

(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2004-501613

(P2004-501613A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 160 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-571711 (P2001-571711)	(71) 出願人	502160545
(86) (22) 出願日	平成13年3月26日 (2001. 3. 26)		ディアデクサス インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月27日 (2002. 9. 27)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/009525		0 8 0、サウス サン フランシスコ、オ
(87) 国際公開番号	W02001/072780		イスター ポイント ブルバード 3 4 3
(87) 国際公開日	平成13年10月4日 (2001. 10. 4)	(74) 代理人	100102842
(31) 優先権主張番号	60/192, 277		弁理士 葛和 清司
(32) 優先日	平成12年3月27日 (2000. 3. 27)	(72) 発明者	サルセダ, スサーナ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, JP, US		1 3 6、サン ホセ、クレッセンド アベ
			ニュー 4 1 1 8
		(72) 発明者	ヒュー, ピン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
			5 8 3、サン レイモン、パルマー スト
			リート 1 0 8
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳腺癌の診断、モニタリング、ステージング、イメージング及び処置のための組成物並びに方法

(57) 【要約】

本発明は、乳腺癌の診断マーカーであるポリヌクレオチドおよびポリペプチドを提供する。さらに、これらのマーカーに免疫特異的な抗体が提供される。これらのマーカーを産生するためのベクター、宿主細胞および方法、ならびに、これらのマーカーを乳腺癌の検出、診断、モニタリング、ステージング、予後判定、イメージングおよび処置に用いるための方法およびツールもまた提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- (a) 配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20、
- (b) 配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 の、少なくとも 15 個の連続した核酸塩基の断片、
- (c) 遺伝コードの縮重に起因して、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 に比べヌクレオチド配列中に変化を含むが、依然として同一タンパク質をコードする核酸配列、または、
- (d) 配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 のアンチセンス配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、を含む、単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドにハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のベクターを発現している宿主細胞。

20

【請求項 5】

ポリヌクレオチドの発現を促進する条件下で請求項 4 に記載の宿主細胞を培養すること、および該細胞に発現されたポリペプチドを単離することを含む、MSG ポリペプチドを製造するための方法。

【請求項 6】

適切な培養条件下で、細胞がMSG ポリペプチドを発現するように、細胞を請求項 3 に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトすることを含む、MSG ポリペプチドを発現する細胞を生産するための方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

30

【請求項 8】

請求項 7 に記載のポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたはそれによりコードされるポリペプチドを含む、乳がんを診断するためのMSG。

【請求項 10】

患者における乳がんの存在を診断する方法であって、

- (a) 患者における細胞、組織または体液における請求項 9 に記載のMSG のレベルを測定すること、および
- (b) 正常ヒト対照由来の細胞、組織または体液における請求項 9 に記載のMSG のレベルと、測定されたMSG レベルとを比較すること、ここで、正常ヒト対照に対する患者における測定MSG レベルの変化は、乳がんの存在に関連する、を含む、前記方法。

40

【請求項 11】

患者における乳がんの転移を診断する方法であって、

- (a) 転移したことがわかっていない乳がんを有する患者を同定すること、
- (b) 該患者由来の細胞、組織または体液の試料中の、請求項 9 に記載のMSG のレベルを測定すること、および
- (c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液における請求項 9 に記載のMSG のレベルと

50

、測定MSGレベルとを比較すること、ここで、正常ヒト対照に対する患者における測定MSGレベルの増加は、転移した癌に関連する、を含む、前記方法。

【請求項12】

乳腺癌を有する患者における乳腺癌をステージングする方法であって、

(a) 乳腺癌を有する患者を同定すること、

(b) 患者由来の細胞、組織または体液の試料中の請求項9に記載のMSGのレベルを測定すること、および

(c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液における請求項9に記載のMSGのレベルと、測定MSGレベルとを比較すること、ここで、正常ヒト対照に対する患者における測定MSGレベルの増加は、進行している癌に関連し、測定MSGレベルの減少は、消退または寛解している癌に関連する、を含む、前記方法。

10

【請求項13】

転移の発症に関して、患者における乳腺癌をモニタリングする方法であって、

(a) 転移したことがわかっていない乳腺癌を有する患者を同定すること、

(b) 患者由来の細胞、組織または体液の試料中の請求項9に記載のMSGのレベルを定期的に測定すること、および

(c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液における請求項9に記載のMSGのレベルと、定期的に測定したMSGレベルとを比較すること、ここで、正常ヒト対照に対する患者において定期的に測定したMSGレベルのいずれか1つの増加は、転移した癌に関連する、を含む、前記方法。

