剰発現した同定可能なタグ(tag's)の総覧

タグ番号	タグ配列	エジン番号	同定	過剰発現
TAG007	gatgtgcacga	Hs117729	ケラチン 14	10-14
TAG010	ccccagtcggc	Hs171596	Eph A2(新脈管形成)	3
TAG011	cttgacatacc	Hs171695	デュアル specificity ホスファターゼ (Dual specificity phosphatase)	3
TAG012	catcacggatc	Hs82112	IL1 リセプター, タイプ 1 *	10-30
TAG013	ggccaaaggcc	Hs78436	ソーティング ネキシン 17	>2
TAG014	ttgcatatcag	Hs82237	AT グループ D 蛋白質	10-15
TAG015	ccctgttcagc	Hs78824	Tie 1*(新脈管形成)	2-5
TAG016	gatcaatcagt	Hs16530	スモール ind. サイトカイン A18	10-20
TAG017	gaggggtgcaa	Hs898	相補物質 1Qβ	5-10
TAG018	taaacctgctg	Hs99923	ガレクテン7 (特異的)	3-10
TAG019	gtggccagagg	Hs1420	FGFR3(癌、新脈管形成で 活性化している)	2-5
TAG020	tctggcccagc	Hs183	DARC (ダフィー血液グループ)	8-10
TAG021	caggtcgctac	Hs75066	トランスリン(転位に関与)	2-6
TAG022	gagcagcgccc	Hs112408	プソリアシ(Psoriasin(S100 A7))	>20 特異的
TAG033	acttattatgc	Hs76152	デコリン(Decorin、結合組織)	2-10
TAG034	caggcctggcc	Hs288761	仮説の蛋白質 FLJ21749	2-4
TAG035	gtgcgaggac	Hs181062	血清アミロイド A1	5-14
TAG036	acagcgcaat	Hs74316	デスモプラキン(Desmoplakin)	5-10
TAG037	caggtttcata	Hs24395	スモール ind. サイトカイン, B14(BRAK)	5-10
TAG038	aactctgaccc	Hs93675	プロケステロン*によって誘導された 脱落膜蛋白質	3-10

*エステ. クロイツクスらによってチンパンジー属 (Pan) 内皮マーカーと同定された。
St. Croix et al., Gene expressed in human tumor endothelium, Science 289: 1197-1202, 2000.

10

20

30

40

50

【0048】

実施例 7

KS1とKS2ライブラリに比較してカポジ肉腫SAGEライブラリKS3とKS4で発現が増加している未知因子を有する遺伝子のEST's由来の同定不可能なタグ(TAG's)を示す分析結果。タグ(TAG)数は、そのライブラリと公開された他のライブラリ間で比較できるようにまず、ライブラリ当たりの、配列決定された100,000総TAGレベルに標準化された。

配列catgは、表4の縦列2に示された各TAG配列に優先して起こる。

【0049】

【表4】

SAGEライブラリKS3とKS4で過剰発現した同定可能なタグ(tag's)の総覧

15

タグ番号	タグ配列 (5'>3')	ユニオン番号	同定	過剰発現
TAG023	aaatcaataca	Hs94953	EST	4-10
TAG024	tggtactggc	Hs108741	EST	4-10
TAG025	tctgactgag	Hs173789	EST	2-4
TAG026	caggctgctgg	Hs60440	EST	4-30
TAG027	atgacagatgg	Hs13775	EST	5-10
TAG028	gcacaacaaga	Hs236510	EST	3-10
TAG029	ccacaggagaa	Hs23579	EST	4-10
TAG030	ctgtgcggaac	Hs46987	EST	2-10
TAG031	gatggctgcct	Hs18104	EST	4-20
TAG032	ctccattgcca	Hs31869	EST	2-10
TAG004	acctccactgg	Hs112457	EST	特有である*

*このTAGは我々のライブラリ以外のいかなるSAGEライブラリには出現せず、そして、これは新脈管形成のための独自の新しい標識遺伝子と思われる。

10

【0050】

表3と表4に記載された過剰発現タグ(TAG's)は表1および表2記載のものとそれぞれ同一である。このことは、治療後の発現パターンは正常な発現パターンを有する健常個体の発現パターンに匹敵することを示している。

【0051】

実施例8

RT-PCRに基づく方法を使用して我々は、TAG11(表2)/TAG004(表4)が確かに相違して発現された遺伝子を示していることを決定することができた。RNAがKS病巣から単離され、最初のストランドcDNA合成が、5' M13テイル(5' CTA GTT GTA AAA CGA CGG CCAG-(T)₂₄3')のオリゴ(dT)プライマーで試みられた。10マイクロリットルの全RNAが使用され、プラスプライマーと5μl RT-mix(50mM Tris、pH8.3、75mM KCl、3mM MgCl₂、10mM DTT)、80mM dNTPsと20ユニットRNA sinが加えられ、65℃で3分間インキュベーションされて、氷上で冷却された。RT反応は5ユニットのAMV RTを加えて開始され、続いて42℃で45分間インキュベートされた。PCRのために、我々は19-塩基TAG-特異的プライマー(アニーリング温度を増加させるために、5'NLAIII制限反応サイトとイノシンヌクレオチドでSAGEで厳密に同定された11ヌクレオチド(nt)からなる)と-21M13プライマーを使用した。RT混合物(RT-mix)は、100ngの各プライマー(-21m13プライマー:5'GTA AAA CGA CGG CCA GT3'と5'III IIC ATG ACC TCC ACT GG3')、50mM Tris(pH8.3)、20mM KCl、1ミリリットル当たり0.1mg BSA、dNTPs(各0.1mM)、2.4mM MgCl₂および2ユニットTaqポリメラーゼを含有する80μl PCR混合物に加えられた。5分間94℃でインキュベーションの後、反応はサーモサイクラー(9700パーキン-エルマー(Perkin-Elmer))中で35サイクルの増幅にかけられた。1サイクルは、95℃で1分間の変性、55℃で1分間のアニーリングそして72℃で2分間の伸長を含む。最後のサイクルの次に72℃で10分間のインキュベーションが実施された。

【0052】

増幅されたフラグメントは、ATプラスミド(インビトロジェン(InvitroGen))にクローン化され続いて挿入物は、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems Inc.)製

20

30

40

50

の染色ターミネーター配列決定キット (dye terminator sequencing kit) を用いて配列が決定された。フラグメントは、102塩基対の長さを有しており、フラグメントの配列分析は図1に示す配列を示した。この配列はヒト胎児の心臓から同定されたEST配列 (ジェンバンク 登録番号 (GenBank acc.) AI217565 およびその他) と同一であり、その結果これは染色体19上の予想されたエクソンと合致した。新脈管形成との関係は文献未記載であり新規である。

【0053】

実施例9

タグ配列の同定の確認。

15ヌクレオチドからなる配列は特定のmRNAまたは遺伝子を同定するのに十分である。タグの独自性を確認するために、我々はRT反応のためのオリゴ24dTプライマーを用いてRT-PCRを作製した。タグ配列自身を含有する5'プライマーが2番目のストランド合成に使用された。オリゴ24dTは、-21M13配列で延長された5'位置に延長された。PCR反応とそれに続くRT反応において、-21M13プライマーが、タグ配列を含む5'プライマーとともに増幅に使用される。タグ配列を含む5'プライマーは、このプライマーの結合能力を増大するためにその5'位置に5イノシンで延長された。増幅されたフラグメントの配列は、これがタグ配列で同定された遺伝子であることを確認するために決定することができる。タグを確認するためのRT-PCR反応は、タグ配列の発現プロファイルを調製するために使用されたと同一の組織検体で実施された。

10

【0054】

手順

実験に使用された共通の緩衝液

10x RT 緩衝液:

- 500 mM TRIS、pH 8.3
- 750 mM KCL
- 30 mM MgCl₂
- 100 mM DTT

10x PCR 緩衝液:

- 200 mM TRIS pH 8.3
- 500 mM KCL
- 1 mg/ml BSA

20

1ml トリゾール (TRIzol) 試薬 (インビトロジェンライフテクノロジ (Invitrogen Life Technologies) カタログ番号15596) が、10~100mgの組織または約10⁷細胞に即時に加えられる (組織は、マイクロームで14μmの厚さに薄く切り取られる)。

30

【0055】

検体の全RNA単離は製造者プロトコルに従って、以下の通り実施される:

- ・クロロフォルム (メルク) 0.2ml 添加、そして手で15秒間試験管を激しく振盪。
- ・室温で5分間インキュベート。
- ・4 で15分間、12,000xg以下で遠心分離。
- ・無色の上部水層600μlを新しい試験管に移す。下部の有機層は赤色であるべき。
- ・0.5ml イソプロピルアルコール (メルク) を添加し、攪拌。
- ・室温で5分間インキュベート。
- ・4 で15分間、12,000xg以下で遠心分離。
- ・上澄みを捨て、1mlの80%エタノールでRNAペレットをボルテキシング (vortexing) により洗浄し、4 で5分間、7,500xg以下で遠心分離し、上澄み液を捨てる。
- ・ペレットを乾燥するために、56 に3分間試験管おき、以下の欄に記載の通りポリA⁺ RNA単離を続ける。

40

【0056】

50

ポリA⁺RNA単離は、製造者インビトロジェン コーポレーション、カールスバッド、USA カタログ番号K1520)から提供されたマイクロファーストトラック(Micro Fasttrack) 2.0ポリA⁺mRNA単離キットのマニュアルに従って実施された。

【0057】

続いて、単離されたポリA⁺RNAは、RT-PCR反応の分析にインプットとして使用された。RT-PCR反応は、以下の材料の混合物を使用して開始した：

21M13ポリTプライマー(100ng/μl)	1.25μl	
10xRT緩衝液	2.0μl	
100mM dNTP(ファルマシア)	0.8μl	
20U RNAsin(ロッシュ)	0.3μl	10
dH ₂ O(ベーカー)	0.65μl	

・ポリA⁺mRNAの10μl希釈液をRT-mixの5μlに加える。
 ・プライマーをテンプレートにアニーリングするために反応溶液を65℃で45分間インキュベートし、その後室温まで冷却する。

・5μl 1U/μl AMV-RTを反応溶液に加え42℃で45分間インキュベーションすることによって逆転写を実施する。

・逆転写の後、すぐに混合物を95℃で5分間インキュベートし反応を停止する。そして、反応混合物を室温まで冷却する。

・PCR-mixの80μlを各反応混合物(全容量は100μl)に添加。

反応あたりのPCR-mixは次の通り調製する： 20

- 5'プライマー(100ng/μl)、表5参照	1.0μl
- 21M13(100ng/μl)	1.0μl
- 10xPCR緩衝液	8.0μl
- 100mM MgCl ₂	2.1μl
- Ampli taq 5U/μl(パーキンエルマー)	0.4μl
- dH ₂ O(ベーカー)	67.5μl

・PCR増幅は、9700 DNA サーマルサイクラー(パーキンエルマー)中で以下のプログラムに従い実施した。

- 95℃で5分間	
- 95℃で1分間；55℃で1分間；72℃で2分間、35サイクル	30
- 72℃で10分間	

【0058】

RT-PCR産物のTA-クローニングは、製造者(インビトロジェン コーポレーション、カールスバッド、(Invitrogen Corporation, Carlsbad) 米国 カタログ番号K4600)から提供されたTOPO TAクローニング(登録商標)(キットのマニュアルに従って、pCR(登録商標)II-TOPO(登録商標) DualプロモターベクターとTOP10 One Shot(登録商標)細胞を使用して実施された。

【0059】

クローンのスクリーニングは、SP6とT7プライマーでPCRを使用して以下のとおり実施された。 40

【0060】

・コロニーを50μl dH₂O(ベーカー)に最懸濁する。この細菌懸濁液をPCR混合物の10μlに懸濁する。

・反応あたりのPCR-混合物は次の通り調製する：

SP6(100ng/μl)、	0.10μl	
T7(100ng/μl)	0.10μl	
10xPCR緩衝液	1.00μl	
100mM MgCl ₂	0.20μl	
100mM dNTP's(ファルマシア)	0.08μl	
Ampl i t a q 5U/μl(パーキンエルマー)	0.04μl	50

d H₂O (ベーカー)

7.48 μl

・PCR増幅は、9700 DNA サーマルサイクラー (パーキンエルマー) 中で以下のプログラムに従い実施した。

- 95 で5分間

- 95 で30秒間 ; 55 で30秒間 ; 72 で1分間、35サイクル

- 72 で10分間

・コロニー - PCR産物の5 μlを1.5%アガロース 1×TBE ゲルにかけ エチジウム ブロマイド (Ethidium Bromide) で染める。

・挿入物含有 (insert - containing) クローンを同定するために、増幅産物をUV - 照射装置 (UV - illuminator) 上で目に見えるようにする。

10

【0061】

挿入物含有クローン (Clones containing insert) は、SP6とT7プライマー - 、およびエイピアイ プリズム ビグ - ダイ ターミネーターサイクル配列決定キット (ABI Prism Big - Dye terminator cycle sequencing kit、パーキンエルマー アプライド ビオシステムズ、フォスター市、カルフォルニア、米国 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif USA)) を使用して両方向から配列決定された。

【0062】

【表5】

タグ確認に使用されたプライマー

タグ名	配列	同定
-21M13POLYT	CTA GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T	RT-プライマー
TAG007	III IIC ATG GAT GTG CAC G	ケラチン 14 (Keratin14)
TAG010	III IIC ATG CCC CAG TCG GC	エフリン(ephrlin)A2(新脈管形成)
TAG011	III IIC ATG CTT GAC ATA CC	テュアル スペシフィシティ ホスファターゼ
TAG012	III IIC ATG CAT CAC GGA TC	IL1 リセプター, タイプ 1
TAG013	III IIC ATG GGC CAA AGG CC	ソテイング ネシン 17(SNX17)
TAG014	III IIC ATG TTG CAT ATC AG	AT グループ D 蛋白質
TAG015	III IIC ATG CCC TGT TCA GC	Tie 1(新脈管形成)
TAG016	III IIC ATG GAT CAA TCA GT	スモール ind. サイトカイン A18
TAG017	III IIC ATG GAG GGT GCC AA	相補物質 1Q beta
TAG018	III IIC ATG TAA ACC TGC TG	ガレクテン 7(11 nt tag)
TAG019	III IIC ATG GTG GCC AGA GG	FGFR3(11 nt tag)
TAG020	III IIC ATG TCT GGC CCA GC	DARC
TAG021	III IIC ATG CAG GTC GCT AC	トランスリン
TAG022	III IIC ATG GAG CAG CGC CC	フソリアシン(S100 A7) (11 nt tag)
TAG033	III IIC ATG ACT TAT TAT GC	デコリン(Decorin)
TAG034	III IIC ATG CAG GCC TGG CC	仮説の蛋白質 FLJ21749
TAG035	III IIC ATG GTG CGG AGG AC	血清アミロイド
TAG036	III IIC ATG ACA GCG GCA AT	デスモプラキシン(Desmoplakin)
TAG037	III IIC ATG CAG GTT TCA TA	スモール ind. サイトカイン, B14(BRAK)
TAG038	III IIC ATG AAC TCT GAC CC	プロケステロンによって誘導された脱落膜蛋白質
TAG023	III IIC ATG AAA TCA ATA CA	EST エージン番号 Hs94953
TAG024	III IIC ATG TGG TAA CTG GC	EST エージン番号 Hs108741
TAG025	III IIC ATG TCT GCA CTG AG	EST エージン番号 Hs173789
TAG026	III IIC ATG CAG GCT GCT GG	EST エージン番号 Hs60440
TAG027	III IIC ATG ATG ACA GAT GG	EST エージン番号 Hs13775
TAG028	III IIC ATG GCA CAA CAA GA	EST エージン番号 Hs236510
TAG029	III IIC ATG CCA CAG GAG AA	EST エージン番号 Hs23579(PIG)
TAG030	III IIC ATG CTG TGC GGA AC	EST エージン番号 Hs46987
TAG031	III IIC ATG GAT GGC TGC CT	EST エージン番号 Hs18104
TAG032	III IIC ATG CTC CAT TGC CA	Hs31869 シグレック 1 またはシアロポドヘン (siglec-1 or sialoadhesin)
TAG004	III IIC ATG ACC TCC ACT GG	EST エージン番号 Hs1124557

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

タグ配列の確認結果：

オリゴ 2 4 d T プライマーと上記のタグを基本としたプライマー (tag - based primer primer) (表 5 中で指定されたタグ 0 0 4、0 0 7、0 1 1、0 1 2、0 1 4、0 1 5、0 1 6、0 1 7、0 2 2、0 2 5、0 2 9、0 3 0、0 3 2、0 3 6) との RT - PCR を使用した配列分析によってこの実施例 1 4 に記載されたプロトコルで分析された 1 8 のタグ配列が確認された。4 種のタグ配列 (指定されたタグ 0 1 0、0 1 3、0 1 8、0 1 9) はこの方法で確認できなかった。これはおそらく、タグを基本としたプライマーは十分に特異的でないかあるいは mRNA のポリ A 末尾が十分に長くはなかった事実によるものであった。1 つのタグに対してもう一つのもっと特異的な 5' プライマーが、- 2 1 M 1 3 ポリ T (指定タグ 0 0 4) とともに RT - PCR を実施するためにデザインされた。タグ 0 1 0 について、逆転写と増幅を実施するために完全に特異的なプライマーセットがデザインされた。他のタグは特異的な RT - PCR プライマーセットを使用し、次いで特異的なネスト化プライマーセット (指定タグ 0 1 3、0 1 8、0 1 9) でのネスト化 PCR (Nested PCR) を使用して確認された。全て確認された配列の結果は、以下と、図に一

覧として記載されている。mRNA配列中のタグ配列は、もし存在すれば太文字で示されている。

【0064】

TAG004 (EST AI217565、genbank番号BE466728) : この実施例のプロトコルで確認された。

CATGACCTCCACTGGAAGAGGGGGCTAGCGTGAGCGCTGATTCTCAACCT
ACCATAACTCTTTCCTGCCTCAGGAACTCCAATAAAACATTTTCCATCCA

(図1)

10

【0065】

TAG007 (ケラチン14、genbank番号XM_008578) : この実施例のプロトコルで確認された。

CATGGATGTGCACGATGGCAAGGTGGTGTCCACCCACGAGCAGGTCCTT
CGCACCAAGAACTGAGGCTGCCAGCCCCGCTCAGGCCTAGGAGGCCCC
CCGTGTGGACACAGATCCCCTGGAAGATCCCCTCTCCTGCCAAGCACT
TCACAGCTGGACCCTGCTTCACCCTCACCCCTCCTGGCAATCAATACAG
CTTCATTATCTGAGTTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

20

(図2)

【0066】

TAG010 (エフリンA2 (ephrin A2)、genbank番号XM_002088) :

catg-位置上にデザインされた5'プライマー(元のプライマーは表5に示す)でのRT-PCRでは確認できなかった。おそらく確実にタグを基礎とするプライマー(tag-based primer)が充分特異的でない。エフリンA2(Ephrin A2)特異的プライマーが確認のために使用された。タグ配列は、エフリン(Ephrin)特異的RT-PCRに含まれていない。

30

ATCTACCAGCTCATGATGCAGTGCTGGCAGCAGGAGCGTGCCACCGCCC
CAAGTTCGCTGACATCGTCAGCATCCTGGACAAGCTCATTCGTGCCCTG
ACTCCCTCAAGACCCTGGCTGACTTTGACCCCGCGTGTCTATCCGGCTC
CCCAGCACGAGCGGCTCGGAGGGGGTGCCCTTCCGCACGGTGTCCGAGT
GGCTGGAGTCCATCAAGATGCAGCAGTATACGGAGCACTTC

(図3)

【0067】

40

TAG011 (デュアルスペシフィシティホスファターゼ (dual specificity phosphatase)、genbank番号XM_003720) : この実施例のプロトコルで確認された。

CATGCTTGACATACCTACCAGTATTATTCCCGACGACACATATACATATG
 AGAATATACCTTATTTATTTTTGTGTAGGTGTCTGCCTTCACAAATGTCAT
 TGTCTACTCCTAGAAGAACCAAATACCTCAATTTTTGTTTTGAGTACTGT
 ACTATCCTGTAAATATATCTTAAGCAGGTTTGTTTTCAGCACTGATGGAAA
 ATACCAGTGTTGGGTTTTTTTTTAGTTGCCAACAGtTGTATGTTTGCTGAT
 TATTTATGACCTGAAATAATATATTTCTTCTTCTAAGAAGACATTTTGTTAC
 ATAAGGATGACTTTTTTATAACAATGGAATAAATTATGGCATTCTATTG

10

(図 4)

【 0 0 6 8 】

T A G 0 1 2 (I L 1 レセプター、タイプ 1、g e n b a n k 番号 X M _ 0 0 2 6 8 6)
 : この実施例のプロトコルで確認された。

CATGCATCACGGATCAATAGACTGTACTTATTTTCCAATAAAATTTTCAA
 ACTTTGTACTGTT

(図 5)

【 0 0 6 9 】

T A G 0 1 3 (エフリン B 1 (ephrin B1)、g e n b a n k 番号 X M _ 0 0 2 5 3 5
 、 B C 0 0 2 5 2 4) :

catg - 位置上にデザインされた 5 ' プライマー (元のプライマーは表 5 に示す) での R T
 - P C R では確認できなかった。おそらく確実に、タグを基礎とするプライマーは充分特
 異的でない。エフリン B 1 (Ephrin B1) 特異的プライマーが確認のために使用された。
 タグ配列は、エフリン B 1 (Ephrin B1) 特異的 R T - P C R フラグメントの 3 ' プライ
 マーに含まれている。ネスト化された P C R フラグメント (Nested PCR fragment) がこ
 こに示されており、タグ配列のちょうど上流部に位置している。

20

AACTTGCCCTGTGCCTGTGTCCCCATGCTAGGGGCGGAGGGGTCTTTTC
 CTTCTTCTTTCTACCTACCCCTTTTCTCTTGCCAGGGGCCTCGTATCCT
 ACCTTTCCTTGTCCCCTGGGCTGGCTGCACAGAGGATTGCCCTTCTCTTT
 TCAGAGCTGGCCCTCGATGCCAAATTAGCATTTAGTATTTTGCTCAAAGTC
 TAAGGGACC

30

(図 6)

【 0 0 7 0 】

T A G 0 1 4 (A T グループ D 蛋白、g e n b a n k 番号 X M _ 0 0 6 1 8 4、A F 2 3 40
 0 3 8 8) :
 この実施例のプロトコルで確認された。

CATGTTGCATATCAGGGTGTCAAGGATTGGAGAGGAGACAAAACCAGG
 AGCAGCACAGTGGGGACATCTCCCGTCTCAACAGCCCCAGGCCTATGGGG
 GCTCTGGAAGGATGGGCCAGCTTGCAGGGGTTGGGGAGGGAGACATCCA
 GCTTGGGCTTTCCCCTTTGGAATAAACCATTGGTCTGTCACAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

50

(図 7)

【 0 0 7 1 】

T A G 0 1 5 (T I E 1、g e n b a n k 番号 X M _ 0 0 2 0 3 7) :

この実施例のプロトコルで確認された。

**CATGCCCTGTTTCAGCTACTCCCACTCCCGGCCTGTCATTCAGAAAAAAT
AAATGTTCTAATAAGCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

(図 8)

【 0 0 7 2 】

T A G 0 1 6 (小さいind.サイトカイン A 1 8、g e n b a n k 番号 X M _ 0 0 8 4 5 1、Y 1 3 7 1 0、A F 1 1 1 1 9 8) :

この実施例のプロトコルで確認された。

**CATGGATCAATCAGTGTGATTAGCTTTCTCAGCAGACATTGTGCCATATG
TATCAAATGACAAATCTTTATTGAATGGTTTTGCTCAGCACCACCTTTTAA
TATATTGGCAGTACTTATTATATAAAAGGTAAACCAGCATTCTCAAAAAA
AAAAAAAAAAAA**

10

20

(図 9)

【 0 0 7 3 】

T A G 0 1 7 (補体、1 Q ベータ、g e n b a n k 番号 X M _ 0 1 0 6 6 6) : この実施例のプロトコルで確認された。

**CATGGAGGGTGCCAACAGCATCTTTTCCGGGTTCTGCTCTTTCCAGAT
ATGGAGGCCTGACCTGTGGGCTGCTTCACATCCACCCCGGCTCCCCCTGC
CAGCAACGCTCACTCTACCCCAACACCACCCCTTGCCCAGCCAATGCAC
ACAGTAGGGCTTGGTGAATGCTGCTGAGTGAATGAGTAAATAAACTCTTC
AAGGCC**

30

(図 1 0)

【 0 0 7 4 】

T A G 0 1 8 (ガレクチン 7 (galectin 7)、g e n b a n k 番号 N M _ 0 0 2 3 0 7、U 0 6 6 4 3) :

catg- 位置上にデザインされた 5' プライマー (元のプライマーは表 5 に示す) での R T - P C R では確認できなかった。おそらく確実に、タグを基礎とするプライマー (tag-based primer) は充分特異的でない。ガレクチン 7 (galectin 7) 特異的プライマーが確認のために使用された。ガレクチン 7 (galectin 7) 特異的プライマーで使用された 5' プライマーは、タグ配列を含む。タグ配列は、ガレクチン 7 (galectin 7) 特異的 R T - P C R フラグメントに含まれている。ネスト化された P C R フラグメント (Nested PCR fragment) がここに示されており、タグ配列のちょうど下流部に位置している。

40

**CGGCTGGACACGTCGGAGGTGGTCTTCAACAGCAAGGAGCAAGGCTCCT
GGGGCCGCGAGGAGCGCGGGCCGGGCGTTCCCTTCCAGCGCGGGCAGCC
CTTCGAGGTGCTCATCATCGCGTCAGACGACGGCTTCAAGCCGTGGTTG
GGGACGCCAGTACCACCACTTCCGCC**

50

(図 1 1)

【 0 0 7 5 】

T A G 0 1 9 (F G F R 3、 g e n b a n k 番号 N M _ 0 2 2 9 6 5、 N M _ 0 0 0 1 4 2) :

catg - 位置上にデザインされた 5' プライマー (元のプライマーは表 5 に示す) での R T - P C R では確認できなかった。おそらく確実に、タグを基礎とするプライマー (tag - b a s e d p r i m e r) は充分特異的でない。F G F R 3 特異的プライマーが確認のために使用された。タグ配列は、エフリン (Ephrin) 特異的 R T - P C R に含まれていない。ネスト化された P C R フラグメント (N e s t e d - P C R f r a g m e n t) がここに示されており、タグ配列の上流部に位置している。

10

CACAACCTCGACTACTACAAGAAGACAACCAACGGCCGGCTGCCCGTGAA
GTGGATGGCGCCTGAGGCATTATTTGACCGAGTCTACACTCACCAGAGTG
ACGTCCTGGTCCTTTGGGGTCCTGCTCTGGGAGATCTTCACGCTGGGGGGC
TCCCCGTACCCCGGCATCCCTGTGGAGGAGCTCTTCAAGCTGCTGAAGGA
GGGC

(図 1 2)

【 0 0 7 6 】

T A G 0 2 2 (プソリアシン (Psoriasis) (S 1 0 0 A 7))、 g e n b a n k 番号 X M _ 0 4 8 1 2 0) : この実施例のプロトコルで確認された。

20

CATGGAGCAGCGCCCTGTTCCGGGGGCAGCCAGTGACCCAGCCCCACC
AATGGGCCTCCAGAGACCCAGGAACAATAAAAATGTCTTCTCCCACC

(図 1 3)

【 0 0 7 7 】

T A G 0 2 5 (E S T ユニジーン (EST Unigene) 番号 H s 1 7 3 7 8 9、 g e n b a n k 番号 X M _ 0 1 8 4 0 4、 A L 1 3 7 2 6 2) :

30

この実施例のプロトコルで確認された。

CATGTCTGCACTGAGAACTGCATTTTCAGTAGCATTTGTTCATCCAGCCG
GAAGTTAAAGCACACTTACTTTATTCACCTATTTTTATAATAAACGTTCTT
GCTGCTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(図 1 4)

【 0 0 7 8 】

T A G 0 2 9 (P I G、 g e n b a n k 番号 X M _ 0 1 1 4 5 3、 A J 2 5 1 8 3 0) : この実施例のプロトコルで確認された。

40

CATGCCACAGGAGAATTTCGGGGATTTGAGTTTCTCTGAATAGCATATAT
ATGATGCATCGGATAGGTCATTATGATTTTTTACCATTTTCGACTTACATAA
TGAAAACCAATTCATTTTAAATATCAGATTATTATTTTGTAAGTTGTGGAA
AAAGCTAATTGTAGTTTTTCATTATGAAGTTTTCCCAATAAACAGGTATTC
TAAACTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(図 1 5)

【 0 0 7 9 】

50

T A G 0 3 0 (E S T ユニジーン (EST Unigene) 番号 H s 4 6 9 8 7 、 g e n b a n k 番号 D G 1 5 1 1 9 0 、 B G 0 5 7 2 8 9 、 B E 8 5 8 2 7 6 、 A V 6 8 1 7 5 9 、 B E 5 0 3 1 6 9) :

この実施例のプロトコルで確認された。

**CATGCTGTGCGGAACTGCGTCAGGGCAAATGTCACAGCAGGATTTCCCC
AACCCAGCTCCATCATCACAGACACAGAGGGCTGCAGGGGAGGCCTGCCC
ACTGTTTTGTGCGACTCTGCCCTCCTCTGGCAGCATAGATCCTTAGGTGCTC
AATAAAGGTGTGCTGTATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

10

(図 1 6)

【 0 0 8 0 】

T A G 0 3 2 (シアロアドヘシン (SialoAdhesin) 、 シグレック 1 (Siglec 1) と呼ばれる、 g e n b a n k 番号 X M _ 0 1 6 2 4 5) :

この実施例のプロトコルで確認された。

**CATGCTCCATTGCCAGACTCTTGCTGGGAGCCCGTCCAGAATGTCCTCC
CAATAAACTCCATCCTATGACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

20

(図 1 7)

【 0 0 8 1 】

T A G 0 3 6 (デスモプラキン (Dsmoplakin) 、 g e n b a n k 番号 X M _ 0 0 4 4 6 3 、 N M _ 0 0 4 4 1 5 、 A F 1 3 9 0 6 5) :

この実施例のプロトコルで確認された。

**CATGACAGCGGCAATCTTTTCTTTGGTCAAAGTTTTCTGTTTATTTTGCT
TGTCATATTCGATGTACTTTAAGGTGTCTTTATGAAGTTTGCTATTCTGGC
AATAAACTTTTAGACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

30

(図 1 8)

【 0 0 8 2 】

実施例 1 0

皮膚検体中のタグ配列の遺伝子発現レベルの測定

新脈管形成のマーカーとしてタグ配列の使用に関する感觸を得るために、カポジ肉腫病変のある皮膚検体 (5 種の異なる検体) とカポジ肉腫病変のない皮膚検体 (2 種の対照検体) が、タグ配列で同定された遺伝子の発現レベルについて分析された。

【 0 0 8 3 】

手順 :

1 m l トリゾール (TRIzol) 試薬 (インビトロジェン ライフ テクノロジーズ (Invitrogen Life Technologies) カタログ番号 1 5 5 9 6) が、 1 0 ~ 1 0 0 m g の組織または約 10^7 細胞に即時に加えられる (組織は、マイクロームで $14 \mu m$ の厚さに薄く切り取られる) 。

40

【 0 0 8 4 】

検体の全 R N A の単離は製造者プロトコルに従って、以下の通り実施される :

- ・クロロフォルム (メルク) 0 . 2 m l 添加、そして手で 1 5 秒間試験管を激しくし振盪。
- ・室温で 5 分間インキュベートする。
- ・ 4 で 1 5 分間、 $12,000 \times g$ 以下で遠心分離。

50

- ・無色の上部水層 600 μ l を新しい試験管に移す。下部の有機層は赤色であるべき。
- ・0.5 ml イソプロピルアルコール (メルク) を添加し、混合。
- ・室温で 10 分間インキュベートする。
- ・4 で 15 分間、12,000 \times g 以下で遠心分離。
- ・上澄みを捨て、1 ml の 80% エタノールで RNA ペレットをボーテクシング (vortexing) により洗浄し、4 で 5 分間、7,500 \times g 以下で遠心分離し、上澄み液を捨てる。
- ・ペレットを乾燥するために、56 に 3 分間試験管をおき、以下の欄に記載の通り DNA 分解酵素 (DNase) 処理をする。

【0085】

全ての単離された RNA にゲノミック (genomic) DNA が存在ないことを確認するために、われわれは DNA 分解酵素処理を実施し、DNA 分解酵素反応に RNA 分解酵素阻害剤 (RNasin) を添加することによって、DNase I の RNAse 活性に対して RNA が保護された。DNA 分解酵素処理は以下の通り実施された： /

- ・トリゾール (Trizol) 全 RNA 単離の後、ペレットを 88 μ l の dH₂O 中に再懸濁する。
- ・以下を、順次、RNA 溶液に加える：
 - 10 μ l 10 \times DNA 分解酵素緩衝液 (アムピオン (Ambion))
 - 1 μ l 40 U / μ l RNA 分解酵素阻害剤 (RNasin, ロッシュ)
 - 1 μ l 10 U / μ l DNA 分解酵素 I (DNase I, ロッシュ) /
- ・37 で 1 時間インキュベートする。
- ・100 μ l の dH₂O を加えて検体容量を 200 μ l に増量する。
- ・200 μ l の冷フェノール / クロロフォルム pH 8 (PC8) を加える。
- ・マイクロ遠心分離機中、全速で室温下 5 分間遠心分離する。
- ・水性上層を新しいマイクロ遠心分離試験管に移し、順次、以下を加える：
 - 3 μ l グリコーゲン (ロッシュ)
 - 100 μ l 10 M 酢酸アンモニウム
 - 700 μ l 100% エタノール
- ・完全に混合し 25,000 \times g で 15 分間 4 で遠心分離し、傾斜し上澄を注ぎ出す。
- ・700 μ l の 80% エタノールを加えて 2 回洗浄する。完全に混合し 25,000 \times g で 5 分間、4 で遠心分離し、傾斜し上澄を注ぎ出す。
- ・ペレットを 56 で 5 分間乾燥し、11 μ l の dH₂O に再懸濁する。
- ・1 μ l の RNA 単離物を 140 μ l の dH₂O に希釈し、OD₂₆₀ 測定によって単離物の RNA 濃度と収率を計算する。DNA 分解酵素処理された全 RNA の収率は、完全なタグ発現プロファイルの測定には少なくとも 13.5 μ g であるべきである。
- ・濃度 50 ng / μ l の RNA 単離物の溶液を調製する。これは、TAG 特異的な RT-PCR のための希釈用のもととなる RNA 溶液である。

【0086】

DNA 分解酵素処理された全 RNA のサンプルごとに、18 の TAG 特異的 RT-PCR / ネステッド PCR (Nested PCR) 反応が、RNA の希釈シリーズで実施された。各検体に対して 5 つの対照 RT-PCR が希釈シリーズ、すなわち、HIV-1 GAG (SK39 / 145)、GAPDH + RT (2 回) および RT 反応なし (2 回)、で実施されるだろう。次の希釈体系は、RT-PCR で分析される検体のシリーズの希釈を得るために使用された：

1. 270 μ l 50 ng / μ l DNA 分解酵素処理された全 RNA。
各プライマーセットの RT-PCR における投入量としての、10 μ l 50 ng / μ l 溶液 = 500 ng。
2. 27 μ l 50 ng / μ l 全 RNA 10 \times 希釈 = 270 μ l 5 ng / μ l。
各プライマーセットの RT-PCR における投入量としての、10 μ l 5 ng / μ l 溶液 = 50 ng。

10

20

30

40

50

3. 27 μ l 5 ng / μ l 全RNA 10 \times 希釈 = 270 μ l 0.5 ng / μ l。
各プライマーセットのPT-PCRにおける投入量としての、10 μ l 0.5 ng / μ l 溶液 = 5 ng。
4. 27 μ l 0.5 ng / μ l 全RNA 10 \times 希釈 = 270 μ l 0.05 ng / μ l。
各プライマーセットのPT-PCRにおける投入量としての、10 μ l 0.05 ng / μ l 溶液 = 0.5 ng。
5. 27 μ l 0.05 ng / μ l 全RNA 10 \times 希釈 = 270 μ l 0.005 ng / μ l。
各プライマーセットのPT-PCRにおける投入量としての、10 μ l 0.005 ng / μ l 溶液 = 0.05 ng。 10
6. 27 μ l 0.005 ng / μ l 全RNA 10 \times 希釈 = 270 μ l 0.0005 ng / μ l。
各プライマーセットのPT-PCRにおける投入量としての、10 μ l 0.0005 ng / μ l 溶液 = 0.005 ng。
7. 27 μ l 0.0005 ng / μ l 全RNA 10 \times 希釈 = 270 μ l 0.00005 ng / μ l。
各プライマーセットのPT-PCRにおける投入量としての、10 μ l 0.00005 ng / μ l 溶液 = 0.0005 ng。
8. 27 μ l 0.00005 ng / μ l 全RNA 10 \times 希釈 = 270 μ l 0.000005 ng / μ l。
各プライマーセットのPT-PCRにおける投入量としての、10 μ l 0.000005 ng / μ l 溶液 = 0.00005 ng。 20

【0087】

AMV-RTを用いる希釈の全RNAシリーズにおけるTAG特異的RT-PCRは以下の通り実施された。希釈シリーズ中のDNA分解酵素処理全RNA上の全てのTAGの逆転写反応は、96ウエルPCR板で実施された。それぞれの全RNA希釈液の10 μ lがRT-PCRの投入量として使用された。逆転写反応の反応容量は、20 μ lでありdNTP、MgCl₂およびRNA分解酵素阻害剤(RNasin)を含有している。

【0088】

- ・反応毎のRT混合物(RT-mix)を次の通り調製する：
- | | |
|---------------------------------|--------------|
| 3'プライマー(100 ng / μ l) 表6参照 | 1.25 μ l |
| 10 \times RT緩衝液 | 2.0 μ l |
| 100 mM dNTP (ファルマシア) | 0.8 μ l |
| 20 U RNAsin (ロッシュ) | 0.3 μ l |
| dH ₂ O (ベーカー(Baker)) | 0.65 μ l |
- ・全RNA希釈液10 μ lをRT混合物(RT-mix)の5 μ lに加える。
- ・プライマーをテンプレートにアニーリングするために反応溶液を65 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし、その後室温まで冷却する。
- ・5 μ l 1 U / μ l AMV-RTを反応溶液に加え、42 $^{\circ}$ Cで45分間インキュベーションすることによって逆転写を実施する。 40
- ・逆転写の後、すぐに混合物を95 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし反応を停止する。そして、反応物を室温まで冷却する。
- ・PCR反混合物(PCR-mix)の80 μ lを各反応混合物に添加(全容量は100 μ l)。
- 反応あたりのPCR混合物(PCR-mix)は次の通り調製する：
- | | |
|----------------------------------|-------------|
| - 5'プライマー(100 ng / μ l)、表6参照 | 1.0 μ l |
| - 10 \times PCR緩衝液 | 8.0 μ l |
| - 100 mM MgCl ₂ | 1.9 μ l |
| - Amplitaq 5 U / μ | 0.4 μ l |
- 50

- d H₂O (ベイカー) 68.7 μl
- ・ P C R 増幅は、9700 DNA サーマルサイクラー (パーキンエルマー) 中で以下のプログラムに従い実施される。
- 95 で5分間
- 95 で1分間 ; 55 で1分間 ; 72 で2分間、35 サイクル
- 72 で10分間

【0089】

この最初の増幅に続いて、第2回のネスト化された (nested) 増幅が実施された。R T - P C R 産物上の T A G 特異的な第2回のネスト化された (nested) P C R は、以下のとおり実施された：

ネスト化 P C R 混合物 (Nested - PCR mix) 45 μl に T A G R T - P C R 産物 5 μl を加える。

- ・ 反応ごとのネスト化された P C R 混合物 (Nested - PCR mix) を次のように調製する：

5' ネスト化 (nested) プライマー (100 ng / μl)、表7参照 0.5 μl

3' ネスト化 (nested) プライマー (100 ng / μl)、表7参照 0.5 μl

10 × P C R 緩衝液 5.0 μl

100 mM M g C l₂ 1.25 μl

100 mM d N T P (ファルマシア) 0.4 μl

A m p l i t a q 5 U / μl 0.2 μl

d H₂O (ベイカー) 37.15 μl

タグによって同定された遺伝子の増幅のために使用されたプライマーの組み合わせと増幅されたフラグメントの長さは、表8に示されている。

- ・ P C R 増幅は、9700 DNA サーマルサイクラー (パーキンエルマー) 中で以下のプログラムに従い実施される。

- 95 で5分間

- 95 で1分間 ; 55 で1分間 ; 72 で2分間、25 サイクル

- 72 で10分間

・ ネスト化 (nested) P C R 産物の 10 μl を 1.5 % アガロース 1 × T B E ゲルにかけ、エチジウム ブロマイド (Ethidium Bromide) で染める。

・ 希釈シリーズの T A G 増幅フラグメントを U V - 照射装置 (U V - illuminator) 上で可視化することで、希釈しても明白なシグナルを示す最高希釈度を決定することにより発現レベルが明らかになる。