20

【請求項14】

患者における乳腺癌のステージの変化をモニタリングする方法であって、

(a) 乳腺癌を有する患者を同定すること、

(b) 患者由来の細胞、組織または体液における請求項9に記載のMSGのレベルを定期的に測定すること、および

(c) 正常ヒト対照の細胞、組織または体液における請求項9に記載のMSGのレベルと、定期的に測定したMSGレベルとを比較すること、ここで、正常ヒト対照に対する患者において定期的に測定したMSGレベルのいずれか1つの増加は、ステージが進行している癌に関連し、減少は、ステージが後退または寛解している癌に関連する、を含む、前記方法。

30

【請求項15】

乳腺癌のイメージングおよび処置における使用のための潜在的治療薬を同定する方法であって、請求項9に記載のMSGに結合する能力に関して分子をスクリーニングすることを含む、ここで、MSGに結合する分子の能力は、該分子が乳腺癌のイメージングおよび処置において有用であることを示す、前記方法。

【請求項16】

請求項8に記載の抗体を患者に投与することを含む、患者における乳腺癌のイメージング方法。

40

【請求項17】

抗体が、常磁性イオンまたは放射性同位体で標識される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

患者に請求項8に記載の抗体を投与することを含む、患者において乳腺癌を処置する方法。

【請求項19】

抗体が細胞毒性剤と結合している、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

請求項7に記載のMSGポリペプチドを阻害するまたは作働させる化合物を同定するため

50

の方法であって、

(a) 請求項 7 に記載の M S G ポリペプチドを発現する細胞または請求項 7 に記載の M S G ポリペプチドを発現している細胞膜を候補化合物と接触させること、

(b) 候補化合物に接触していない細胞または細胞膜に比した M S G ポリペプチドの活性または結合の変化について細胞をモニタリングすること、

とを含む、前記方法。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の方法により同定された M S G ポリペプチドアゴニスト。

【請求項 2 2】

請求項 2 0 に記載の方法により同定された M S G ポリペプチドアンタゴニスト。

10

【請求項 2 3】

哺乳類において、M S G ポリペプチドに対する免疫応答を誘発する、M S G ポリペプチドまたは M S G ポリペプチドを発現したベクターを含むワクチン。

【請求項 2 4】

哺乳類に請求項 2 3 に記載のワクチンを投与することを含む、哺乳類において、M S G ポリペプチドに対する免疫応答を誘発する方法。

【請求項 2 5】

請求項 2 3 に記載のワクチンを患者に投与することを含む、患者における乳腺癌を処置する方法。

【発明の詳細な説明】

20

【0 0 0 1】

発明の技術分野

本発明は、一部は、新規に同定されたポリヌクレオチド及びそれによりコードされるポリペプチド、ならびにこれらのポリヌクレオチド及びポリペプチドを製造し及び使用するための方法に関する。これらのポリペプチドに免疫特異的である抗体もまた、記載されている。新規に同定されたポリヌクレオチド及びそれによりコードされるポリペプチドのレベルは、乳腺癌組織において、または乳腺癌組織特異的に上方調節されている。これらの新規なポリヌクレオチド及びポリペプチドは、本明細書中で、乳腺癌特異遺伝子または M S G と呼ばれ、癌、特に乳腺癌の検出、診断、モニタリング、ステージング、予後判定及び処置のためのアッセイに有用と思われる。

30

【0 0 0 2】

発明の背景

アメリカでは 9 人の女性のうち 1 人は、8 5 歳の寿命を基準とした生涯のある時期に乳腺癌を発症するであろうと予測されている。毎年、アメリカ合衆国の 1 8 0 , 0 0 0 人を超える女性が乳腺癌と診断され、約 4 6 , 0 0 0 人がこの病気により亡くなっている。あらゆる女性が乳腺癌の危険にさらされている。しかしながら、女性のこの癌を発症する可能性は年をとるにつれ増加し、すべての癌の 8 0 パーセントが、5 0 歳を超える女性に見られる。女性の乳腺癌を発症する可能性を増加させ得る幾つかの危険要因もまた存在する。これらは、乳腺癌の家族歴、子供がいないことまたは 3 0 歳を過ぎてから第 1 子を持つこと、および月経の早期開始を含む。しかしながら、乳腺癌を発症する女性の 7 0 % 以上は、危険要因がわかっていない。1 0 パーセント未満の乳腺癌の症例は、1 9 9 4 年に発見された B R C A 1 遺伝子に関連すると思われる。研究者は現在では、この婦人科の癌の発症における栄養、アルコール、運動、喫煙、および経口避妊薬等の他の要因の役割を研究している。乳房撮影または胸部の特殊 X 線は、すべての癌の 9 0 % 以上を検出することができる。