【0090】

【表6】

10

20

30

第1回の増幅のためのRT-PCRデザイン

プライマー	配列
5'TAG004GENE	GGC CTT TAA CAC CCC GTT CCT
3'TAG004GENE	TGG TAG GTT GAG AAT CAG CGC TCA
5'TAG007GENE-N	AGG AGA CCA AAG GTC GCT ACT GCA
3'TAG007GENE	CAG TTC TTG GTG CGA AGG ACC T
5'TAG010GENE	ATC TAC CAG CTC ATG ATG CAG TGC T
3'TAG010GENE	GAA GTG CTC CGT ATA CTG CTG CAT
5'TAG011GENE	AGT GGG TAC ATC AAG TCC ATC TGA
3'TAG011GENE	CAC TGG TAT TTT CCA TCA GTG CT
5'TAG012GENE	TAA AGT TGT CCT GCT TGA GCT GGA
3'TAG012GENE	GGC ACG TGA GCC TCT CTT TGC AGT
5'TAG013GENE	CTC TAC CCC AGA GGA ATT TAC AGA
3'TAG013GENE	GGG CCA GAC CAA ACA CAG ACC TCT
5'TAG014GENE	GGC AAC AAG CAG AAG GCG GTC A
3'TAG014GENE	TGA TCT TGA GCT GCA GCT GCT CCT
5'TAG015GENE	GAA TGT GCT GGT CGG AGA GAA
3'TAG015GENE	TGG GGC AGC TTT TCA TAG AGC T
5'TAG016GENE	TTC TCT GCC TGC CCA GCA TCA TGA
3'TAG016GENE	TCA GGC ATT CAG CTT CAG GTC GCT
5'TAG017GENE	GTC TCT ACT ACT TCA CCT ACC A
3'TAG017GENE	TGT TGG GGG TAG AGT GAG CGT TGC T
5'TAG018GENE	GCA GGT TCC ATG TAA ACC TGC TGT
3'TAG018GENE	CTG CTC AGA AGA TCC TCA CGG AGT
5'TAG019GENE	GTG ACC GAG GAC AAC GTG ATG AAG A
3'TAG019GENE	CAT GAT CAT GTA CAG GTC GTG TGT
5'TAG022GENE	TGA GCA ACA CTC AAG CTG AGA G
3'TAG022GENE	TCT CTG GAG GCC CAT TGG T
5'TAG025GENE	ATG GGG TCA GGA ACA TCT GGC AGA
3'TAG025GENE	TCC GGC TGG ATG ACA AAT GCT ACT
5'TAG029GENE	CTC AGG TTT ATC TGG GCT CTA TCA
3'TAG029GENE	TCA TAA TGA CCT ATC CGA TGC AT
5'TAG030GENE	CTT GCA AAG ATA GGA GAG GCT CCA
3'TAG030GENE	ATT GAG CAC CTA AGG ATC TAT GCT
5'TAG032GENE	TGC GAA TCA GGG ACC AAC AGG AGA
3'TAG032GENE	TTG GGA GGA CAT TCT GGA CGG GCT
5'TAG036GENE	ATT TAG CAG TAG TTC TAT TGG GCA
3'TAG036GENE	ACT GAT TAG CAC TTC AGA CGC ACT

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

【 表 7 】

ネスト化(Nested) - PCR プライマー デザイン

プライマー	配列
5'TAG004GENE-2	CAT CGA CAA ATT GCG ATC T
3'TAG004GENE-2	CGC TAG CCC CCT CTT CCA GT
5'TAG007GENE-2.1	AGG AGA TGA TTG GCA GCG T
3'TAG007GENE-2	GGA GGA GGT CAC ATC TCT GGA T
5'TAG010GENE-2	CCA AGT TCG CTG ACA TCG T
3'TAG010GENE-2	TGC TGG GGA GCC GGA TAG ACA
5'TAG011GENE-2	GAA GAG AAA GGA CTC AGT GT
3'TAG011GENE-2	AGA TAT ATT TAC AGG ATA GT
5'TAG012GENE-2	AAA TCC AAG ACT ATG AGA
3'TAG012GENE-2	CTT AGT GGC TGG TGA CAG T
5'TAG013GENE-2	AAC TTG CCC TGT GCC TGT GT
3'TAG013GENE-2	GGT CCC TTA GAC TTT GAG CA
5'TAG014GENE-2	CTT CTG CGA GCT GCA TCT CA
3'TAG014GENE-2	TGC AGT GAC AGC TCC GTC T
5'TAG015GENE-2	AGA GGA GGT TTA TGT GAA GA
3'TAG015GENE-2	ACT ATC TCC CAA AGA AGG ACT
5'TAG016GENE-2	TGT CCT CGT CTG CAC CAT
3'TAG016GENE-2	ATG TAT TTC TGG ACC CAC T
5'TAG017GENE-2	GTC ACC TTC TGT GAC TAT GCC T
3'TAG017GENE-2	ACA GGT CAG GCC TCC ATA TCT
5'TAG018GENE-2	CGG CTG GAC ACG TCG GA
3'TAG018GENE-2	GGC GGA AGT GGT GGT ACT
5'TAG019GENE-2	CAC AAC CTC GAC TAC TAC A
3'TAG019GENE-2	GCC CTC CTT CAG CAG CTT
5'TAG022GENE-2	TTC ACA AAT ACA CCA GAC GTG AT
3'TAG022GENE-2	GGG CGC TGC TCC ATG GCT CTG CT
5'TAG025GENE-2	TGC CTA GAA AGG GGT GGC T
3'TAG025GENE-2	TTC TCA GTG CAG ACA TGT GGC T
5'TAG029GENE-2	CAG GCT TCT GAT AGT TTG CAA CT
3'TAG029GENE-2	TAT GCT ATT CAG AGA AAC T
5'TAG030GENE-2	TCT AAT GCA TGT AGA AGC T
3'TAG030GENE-2	AGG GCA GAG TCG ACA AAA CAG T
5'TAG032GENE-2	TCT TGA GTG GGC TAG TGA CT
3'TAG032GENE-2	AGT CTG GCA ATG GAG CAT GA
5'TAG036GENE-2	TGC TAT ACC TTG ACT TCA T
3'TAG036GENE-2	TCC AAG TGT ACT GCT TAT
5'TAG036GENE-2.1	CTA GTA GTC AGT TGG GAG T
3'TAG036GENE-2.1	AGC CAG AAC AGC CTT TAC T

10

20

30

40

【 0 0 9 2 】

【 表 8 】

50

プライマー組合わせとタグ特異的ネスト化(Nested) PCR反応での増幅されたフラグメントの長さ

名称	5' プライマー名	3' プライマー名	PCRフラグメント
TAG004	5' TAG004gene-2	3' TAG004gene-2	182
TAG007	5' TAG007gene-2.1	3' TAG007gene-2	211
TAG010	5' TAG010gene-2	3' TAG010gene-2	108
TAG011	5' TAG011gene-2	3' TAG011gene-2	239
TAG012	5' TAG012gene-2	3' TAG012gene-2	197
TAG013	5' TAG013gene-2	3' TAG013gene-2	212
TAG014	5' TAG014gene-2	3' TAG014gene-2	243
TAG015	5' TAG015gene-2	3' TAG015gene-2	131
TAG016	5' TAG016gene-2	3' TAG016gene-2	219
TAG017	5' TAG017gene-2	3' TAG017gene-2	185
TAG018	5' TAG018gene-2	3' TAG018gene-2	176
TAG019	5' TAG019gene-2	3' TAG019gene-2	204
TAG022	5' TAG022gene-2	3' TAG022gene-2	238
TAG025	5' TAG025gene-2	3' TAG025gene-2	183
TAG029	5' TAG029gene-2	3' TAG029gene-2	141
TAG030	5' TAG030gene-2	3' TAG030gene-2	179
TAG032	5' TAG032gene-2	3' TAG032gene-2	223
TAG036	5' TAG036gene-2	3' TAG036gene-2	191

10

20

【0093】

結果

タグ配列によって同定された遺伝子の発現レベルの測定結果は、図19に示されている。データは明らかにタグ配列によって同定された遺伝子の数は、正常皮膚に比べてカポジ肉腫病変の皮膚検体において高発現であることを示している：タグ007、タグ010、タグ012、タグ013、タグ014、タグ015、タグ016、タグ017、タグ022、

30

【0094】

実施例11

末梢血単核細胞(PBMC)検体中でのタグ配列の遺伝子発現レベルの測定

新脈管形成部位、すなわち皮膚中のカポジ肉腫または体内の他の癌からの検体中ではなく、血液(PBMC)から入手可能な検体で、新脈管形成過程のマーカールとしてのタグ配列の使用感を得るために、5種のタグ同定された遺伝子の発現が、PBMC検体で測定された。PBMC検体は、カポジ肉腫病変のある患者の血液から(4種の異なる検体)とそうでない患者(2種の対照検体)血液由来であり、タグ配列で同定された5種の遺伝子のPBMC中での発現について分析された。

40

【0095】

この実施例の手法は、皮膚生検のかわりにPBMC検体(1検体当たり、約1千万細胞、250万から5000万の範囲)が使用される以外は実施例10に記載されたものと同じであった。分析される遺伝子は、タグ007、タグ017、タグ010、タグ013、タグ015、タグ029およびタグ032によって同定された。分析結果は、図20に示されている。これらのデータから、タグ015(TIE1)とタグ032(サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1))で同定された遺伝子の癌位置での昂進された発現は、血液細胞画分すなわちPBMC、と対応していることが明らかである。

【0096】

50

結果

タグ007(ケラチン14)で皮膚検体(実施例5参照)中で同定された遺伝子の過剰発現は、血液と対応していないことを、このデータは明らかに示している。対照的に、この実施例で試験された検体中では、タグ007によって同定された遺伝子は血液画分で全く発現されていない。このことは、タグ007を発現している癌細胞は血液中に存在しないことを示している。その結果、血液中のタグ007の測定は、血液中のこれら癌細胞存在のためのよい標識になるであろう、そして従って、転移を起こし得る循環癌細胞のマーカーになる。

【0097】

皮膚検体中のタグ015(TIE1)とタグ032(サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1))によって同定された遺伝子のアップレギュレーションは明らかに血液と相関している。これら2つのタグは、健常人と比較して癌保持患者の血液中で高く発現している。このアップレギュレーションは、典型的な血液細胞中の発現のアップレギュレーションに起因している。

10

【0098】

このアップレギュレーションは、血液中でタグ015とタグ032を発現する癌細胞の存在に帰する事はできない、なぜなら、タグ007によって同定された遺伝子発現のないことが、上記で説明したよう、血中に癌細胞が存在しないことを示すからである。このことは、血液中のタグ015および/またはタグ032の発現の測定が体内のどこか他の場所での癌細胞の存在を示唆することを意味する。さらに、抗癌治療および/または抗新脈管形成治療中のタグ015および/またはタグ032によって同定された遺伝子の発現の測定は、この治療の有効性をモニターするために使用できる。

20

【0099】

結論

タグ015(TIE1)とタグ032(サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1))によって癌と血液中で同定された遺伝子の相関したアップレギュレーションは、癌の成長の減少を目的とする治療、特に抗新脈管形成性癌治療の有効性をモニターすることを可能にする。このことは、もしこの2つの遺伝子が体内の他の場所での癌中の血管形成のためのPBM C中でのマーカーであるとする、血中のこの2つのマーカーも癌側でのこの血管形成の減少と共に減少するであろうとの推論による。

30

【0100】

タグ007(ケラチン14)、タグ015(TIE1)およびタグ032(サリオアドヘシン(Salioadhesin)またはシグレック1(Siglec1))によって同定された遺伝子は、正常個体と比較して癌保有患者の血中で異なった発現をしている。従って、これらの遺伝子は、特にその発現は、その住民の各メンバーで癌の存在の危険に曝されている住民を集団検診するのに使用できる。

【0101】

正常組織と癌組織を比べて変化した発現レベルを示す、この研究でタグによって同定された全ての遺伝子、すなわち、タグ007、タグ010、タグ012、タグ013、タグ014、タグ015、タグ016、タグ017、タグ022、タグ029、タグ030、タグ032およびタグ036は、抗新脈管形成効果を有し癌治療に適用可能な治療薬剤としての潜在的な標的分子をエンコードしている、そして/またはこれらの遺伝子は、たとえば心臓および冠動脈疾患の治療で血管成長を刺激する治療薬剤の潜在的標的分子になりえる潜在的標的分子をエンコードしている。

40

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】新脈管形成に含まれる配列。特定の治療後のこの配列の発現変化は、その治療が有効であることを示す。この配列は、ヒト胎児の心臓から同定されたEST配列と同一である(GenBank登録番号AI217565およびその他)、その結果これは染色体19上の予測されたエクソンと合致する。新脈管形成との関係について今まで記載された

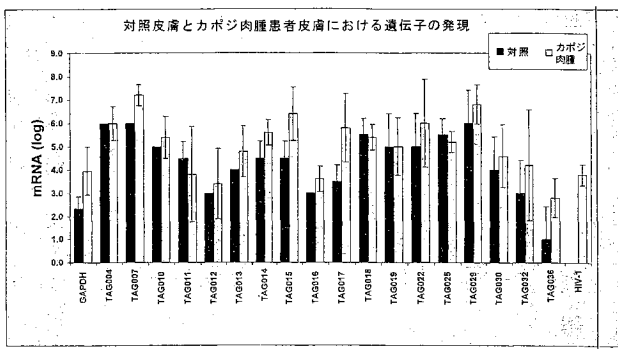
50

同定は表 1 ~ 4 (ユニジーン (Unigene) 番号) で見ることができ、これは N C B I の S A G E データベースで見つけることができる。

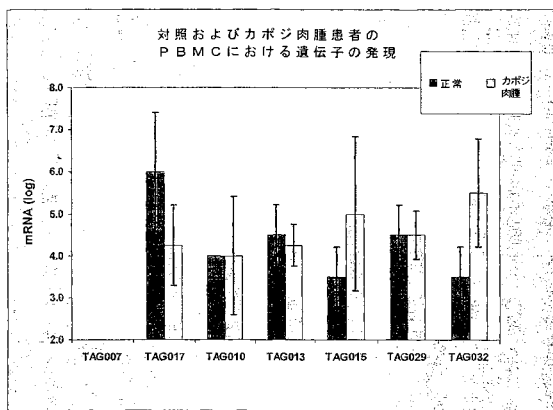
【図 19】カポジ肉腫の皮膚 5 検体 (明るい色の棒線) と 2 つの対照正常皮膚検体 (黒棒線) から単離された全 R N A の 5 0 0 n g から希釈し始めてもなお陽性を示すログ希釈ファクターとして表示された平均発現レベルと標準偏差。

【図 20】カポジ肉腫患者の 4 P B M C 検体 (明るい色の棒線) と 2 つの対照正常 P B M C 検体 (黒棒線) から単離された全 R N A の 5 0 0 n g から希釈し始めてもなお陽性を示すログ希釈ファクターとして表示された平均発現レベルと標準偏差。

【図 19】



【図 20】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059558 A2

- (51) International Patent Classification: G01N (74) Agent: PRINS, A., W.; c/o Verenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).
- (21) International Application Number: PCT/NL02/00051
- (22) International Filing Date: 23 January 2002 (23.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- | | | |
|------------|--------------------------------|----|
| 01200228.3 | 23 January 2001 (23.01.2001) | EP |
| 01203703.2 | 28 September 2001 (28.09.2001) | EP |
| 60/525,722 | 28 September 2001 (28.09.2001) | US |
- (61) Related by addition to earlier application or grant:
- | | |
|----------|---------------------|
| CU | Not furnished (ICA) |
| Filed on | Not furnished |
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMSTERDAM SUPPORT DIAGNOSTICS B.V. [NL/NL]; Twin-2, Building R-South, Meibergdreef 59, NL-1105 BA Amsterdam (NL).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): VAN DER KUYL, Antoinette, Cornelia [NL/NL]; Van Colleenstraat 26, NL-1231 VS Loosdrecht (NL). CORNELISSEN, Marion [NL/NL]; Wipmolen 21, NL-3642 AC Loosdrecht (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU (inventor's certificate), CZ (utility model), DE (utility model), DK (utility model), DM, DZ, EC, EB (utility model), ES, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR (consensual patent), HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT (utility certificate), TZ, UA, UG (utility certificate), US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/059558 A2

(54) Title: MEANS AND METHODS FOR TREATMENT EVALUATION

(57) Abstract: The invention provides a method for determining whether a treatment is effective in changing the status of a certain set of target cells, such as a tumor, in a patient. This method implies obtaining a sample from a patient after initiation of a treatment, and determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene. Preferably, said sample is a blood sample. In one aspect, said expression product is expressed by a peripheral blood mononuclear cell. Said marker gene may be a gene involved in the generation, maintenance and/or breakdown of blood vessels (angiogenesis). A method of the invention is very suitable to determine within a few days if a certain treatment against Kaposi's Sarcoma is successful. Moreover, this method is suitable for determining the presence of angiogenesis and/or tumor cells in a patient.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

Title: Means and methods for treatment evaluation.

The invention relates to the field of medicine. The invention particularly relates to the fields of molecular biology and detection methods.

Recent advances in the knowledge of molecular processes in a cell and techniques to study these processes have resulted in improved methods of typing and treating diseases. Understanding of the underlying molecular diversity of tumors has, for instance, already led to a better understanding of the diversity of response to treatment of morphologically similar tumors. Improved typing influences the way tumor patients are being treated. A drawback of the current methods of treatment is, however, that it takes a relatively long time to determine whether a treatment given to a patient is actually effective. This impedes the optimization of dosages and/or schedules with which treatment is given. Moreover, it also slows down the possibility to adjust the treatment regimen all together. For instance, adjustment of therapy is currently only possible when macroscopic analysis of tumor cells in the body indicates that the therapy given is not effective. Macroscopic changes typically need several weeks to manifest themselves and equipment to measure such changes is often not readily available.

The present invention provides a method for determining whether a treatment is effective in changing a status of a certain set of target cells in an individual comprising obtaining a sample from said individual after initiation of said treatment and determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene. In one embodiment of the invention said set of target cells comprises a tumor cell. By changing a status of a set of target cells is meant herein that at least one property of said set of target cells is altered. For instance, the amount of said target cells may be changed. Said amount may either be increased or decreased. Alternatively, the activity of said target cells may be altered. Said activity may be a replication

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

2

activity. As another example, said activity may be an activity involved with angiogenesis. Alternatively, said activity may be an apoptotic activity.

It was found that tumor cells and/or surrounding tissue respond, on a molecular level, very quickly to an effective treatment. This response can be detected by measuring an expression product of a marker gene. Marker gene expression products are indicative for a response to treatment. Marker genes are typically genes that are expressed by said set of target cells, for instance tumor cells, and/or surrounding tissue. However, marker genes can also be expressed in non-tumor target cells in other compartments of the body, for instance blood cells and/or cardiovascular cells.

Alternatively, marker gene expression can be initiated upon treatment given to the individual. Marker gene expression products are responsive to treatment given to a patient. A response can be an alteration in the relative amounts of expression product. However, it can also be an alteration in absolute presence or absence of expressed product such as RNA and/or protein.

According to the invention, a sample which is obtained from a patient may comprise at least one of said target cells. This is particularly suitable for detecting circulating tumor cells which have released themselves from a tumor and are circulating in the blood of a patient. Alternatively, said target cells may be non-tumor cells. In another embodiment of the invention, said sample does not comprise any target cells. However, said sample may comprise another, non-target cell. Expression, or change of expression, of at least one marker gene by said non-target cell is indicative for the status of a certain set of target cells. Said non-target cell preferably comprises a peripheral blood mononuclear cell, as is described below. In yet another embodiment, said sample does not comprise any cell at all. For instance, an expression product of a marker gene, produced by a target cell or non-target cell elsewhere in an individual's body, may be present in said sample at detectable levels.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

3

With a method of the invention it is possible to determine whether a treatment is effective in said individual. This can be done while a treatment is given or shortly after said treatment. Thus it is possible for instance to adjust treatment schedule, dosages and type on a patient per patient basis. It is preferred that said sample is obtained within a week of initiation of treatment. More preferably, said sample is obtained within two days of initiation of treatment. With a method of the invention it is possible to evaluate treatment effectiveness almost immediately after initiation of said treatment. A method of the invention thus offers a good opportunity for determining whether treatment adjustments are required.

A marker gene preferably comprises a gene involved in the generation, maintenance and/or breakdown of blood vessels (angiogenesis). Classes of genes involved in the process of angiogenesis encompass among others receptors, ligands and signaling molecules. Tumor cells are dependent on the growth of new blood vessels to maintain expansion of tumor mass. On the one hand, blood vessels are required to carry nutrients to the site of the tumor, whereas on the other hand waste material needs to be transported from the tumor. In the present invention it has been shown that expression products from genes involved in the generation, maintenance and breakdown of a blood vessel are among the first to respond to anti-tumor treatments. Such genes are therefore very suitable marker genes of the invention. In one embodiment said marker gene comprises a sequence as depicted in table 1 or 2. In another embodiment said marker gene comprises a sequence as depicted in figures 1-18, or a part or analogue thereof. In a preferred embodiment said marker gene comprises a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof.