40

【0 0 0 3】

乳腺癌の検出、診断、モニタリング、ステージング、および予後判定に用いられる手順は、患者の予後にとって決定的に重要である。早期に診断された患者は、一般的に、遠隔転移性乳腺癌と診断された患者の 5 年生存率と比較して、ずっと高い 5 年生存率を有する。乳腺癌を早期に検出するための、より感受性が高く特異的な新たな診断方法が明らかに必

50

要である。

【0004】

初期治療後およびアジュバント療法中に、乳がん患者を綿密にモニタリングして、治療に対する応答を測定し、持続性もしくは再発性の疾患または転移を検出する。したがって、乳がん再発を検出する際に、より感受性が高く特異的な癌マーカーもまた明らかに必要である。

【0005】

乳がんを管理する際の別の重要な工程は、患者の疾患のステージを決定することである。ステージの決定は、潜在的な予後判定価値を有し、最適治療を設計するための基準を提供する。一般に、癌の病理学的ステージングは、より正確な予後判定を与えるため、臨床的ステージングよりも好ましい。しかしながら、臨床的ステージングは、病理学的評価用組織を得るための侵襲的方法によらないので、少なくとも病理学的ステージングと同程度に正確である場合には好ましいであろう。癌のステージングは、異なる浸潤のステージを識別することができる、細胞、組織または体液における新規マーカーを検出することにより改良されるであろう。

10

【0006】

本発明は、本明細書中で乳がん特異遺伝子またはMSGと呼ばれる新規に同定されたポリヌクレオチド及びそれによってコードされたポリペプチド、ならびに該ポリペプチドに免疫特異的な抗体に関する。本発明はまた、乳がんの検出、診断、モニタリング、ステージング、予後判定、イメージング及び処置におけるこれらのMSGの使用のための方法にも関する。本発明に関して、MSGは、中でも、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のポリヌクレオチド配列を含む遺伝子によって発現されたネイティブタンパク質を表す。

20

【0007】

本明細書中では、MSGはまた、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20に比べヌクレオチド配列中に変化を含むが、依然として同一タンパク質をコードするポリヌクレオチドを意味する。あるいは、本明細書中で用いられるMSGが意味するものは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のポリヌクレオチド配列を含む遺伝子にコードされるネイティブmRNA、または配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のアンチセンス配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションが可能なポリヌクレオチドを意味する。

30

【0008】

本発明の他の目的、特徴、利点および側面は、以下の説明より当業者に明らかになるだろう。しかしながら、以下の説明および具体的な例は、発明の好ましい態様を示すものではあるが、例示のみを目的として与えられたものであることが理解されるべきである。以下の記述を読むことにより、そして本開示のその他の部分を読むことにより、開示された発明の精神および範囲内の各種変更および改良は当業者にとって容易に明らかになるだろう。

40

【0009】

発明の概要

これらの目的、およびその他の問題に対し、本発明の目的は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20の少なくとも15個の連続した核酸塩基を含む配列の断片または部分、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20に比べポリヌクレオチド配列中に変化を含むが、依然として同一タンパク質をコー

50

ドする核酸配列、及び配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 のアンチセンス配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションが可能な核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド配列を提供することである。本発明はさらに、上記のポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチドに関する。これらのポリヌクレオチド及び/またはそれによってコードされるポリペプチドは、本明細書中で一般的に乳腺癌特異遺伝子または M S G と呼ばれる。

【0010】

本発明の他の目的は、M S G ポリヌクレオチドを含むベクター、及びそれによりコードされる M S G ポリペプチドの発現及び回収のための宿主細胞を提供することである。

10

本発明の他の目的は、M S G ポリペプチドに免疫特異的な抗体を提供することである。

本発明の他の目的は、M S G の検出のためのツールを提供することである。このようなツールは、限定されることなく、M S G に特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド及び M S G に免疫特異的な抗体を含む。