A change in the level of expression product of a marker gene is indicative for whether a treatment is effective or not. For instance, the level of expression product of a marker gene can be enhanced in a sample when a treatment is effective, alternatively expression product of a marker gene can

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

4

be reduced. Thus, preferably, expression product of a marker gene is quantified. The level of expression product in a sample can vary due to changes in the expression of a marker gene. However, it is also possible that the level changes due to a change in type of cells comprising said expression product in said sample, for instance due to treatment related cell death at the site of the body where the sample is obtained. Considering that the level of expression product of marker genes can vary from patient to patient, it is preferred that a method of the invention further comprises comparing the level of expression product of said marker gene with a reference. Preferably said reference comprises the same type of tumor cells prior to, or in the absence of, said treatment. Preferably, said tumor cells are derived from the same patient. The difference in the level of expression product of a marker gene in an effective and a non-effective treatment can be very large. In the extreme cases the level of expression product can range from detectable to not detectable. Marker genes displaying such zero to one relation in expression product levels are preferred in the present invention. A zero to one relation can be used to design relatively simple test systems. A zero to one relation is of course dependent on the detection system used to detect expression product of a marker gene. Very sensitive expression detection systems will typically detect expression product where a less sensitive systems detects no expression product. An expression product can be RNA or a part thereof, transcribed from said marker gene or a translated protein or a part thereof. A person skilled in the art is well capable of designing the most appropriate expression detection system to practice this preferred embodiment of the invention.

A part of an RNA or DNA molecule is defined herein as an RNA or DNA sequence, comprising at least 50 nucleotides. A part and/or an analogue of an expression product is defined herein as a part and/or analogue that can be detected using essentially the same kind of detection method as said expression product, although the sensibility of detection may differ. An analogue of an RNA or DNA molecule is defined herein as an RNA or DNA

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

5

sequence which is essentially the same as a particular RNA or DNA sequence. However, a nucleotide mutation, replacement, alteration, addition and/or deletion may have taken place naturally and/or performed artificially, without essentially altering the detection of said analogue as compared with the
5 detection of said particular RNA or DNA sequence. A person skilled in the art is well able to determine whether a given RNA or DNA sequence is an analogue of a particular RNA or DNA sequence, using techniques known in the art.

In a preferred embodiment said tumor comprises Kaposi's Sarcoma.
10 Kaposi's Sarcoma is a disease of proliferating blood vessels and therefore very much suited for identifying marker genes involved in angiogenesis. According to the invention, changes in angiogenesis factors are among the first marker events as a result of treatment. Kaposi's Sarcoma (KS) manifests itself clinically by reddish skin lesions. Kaposi's Sarcoma is a multicentric,
15 malignant neoplastic vascular proliferation characterized by the development of bluish-red cutaneous nodules, usually on the lower extremities, most often on the toes or feet, and slowly increasing in size and number and spreading to more proximal areas. The tumors have endothelium-lined channels and vascular spaces admixed with variably sized aggregates of spindle-shaped
20 cells, and often remain confined to the skin and subcutaneous tissue, but widespread visceral involvement may occur. Kaposi's Sarcoma occurs spontaneously in Jewish and Italian males in Europe and the United States. An aggressive variant in young children is endemic in some areas of Africa. A third form occurs in about 0.04% of kidney transplant patients. There is also a
25 high incidence in AIDS patients. (From Dorland, 27th ed & Holland et al., Cancer Medicine, 3d ed, pp2105-7)

Kaposi's Sarcoma is aggressive in HIV infected individuals. The angiogenic mechanism causing the lesions results from the interplay of viral and cellular gene expression and is poorly understood in terms as to which
30 genes are involved and what controls their expression. The angiogenic

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

6

proliferation in KS involves mechanisms likely to be universal in angiogenesis. The central role of angiogenesis in Kaposi's Sarcoma is clearly illustrated by the French name for this tumor: angiosarcomatose kaposi. Because of said central role of angiogenesis in Kaposi's Sarcoma, determination of marker
5 genes involved in angiogenesis is very suitable to determine whether a treatment of Kaposi's Sarcoma is effective.

In the present invention, gene expression patterns of Kaposi's Sarcoma were examined with a method called serial analysis of gene
10 expression (SAGE) (Velculescu et al. (1995) Science 270; 484-487). This method allows the quantitative and simultaneous analysis of a large number of transcripts. SAGE is based on two principles. First, a short nucleotide sequence TAG (14 base pairs) contains sufficient information to uniquely
15 identify a transcript, provided it is isolated from a defined position within the transcript. Second, concatenation of short sequence TAG's allows the efficient analysis of transcript in a serial manner by sequencing of multiple TAG's within a single clone.

Briefly, in this method a biotinylated oligo (dT) primer is used to
20 synthesize cDNA from mRNA, and after digestion with a restriction enzyme, the most 3' terminus (near the poly-A tail) is isolated. These 3' fragments of cDNA are ligated to linkers and cleaved with a type II restriction enzyme to release short sequence (14 bp) of the original cDNA (TAG's). The TAG's are
25 ligated to diTAG's and PCR amplified. These di-TAG's are then ligated to form long concatamers, which are cloned and sequenced. In this way, one sequence reaction yields information about the distribution of many different mRNA's. Finally, the calculation of the abundance of different TAG's and the matching
of the TAG's in Genbank are done using the necessary computer software.

In another aspect the invention provides the use of a nucleic acid
30 comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a part or analogue thereof, in an expression product detection method. Preferably

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

7

said nucleic acid comprises a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. Expression of a marker gene in an individual can be detected by determining whether said nucleic acid or part or analogue is able to hybridize with nucleic acid, preferably RNA, in a sample of said individual. If hybridisation takes place, it is indicative of expression of a marker gene in said individual. Of course, as is known by a person skilled in the art, a coding strand of DNA/RNA is capable of hybridizing with the complementary strand of a corresponding doublestranded nucleic acid sequence. Hence, a complementary strand of a certain coding strand is particularly suitable for detection of expression of said coding strand. For instance, a complementary strand of a coding strand as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2 is suitable for detection of expression of a gene comprising said coding strand.

In yet another aspect, the invention provides the use of a proteinaceous molecule capable of specifically binding a protein encoded by a nucleic acid comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a part or analogue thereof, in a detection method. Preferably, said proteinaceous molecule is capable of specifically binding a protein encoded by a nucleic acid comprising a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. In one embodiment of the invention, said uses are directed toward determining the presence of a site of angiogenesis in an individual. In another embodiment of the invention, said uses are directed toward determining the presence of a tumor cell in an individual. The presence of a tumor cell in an individual can be determined because said tumor cell typically expresses marker genes that can be detected by an expression product detection method. For instance, an antibody, or analogue thereof, specifically directed against an expression product of said marker gene can be generated. Said antibody or analogue is suitable for determination of an expression product of said marker gene in a sample. To determine the presence of a tumor cell in an individual, a sample

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

8

from said individual can be incubated with said antibody. If said sample contains an expression product of said marker gene, said antibody will bind. Binding can be demonstrated by techniques known in the art, like for instance ELISA. If binding of said antibody is demonstrated, one can conclude that said sample contains an expression product of said marker molecule. The presence of an expression product of said marker molecule can indicate the presence of a tumor cell in an individual, since said marker molecule is expressed by tumor cells. There are of course many more alternative techniques to detect an expression product with use of a proteinaceous binding molecule, which are well known in the art and need no further discussion here. Thus, proteins expressed by a tumor cell can be detected by a proteinaceous molecule capable of specifically binding a protein encoded by a nucleic acid comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, like for instance a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin and/or Siglec 1 sequence, or a part or analogue thereof. Likewise, the presence of a site of angiogenesis in an individual can be determined by detecting an expression product of a marker gene.

In another embodiment, a use of a nucleic acid comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a use of a proteinaceous molecule capable of specifically binding a protein encoded by a nucleic acid comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a part or analogue thereof, are directed toward determining whether a treatment is effective in changing the status of a certain set of target cells in an individual. In a preferred embodiment said nucleic acid comprises a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. In another preferred embodiment said proteinaceous molecule is capable of specifically binding a protein encoded by a nucleic acid comprising a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. More preferably, said uses are directed toward determining whether a treatment is

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

9

effective in counteracting a tumor in an individual. In one embodiment of the invention, said tumor comprises Kaposi's Sarcoma.

In one aspect the invention provides the use of a nucleic acid
5 comprising a sequence as depicted in table 1 or 2 and/or figure 1-18 as an
indicator for angiogenesis. In a preferred embodiment the invention provides
the use of a nucleic acid comprising a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec
1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue
thereof as an indicator for angiogenesis. For instance, a nucleic acid
10 comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2 can be
used as detection marker for the process of angiogenesis in the course of
regenerative treatment. Changes in the expression level of the detection
marker indicate active growth of blood vessels (i.e. angiogenesis) as was meant
to induce with the regenerative treatment course. In a preferred embodiment
15 such application is in the field of heart and coronary disease aimed at
generation of new blood supply to affected organs by means of new blood
vessels. Likewise, the treatment of tumors with anti-angiogenesis drugs can be
monitored by changes in expression levels of detection marker genes as
depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, such as a TIE 1 sequence, a
20 Sialoadhesin and/or Siglec 1 sequence.

In another aspect the invention provides the use of a nucleic acid
comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2 as
detection marker for tumor cells. In yet another aspect the invention provides
25 the use of a proteinaceous molecule encoded by a nucleic acid comprising a
sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2 or a proteinaceous
molecule capable of binding a protein encoded by a nucleic acid comprising a
sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2 as detection marker for
tumor cells.

30

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

10

With a method of the invention it is possible to monitor a specific status of an individual. The presence of a disease – or danger of developing one – can be determined by determining whether or not a sample of an individual comprises an expression product of a marker gene. This means that also the absence of a marker gene in a sample can be indicative for the presence of a disease, or for danger of developing a disease. This is possible for any disease, as long as the disease involves an altered expression pattern of at least one marker gene. Preferably the presence of a marker gene in a sample is determined.

10 Additionally, a healing process can be followed as well. For instance, recovery of damaged tissue can involve an increasing amount of expression product of a marker gene over time. It is however also possible that recovery of damaged tissue involves a decreasing amount of expression product of a marker gene over time. Samples taken at different time intervals provide information about

15 the amount of expression product which is generated at different time points. An altered amount of a specific expression product found in samples during a period of time is indicative of the amount of tissue cells generated. Likewise, a decreasing amount of an expression product found in samples in a specific time-period can indicate a certain – either beneficial or harmful – process. For

20 instance, said process may involve the development or the treatment of disease. An important application is a treatment of heart and coronary disease. A method of the invention is very suitable for monitoring the generation of new cardiac tissue.

25 Thus, one aspect of the invention provides a method of diagnosis, in particular a method for determining whether an individual comprises a tumor cell and/or a site of angiogenesis, comprising obtaining a sample from an individual, and determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene. Preferably, said marker gene comprises a

30 sequence as depicted in table 1 or 2 and/or figure 1-18, or a part or analogue

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

11

thereof. More preferably said marker gene comprises a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. With a method of the invention it is possible to detect tumor cells that have released themselves from the tumor and are elsewhere
5 in the body. In a preferred embodiment such detection is performed in the blood of a person detecting circulating tumor cells. These circulating tumor cells can be used for primary identification of presence of a tumor somewhere in the body and also for identification of the risk of metastasis of the tumor to other places in the body next to the primary location of the body. Likewise, a
10 method of the invention is suitable for determining a site of angiogenesis in an individual. Angiogenesis is an indicator for different aspects. For instance, an increased level of angiogenesis indicates the presence of tumor cells, or the healing of damaged tissue, like for instance recovery of heart and coronary disease.

15 Since an angiogenic process is now easily monitored by a method of the invention, it is likewise easy to determine whether a certain treatment is effective in altering an angiogenic process. For instance, if a certain treatment is effective in counteracting an angiogenic process, the amount of an expression product of a marker gene involved in angiogenesis decreases as well
20 over time. In the art, many drugs are known for anti-angiogenic treatment. Thus, one embodiment of the invention provides a method for determining whether a treatment is effective in altering an angiogenic process in an individual comprising obtaining a sample from said individual after initiation of said treatment, and determining whether said sample comprises an
25 expression product of at least one marker gene. Preferably, said marker gene comprises a sequence as depicted in table 1, 2, and/or figures 1-18, or a part or analogue thereof. More preferably, said marker gene comprises a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. In one embodiment, said treatment
30 comprises counteracting angiogenesis in said individual. In yet another

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

12

embodiment said treatment involves the use of at least one of the following drugs: 2ME2, Angiostatin, Angiozyme, Anti-VEGF RhuMAb, Apra (CT-2584), Avicine, Benefin, BMS275291, Carboxyamidotriazole, CC4047, CC5013, CC7085, CDC801, CGP-41251 (PKC 412), CM101, Combretastatin A-4

5 Prodrug, EMD 121974, Endostatin, Flavopiridol, Genistein (GCP), Green Tea Extract, IM-862, ImmTher, Interferon alpha, Interleukin-12, Iressa (ZD1839), Marimastat, Metastat (Col-3), Neovastat, Octreotide, Paclitaxel, Penicillamine, Photofrin, Photopoint, PI-88, Prinomastat (AG-3340), PTK787 (ZK22584), RO317453, Solimastat, Squalamine, SU 101, SU 5416, SU-6668,

10 Suradista (FCE 26644), Suramin (Metaret), Tetrathiomolybdate, Thalidomide, TNP-470, and/or Vitaxin. However, the artisan can think of more drugs that can be used during said treatment.

In a preferred embodiment, a sample of a method of the invention is a blood sample. Although the location of for instance an angiogenic process can be a tumor or a part of the skin, a blood sample is preferred, among other things because it is much easier to obtain. A blood sample is also often easier to investigate, requiring less expensive and/or specific equipment. Quite surprisingly, we have found that the expression of certain marker genes by

20 hemopoietic cells, like peripheral blood mononuclear cells (PBMC), can be indicative for a process occurring somewhere else in an individual's body. For instance, the presence, or alteration in amount, of an expression product of a marker molecule in PBMC can indicate the presence of a tumor somewhere in the body. In example 10 it is for instance shown that a TIE 1 sequence (tag 15,

25 table 3) or a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence (tag 32, table 4) are both upregulated in skin tumor and in PBMC cells in a Kaposi's Sarcoma patient. Additionally, example 8 shows that the absence of expression product of a Keratin 14 sequence (tag 7, table 3) in a blood sample of said patient, whereas Keratin 14 is overexpressed in tumor cells, indicates that said sample was not

30 contaminated with tumor cells. Likewise, the expression of certain marker

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

13

genes by PBMC can provide another diagnostic indication. The presence or absence of an expression product of a marker gene in PBMC provides adequate information about different aspects and/or processes of an individual's body. Preferably, the amount of expression product in a non-hemopoietic cell is compared with a reference value. This way an indication is obtained about an increment or decrement of expression in said hemopoietic cell.

In one aspect the invention therefore provides a method for determining whether an individual comprises a non-hemopoietic tumor cell and/or a site of angiogenesis, said method comprising determining whether a hemopoietic cell from said patient comprises an altered amount of an expression product of a marker gene as compared with a reference value. Preferably, said marker gene comprises a gene involved in angiogenesis. More preferably, said gene comprises a sequence as depicted in table 1 or 2, and/or figures 1-18, or a part or analogue thereof. Most preferably, said gene comprises a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. In one embodiment of the invention said hemopoietic cell comprises a peripheral blood mononuclear cell.

In one aspect the invention provides a method of the invention, wherein said expression product is expressed by a PBMC. Preferably, said expression product comprises a TIE 1 sequence, a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof. As these sequences are involved in angiogenesis, the invention also provides a use of a PBMC expressed Keratin 14 sequence, TIE 1 sequence, Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 2, 8 or 17, or a part or analogue thereof, as an indicator for angiogenesis. Likewise, these sequences are involved in the presence of tumor cells. Therefore, a use of a PBMC expressed Keratin 14 sequence, TIE 1 sequence, Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 2, 8, or 17, or a part or analogue

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

14

thereof, for determining the presence of a tumor cell in an individual, is also herewith provided. Additionally, the invention also provides an isolated Keratin 14 sequence, TIE 1 sequence, Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 2, 8, or 17, or a part or analogue thereof, for use in a diagnostic method. A diagnostic method can be carried out using a diagnostic kit. Therefore, a diagnostic kit comprising a nucleic acid comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a part or analogue thereof, and/or a proteinaceous molecule capable of specifically binding a protein encoded by said nucleic acid or said part or analogue, is also herewith provided. Preferably, said kit comprises a suitable means of detection. In one embodiment a diagnostic kit of the invention is provided comprising a Keratin 14 sequence, and/or a TIE 1 sequence, and/or a Sialoadhesin or Siglec 1 sequence, and/or a sequence as depicted in figure 2, 8 or 17, or a part or analogue thereof.

15 A diagnostic kit of the invention is particularly useful for carrying out a method of the invention. In yet another embodiment the invention therefore provides a use of a diagnostic kit of the invention for determining whether a treatment is effective in changing the status of a certain set of target cells in an individual and/or altering an angiogenic process in an individual.

20 Additionally, the invention provides a use of a diagnostic kit of the invention for determining whether an individual comprises a tumor cell and/or a site of angiogenesis.

With a marker gene of the invention it is possible to screen for drugs directed against a disease for which said marker gene is indicative. There are many methods available in the art for screening for a specific drug activity. For instance, cells can be incubated with different potential drug compounds, and an expression pattern of a marker gene in said cells before and after exposure to each potential drug compound can be compared. A specific difference in an expression pattern after exposure to a particular potential drug compound shows that said compound is a suitable candidate for the

25

30

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

15

development of a medicament. The invention therefore provides in one embodiment a use of an expression product of a gene comprising a sequence as depicted in figure 1-18, table 1 or table 2 as a drugtarget. Preferably, said sequence is a Salioadhesin or Siglec 1, TIE 1, and/or Keratin 14 sequence. A
5 compound capable of altering the activity of Salioadhesin or Siglec 1, TIE 1, Keratin 14, and/or the expression of Salioadhesin or Siglec 1, TIE 1, and/or Keratin 14 in a cell is also herewith provided. Said compound is particularly suitable for the preparation of a medicament.

10

The present invention is further explained in more detail by the following examples, which do not limit the invention in any way.

Examples**Example 1**

In this example a selection of samples for analysis of expression profiles is made.

5 A 31-year old man was demonstrated to be HIV-1 seropositive in February 1997. The initial CD4 cell count was $25 \times 10^6/l$. The patient presented within two months a mucocutaneous Herpes simplex infection and an extrapulmonary Cryptococcosis for which specific medication was given. The HIV-1 RNA load

10 at presentation was 15,000 copies/ml and increased to 33,000 copies/ml in three months. Then antiretroviral therapy was started with zidovudine, lamivudine and indinavir. Immediately after start therapy the HIV-1 RNA load dropped below detection limit. In November 1997 the patient presented with gradual appearance of an increasing number of violaceous skin lesions

15 that clinically resembled Kaposi's Sarcoma. The diagnosis was confirmed by histological examination of one of the lesions. At start of the chemotherapy (bleomycin, vincristine and adriamycine intravenously) KS had progressed to about 150 cutaneous lesions. The interval between the courses of chemotherapy was three weeks and stopped after the fifth course. Several

20 lesions had disappeared by three weeks of therapy and complete remission was gradually reached after one year.

During chemotherapy several biopsies were taken. The first biopsy was obtained 24 hours after start chemotherapy (named KS1) and the second biopsy after 48 hours (named KS2). All biopsies were flash-frozen in liquid

25 nitrogen immediately after surgical removal and stored at -80°C . Diagnosis of Kaposi's Sarcoma was confirmed histopathologically.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

17

Control SAGE libraries KS3 and KS4 were made from frozen material taken at autopsy from two AIDS patients with Kaposi's Sarcoma, both of which died in 1986 without having had any form of chemotherapy or retroviral treatment.

5 **Example 2**

The expression profiles of the biopsy samples were determined using the SAGE technology. All biopsies were cut with a microtome in 15-20 μ m sections and transferred to a tube containing TRIzol. RNA isolation with TRIzol was performed according to the manufacturer's instructions. Poly (A) RNA was
10 obtained using the Micro-FastTrack™ 2.0 mRNA Isolation Kit. cDNA preparation and the subsequent steps were performed as described by Velculescu. Primary analysis of the sequence results was performed using software especially designed for SAGE by the Bioinformatics Laboratory of the Academic Medical Centre, Amsterdam (van Kampen *et al.* USAGE: a web-
15 based approach towards the analysis of SAGE data. Bioinformatics, *in press*). The libraries were also analysed using the Human Transcriptome Map (HTM), a program developed in the AMC, which maps TAG's onto human chromosomes (Caron *et al.* The Human Transcriptome Map reveals a clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. Submitted for
20 publication).