【0011】

本発明の別の目的は、細胞、組織または体液中の L S C レベルの変化を、正常ヒト対照の、好ましくは同種類の細胞、組織または体液中の M S G のレベルと比較して分析することにより、乳腺癌の存在を診断する方法であって、正常ヒト対照に対する患者における M S G レベルの変化が乳腺癌に関連する方法を提供することである。

【0012】

20

さらに、転移した乳腺癌を有することが疑われるヒト患者を同定し、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料を M S G について分析し、かかる細胞、組織または体液中の M S G レベルを正常ヒト対照の、好ましくは同種類の細胞、組織または体液中の M S G レベルと比較することにより、転移をしたことがわかっていない乳腺癌を有する患者における転移性の癌を診断する方法であって、正常ヒト対照に対する患者における M S G レベルの増加が、転移をした乳腺癌に関連する方法が適用される。

【0013】

本発明はまた、乳腺癌を有するヒト患者を同定し、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料を分析し、かかる細胞、組織または体液中の M S G レベルを、正常ヒト対照試料の、好ましくは同種類の細胞、組織または体液中の M S G レベルと比較することにより、乳腺癌を有するヒトにおける乳腺癌をステージングする方法であって、正常ヒト対照に対する患者における M S G レベルの増加が、進行中の癌に関連し、そして M S G レベルの低下が消退または寛解している癌に関連する方法を提供する。

30

【0014】

さらに、転移の発生について、乳腺癌を有するヒトの乳腺癌をモニタリングする方法が提供される。この方法は、転移したことがわかっていないこのような癌を有する患者を同定すること、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料を M S G について定期的に分析すること、かかる細胞、組織または体液中の M S G レベルを、正常ヒト対照試料の、好ましくは同種類の細胞、組織または体液中の M S G レベルと比較することとを含み、ここで、正常ヒト対照に対する患者における M S G レベルの増加が、転移した癌に関連している。

40

【0015】

さらに、乳腺癌を有するヒトのこのような癌のステージの変化を、このような癌を有するヒトにおける M S G レベルを観察することによりモニタリングする方法が提供される。この方法は、このような癌を有するヒト患者を発見すること、かかる患者由来の細胞、組織または体液試料を M S G について定期的に分析すること、このような細胞、組織または体液中の M S G レベルを、正常ヒト対照試料の、好ましくは同種類の細胞、組織または体液中の M S G レベルと比較することとを含み、ここで、正常ヒト対照に対する患者における M S G レベルの増加が、進行している癌に関連し、M S G レベルの減少が、消退または寛解している癌に関連する。

50

【0016】

さらに、乳がんなどのMSGに関係する疾患のイメージングおよび処置に使用するための、新たな治療薬及びMSGを標的とする治療薬を同定する方法が提供される。例えば、一態様では、MSGを標的とする抗体、またはかかる抗体の断片などの治療薬を用い、疾患もしくは状態を検出または診断することを目的とし、患者におけるMSGの局在を検出またはイメージングすることができる。かかる抗体は、ポリクローナル、モノクローナルまたはオムニクローナル(omniclonal)であってもよく、あるいは分子生物学的技術により調製できる。

【0017】

本発明において、および本明細書全体にわたって用いられる場合、「抗体」という用語はまた、SELEXと呼ばれる、当業者によく知られている*in vitro*進化プロトコルに由来するようなアプタマーおよび一本鎖オリゴヌクレオチドを含むとされる。抗体は放射性同位体および常磁性金属を含むが、これらに限定されない各種の検出可能なラベルで標識することができる。MSGの濃度および/または活性を下げる、小分子または抗体またはその断片などの治療薬もまた、MSGの発現を特徴とする疾患の処置に使用できる。これらの用途において、抗体は放射性同位体、酵素、毒素、薬剤またはプロドラッグなどの細胞毒性剤へ誘導体化して、または誘導体化せずに用いることができる。本発明の治療薬はまた、MSGポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニスト、及びMSGポリペプチドに対し免疫応答を誘発する能力のあるワクチンを含む。かかる薬剤は本明細書中の教示に従い容易に同定できる。

10

20

【0018】

本発明の他の目的、特徴、利点および側面は、以下の説明から当業者に明らかになるだろう。しかしながら、以下の説明および具体的な例は、発明の好ましい態様を示しているが、例示のみを目的として理解されるべきである。以下の説明を読むこと、および本開示の他の部分を読むことにより、開示された発明の精神および範囲内の各種変更および改良は当業者に容易に明らかになるだろう。