We sequenced ~ 47,000 TAG's from the four biopsies, 47,298 TAG's from KS 1 library, 46,671 from the KS 2 library, 49,335 TAG's from the KS3 library, and
25 48,814 TAG's from the KS4 library. TAG lists (i.e. individual TAG's plus the number of appearance) were compared with each other in USAGE, TAG sequences with the highest counts were identified with the amct2g database available in USAGE (which is an improved TAG identification compared with the SAGEmap database from CGAP (available from GenBank). Secondly, TAG lists were mapped to chromosome locations with the HTM program, and at the

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

18

same time compared with specific TAG lists (e.g. vascular endothelium, publicly available), and with a compilation of all TAG lists in the SAGEmap database (designated "All" in HTM) TAG's belonging to genes specifically up regulated in KS3 and KS 4 identified (Table 1). Nucleotide 15 was determined
5 from the original diTAG list in USAGE. The TAG sequence of 15 nt. was checked with GenBank (BLAST) to confirm its identification. A few TAG's were eliminated because of ambiguity in the 15th nucleotide, or because of misidentification.

10 **Example 3**

Result of the analysis showing the identifiable TAG's derived from known genes with increased expression in Kaposi's Sarcoma SAGE libraries KS3 and KS4 compared to libraries KS1 and KS2. The TAG numbers are first
15 normalized to a level of 100,000 total TAG's sequenced per library to allow comparison between the libraries and comparison with other libraries in the public domain.
The sequence catg precedes each TAG sequence given in column 2 of table 1.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

19

Table 1. Overview of identifiable TAG's over-expressed in SAGE libraries KS3 and KS4.

No.	TAG sequence (5' -> 3')	Unigene no.	ID	overexpression factor ¹
1.	ccccagtgcc	Hs171596	EphA2	3
2.	cttgacatacc	Hs171695	Dual specificity phosphatase	3
3.	catcaaggatc	Hs82112	IL1 receptor, type 1 ²	10-30
4.	ggccaaaggcc	Hs78436	EphB1	>2
5.	ttgcataatcag	Hs82237	AT group D protein	10 - 15
6.	ccctgttcagc	Hs78824	Tie 1 ²	2-5
7.	gatcaatcagt	Hs16530	Small ind. cytokine A18	10-20
8.	gagggtgccaa	Hs898	Complement comp. 1Q β	5-10
9.	taaacctctg	Hs99923	galectin 7	3-10
10.	gtggccagagg	Hs1420	FGFR3	2-5
11.	tctgcccagc	Hs183	DARC (Duffy blood group)	8-10
12.	caggctgctac	Hs75066	Translin	2-6
13.	gagcagcggcc	Hs112408	Psoriasis (S100 A7)	> 20 (specific)
14.	acttattatgc	Hs76152	Decorin	2-10
15.	caggcctggcc	Hs74649	Cytochrome C oxidase subunit VIc	2-4
16.	gtggcgaggac	Hs181062	Serum amyloid A1	5-14
17.	acagcggaat	Hs74316	Desmoplakin	5-10
18.	gatgtgcacga	Hs117729	Keratin 14	10-14
19.	caggttcata	Hs24395	Small ind. cytokine, B14 (BRAK)	5-10
20.	aactctgacc	Hs93675	Decidual protein induced by progesterone ²	3-10

1. TAG numbers of appearance were normalized to library sizes of 100.000 TAG's.

2. Identified as Pan Endothelial Markers by St. Croix *et al.*, Genes expressed in human tumor endothelium.

5 *Science* 289:1197-1202, 2000.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

20

Example 4

Result of the analysis showing the non-identifiable TAG's derived from EST's of genes with unknown function with increased expression in Kaposi's

5 Sarcoma SAGE libraries KS3 and KS4 compared to libraries KS1 and KS2.

The TAG numbers are first normalized to a level of 100.000 total TAG's sequenced per library to allow comparison between the libraries and comparison with other libraries in the public domain.

The sequence catg precedes each TAG sequence given in column 2 of table 2.

10

Table 2. Overview of identifiable TAG's over-expressed in SAGE libraries KS3 and KS4.

No.	TAG sequence (5' -> 3')	Unigene no.	ID	overexpression factor ¹
1.	aatcaataca	Hs94953	EST	4-10
2.	tggtlaactggc	Hs108741	EST	4-10
3.	tctgcactgag	Hs173789	EST	2-4
4.	caggctgctgg	Hs60440	EST	4-30
5.	atgacagatgg	Hs13775	EST	5-10
6.	gcacaacaaga	Hs236510	EST	3-10
7.	ccacaggagaa	Hs23579	EST	4-10
8.	ctgtgoggaac	Hs46987	EST	2-10
9.	gatggctgct	Hs18104	EST	4-20
10.	ctcattgcca	Hs31869	EST	2-10
11.	acctccaactgg	Hs112457	EST	Unique ²

1. TAG numbers of appearance were normalized to library sizes of 100.000 TAG's

2. This TAG does not appear in any other SAGE library than our own

15 libraries and seems to be a unique new indicator gene for angiogenesis.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

21

Example 5

Kaposi's sarcoma skin tissue was obtained from the same two AIDS patients mentioned in example 1 from whom SAGE libraries KS3 and KS4 were made. Both patients were homosexual men and were infected at the beginning of the HIV-1 epidemic in Europe. Patient 1 born in Indonesia was demonstrated to be HIV-1 positive in 1982. In February 1985 a histological examination confirmed the diagnosis of Kaposi's sarcoma. He died 13 month later and postmortem examination revealed morphological variants of visceral KS. Patient 2 presented in February 1984 at the Academic Medical Centre with progressive KS skin lesions. During follow-up the KS progressed to the intestines, oropharynx, lung, tongue, sinus piriformis and lymph nodes. In March 1986 the patient died and autopsy took place. The biopsies of said two patients were named KS3 and KS4.

Normal adult breast skin tissue was obtained as discarded tissue from reduction mammoplasties (obtained from the department of plastic Surgery of our hospital). RNA isolated of three breast reductions was used to construct the normal skin expression profile library.

20

The expression profiles of the biopsy samples were determined using the SAGE technology as described in example 2.

We sequenced ~ 47,000 TAG's from the four biopsies, 49,335 TAG's from the KS3 library, and 48,814 TAG's from the KS4 library. TAG lists (i.e. individual TAG's plus the number of appearance) were compared with each other in USAGE, TAG sequences with the highest counts were identified with the amct2g database available in USAGE (which is an improved TAG identification compared with the SAGEmap database from CGAP (available from GenBank). Secondly, TAG lists were mapped to chromosome locations with the HTM program, and at the same time compared with specific TAG

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

22

lists (e.g. vascular endothelium, publicly available), and with a compilation of all TAG lists in the SAGEmap database (designated "All" in HTM) TAG's belonging to genes specifically up regulated in KS3 and KS 4 identified (Table 1). Nucleotide 15 was determined from the original diTAG list in USAGE. The TAG sequence of 15 nt. was checked with GenBank (BLAST) to confirm its identification. A few TAG's were eliminated because of ambiguity in the 15th nucleotide, or because of misidentification.

Example 6

10 Result of the analysis showing the identifiable TAG's derived from known genes with increased expression in Kaposi's Sarcoma SAGE libraries KS3 and KS4 compared to the public libraries of National Center for Biotechnology Information. The TAG numbers are first normalized to a level of 100.000 total TAG's sequenced per library to allow comparison between the libraries and
15 comparison with other libraries in the public domain.
The sequence catg precedes each TAG sequence given in column 2 of table 3.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

23

Table 3. Overview of identifiable tag's overexpressed in SAGE libraries KS3 and KS4

Tag number	Tag sequence	Unigene no.	ID	overexpressed
TAG007	gatgtgcacga	Hs117729	Keratin 14	10-14
TAG010	ccccagtcggc	Hs171596	Eph A2 (angiogenesis)	3
TAG011	cttgacatacc	Hs171695	Dual specificity phosphatase	3
TAG012	catcacggatc	Hs82112	IL1 receptor, type 1*	10-30
TAG013	ggccaaaggcc	Hs78496	Sorting nexin 17	>2
TAG014	ttgcatatcag	Hs82237	AT group D protein	10 - 15
TAG015	ccctgttcagc	Hs78824	Tie 1*(angiogenesis)	2-5
TAG016	gatcaatcagt	Hs16530	Small ind. cytokine A18	10-20
TAG017	gagggtgccaa	Hs898	Complement comp. 1Q β	5-10
TAG018	taaacctgctg	Hs99923	galectin 7(specific)	3-10
TAG019	gtggccagagg	Hs1420	FCFR3 (activated in carcinomas, angiogenesis)	2-5
TAG020	tctggcccagc	Hs183	DARC (Duffy blood group)	8-10
TAG021	caggctgctac	Hs75066	Translin(involved in translocations)	2-6
TAG022	gagcagcggcc	Hs112408	Psoriasis (S100 A7)	> 20 (specific)
TAG033	acttattatgc	Hs76152	Decorin (connective tissue)	2-10
TAG034	caggcctggcc	Hs288761	Hypothetical protein FLJ21749	2-4
TAG035	gtgcggaggac	Hs181062	Serum amyloid A1	5-14
TAG036	acagcggcaat	Hs74316	Desmoplakin	5-10
TAG037	caggtttcata	Hs24395	Small ind. cytokine, B14 (BRAK)	5-10
TAG038	aactctgaccc	Hs93675	Decidual protein induced by progesterone*	3-10

5 *Identified as Pan Endothelial Markers by St. Croix *et al.*, Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289:1197-1202, 2000.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

24

Example 7

Result of the analysis showing the non-identifiable TAG's derived from EST's of genes with unknown function with increased expression in Kaposi's Sarcoma SAGE libraries KS3 and KS4 compared to libraries KS1 and KS2. The TAG numbers are first normalized to a level of 100.000 total TAG's sequenced per library to allow comparison between the libraries and comparison with other libraries in the public domain. The sequence catg precedes each TAG sequence given in column 2 of table 4.

10

Table 4.
Overview of identifiable tag's over-expressed in SAGE libraries KS3 and KS4

15

Tag number.	Tag sequence (5'>3')	Unigene no.	ID	overexpressed
TAG023	aaatcaataca	Hs94953	EST	4-10
TAG024	eggtaactggc	Hs108741	EST	4-10
TAG025	tctgcactgag	Hs173789	EST	2-4
TAG026	caggctgctgg	Hs60440	EST	4-30
TAG027	atgacagatgg	Hs13775	EST	5-10
TAG028	gcacaacaaga	Hs236510	EST	3-10
TAG029	ccacaggagaa	Hs23579	EST	4-10
TAG030	ctgtgcggaac	Hs46987	EST	2-10
TAG031	gatggctgcct	Hs18104	EST	4-20
TAG032	ctccattgcca	Hs31869	EST	2-10
TAG004	acctccactgg	Hs112457	EST	Unique*

*This tag does not appear in any other SAGE library than our own libraries and seems to be unique new indicator gene for angiogenesis.

20

The overexpressed TAG's listed in tables 3 and 4 are the same as in tables 1 and 2, respectively. This shows that the expression pattern after treatment is

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

25

comparable with the expression pattern of healthy individuals with normal expression patterns.

5 Example 8

Using an RT-PCR based method we were able to determine that TAG 11 (table 2) / TAG 004 (table 4) indeed represents a differently expressed gene. RNA was isolated from a KS lesion and the first strand cDNA synthesis was primed with an oligo(dT) primer with a 5' M13 tail (5'CTA GTT GTA AAA CGA CGG CCA G-(T)₂₄ 3'). Ten microliter total RNA was used, plus primer and 5 µl RT-mix (50 mM Tris, pH 8.3, 75mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 80 mM dNTPs and 20 units RNAsin were added, followed by an incubation for 3 minutes at 65°C and chilled on ice. The RT reaction starts by adding 5 units AMV RT followed by an incubation of 45 minutes at 42°C. For the PCR we used a 19-base TAG-specific primer (which consisted of 11 nt identified in the sage with a 5' NLAIII restriction site and 5 inosine nucleotides to increase the annealing temperature of the primers) and the -21M13 primer. The RT-mix was added to 80 µl PCR mixture containing the 100 ng of each primers (-21m13 PRIMER: 5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3' and 5' III IIC ATG ACC TCC ACT GG 3'), 50mM Tris (pH8.3), 20 mM KCl, 0.1 mg BSA per ml, dNTPs (0.1 mM each), 2,4 mM MgCl₂, and 2 units Taq polymerase. After incubation of 5 minutes at 94°C, the reaction was subjected to 35 cycles of amplification in a thermocycler (9700 Perkin-Elmer). A cycle included denaturation for 1 minute at 95°C, annealing for 1 minute at 55°C and extension for 2 minutes at 72°C. The last cycle was followed by 72°C incubation for 10 minutes.

The amplified fragment was cloned in to an AT plasmid (InvitroGen) and subsequently the insert was sequenced using the dye terminator sequencing kit from Applied Biosystems Inc. The fragment appeared to have a length of

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

26

102 base pairs and the sequence analysis of the fragment revealed the sequence as depicted in figure 1. This sequence was identical to an EST sequence identified from human foetal heart (GenBank acc. # AI217565 and others), which in turn matched a predicted exon on chromosome 19. A relation with angiogenesis has not been described previously and is new.

Example 9

Confirmation of the identity of tag sequences.

A sequence consisting of 15 nucleotides should be enough to identify a particular specific mRNA or gene. To confirm the identity of the tags we developed a RT-PCR using an oligo24dT primer for the RT-reaction. A 5'primer containing the tag sequence itself is used for second strand synthesis. The oligo24dT primer is extended at the 5' site extended with a -21M13 sequence. In the PCR following the RT-reaction -21M13 primer is used for the amplification together with the 5' primer containing the tag sequence. The 5' primer containing the tag sequence is extended with 5 Inosines at its 5' site to enlarge the binding capacity of this primer. The sequence of the amplified fragment can be determined to confirm that this is the gene as identified by the tag sequence. The RT-PCR reactions to confirm the tags were performed on the same tissue samples that were used to prepare the expression profiles of tag sequences.

Procedure:

Common buffers used throughout the experiments:

25

10x RT buffer:

- 500 mM TRIS, pH 8.3
- 750 mM KCL
- 30 mM MgCl₂

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

27

- 100 mM DTT

10x PCR buffer:

- 200 mM TRIS pH 8.3
- 5 - 500 mM KCL
- 1 mg/ml BSA

1 ml TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, cat. no. 15596) is added to
10 10-100 mg tissue or approximately 10^7 cells immediately (tissue is sliced 14 μ m
thick by microtome).

The Total RNA isolation of the samples is performed according to the
manufacturers protocol as follows:

- 15 • Add 0.2 ml of Chloroform (Merck) and shake the tube vigorously by
hand for 15 seconds.
- Incubate for 5 minutes at RT.
- Centrifuge the sample at no more than 12,000 x g for 15 minutes at 4°C.
- Transfer 600 μ l of the colourless upper aqueous layer to a new tube. The
lower organic layer should be red.
- 20 • Ad 0.5 ml isopropyl alcohol (Merck) and mix.
- Incubate at room temperature for 10 minutes.
- Centrifuge at no more than 12,000 x g for 15 minutes at 4°C.
- Discard the supernatant and wash the RNA pellet with 1 ml 80%
ethanol by vortexing and centrifuge at no more than 7,500 x g at 4°C for
25 5 minutes and discard the supernatant.
- Place the tube at 56°C for 3 minutes to dry the pellet and proceed with
the Poly A⁺ RNA isolation as described in the next section.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

28

The Poly A⁺ mRNA isolation was performed according to the manual of Micro Fasttrack[®] 2.0 Poly A⁺ mRNA 2.0 isolation kit as provided by the manufacturer (Invitrogen Corporation, Carlsbad USA; cat no K1520).

- 5 Subsequently the isolated poly A⁺ RNA was used as input for analysis in a RT-PCR reaction. The RT-PCR reactions started with the following mixture of ingredients:

21M13POLYT primer (100 ng/μl)	1.25 μl
10 x RT buffer	2.0 μl
100 mM dNTP (Pharmacia)	0.8 μl
20 U RNAsin (Roche)	0.3 μl
dH ₂ O (Baker)	0.65 μl

- 10
- Add 10 μl of Poly A⁺ mRNA dilution to 5 μl of RT-mix.
 - To anneal the primer to the template incubate the reaction mixture at 65°C for 5 minutes followed by cooling down to room temperature.
 - Add 5 μl 1U/μl AMV-RT to the reaction mixture and perform the Reverse Transcription by incubating at 42°C for 45 minutes.
- 15
- After the Reverse Transcription immediately incubate the mixture at 95°C for 5 minutes to stop the reaction. Then let the reaction cool down to room temperature.
 - Add 80 μl of PCR-mix to each reaction mixture (total volume is 100 μl).
Prepare the PCR-mix per reaction as follows:

20

- 5' primer (100 ng/μl), see table 5	1.0 μl
- 21M13 (100 ng/μl)	1.0 μl
- 10x PCR buffer	8.0 μl
- 100 mM MgCl ₂	2.1 μl
- Amplitaq 5U/μl (Perkin Elmer)	0.4 μl
- dH ₂ O (Baker)	67.5 μl

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

29

- PCR amplification was performed in a 9700 DNA thermal cycler (Perkin Elmer) according to the following program.
- 5 minutes 95 °C
- 1 minute 95 °C; 1 minute 55 °C; 2 minutes 72 °C, for 35 cycles
- 5 - 10 minutes 72 °C

The TA-cloning of the RT-PCR products was performed according to the manual of TOPO TA Cloning® kit as provided by the manufacturer (Invitrogen Corporation, Carlsbad USA; cat no K4600) using the pCR® II-TOPO® Dual promoter vector and the TOP10 One Shot® Cells.

10 Screening of the clones was performed using PCR with SP6 and T7 primers. As follows:

- Resuspend the colony in 50µl dH₂O (Baker). Add 1 µl of this bacteria suspension to 10 µl of PCR mixture.
- 15 • Prepare the PCR-mixture per reaction as follows:

SP6 (100 ng/µl)	0.10 µl
T7 (100 ng/µl)	0.10 µl
10x PCR buffer	1.00 µl
100 mM MgCl ₂	0.20 µl
100 mM dNTP's (Pharmacia)	0.08 µl
Amplitaq 5U/µl (Perkin Elmer)	0.04 µl
dH ₂ O (Baker)	7.48 µl

- PCR amplification was performed in a 9700 DNA thermal cycler (Perkin Elmer) according to the following program.
- 20 - 5 minutes 95 °C
- 30 seconds 95 °C; 30 seconds 55 °C; 1 minutes 72 °C, for 25 cycles
- 10 minutes 72 °C
- Run 5 µl of the Colony-PCR product on a 1.5% agarose 1xTBE gel stained with EthidiumBromide.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

30

- Visualise the amplification products on a UV-illuminator to identify insert-containing clones.

Clones containing insert were sequenced from both directions using SP6 and
5 T7 primers and the ABI Prism Big-Dye terminator cycle sequencing kit
(Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif USA).

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

31

Table 5: Primers used for tag confirmation

Tag name	Sequence	ID
-21M13POLY1	CTA GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T	RT-primer
TAG007	III IIC ATG GAT GTG CAG G	keratin 14
TAG010	III IIC ATG CCC CAG TCG GC	heparin A2 (angiogenesis)
TAG011	III IIC ATG CTT GAC ATA CC	dual specificity phosphatase
TAG012	III IIC ATG CAT CAC GGA TC	IL1 receptor, type 1
TAG013	III IIC ATG GGC CAA AGG CC	Sorting Nexin 17 (SNX17)
TAG014	III IIC ATG TTG CAT ATC AG	AT group D protein
TAG015	III IIC ATG CCC TGT TCA GC	Tie 1 (angiogenesis)
TAG016	III IIC ATG GAT CAA TCA GT	small ind. Cytokine A18
TAG017	III IIC ATG GAG GGT GCC AA	complement comp. 1Q beta
TAG018	III IIC ATG TAA ACC TGC TG	galactin 7 (11 nt tag)
TAG019	III IIC ATG GTG GCC AGA GG	FGFR3 (11 nt tag)
TAG020	III IIC ATG TCT GCC CCA GC	DARC
TAG021	III IIC ATG CAG GTC GCT AC	Translin
TAG022	III IIC ATG GAG CAG CGC CC	Psoriasis (S100 A7) (11 nt tag)
TAG033	III IIC ATG ACT TAT TAT GC	Decorin
TAG034	III IIC ATG CAG GCC TGG CC	Hypothetical protein FLJ21749
TAG035	III IIC ATG GTG CGG AGG AC	Serum amyloid
TAG036	III IIC ATG ACA GCG GCA AT	Desmoplakin
TAG037	III IIC ATG CAG GTT TCA TA	Small ind. Cytokine, B14 (BRAK)
TAG038	III IIC ATG AAC TCT GAC CC	Decidual protein induced by progesterone
TAG023	III IIC ATG AAA TCA ATA CA	EST Unigene no. Hs94953
TAG024	III IIC ATG TGG TAA CTG GC	EST Unigene no. Hs108741
TAG025	III IIC ATG TCT GCA CTG AG	EST Unigene no. Hs173789
TAG026	III IIC ATG CAG GCT GCT GG	EST Unigene no. Hs60440
TAG027	III IIC ATG ATG ACA GAT GG	EST Unigene no. Hs13775
TAG028	III IIC ATG CCA CAA CAA GA	EST Unigene no. Hs236510
TAG029	III IIC ATG CCA CAG GAG AA	EST Unigene no. Hs23579 (PIG)
TAG030	III IIC ATG CTG TGC GGA AC	EST Unigene no. Hs46987
TAG031	III IIC ATG GAT GGC TGC CT	EST Unigene no. Hs18104
TAG032	III IIC ATG CTC CAT TGC CA	Hs31869 siglec-1 or sialoadhesin
TAG004	III IIC ATG ACC TCC ACT GG	EST Unigene no. Hs1124557

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

32

Results of Confirmation of tag sequences:

Of 18 tag sequences that were analysed with the protocol as described in this example 14 were confirmed with sequences analysis using the RT-PCR with the oligo24dT primer and the tag-based primer as described above (tags 5 designated 004, 007, 011, 012, 014, 015, 016, 017, 022, 025, 029, 030, 032, 036 in table 5). Four tag sequences could not be confirmed based on this method (designated 010, 013, 018, 019). This was probably due to the fact that the tag-based primer was not specific enough or that the polyA tail of the mRNA was not long enough. For one tag an alternative more specific 5' primer was 10 designed to perform a RT-PCR together with -21M13POLYT (tag designated 004). For tag010 a complete specific primer set was designed to perform as well the Reverse Transcription as the amplification. Other tags were confirmed by using a specific RT-PCR primer set followed by a Nested PCR with a specific nested primer set (tags designated 013, 018, 019). Sequence 15 results of all confirmations are listed below and in the figures. The tag sequence in the mRNA sequence if present is shown in bold fonts.

TAG004 (EST AI217565, genbank number BE466728):

Confirmed with protocol from this example.

20 CATGACCTCCACTGGAAGAGGGGGCTAGCGTGAGCGCTGATTCTCAACCT
ACCATAACTCTTTCCTGCCTCAGGAACTCCAATAAAACATTTTCCATCCA
(Figure 1)

TAG007 (keratin 14, genbank number XM_008578):

Confirmed with protocol from this example.

25 CATGGATGTGCACGATGGCAAGGTGGTGTCCACCCACGAGCAGGTCCTT
CGCACCAAGAAGCTGAGGCTGCCAGCCCGCTCAGGCCTAGGAGGCCCC
CCGTGTGGACACAGATCCCACTGGAAGATCCCTCTCCTGCCAAGCACT
TCACAGCTGGACCCCTGCTTACCCTCACCCCTCCTGGCAATCAATACAG
30 CTTTATTATCTGAGTTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
(Figure 2)

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

33

TAG010 (ephrin A2, genbank number XM_002088):

The RT-PCR with the 5' primer designed on the catg-site (the original primer shown in table 5) gave no confirmation. Most probably the tag-based primer is

5 not specific enough. Ephrin A2 specific primers were used for confirmation.

The tag sequence is not included in the Ephrin specific RT-PCR.

ATCTACCAGCTCATGATGCAGTGTGGCAGCAGGAGCGTGCCACCGCCC
CAAGTTGCTGACATCGTCAGCATCCTGGACAAGCTCATTGTCGCCCTG
ACTCCCTCAAGACCCTGGCTGACTTTGACCCCGCGTGTCTATCCGGCTC
10 CCCAGCACGAGCGGCTCGGAGGGGTGCCCTTCCGACGGTGTCCGAGT
GGCTGGAGTCCATCAAGATGCAGCAGTATACGGAGCACTTC

(Figure 3)

TAG011 (dual specificity phosphatase, genbank number XM_003720):

15 Confirmed with protocol from this example.

CATGCTTGACATACTACCAGTATTATCCCGACGACACATATACATATG
AGAATATACCTTATTTAATTTTGTGTAGGTGTCTGCCTTCACAAATGTCAT
TGTCTACTCCTAGAAGAACCAAATACCTCAATTTTTGTTTTGAGTACTGT
ACTATCCTGTAATAATATCTTAAGCAGGTTTGTTCAGCACTGATGGAAA
20 ATACCAGTGTGGGTTTTTTTTAGTTGCCAACAGTGTATGTTTGCTGAT
TATTTATGACCTGAAATAATATATTTCTTCTTAAGAAGACATTTTGTTAC
ATAAGGATGACTTTTTTATACAATGGAATAAATATGGCATTCTATTG

(Figure 4)

25 TAG012 (IL1 receptor, type 1, genbank number XM_002686):

Confirmed with protocol from this example.

CATGCATCACGGATCAATAGACTGTACTTATTTTCCAATAAAATTTTCAA
ACTTTGTAAGTGT

(Figure 5)

30

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

34

TAG013 (ephrin B1, genbank numbers XM_002535, BC002524):

The RT-PCR with the 5'primer designed on the catg-site (the original primer shown in table 5) gave no confirmation. Most probably the tag-based primer is not specific enough. Ephrin B1 specific primers were used for confirmation.

- 5 The tag sequence is included in the 3'primer of the Ephrin B1 specific RT-PCR fragment. The Nested PCR fragment is shown here and is just located upstream of the tag sequence.

```
AACTTGCCCTGTGCCCTGTGTCCCCCATGCTAGGGGCGGAGGGGTCTTTTC
CTTCTTCTTTCTACCTACCCCTTTTCTCTTTGGCCAGGGGCCTCGTATCCT
10 ACCTTTCCTTGTCCCCTGGGCTGGCTGCACAGAGGATTGCCCTTCTCTTT
TCAGAGCTGGCCCTCGATGCCAAATTAGCATTTAGTATTTTGTCAAAGTC
TAAGGGACC
```

(Figure 6)

- 15 TAG014 (AT group D protein, genbank numbers XM_006184, AF230388):

Confirmed with protocol from this example.

```
CATGTTGCATATCAGGGTGCTCAAGGATTGGAGAGGAGACAAAACCAGG
AGCAGCACAGTGGGGACATCTCCCGTCTCAACAGCCCAGGCCTATGGGG
GCTCTGGAAGGATGGGCCAGCTTGCAGGGGTTGGGGAGGGAGACATCCA
20 GCTTGGGCTTTCCCTTTGGAATAAACCATTTGGTCTGTCAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAA
```

(Figure 7)

TAG015 (TIE 1, genbank number XM_002037):