【0019】

用語集

以下の例示的な説明は本明細書中に頻繁に使用されるある種の用語の理解を助けるために提供される。説明は、便宜的に提供されるものであり、発明を限定するものではない。DNAの「消化」とは、DNA中のある配列のみに作用する制限酵素でDNAを触媒的に開裂させることを指す。本明細書中に参照される各種制限酵素は市販されており、それらの反応条件、補因子および使用に関するその他の要件は当業者に既知かつ日常的である。

30

【0020】

分析を目的とする場合、典型的にはプラスミドまたはDNA断片1 µgは、約20 µlの反応緩衝液中で、約2単位の酵素で消化される。プラスミドの構築のためのDNA断片の単離の場合には、典型的には5 ~ 50 µgのDNAがそれに比例したより大きい容積中で、20 ~ 250単位の酵素で消化される。

特定制限酵素に関する適切な緩衝液および基質量は、以下に参照されるような標準的研究室マニュアル中に記載されており、それらはサプライヤーによって明記されている。

40

【0021】

37 °Cで、約1時間のインキュベーション時間が通常用いられるが、条件は標準的方法、サプライヤーの取扱説明書および反応の細目により変化し得る。消化後、当業者にとって日常的である既知の方法を用いて、反応物は分析され、断片はアガロースまたはポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法により精製され得る。

遺伝的要素とは一般に、ポリペプチドをコードする領域、または宿主細胞における転写または翻訳またはポリペプチドの発現にとって重要な他のプロセスを調節する領域を含むポリヌクレオチド、あるいはポリペプチドをコードする領域、およびそれに作動可能に(operably)連結された、発現を調節する領域の両方を含むポリヌクレオチドを意味する。

50

【 0 0 2 2 】

遺伝的要素はエピソーム要素として、すなわち宿主細胞ゲノムとは物理的に独立した分子として複製するベクター内に含まれ得る。それらは真核生物細胞でのメトトレキサート選択によるトランスフェクトされたDNAの増幅中に生じるような、ミニ染色体内に含まれてもよい。遺伝的要素はまた自然状態ではなく、むしろ、とりわけ、単離、クローニングおよび精製DNAの形態での宿主細胞への導入などの操作により、またはベクター中で、宿主細胞ゲノム中に含まれてもよい。

【 0 0 2 3 】

単離された、とは、その自然状態から「人工的」に変更されること、すなわち自然界で生じる場合、それはその本来の環境から変更されたか、または取り出されたか、あるいはその両方を意味する。 10

その用語が本明細書中で使用されるように、例えば、生きている動物に、その自然な状態で自然に存在しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その自然状態の共存物質から分離された同一ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものである。例えば、ポリヌクレオチドに関しては、単離されたという用語は、それが天然に存在する染色体および細胞から分離されていることを意味する。

【 0 0 2 4 】

単離の一部として、または単離に続いて、かかるポリヌクレオチドを、例えば、突然変異誘発、融合タンパク質を形成させること、および宿主内での増殖または発現のために、DNAなどの他のポリヌクレオチドに結合することができる。単独またはベクターのような他のポリヌクレオチドと結合させて、単離ポリヌクレオチドは、培養液または生体全体にて、宿主細胞に導入することができる。培養液または生体全体にて、宿主細胞へ導入する場合、その用語が本明細書中で用いられるように、かかるDNAは、自然の形態または環境にないことから、それでもなお単離されているだろう。同様に、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、培地配合物、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの、例えば細胞への導入用の溶液、化学反応または酵素反応のための組成物もしくは溶液であって、例えば自然に存在する組成物ではないものなどの組成物中に現れてもよく、そこでは、依然として本明細書中で用いられるような用語の意味での単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。 20

【 0 0 2 5 】

連結は、最も多くは二本鎖DNAである、2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド間にホスホジエステル結合を形成するプロセスである。連結に関する技術は当該技術分野で既知であり、連結のプロトコルは例えば以下に引用される Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、および Maniatis et al., pg. 146 のような標準的研究室マニュアルおよび参考資料に記述されている。 30