- 25 Confirmed with protocol from this example.

```
CATGCCCTGTTCAGCTACTCCCACTCCCGGCCTGTTCATTCAGAAAAAAT
AAATGTTCTAATAAGCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

(Figure 8)

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

35

TAG016 (small ind. Cytokine A18, genbank numbers XM_008451, Y13710, AF111198):

Confirmed with protocol from this example.

CATGGATCAATCAGTGTGATTAGCTTTCTCAGCAGACATTGTGCCATATG
 5 TATCAAATGACAAATCTTTATTGAATGGTTTTGCTCAGCACCCCTTTTAA
 TATATTGGCAGTACTTATTATATAAAAGGTAAACCAGCATTCTCAAAAAA
 AAAAAAAAAA

(Figure 9)

10 TAG017 (complement comp. 1Q beta, genbank number XM_010666):

Confirmed with protocol from this example.

CATGGAGGGTGCCAACAGCATCTTTTCGGGGTTCCTGCTTTCCAGAT
 ATGGAGGCTGACCTGTGGGCTGCTTCACATCCACCCGGCTCCCCTGC
 CAGCAACGCTCACTTACCCCAACACCACCCCTTGCCCAGCCAATGCAC
 15 ACAGTAGGGCTTGGTGAATGCTGCTGAGTGAATGAGTAAATAAACTCTTC
 AAGGCC

(Figure 10)

TAG018 (galectin 7, genbank numbers NM_002307, U06643):

20 The RT-PCR with the 5' primer designed on the catg-site (the original primer shown in table 5) gave no confirmation. Most probably the tag-based primer is not specific enough. Galectin 7 specific primers were used for confirmation. The 5' primer used in the Galectin 7 specific RT-PCR contains the tag sequence. The tag sequence is included in the 5' primer of the Galectin 7
 25 specific RT-PCR fragment. The Nested PCR fragment is shown here and is just located downstream of the tag sequence.

CGGCTGGACACGTCGGAGGTGGTCTTCAACAGCAAGGAGCAAGGCTCCT
 GGGCCGCGAGGAGCGCGGGCGGGCGTTCTTTCCAGCGCGGGCAGCC
 CTCGAGGTGCTCATCATCGGTCAGACGACGGCTTCAAGGCCGTGGTTG

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

36

GGGACGCCAGTACCACCACTTCGGCC

(Figure 11)

TAG019 (FGFR3, genbank numbers NM_022965, NM_000142):

- 5 The RT-PCR with the 5' primer designed on the catg-site (the original primer shown in table 5) gave no confirmation. Most probably the tag-based primer is not specific enough. FGFR3 specific primers were used for confirmation. The tag sequence is not included in the Ephrin specific RT-PCR. The Nested PCR fragment is shown here and is located upstream of the tag sequence.

10 CACAACCTCGACTACTACAAGAAGACAACCAACGGCCGGCTGCCCGTGAA
GTGGATGGCGCCTGAGGCATTATTTGACCGAGTCTACACTACCAGAGTG
ACGTCTGGTCCTTTGGGGTCTGCTCTGGGAGATCTTCACGCTGGGGGGC
TCCCGTACCCGGCATCCCTGTGGAGGAGCTTCAAGCTGCTGAAGGA
GGGC

15 (Figure 12)

TAG022 (Psoriasin (S100 A7), genbank number XM_048120):

Confirmed with protocol from this example.

CATGGAGCAGCGCCCTGTTCCGGGGCAGCCAGTGACCCAGCCCCACC

20 AATGGGCCTCCAGAGACCCAGGAACAATAAAATGTCTTCTCCACC

(Figure 13)

TAG025 (EST Unigene no. Hs173789, genbank numbers XM_018404,

AL137262):

- 25 Confirmed with protocol from this example.

CATGCTGCACTGAGAACTGCATTTTCAGTAGCATTTGTCATCCAGCCG
GAAGTTAAAGCACACTTACTTTATTCACCTATTTTTATAATAAACGTTCTT
GCTGCTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(Figure 14)

30

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

37

TAG029 (PIG, genbank numbers XM_011453, AJ251830):

Confirmed with protocol from this example.

CATGCCACAGGAGAATTCGGGGATTGAGTTTCTCTGAATAGCATATAT
 ATGATGCATCGGATAGGTCATTATGATTTTTTACCATTTGACTTACATAA
 5 TGA AAAACCAATTCATTTTAAATATCAGATTATTATTTGTAAGTTGTGGAA
 AAAGCTAATTGTAGTTTTCATTATGAAGTTTCCCAATAAACAGGTATTC
 TAAACTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(Figure 15)

10 TAG030 (EST Unigene no. Hs46987, genbank numbers DG151190, BG057289,
 BE858276, AV681759, BE503169):

Confirmed with protocol from this example.

CATGCTGTGCGGAAC TGC GT CAGGGCAAATGTCACAGCAGGATTTCCCC
 AACCCAGCTCCATCATCACAGACACAGAGGGCTGCAGGGAGGCCTGCC
 15 ACTGTTTTGTGCGACTGCGCCTCCTCTGGCAGCATAGATCCTTAGGTGCTC
 AATAAAGGTGTGCTGTATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(Figure 16)

TAG032 (SialoAdhesin, also called Siglec 1, genbank number XM_016245):

20 Confirmed with protocol from this example.

CATGCTCCATTGCCAGACTCTTGCTGGGAGCCCGTCCAGAATGTCCTCC
 CAATAAACTCCATCCTATGACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(Figure 17)

25 TAG036 (Desmoplakin, genbank numbers XM_004463, NM_004415,
 AF139065):

Confirmed with protocol from this example.

CATGACAGCGGCAATCTTTCTTTGGTCAAAGTTTCTGTTTATTTGCT
 TGT CATATTCGATGTACTTTAAGGTGCTTTATGAAGTTTGTATTTCTGGC
 30 AATAAACTTTTAGACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

38

(Figure 18)

Example 10Determination of the gene expression levels of the tag sequences in skin5 samples

To get a feeling for the use of the tag sequences as markers for angiogenesis process skin samples with (5 different samples) and without (2 control samples) Kaposi's Sarcoma lesions were analysed for the expression level of the genes identified by the tag sequences.

10

Procedure:

1 ml TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, cat. no. 15596) is added to 10-100 mg tissue or approximately 10^7 cells immediately (tissue is sliced 14 μ m thick by microtome).

15 The Total RNA isolation of the samples is performed according to the manufacturers protocol as follows:

- Add 0.2 ml of Chloroform (Merck) and shake the tube vigorously by hand for 15 seconds.
- Incubate for 5 minutes at RT.
- 20 • Centrifuge the sample at no more than 12,000 x g for 15 minutes at 4°C.
- Transfer 600 μ l of the colourless upper aqueous layer to a new tube. The lower organic layer should be red.
- Add 0.5 ml isopropyl alcohol (Merck) and mix.
- Incubate at room temperature for 10 minutes.
- 25 • Centrifuge at no more than 12,000 x g for 15 minutes at 4°C.
- Discard the supernatant and wash the RNA pellet with 1 ml 80% ethanol by vortexing and centrifuge at no more than 7,500 x g at 4°C for 5 minutes and discard the supernatant.
- Place the tube at 56°C for 3 minutes to dry the pellet and proceed with
- 30 the DNase treatment as described in the next section.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

39

To make sure no genomic DNA exists in the Total RNA isolate we perform a DNase treatment. Protection of RNA against RNase activity of DNase I is done by the addition of RNasin to the DNase reaction. The DNase treatment was

5 performed as follows:

- After TRizol Total RNA isolation resuspend the pellet in 88 μ l dH₂O.
- Add sequentially to the RNA solution:
 - 10 μ l 10x DNase Buffer (Ambion)
 - 1 μ l 40U/ μ l RNasin (Roche)
 - 10 - 1 μ l 10 U/ μ l DNase I (Roche)
- Incubate at 37°C for 1 hr.
- Raise sample volume to 200 μ l by adding 100 μ l dH₂O.
- Add 200 μ l cold Phenol/Chloroform pH8 (PCS) and mix thoroughly.
- Centrifuge full speed for 5 minutes at room temperature in a
- 15 microcentrifuge.
- Transfer the aqueous top layer to a new microcentrifuge tube add sequentially:
 - 3 μ l glycogen (Roche)
 - 100 μ l 10 M ammonium acetate
 - 20 - 700 μ l 100% ethanol
- Mix thoroughly and centrifuge at 25,000 x g for 15 minutes at 4°C and decant the supernatant.
- Wash twice by adding 700 μ l 80 % ethanol. Mix thoroughly and centrifuge at 25,000 x g for 5 minutes at 4°C and decant the
- 25 supernatant.
- Dry the pellet for 5 minutes at 56°C and resuspend in 11 μ l dH₂O.
- Dilute 1 μ l of the RNA isolate in 140 μ l dH₂O and calculate the RNA concentration and yield of the isolate through OD₂₆₀ measurement. The yield of DNase treated Total RNA should at least be 13.5 μ g for the
- 30 determination of the complete TAG expression profile.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

40

- Prepare a solution of the RNA isolate with a concentration of 50 ng/ μ l. This is the starting RNA solution for the series of dilution for the TAG specific RT-PCR.

5

Per sample of DNase treated Total RNA 18 TAG specific RT-PCR/Nested PCR reactions are performed in series of dilution of the RNA. For each sample five control RT-PCR's will be performed in series of dilution namely HIV-1 GAG (SK39/145), GAPDH +RT (in duplo) and no-RT reaction (in duplo). The following dilution scheme was used to derived the samples in serial dilution that are analysed with the RT-PCR:

10

1. 270 μ l 50 ng/ μ l DNase treated Total RNA DNase treated.
10 μ l 50 ng/ μ l solution as input in RT-PCR of each primerset = 500ng.
- 15 2. 27 μ l 50ng/ μ l Total RNA 10x diluted = 270 μ l 5 ng/ μ l.
10 μ l 5 ng/ μ l solution as input in RT-PCR of each primerset = 50 ng.
3. 27 μ l 5 ng/ μ l Total RNA 10x diluted = 270 μ l 0.5 ng/ μ l.
10 μ l 0.5 ng/ μ l solution as input in RT-PCR of each primerset = 5 ng.
4. 27 μ l 0.5 ng/ μ l Total RNA 10x diluted = 270 μ l 0.05 ng/ μ l.
20 10 μ l 0.05 ng/ μ l solution as input in RT-PCR of each primerset = 0.5 ng.
5. 27 μ l 0.05 ng/ μ l Total RNA 10x diluted = 270 μ l 0.005 ng/ μ l.
10 μ l 0.005 ng/ μ l solution as input in RT-PCR of each primerset = 0.05 ng.
6. 27 μ l 0.005 ng/ μ l Total RNA 10x diluted = 270 μ l 0.0005 ng/ μ l.
25 10 μ l 0.0005 ng/ μ l solution as input in RT-PCR of each primerset = 0.005 ng.
7. 27 μ l 0.0005 ng/ μ l Total RNA 10x diluted = 270 μ l 0.00005 ng/ μ l.
10 μ l 0.00005 ng/ μ l solution as input in RT-PCR of each primerset = 0.0005 ng.
- 30 8. 27 μ l 0.00005 ng/ μ l Total RNA 10x diluted = 270 μ l 0.000005 ng/ μ l.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

41

10 μl 0.000005 ng/ μl solution as input in RT-PCR of each primerset =
0.000005 ng.

5 TAG specific RT-PCR on Total RNA series of dilution using AMV-RT was
performed as follows. The reverse Transcription Reactions of all the TAGs on
DNase treated Total RNA in series of dilution are performed in 96 wells PCR
plates. Ten μl of each Total RNA dilution is used as input for the RT PCR. The
reaction volume of the Reverse Transcription is 20 μl and contains dNTP's,
10 MgCl₂ and RNasin.

- Prepare the RT-mix per reaction as follows:

3' primer (100 ng/ μl) see table 6	1.25 μl
10 x RT buffer	2.0 μl
100 mM dNTP (Pharmacia)	0.8 μl
20 U RNasin (Roche)	0.3 μl
dH ₂ O (Baker)	0.65 μl

- 15
- Add 10 μl of Total RNA dilution to 5 μl of RT-mix.
 - To anneal the primer to the template incubate the reaction mixture at 65°C for 5 minutes followed by cooling down to room temperature.
 - Add 5 μl 1U/ μl AMV-RT to the reaction mixture and perform the Reverse Transcription by incubating at 42°C for 45 minutes.
- 20
- After the Reverse Transcription immediately incubate mixture at 95°C for 5 minutes to stop the reaction. Then let the reaction cool down to room temperature.
 - Add 80 μl of PCR-mix to each reaction mixture (total volume is 100 μl).
Prepare the PCR-mix per reaction as follows:

25

5' primer (100 ng/ μl) see table 6	1.0 μl
10x PCR buffer	8.0 μl
100 mM MgCl ₂	1.9 μl

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

42

Amplitaq 5U/ μ l	0.4 μ l
dH ₂ O (Baker)	68.7 μ l

- PCR amplification is performed in a 9700 DNA thermal cycler (Perkin Elmer) according to the following program.
- 5
- 5 minutes 95 °C
 - 1 minute 95 °C; 1 minute 55 °C; 2 minutes 72 °C, for 35 cycles
 - 10 minutes 72 °C

10 Subsequent to this first round of amplification a second round, nested, amplification was performed. TAG specific second round nested PCR on RT-PCR product was performed as follows:

Add 5 μ l of the TAG RT-PCR product in 45 μ l of the Nested-PCR mix.

- Prepare the Nested-PCR mix per reaction as follows:

15

5' nested primer (100 ng/ μ l), see table 7	0.5 μ l
3' nested primer (100 ng/ μ l), see table 7	0.5 μ l
10x PCR buffer	5.0 μ l
100 mM MgCl ₂	1.25 μ l
100 mM dNTP (Pharmacia)	0.4 μ l
Amplitaq 5U/ μ l	0.2 μ l
dH ₂ O (Baker)	37.15 μ l

The combination of primers used for amplification of the genes identified by the tags and the length of the amplified fragment is given in table 8.

20

- PCR amplification is performed in a 9700 DNA thermal cycler (Perkin Elmer) according to the following program.
- 5 minutes 95 °C
 - 1 minute 95 °C; 1 minute 55 °C; 2 minutes 72 °C, for 25 cycles

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

43

- 10 minutes 72 °C
 - Run 10 µl of the Nested-PCR product on a 1.5% agarose 1xTBE gel stained with EthidiumBromide.
 - Visualization of the TAG amplified fragments in the dilution series on a UV-illuminator reveals the level of expression by determining the highest dilution still giving a positive signal.
- 5

Table 6. RT-PCR primer design for first round amplification.

Primer	Sequence
5'TAG004GENE	GGC CTT TAA CAC CCC GTT CCT
3'TAG004GENE	TGG TAG GTT GAG AAT CAG CGC TCA
5'TAG007GENE-N	AGG AGA CCA AAG GTC GCT ACT GCA
3'TAG007GENE	CAG TTC TTG GTG CGA AGG ACC T
5'TAG010GENE	ATC TAC CAG CTC ATG ATG CAG TGC T
3'TAG010GENE	GAA GFG CTC CGT ATA CTG CTG CAT
5'TAG011GENE	AGT GGG TAC ATC AAG TCC ATC TCA
3'TAG011GENE	CAC TGG TAT TTT CCA TCA GTG CT
5'TAG012GENE	TAA AGT TGT CCT GCT TGA GCT GGA
3'TAG012GENE	GGC ACG TGA GCC TCT CTT TGC AGT
5'TAG013GENE	CTC TAC CCC AGA GGA ATT TAC AGA
3'TAG013GENE	GGG CCA GAC CAA ACA CAG ACC TCT
5'TAG014GENE	GGC AAC AAG CAG AAG GCG GTC A
3'TAG014GENE	TGA TCT TGA GCT GCA GCT GCT CCT
5'TAG015GENE	GAA TGT GCT GGT CGG AGA GAA
3'TAG015GENE	TGG GGC AGC TTT TCA TAG AGC T
5'TAG016GENE	TTC TCT GCC TGC CCA GCA TCA TGA
3'TAG016GENE	TCA GGC ATT CAG CTT CAG GTC GCT
5'TAG017GENE	GTC TCT ACT ACT TGA CCT ACC A
3'TAG017GENE	TGT TGG GGG TAG AGT GAG CGT TGC T
5'TAG018GENE	GCA GGT TCC ATG TAA ACC TGC TGT
3'TAG018GENE	CTG CTC AGA AGA TCC TCA CGG AGT
5'TAG019GENE	CTG ACC GAG GAC AAC GTG ATG AAG A
3'TAG019GENE	CAT GAT CAT GTA CAG GTC GTG TGT
5'TAG022GENE	TGA GCA ACA CTC AAG CTG AGA G
3'TAG022GENE	TCT CTG GAG GCC CAT TGG T
5'TAG025GENE	ATG GGG TCA GGA ACA TCT GGC AGA
3'TAG025GENE	TCC GGC TGG ATG ACA AAT GCT ACT
5'TAG029GENE	CTC AGG TTT ATC TGG GCT CTA TCA
3'TAG029GENE	TCA TAA TGA CCT ATC CGA TGC AT
5'TAG030GENE	CCT GCA AAG ATA GGA GAG GCT CCA
3'TAG030GENE	ATT GAG CAC CTA AGG ATC TAT GCT
5'TAG032GENE	TGC GAA TCA GGG ACC AAC AGG AGA
3'TAG032GENE	TTG GGA GGA CAT TCT GGA CGG GCT
5'TAG036GENE	AAT TAG CAG TAG TTC TAT TGG GCA
3'TAG036GENE	ACT GAT TAG CAC TTC AGA CGC ACT

Table 7. Nested-PCR primer design.

Primer	Sequence
5'TAG004GENE-2	CAT CGA CAA ATT GCG ATC T
3'TAG004GENE-2	CGC TAG CCC CCT CTT CCA GT
5'TAG007GENE-2.1	AGG AGA TGA TTG GCA GCG T
3'TAG007GENE-2	GGA GGA GGT CAC ATC TCT GGA T
5'TAG010GENE-2	CCA AGT TCG CTG ACA TCG T
3'TAG010GENE-2	TGC TGG GGA GCC GGA TAG ACA
5'TAG011GENE-2	GAA GAG AAA GGA CTC AGT GT
3'TAG011GENE-2	AGA TAT ATT TAC AGG ATA GT
5'TAG012GENE-2	AAA TCC AAG ACT ATG AGA
3'TAG012GENE-2	CTT AGT GGC TGG TGA CAG T
5'TAG013GENE-2	AAC TTG CCC TGT GCC TGT GT
3'TAG013GENE-2	GGT CCC TTA GAC TTT GAG CA
5'TAG014GENE-2	CTT CTG CGA GCT GCA TCT CA
3'TAG014GENE-2	TGC AGT GAC AGC TCC GTC T
5'TAG015GENE-2	AGA GGA GGT TTA TGT GAA GA
3'TAG015GENE-2	ACT ATC TCC CAA AGA AGG ACT
5'TAG016GENE-2	TGT CCT CGT CTG CAC CAT
3'TAG016GENE-2	ATG TAT TTC TGG ACC CAC T
5'TAG017GENE-2	GTC ACC TTC TGT GAC TAT GCC T
3'TAG017GENE-2	ACA GGT CAG GCC TCC ATA TCT
5'TAG018GENE-2	CGG CTG GAC ACG TCG GA
3'TAG018GENE-2	GGC GGA AGT GGT GGT ACT
5'TAG019GENE-2	CAC AAC CTC GAC TAC TAC A
3'TAG019GENE-2	GCC CTC CTT CAG CAG CTT
5'TAG022GENE-2	TTC ACA AAT ACA CCA GAC GTG AT
3'TAG022GENE-2	GGG CGC TGC TCC ATG GCT CTG CT
5'TAG025GENE-2	TGC CTA GAA AGG GGT GGC T
3'TAG025GENE-2	TTC TCA GTG CAG ACA TGT GGC T
5'TAG029GENE-2	CAG GCT TCT GAT AGT TTG CAA CT
3'TAG029GENE-2	TAT GCT ATT CAG AGA AAC T
5'TAG030GENE-2	TCT AAT GCA TGT AGA AGC T
3'TAG030GENE-2	AGG GCA GAG TCG ACA AAA CAG T
5'TAG032GENE-2	TCT TGA GTG GGC TAG TGA CT
3'TAG032GENE-2	AGT CTG GCA ATG GAG CAT GA
5'TAG036GENE-2	TGC TAT ACC TTG ACT TCA T
3'TAG036GENE-2	TCC AAG TGT ACT GCT TAT
5'TAG036GENE-2.1	CTA CTA CTC AGT TGG GAG T
3'TAG036GENE-2.1	AGC CAG AAC AGC CTT TAC T

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

46

Table 8 Primer combinations and amplified fragment length in the Tag specific Nested PCR reactions

Name	5' primer name	3' primer name	PCR fragment
TAG004	5' TAG004gene-2	3' TAG004gene-2	182
TAG007	5' TAG007gene-2.1	3' TAG007gene-2	211
TAG010	5' TAG010gene-2	3' TAG010gene-2	108
TAG011	5' TAG011gene-2	3' TAG011gene-2	239
TAG012	5' TAG012gene-2	3' TAG012gene-2	197
TAG013	5' TAG013gene-2	3' TAG013gene-2	212
TAG014	5' TAG014gene-2	3' TAG014gene-2	243
TAG015	5' TAG015gene-2	3' TAG015gene-2	131
TAG016	5' TAG016gene-2	3' TAG016gene-2	219
TAG017	5' TAG017gene-2	3' TAG017gene-2	185
TAG018	5' TAG018gene-2	3' TAG018gene-2	175
TAG019	5' TAG019gene-2	3' TAG019gene-2	204
TAG022	5' TAG022gene-2	3' TAG022gene-2	238
TAG025	5' TAG025gene-2	3' TAG025gene-2	183
TAG029	5' TAG029gene-2	3' TAG029gene-2	141
TAG030	5' TAG030gene-2	3' TAG030gene-2	179
TAG032	5' TAG032gene-2	3' TAG032gene-2	223
TAG036	5' TAG036gene-2	3' TAG036gene-2	191

5

Results

The results of determination of the expression levels of the genes identified by the tag sequences are depicted in figure 19. The data clearly indicate that a number of the genes identified by the tag sequences have a higher expression
 10 in the skin samples with Kaposi's Sarcoma lesions compared to normal skin:
 tag007, tag010, tag012, tag013, tag014, tag015, tag016, tag017, tag022,
 tag029, tag030, tag032 and tag036.

Example 11Determination of the gene expression levels of the tag sequences in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples

To get a feeling for the use of the tag sequences as markers for angiogenesis process in samples not from the location of the angiogenesis process, i.e. the Kaposi's Sarcoma in the skin or another tumour in the body but at an accessible sample from the blood (PBMC's) the expression of 5 tag identified genes was determined in PBMC samples. The PBMC samples were from the blood of patients with (4 different samples) and without (2 control samples) Kaposi's Sarcoma lesions and were analysed for the expression level of 5 tag identified genes in PBMC's.

The procedure of the example was identical as described in example 10, with the exception that PBMC samples were used (approximately 10 million cells per sample, ranging from 2.5 to 50 million) instead of skin biopsies. The genes that were analysed are identified by tag007, tag017, tag010, tag013, tag015, tag029 and tag032. The results of the analysis are depicted in figure 20. It is clear from these data that the elevated expression in the tumour sites of the genes identified by tag015 (TIE 1) and tag032 (Sialoadhesin or Siglec 1) is paralleled in the blood cell fraction, i.e. PBMC.

Results

The data clearly show that the over expression of the gene identified by tag007 (Keratin 14) in skin samples (see example 5) is not paralleled in blood. In contrast, in the samples tested in this example the gene identified by tag007 is not expressed at all in the blood compartment. This shows that no tumour cells expressing tag007 are present in blood. As a consequence, measurement of tag007 in the blood could be a good indicator for the presence of these tumour

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

48

cells in the blood, and thus a marker for circulating cancer cells that can cause metastasis.

The up regulation of genes identified by tag015 (TIE 1) and tag032 (Saliadhesin or Siglec 1) in skin samples is clearly paralleled in the blood.

5 These two tags are higher expressed in blood from patients with tumours compared to healthy individuals. This up-regulation is due to up-regulation of expression in typical blood cells. The up-regulation cannot be due to the presence of tumour cells that express tag015 and tag032 in the blood, because the absence of expression of the gene identified by tag007 in the blood shows
10 that no tumour cells are present in blood, as explained above. This means that measurement of expression of tag015 and/or tag032 in the blood indicates the presence of a tumour somewhere else in the body. Furthermore, measurement of expression of genes identified by tag015 and/or tag032 during anti-tumour therapy and/or anti-angiogenesis therapy can be used to monitor the efficacy of
15 this treatment.

Conclusions

The paralleled up-regulation of the genes identified with tag015 (TIE 1) and tag032 (Saliadhesin or Siglec 1) in both the tumour and the blood, enables the
20 monitoring of the efficacy of a therapy aimed at decreasing the growth of a tumour, in particular anti-angiogenic tumour treatment. This follows the reasoning that if these two genes are markers in PBMC for blood vessel formation in a tumour in another site in the body, these two markers in blood will also decrease with the decrease of this blood vessel growth at the tumour
25 site.

The genes identified by tag007 (Keratin 14), tag015 (TIE 1) and tag032 (Saliadhesin or Siglec 1) have different expression in the blood of patients with a tumour compared to normal individuals. Therefore these genes, in particular the expression thereof, can be used to screen a population at risk for
30 the presence of tumour in individual members of that population.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

49

All the genes identified by tags in this study that have changed expression levels comparing normal to tumour tissue, i.e. tag007, tag010, tag012, tag013, tag014, tag015, tag016, tag017, tag022, tag029, tag030, tag032 and tag036 are encoding potential target molecules for therapeutic compound with anti-
5 angiogenic effects applicable in tumour treatment, and/or these genes encode potential target molecules that can be potential target molecules for therapeutic compounds that stimulate the growth of blood vessel, for instance in the treatment of heart and coronary disease.

10

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

50

Brief description of the drawings

Figure 1: Sequence involved in angiogenesis. A change of expression of this
5 sequence after a certain treatment indicates that said treatment is effective.
This sequence is identical to an EST sequence identified from human foetal
heart (GenBank acc. # AI217565 and others), which in turn matches a
predicted exon on chromosome 19. A relation with angiogenesis has not been
described previously.

10

Figure 2-18: Sequences which are identified by name and Genbank numbers
(NCBI database). Other identification can be found in tables 1-4 (Unigene
numbers) that can be found in the SAGE databases of NCBI.

15 Figure 19. Mean expression levels and standard deviation depicted as log
dilution factor that still is positive starting with 500 ng of total RNA isolated
from 5 skin samples with Kaposi's Sarcoma (light bars) and 2 control, normal
skin samples (dark bars).

20 Figure 20. Mean expression levels and standard deviation depicted as log
dilution factor that still is positive starting with 500 ng of total RNA isolated
from 4 PBMC samples of patients with Kaposi's Sarcoma (light bars) and 2
control, normal PBMC samples (dark bars).

25

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

51

CLAIMS

1. A method for determining whether a treatment is effective in changing a status of a certain set of target cells in an individual comprising:
 - obtaining a sample from said individual after initiation of said treatment,
 - and
- 5 - determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene.
2. A method according to claim 1, wherein said target cells comprise a tumor cell.
3. A method according to claim 1 or 2, wherein said sample comprises at least
- 10 one of said target cells.
4. A method according to any one of claims 1-3, wherein said sample is obtained within a week of initiation of said treatment.
5. A method according to any one of claims 1-4, wherein said sample is obtained within two days of initiation of said treatment.
- 15 6. A method according to any one of claims 1-5, wherein said marker gene comprises a gene involved in the generation, maintenance and/or breakdown of blood vessels.
7. A method according to any one of claims 1-6, wherein said marker gene comprises a sequence as depicted in table 1 or 2.
- 20 8. A method according to any one of claims 1-7, wherein said marker gene comprises a sequence as depicted in figure 1-18, or a part or analogue thereof.
9. A method according to any one of claims 1-8, wherein expression of said marker gene is quantified.
10. A method according to any one of claims 1-9, further comprising comparing
- 25 expression of said marker gene with a reference.
11. A method according to any one of claims 2-10, wherein said tumor comprises Kaposi's Sarcoma.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

52

12. Use of a nucleic acid comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a part or analogue thereof, in an expression product detection method.
13. Use of a proteinaceous molecule capable of specifically binding a protein encoded by a nucleic acid comprising a sequence as depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a part or analogue thereof, in a detection method.
14. A use according to claim 12 or claim 13 for determining the presence of a tumor cell in an individual.
15. A use according to claim 12 or claim 13 for determining the presence of a site of angiogenesis in an individual.
16. A use according to claim 12 or claim 13, for determining whether a treatment is effective in changing the status of a certain set of target cells in an individual.
17. A use according to any one of claims 12-16, for determining whether a treatment is effective in counteracting a tumor in an individual.
18. A use according to claim 14 or 17, wherein said tumor comprises Kaposi's Sarcoma.
19. A method for determining whether an individual comprises a tumor cell and/or a site of angiogenesis comprising:
- obtaining a sample from said individual, and
 - determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene.
20. A method according to claim 19, wherein said marker gene comprises a sequence as depicted in table 1 or 2 and/or figure 1-18, or a part or analogue thereof.
21. A method for determining whether an individual comprises a non-hemopoietic tumor cell and/or a site of angiogenesis, said method comprising determining whether a hemopoietic cell from said patient comprises an altered amount of an expression product of a marker gene as compared with a reference value.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

53

22. A method according to claim 21, wherein said marker gene comprises a gene involved in angiogenesis.
23. A method according to claim 21 or 22, wherein said gene comprises a sequence as depicted in table 1 or 2, and/or figures 1-18, or a part or analogue thereof.
24. A method according to any one of claims 21-23, wherein said hemopoietic cell comprises a peripheral blood mononuclear cell.
25. A method for determining whether a treatment is effective in altering an angiogenic process in an individual comprising:
- 10 - obtaining a sample from said individual after initiation of said treatment, and
- determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene.
26. A method according to claim 25, wherein said treatment comprises counteracting angiogenesis in said individual.
27. A method according to claim 25 or claim 26, wherein said marker gene comprises a sequence as depicted in table 1, or table 2, or figures 1-18, or a part or analogue thereof.
28. A method according to any one of claims 25-27, wherein said treatment involves the use of at least one of the following drugs: 2ME2, Angiostatin, Angiozyme, Anti-VEGF RhuMAb, Apra (CT-2584), Avicine, Benefin, BMS275291, Carboxyamidotriazole, CC4047, CC5013, CC7085, CDC801, CGP-41251 (PKC 412), CM101, Combretastatin A-4 Prodrug, EMD 121974, Endostatin, Flavopiridol, Genistein (GCP), Green Tea Extract, IM-862,
- 25 ImmTher, Interferon alpha, Interleukin-12, Iressa (ZD1839), Marimastat, Metastat (Col-3), Neovastat, Octreotide, Paclitaxel, Penicillamine, Photofrin, Photopoint, PI-88, Prinomastat (AG-3340), PTK787 (ZK22584), RO317453, Solimastat, Squalamine, SU 101, SU 5416, SU-6668, Suradista (FCE 26644), Suramin (Metaret), Tetrathiomolybdate, Thalidomide, TNP-470, Vitaxin.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

54

29. A method according to any one of claims 1-11, 19-20, or 23-26 wherein said sample is a blood sample.
30. A method according to any one of claims 1-11, 19-20, or 24-27, wherein said sample comprises a peripheral blood mononuclear cell.
- 5 31. A method according to any one of claims 1-11 or 19-30, wherein said expression product comprises a TIE 1 sequence, a Saliadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 8 or 17, or a part or analogue thereof.
32. Use of a PBMC expressed Keratin 14 sequence, TIE 1 sequence,
10 Saliadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 2, 8, or 17, or a part or analogue thereof, as an indicator for angiogenesis.
33. Use of a PBMC expressed Keratin 14 sequence, TIE 1 sequence, Saliadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 2, 8, or 17, or an analogue thereof, for determining the presence of a tumor cell in an
15 individual.
34. An isolated Keratin 14 sequence, TIE 1 sequence, Saliadhesin or Siglec 1 sequence, a sequence as depicted in figure 2, 8, or 17, or an analogue thereof, for use in a diagnostic method.
35. A diagnostic kit comprising a nucleic acid comprising a sequence as
20 depicted in figure 1-18 and/or table 1 or 2, or a part or analogue thereof, and/or a proteinaceous molecule capable of specifically binding a protein encoded by said nucleic acid or said part or analogue.
36. A diagnostic kit according to claim 35 comprising a Keratin 14 sequence, and/or a TIE 1 sequence, and/or a Saliadhesin or Siglec 1 sequence, and/or a
25 sequence as depicted in figure 2, 8 or 17, or a part or analogue thereof.
37. Use of a diagnostic kit according to claim 35 or 36 for determining whether a treatment is effective in changing the status of a certain set of target cells in an individual and/or altering an angiogenic process in an individual.
38. Use of a diagnostic kit according to claim 35 or 36 for determining whether
30 an individual comprises a tumor cell and/or a site of angiogenesis.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

55

39. Use of an expression product of a gene comprising a sequence as depicted in figure 1-18, table 1 or table 2 as a drugtarget.

40. A compound capable of altering the activity of Salioadhesin or Siglec 1, TIE 1, Keratin 14, and/or the expression of Salioadhesin or Siglec 1, TIE 1,
5 and/or Keratin 14 in a cell.

41. Use of a compound according to claim 40 for the preparation of a medicament.

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

1/9

Figure 1

	10	20	30	40	50
5'	CATGACCTCC	ACTGGAAGG	GGGGCTAGCG	TGAGCGGTGA	TTCTCAACT
	60	70	80	90	100
	ACCATAACTC	TTTCTGCTT	CAGGAACTCC	AATAAAAAT	TTTCCATCCA
	102				
AC	3'				

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

2/9

Figure 2

CATGGATGTGCACGATGGCAAGGTGGTGTCCAGCCACGAGCAGGTCCTT
CGCACCAAGAACTGAGGCTGCCAGCCCCGCTCAGGCCTAGGAGGCCCC
CCGTGTGGACACAGATCCCACTGGAAGATCCCCTCTCCTGCCCAAGCACT
TCACAGCTGGACCCTGCTTCACTCACCCTCACCCTCCTGGCAATCAATACAG
CTTCATTATCTGAGTTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 3

ATCTACCAGCTCATGATGCAGTGTGGCAGCAGGAGCGTGCCACCGCCC
CAAGTTCGCTGACATCGTCAGCATCCTGGACAAGCTCATTGCTGCCCTG
ACTCCCTCAAGACCCCTGGCTGACTTTGACCCCGCGTGTCTATCCGGCTC
CCCAGCACGAGCGGCTCGGAGGGGGTGCCCTTCCGCACGGTGTCCGAGT
GGCTGGAGTCCATCAAGATGCAGCAGTATACGGAGCACTTC

Figure 4

CATGCTTGACATACCTACCAGTATTATTTCCGACGACACATATACATATG
AGAAATACCTTATTTATTTTGTGTAGGTGTCCTGCCTTCACAAATGTCAT
TGTCTACTCCTAGAAGAACCATACTCAATTTTGTGTTTGGAGTACTGT
ACTATCCTGTAAATATATCTTAAGCAGTTTGTTCAGCACTGATGAAA
ATACCAGTGTGGGTTTTTTTTAGTTGCCAACAGTGTATGTTGCTGAT
TATTTATGACCTGAAATAATATATTTCTTCTTAAGAAGACATTTTGTAC
ATAAGGATGACTTTTTATACAATGGAATAAATTATGGCATTCTATTG

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

3/9

Figure 5

CATGCATCACGGATCAATAGACTGTACTTATTTTCCAATAAAATTTTCAA
ACTTTGTACTGTT

Figure 6

AACTTGCCCTGTGCCTGTGTCCCCATGCTAGGGGCGGAGGGTCTTTTC
CTTCTTCTTTCTACCTACCCCTTTTCTTTGGCCAGGGCCCTCGTATCCT
ACCTTTCTTGTCCCCTGGGCTGGCTGCACAGAGGATTGCCCTTCTCTTT
TCAGAGCTGGCCCTCGATGCCAAATTAGCATTTAGTATTTTGTCAAAGTC
TAAGGGACC

Figure 7

CATGTTGCATATCAGGGTGCTCAAGGATTGGAGAGGAGACAAAACCAGG
AGCAGCACAGTGGGACATCTCCCGTCTCAACAGCCCAGGCCTATGGGG
GCTCTGGAAGGATGGGCCAGCTTGCAGGGGTTGGGGAGGAGACATCCA
GCTTGGGCTTTCCCCTTTGGAATAAACCATTTGGTCTGTCAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

4/9

Figure 8

CATGCCCTGTTTCAGCTACTCCCACTCCCGGCCCTGTCATTCAGAAAAAAT
AAATGTTCTAATAAGCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 9

CATGGATCAATCAGTGTGATTAGCTTTCTCAGCAGACATTGTGCCATATG
TATCAAATGACAAATCTTTATTGAATGGTTTGTCTCAGCACCCCTTTTAA
TATATTGGCAGTACTTATTATATAAAAAGTAAACCAGCATTCTCAAAAAA
AAAAAAAAA

Figure 10

CATGGAGGGTGCCAACAGCATCTTTCCGGGTTCTGCTTTCCAGAT
ATGGAGGCCCTGACCTGTGGGCTGCTTACATCCACCCGGCTCCCCCTGC
CAGCAACGCTCACTTACCCCAACACCACCCCTTGCCAGCCAATGCAC
ACAGTAGGGCTTGGTGAATGCTGCTGAGTGAATGAGTAAATAAACTCTT
AAGCC

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

5/9

Figure 11

CGGCTGGACACGTCGGAGGTGGTCTTCAACAGCAAGGAGCAAGGCTCCT
GGGGCCGCGAGGAGCGGGCCGGGCGTTCCCTTCCAGCGCGGGCAGCC
CTTCGAGGTGCTCATCATCGCGTCAGACGACGGCTTCAAGGCCGTGTTG
GGGACGCCCAGTACCACCACTTCGGCC

Figure 12

CACAACCTCGACTACTACAAGAAGACAACCAACGGCCGGCTGCCCGTGAA
GTGGATGGCGCCTGAGGCATTATTTGACCGAGTCTACACTCACCAGAGTG
ACGTCTGGTCCCTTGGGGTCCCTGCTCTGGGAGATCTCACGCTGGGGGGC
TCCCCGTACCCCGGCATCCCTGTGGAGGAGCTCTCAAGCTGCTGAAGGA
GGGC

Figure 13

CATGGAGCAGCGCCCTGTTCCGGGGCAGCCAGTGACCCAGCCCCACC
AATGGGCCCTCCAGAGACCCAGGAACAATAAAATGTCCTCTCCCACC

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

6/9

Figure 14

CATGCTGCACTGAGAACTGCATTTTCAGTAGCATTGTCATCCAGCCG
GAAGTTAAAGCACACTTACTTTATTCACCTATTTTTATAATAAACGTTCTT
GCTGCTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 15

CATGCCACAGGAGAATTCGGGGATTGAGTTTCTCTGAATAGCATATAT
ATGATGCATCGGATAGGTCATTATGATTTTTTACCATTTGACTTACATAA
TGAAAACCAATTCATTTTAAATATCAGATTATTTTTGTAAGTTGTGGAA
AAAGCTAATTGTAGTTTTCATTATGAAGTTTCCCAATAAACGAGTATTC
TAAACTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 16

CATGCTGTGCGGAACCTGCGTCAGGGCAAATGTCACAGCAGGATTTCCC
AACCCAGCTCCATCATCACAGACACAGAGGGCTGCAGGGGAGGCCTGCC
ACTGTTTGTGCGACTCTGCCCTCCTCTGGCAGCATAGATCCTTAGGTGCTC
AATAAAGGTGTGCTGTATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 02/059558

PCT/NL02/00051

7/9

Figure 17

CATGCTCCATTGCCAGACTCTTGCTGGGAGCCCGTCCAGAATGTCCTCC
CAATAAACTCCATCCTATGACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 18

CATGACAGCGGCAATCTTTCTTTGGTCAAAGTTTCTGTTATTTGCT
TGTCATATTCGATGTACTTTAAGGTGCTTTATGAAGTTTGCTATTCTGGC
AATAAACTTTTAGACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 19

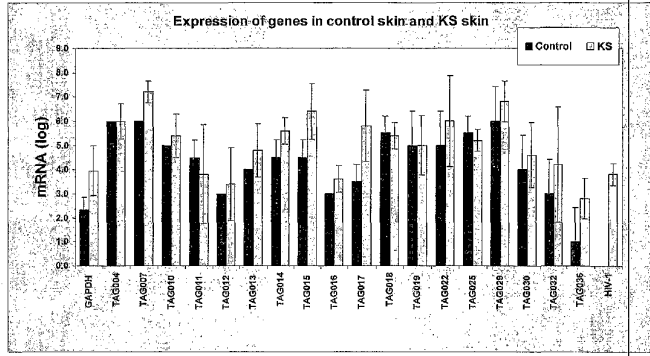
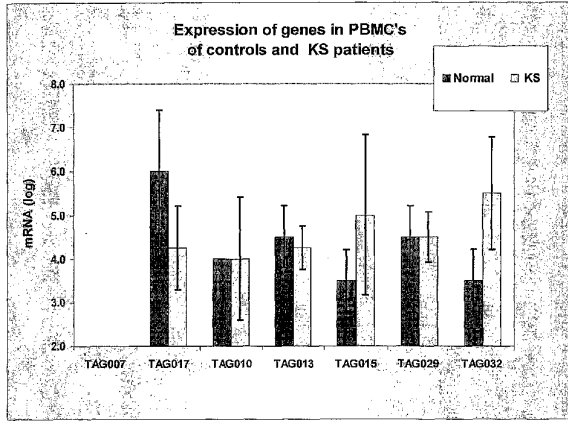


Figure 20



【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059558 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/NL02/00051
- (22) International Filing Date: 23 January 2002 (23.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01200238.3 23 January 2001 (23.01.2001) EP
01203703.2 28 September 2001 (28.09.2001) EP
60/325.722 28 September 2001 (28.09.2001) US
- (61) Related by addition to earlier application or grant:
CU Not furnished (ICA)
Filed in Not furnished
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMSTERDAM SUPPORT DIAGNOSTICS B.V. [NL/NL];
Twin-2, Building R-South, Meibergdreef 59, NL-1105 BA Amsterdam (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): VAN DER KUYL, Antoinette, Cornelia [NL/NL]; Van Collenstraat 26, NL-1231 VS Loosdrecht (NL). CORNELISSEN, Marion [NL/NL]; Wipmolen 21, NL-3642 AC Loosdrecht (NL).
- (74) Agent: PRINS, A., W.; c/o Vereenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU (inventor's certificate), CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR (consensual patent), HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT (utility certificate), TZ, UA, UG (utility certificate), US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
9 January 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/059558 A3

(54) Title: MLIANS AND METHODS FOR TREATMENT EVALUATION

(57) Abstract: The invention provides a method for determining whether a treatment is effective in changing the status of a certain set of target cells, such as a tumor, in a patient. This method implies obtaining a sample from a patient after initiation of a treatment, and determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene. Preferably, said sample is a blood sample. In one aspect, said expression product is expressed by a peripheral blood mononuclear cell. Said marker gene may be a gene involved in the generation, maintenance and/or breakdown of blood vessels (angiogenesis). A method of the invention is very suitable to determine within a few days if a certain treatment against Kaposi's Sarcoma is successful. Moreover, this method is suitable for determining the presence of angiogenesis and/or tumor cells in a patient.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059558 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/NL02/00051
- (22) International Filing Date: 23 January 2002 (23.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01200228.3 23 January 2001 (23.01.2001) EP
01203703.2 28 September 2001 (28.09.2001) EP
60/325,722 28 September 2001 (28.09.2001) US
- (61) Related by addition to earlier application or grant:
CU Not furnished (ICA)
Filed on Not furnished
- (71) Applicant (for all designated States except US): PRIM-AGEN HOLDING B.V. [NL/NL]; Meibergdreef 59, NL-1105 BA Amsterdam (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): VAN DER KUYL, Antoinette, Cornelia [NL/NL]; Van Collenstraat 26, NL-1231 VS Loosdrecht (NL). CORNELISSEN, Marion [NL/NL]; Wipmolen 21, NL-3642 AC Loosdrecht (NL).
- (74) Agent: PRINS, A., W.; c/o Verenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU (inventor's certificate), CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE, EU (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GI, GM, HR (consensus patent), HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, P, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT (utility certificate), TZ, UA, UG (utility certificate), US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
9 January 2003
- (48) Date of publication of this corrected version:
6 November 2003
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 45/2003 of 6 November 2003, Section II
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/059558 A3

(54) Title: MEANS AND METHODS FOR TREATMENT EVALUATION

(57) Abstract: The invention provides a method for determining whether a treatment is effective in changing the status of a certain set of target cells, such as a tumor, in a patient. This method implies obtaining a sample from a patient after initiation of a treatment, and determining whether said sample comprises an expression product of at least one marker gene. Preferably, said sample is a blood sample. In one aspect, said expression product is expressed by a peripheral blood mononuclear cell. Said marker gene may be a gene involved in the generation, maintenance and/or breakdown of blood vessels (angiogenesis). A method of the invention is very suitable to determine within a few days if a certain treatment against Kaposi's Sarcoma is successful. Moreover, this method is suitable for determining the presence of angiogenesis and/or tumor cells in a patient.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/NL 02/00051
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE, CANCERLIT, EMBASE, SCISEARCH, LIFESCIENCES, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OGAWA KAZUSHIGE ET AL: "The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization." ONCOGENE, vol. 19, no. 52, 2000, pages 6043-6052, XP001024674 ISSN: 0950-9232 the whole document --- -/--	1-7, 9-30,35, 37-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2002		Date of mailing of the international search report 06. 11. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bort, S

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/NL 02/00051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 470 824 A (KISHIMOTO TADAMITSU ET AL) 28 November 1995 (1995-11-28)	1-6, 9-11,19, 21,22, 24-26, 28-30
Y	the whole document	7,12-18, 20,23, 27,35, 37-39
X	--- WO 00 63438 A (GOULD RÖTHBERG BONNIE E ; RASTELLI LUCA (US); CURAGEN CORP (US)) 26 October 2000 (2000-10-26)	1-6, 9-11,19, 21,22, 24-26, 28-30
Y	the whole document	7,12-18, 20,23, 27,35, 37-39
X	--- WO 00 40749 A (LIEW CHOONG CHIN) 13 July 2000 (2000-07-13)	1-6, 9-11,19, 21,22, 24-26, 28-30
Y	the whole document	7,12-18, 20,23, 27,35, 37-39
X	--- US 5 955 429 A (GOLI SURYA K ET AL) 21 September 1999 (1999-09-21)	1-6, 9-11,19, 21,22, 24-26, 28-30
Y	the whole document	7,12,18, 20,23, 27,35, 37-39
X	--- WO 98 53319 A (KINZLER KENNETH W ; VOGELSTEIN BERT (US); UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 26 November 1998 (1998-11-26)	1-6, 9-11,19, 21,22, 24-26, 28-30
Y	the whole document	7,12,18, 20,23, 27,35, 37-39
	--- -/--	

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/NL 02/00051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 827 658 A (LIANG BERTRAND C) 27 October 1998 (1998-10-27)	1-6, 9-11,19, 21,22, 24-26, 28-30
Y	the whole document	7,12-18, 20,23, 27,35, 37-39
Y	--- DATABASE EMBL [Online] 21 November 1994 (1994-11-21) LINBERG AND HUNTER: "Human protein tyrosine kinase mRNA, complete cds" Database accession no. M59371 XP002207241 the whole document & LINBERG R A ET AL: "CDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/ek family of protein kinases" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 10, no. 12, 1 December 1990 (1990-12-01), pages 6316-6324, XP000615509 the whole document	7,12-18, 20,23, 27,35, 37-39
P,X	WO 01 12172 A (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 22 February 2001 (2001-02-22) the whole document -----	1-7, 9-30,35, 37-39

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No PCT/NL 02/00051
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 40, 41 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7, 9-30, 35, 37-39 (all partially)
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/NL 02/00051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-7, 9-30, 35, 37-39 (all partially)

Invention 1

Methods and kits comprising a marker (or derivatives), wherein said marker comprises nucleotide sequence No.1 as depicted in Table 1. Uses of said sequences, derivatives and kits in said methods

2. Claims: 1-7, 9-30, 35, 37-39 (all partially)

Inventions 2-20

Idem for sequences No.2 to No.20 of Table 1

3. Claims: 1-7, 9-30, 35, 37-39 (all partially)

Invention 21

Methods and kits comprising a marker (or derivatives), wherein said marker comprises nucleotide sequence No.1 as depicted in Table 2. Uses of said sequences, derivatives and kits in said methods

4. Claims: 1-7, 9-30, 35, 37-39 (all partially)

Inventions 22 to 31

Idem for sequences No.2 to No.11 of Table 2

5. Claims: 1-6, 8-30, 35, 37-39 (all partially)

Invention 32

Methods and kits comprising a marker (or derivatives), wherein said marker comprises nucleotide sequence as depicted in figure 1. Uses of said sequences, derivatives and kits in said methods

6. Claims: 1-6, 8-30, 35, 37-39 (all partially)

Inventions 33-46

Idem for sequences as depicted in figures 3-7, 9-16 and 18

7. Claims: 1-6, 8-30, 32-39 (all partially)

International Application No. PCT/NL 02/00051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 47

Methods and kits comprising a marker (or derivatives), wherein said marker comprises nucleotide sequence as depicted in figure 2. Uses of said sequences, derivatives and kits in said methods. Compounds capable of altering expression of said sequence and uses thereof

8. Claims: 1-6, 8-39 (all partially)

Inventions 48 and 49

Idem for sequences as depicted in figures 8 and 17, respectively

International Application No. PCT/NL 02/00051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 40,41

Present claim 40 relates to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely capable of altering the activity and/or expression of Siglec 1, TIE 1 and/or Keratin 14 in a cell. The claim covers all compounds having this characteristic or property although the application does not provide support therefor. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity, since the compounds have been defined by said desirable characteristic or property. The lack of clarity/support in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claim impossible; moreover, in the present case, the search could not be limited to any part of the claim which might appear to be clear, supported and disclosed, since no example of said claimed compounds has been provided. Consequently, claim 40 has not been searched.

The above reasoning also applies to claim 41, which refers to the use of such compounds for the preparation of a medicament.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/NL 02/00051

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5470824	A	28-11-1995	AU 1970592 A WO 9221380 A1	08-01-1993 10-12-1992
WO 0063438	A	26-10-2000	US 6436642 B1 AU 4366300 A EP 1242617 A2 WO 0063438 A2	20-08-2002 02-11-2000 25-09-2002 26-10-2000
WO 0040749	A	13-07-2000	AU 1853600 A WO 0040749 A2	24-07-2000 13-07-2000
US 5955429	A	21-09-1999	US 5858715 A AU 6041298 A EP 1012272 A1 JP 2001509018 T WO 9832854 A1	12-01-1999 18-08-1998 28-06-2000 10-07-2001 30-07-1998
WO 9853319	A	26-11-1998	AU 7499198 A WO 9853319 A2	11-12-1998 26-11-1998
US 5827658	A	27-10-1998	NONE	
WO 0112172	A	22-02-2001	AU 6784400 A EP 1242060 A1 WO 0112172 A1	13-03-2001 25-09-2002 22-02-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/574	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 ヴァン デア クイル, アントワネット コルネリア
オランダ国 ルースドレヒト ヴァン コレンストラート 2 6

(72) 発明者 コルネリッセン, マリオン
オランダ国 ルースドレヒト ウィブモーレン 2 1

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 HA14
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ43 QR32 QR56 QS25 QX01
4C084 AA17 ZB261 ZC781

专利名称(译)	治疗评估的手段和方法		
公开(公告)号	JP2004523232A	公开(公告)日	2004-08-05
申请号	JP2002559626	申请日	2002-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	普里马根控股公司		
申请(专利权)人(译)	Purimagen控股基地.磷酸盐.		
[标]发明人	ヴァンデアキールアントワネットコルネリア コルネリッセンマリオン		
发明人	ヴァン デア キール,アントワネット コルネリア コルネリッセン,マリオン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P35/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 C12Q1/6809 C12Q1/6886 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K45/00 A61P35/00 G01N33/50.P G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/574.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063 /QR32 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/ZB261 4C084/ZC781		
代理人(译)	广瀬MineTaro		
优先权	2001200228 2001-01-23 EP 2001203703 2001-09-28 EP 60/325722 2001-09-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于确定治疗是否有效改变患者中某些靶细胞组(例如肿瘤)的状态的方法。该方法意味着在治疗开始后从患者获得样品,并确定所述样品是否包含至少一种标记基因的表达产物。优选地,所述样品是血液样品。一方面,所述表达产物由外周血单核细胞表达。所述标记基因可以是与血管的产生,维持和/或破坏(血管生成)有关的基因。本发明的方法非常适合于在几天内确定针对卡波西氏肉瘤的某种治疗是否成功。而且,该方法适合于确定患者中血管生成和/或肿瘤细胞的存在。

No.	タグ配列 (5'→3')	エントリ番号 (hgene)	同定 (ID)	過剰発現フラグ ¹
1.	ccccgctggc	Hs171696	EphA2	3
2.	cttgacatcc	Hs171695	テニアル スペ'シフィシティ ネスファクター'	3
3.	catccggatc	Hs82112	IL1 リセプター, タイプ 1 *	10-30
4.	ggccaaaggcc	Hs78436	EphB1	>2
5.	tgcataacag	Hs82237	AT グループ D 蛋白質	10 - 15
6.	ccctgtcagc	Hs78824	Tie 1*	2-5
7.	gataatcagt	Hs16530	スチール ind. サイトシン A18	10-20
8.	gaggtgocaa	Hs898	相補物質 1 Qβ	5-10
9.	taaacctcgt	Hs99923	ガレクティン 7 (galectin7)	3-10
10.	gtggccagagg	Hs1420	FGFR3	2-5
11.	cttgcccagc	Hs183	DARC (ダフィー血液グループ)	8-10
12.	caggtcgtac	Hs75066	トランスリン(Translin)	2-6
13.	ggagcgcgcc	Hs112408	プソリアシ(Psoriasis (S100 A7))	> 20 特異的
14.	actattatgc	Hs76152	デコリン(Decorin)	2-10
15.	cagccctggc	Hs74649	サイトカイン C オキシゲナー' 物質 Vic	2-4
16.	gtggcaggac	Hs181062	血清アミロイド A 1	5-14
17.	acagccgcat	Hs74316	デスモプラキ(Desmoplakin)	5-10
18.	gatgtgacga	Hs117729	ケラチン 14 (Keratin14)	10-14
19.	caggttcata	Hs24395	スチール ind. サイトシン, B14 (BRK)	5-10
20.	aacctgaccc	Hs93675	アムグ' スチール' によって誘導された 脱糖糖蛋白質	3-10

1. 出現TAG数は、100、000タグ(TAG's)のライブラリサイズに標準化された。
2. エヌティ、クロイツクスらによってチンパンジー属(Pan)内皮マーカ-と同定された。St. Croix et al., Gene expressed in human tumor endothelium, Science 289, 11