【 0 0 2 6 】

オリゴヌクレオチド（単数または複数）は、約8～約50個の核酸塩基の比較的短いポリヌクレオチドを指す。多くの場合、この用語は一本鎖デオキシリボヌクレオチドを指すが、とりわけ、同様に一本鎖または二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド、および二本鎖DNAも指すことができる。 40

一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドは、しばしば自動オリゴヌクレオチド合成装置にて実行されるものなどの化学的方法により合成される。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、例えば in vitro 組換えDNA媒介技術を含む各種のその他の方法、ならびに細胞および生体でのDNA発現により作製することができる。

【 0 0 2 7 】

まず化学的に合成したDNAは、典型的に、5'ホスフェートなしで得られる。かかるオ 50

リボヌクレオチドの 5' 末端は、組換え DNA 分子形成に典型的に用いられる DNA リガーゼを使用する連結反応によるホスホジエステル結合形成の基質ではない。かかるオリボヌクレオチドの連結が望ましい場合には、キナーゼおよび ATP を使用するような標準的技術によりホスフェートを付加することができる。

化学的に合成したオリボヌクレオチドの 3' 末端は、遊離の水酸基を一般的に有しており、T4 DNA リガーゼなどのリガーゼの存在下にて、容易に別のオリボヌクレオチドなどの別のポリヌクレオチドの 5' ホスフェートとホスホジエステル結合を形成するだろう。周知の様に、この反応は、所望する場合、連結前に他のポリヌクレオチド（単数または複数）の 5' リン酸を除去することで選択的に阻止することができる。

【0028】

10

本明細書中ではプラスミドは一般に、当業者には慣用である標準的命名法にしたがって、一般に小文字の「p」で始まり、および/またはその後大文字および/もしくは数字が続く形で命名される。本明細書に開示した開始プラスミドは、市販されているか、非制限的に公的に入手可能であるか、または入手可能なプラスミドから既知の公開された方法をルーチンに応用して構築できる。本発明により使用可能な多くのプラスミドならびにその他のクローニングおよび発現ベクターは、当業者に既知であり、容易に入手できる。さらに、当業者は、本発明での使用に適切な任意の多くのその他プラスミドを容易に構築し得る。本発明でのかかるプラスミドならびにその他のベクターの特性、構造および使用は、本開示より当業者に容易に明らかになるだろう。

【0029】

20

ポリヌクレオチド（単数または複数）は一般に、未修飾 RNA もしくは DNA、または修飾 RNA もしくは DNA であり得る、任意のポリリボヌクレオチドあるいはポリデオキシリボヌクレオチドを指す。従って、例えば、本明細書中で用いるポリヌクレオチドは、とりわけ一本鎖および二本鎖 DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物である DNA、一本鎖および二本鎖 RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物である RNA、一本鎖 DNA であり得るか、あるいはより一般的には二本鎖または一本鎖および二本鎖領域の混合物である DNA および RNA を含むハイブリッド分子を表す。さらに、本明細書中で用いるポリヌクレオチドは、RNA または DNA、あるいは RNA と DNA の両方を含む三重鎖領域を指す。かかる領域内の鎖は同一分子または異なる分子由来であってもよい。この領域には、1 つまたはそれ以上の分子全てを含んでもよいが、より一般的には分子の一部の領域のみが含まれる。三重らせん領域の分子の 1 つは、オリボヌクレオチドであることが多い。

30

【0030】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドという用語には、1 つまたはそれ以上の修飾塩基を含有する上記 DNA または RNA が含まれる。従って、安定性またはその他の理由から修飾された主鎖を持つ DNA または RNA は、本明細書中でその用語が意味するような「ポリヌクレオチド」である。さらに、イノシンのような稀な塩基あるいはトリチル化塩基のような修飾塩基を含む DNA または RNA も、2 例のみ挙げたが、本明細書中でその用語が使用されるようなポリヌクレオチドである。

【0031】

40

当業者に既知の有益な用途を提供する様々な修飾が DNA および RNA に対してなされることが理解されるだろう。本明細書中で使用されるポリヌクレオチドという用語には、化学的、酵素的または代謝的に修飾された形のポリヌクレオチド、ならびにとりわけ単純および複雑な細胞を含む、ウイルスおよび細胞に特徴的な DNA および RNA の化学的形態が包含される。

【0032】

ポリペプチドは、本明細書中で使用される場合、以下に記載の全てのポリペプチドが含まれる。ポリペプチドの基本構造は既知であり、当該分野の多くの教本およびその他の刊行物に記載されている。この状況では、本明細書中ではその用語は、ペプチド結合により直鎖状に相互に結合された 2 個または 3 個以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタン

50

パク質を指すのに用いられる。本明細書中で用いる場合、その用語は一般には例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖型、および当該分野において一般にタンパク質と呼ばれる、多くの型がある長鎖型の両方を指す。

【0033】

ポリペプチドが、一般に20種類の天然アミノ酸と呼ばれる20種類のアミノ酸以外のアミノ酸を含むことが多々あること、および末端アミノ酸を含む多くのアミノ酸が既定のポリペプチドにおいて、プロセシングやその他の翻訳後修飾などの自然のプロセス、または当該技術分野で既知の化学的修飾技術によって修飾されてもよいことが理解されるだろう。ポリペプチド中に自然に生ずる一般的修飾でさえ、あまりに多すぎて、本明細書中にその全体を列挙することはできないが、それらは基礎的テキスト、および詳細なモノグラフ、ならびに多くの研究文献に十分に記載されており、それらは当業者にとって既知である。

10

【0034】

本発明のポリペプチド中に存在し得る既知の修飾は、幾つかを例示すると、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋形成、システイン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化(selenoylation)、硫酸化、アルギニン化(arginylation)のようなタンパク質への転移RNAを介したアミノ酸付加、およびユビキチン化を含む。

20

【0035】

かかる修飾は当業者に既知であり、科学文献に詳細記載されている。幾つかの特に一般的な修飾、例えばグリコシル化、脂質付着(lipid attachment)、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化は、最も基本的なテキスト、例えばタンパク質構造および分子特性(Protein Structure and Molecular Properties), 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993)に記載されている。

30

【0036】

例えば、タンパク質の翻訳後共有修飾(Posttranslational Covalent Modification of Proteins), B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983)の中の、World, F.、翻訳後タンパク質修飾(Posttranslational Protein Modifications): 展望と予想(Perspectives and Prospects), pgs. 1-12, Seifter et al., タンパク質修飾および非タンパク質性補因子の分析(Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors), Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)、およびRattan et al., タンパク質合成: 翻訳後修飾とエイジング(Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging), Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)のような、多くの詳しいレビューが本件に利用できる。

40

【0037】

ポリペプチドは必ずしも完全な直線ではないということは、よく知られており、また上記のように、理解されるであろう。例えば、ポリペプチドはユビキチン化の結果により分枝され、それらは、一般に自然のプロセシング現象および自然には起こらない人工的な操作によりもたらされる現象を含む翻訳後事象の結果として、分枝を伴う、または伴わない、

50

環状であってもよい。環状、分枝状、および分枝環状ポリペプチドは、非翻訳的自然プロセスにより、および完全な合成的方法によっても合成され得る。

【0038】

修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含むポリペプチド中のいかなる場所でも起こり得る。実際に、共有結合的修飾によるポリペプチド中のアミノまたはカルボキシル基、あるいは両方の遮蔽は天然および合成ポリペプチドにおいて一般的であり、かかる修飾は、本発明のポリペプチド中にも同様に存在し得る。例えば、タンパク質分解プロセッシング前に大腸菌で作られたポリペプチドのアミノ末端残基は、大部分が不変的にN-ホルミルメチオニンであろう。

【0039】

ポリペプチド中に見られる修飾は、多くの場合それが作製される条件を反映するであろう。例えば、宿主内でクローニングした遺伝子を発現することにより作製されたポリペプチドでは、大部分の修飾の性質および程度が宿主細胞の翻訳後修飾能力およびポリペプチドのアミノ酸配列中に存在する修飾シグナルにより決定されるであろう。例えば、周知のように、グリコシル化は大腸菌のような細菌性宿主ではたいてい起こらない。したがって、グリコシル化が望まれる場合には、ポリペプチドはグリコシル化用宿主、一般には真核生物細胞で発現させるべきである。しばしば昆虫細胞は、哺乳動物細胞と同一の翻訳後グリコシル化を行うことから、とりわけ自然なパターンのグリコシル化を有する哺乳動物タンパク質を効率的に発現させるために、昆虫細胞発現系が開発されている。他の修飾にも同様の考察が適用される。

【0040】

同一型の修飾は、所定のポリペプチド中の複数の部位にて同一程度または様々な程度で存在し得ることが理解されるだろう。また所定のポリペプチドは多くの型の修飾を含んでもよい。

一般に、本明細書中で使用される場合には、ポリペプチドという用語は、かかる全ての修飾、特に宿主細胞中にてポリヌクレオチドを発現させることにより合成されたポリペプチド中に存在する修飾を包含する。

【0041】

本明細書中で用いられる場合、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体（単数または複数）は、それぞれ参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。この意味での変異体は以下、または本開示中の他所に詳述される。

変異体は、別の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なるポリヌクレオチドを含んでもよい。一般にその差は、参照と変異体のヌクレオチド配列が全体としては極めて類似しており、多くの領域で同一であるように制限される。

【0042】

以下記載するように、変異体のヌクレオチド配列の変化はサイレント(silent)であり得る。すなわち、それらはポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸を変化させない。変化がこの型のサイレントな変化に限定される場合、変異体は参照と同一のアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする。同様に以下に記載するように、変異体のヌクレオチド配列中の変化は、参照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を改変してもよい。かかるヌクレオチドの変化は、以下に記載するように、参照配列によりコードされるポリペプチド中にアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および切断を生じ得る。

【0043】

変異体は、別の参照ポリペプチドとアミノ酸配列が異なるポリペプチドを含んでもよい。一般にその差は、参照と変異体の配列が全体としては極めて類似しており、多くの領域で同一であるように制限される。

変異体と参照ポリペプチドは、1つまたはそれ以上の、置換、付加、欠失、融合および切断によりアミノ酸配列が異なってもよく、それらは、いかなる組み合わせで存在してもよ

10

20

30

40

50

い。

【 0 0 4 4 】

本明細書中で用いる受容体分子は、本発明のMSGポリペプチドと特異的に結合または相互作用する分子を指し、好ましい典型的な受容体だけでなく、発明のポリペプチドと特異的に結合または相互作用するその他分子も包含する（それらはまたそれぞれ「結合分子」および「相互作用分子」、ならびに「MSG結合または相互作用分子」とも呼ばれる）。

【 0 0 4 5 】

発明のポリペプチドと、受容体または結合分子もしくは相互作用分子を含むかかる分子との結合は、発明のポリペプチドに限定され得る（それは非常に好ましい）か、または発明のポリペプチドに高度に特異的であり得る（それは非常に好ましい）か、または本発明のポリペプチドを含むタンパク質のグループに高度に特異的であり得る（それは好ましい）か、あるいはその内の少なくとも1つが発明のポリペプチドを含むタンパク質の複数のグループに特異的であり得る。

10

受容体はまた、発明のポリペプチドに結合する、抗体および抗体由来試薬のように、非天然であってもよい。

【 0 0 4 6 】

発明の詳細な説明

ポリヌクレオチド及びポリペプチド

本発明は、乳腺癌組織において上方調節される、または乳腺癌組織特異的な、新規に同定された単離ポリヌクレオチド及びそれによりコードされるポリペプチドに関する。これらのポリヌクレオチド及びそれによりコードされるポリペプチドは、癌、特に乳腺癌の診断マーカーとして有用と考えられる。該ポリヌクレオチド及びポリペプチドはまた、癌、特に乳腺癌のイメージング剤及び治療薬の開発にも有用である。

20

【 0 0 4 7 】

本発明に関して、ポリヌクレオチドは、1本鎖及び2本鎖DNA、1本鎖及び2本鎖領域の混合物であるDNA、1本鎖及び2本鎖RNAまたはそれらのハイブリッドを含む単離核酸配列を含むとされ、ここでは配列は配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20の少なくとも15の連続した核酸塩基を含む配列の断片、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20に比べポリヌクレオチド配列中に変化を含むが、依然として同一タンパク質をコードする核酸配列、及び配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のアンチセンス配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な核酸配列を含む。

30

【 0 0 4 8 】

ストリンジェントな条件とは、少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在する場合のみ、ハイブリダイゼーションが起こるであろうことを意味する。RNA配列はmRNAの形態であってもよく、一方DNA配列は、クローニングにより得られた、または、化学合成技術により製造された、またはそれらの組み合わせによるcDNAまたはゲノムDNAの形態であってもよい。本明細書中で用いる場合、ポリヌクレオチドの用語は、上記のように、1個または2個以上の修飾された塩基を含むDNAまたはRNAをも含む。修飾された塩基の例は、安定性を増すための主鎖の修飾及びイノシンまたはトリチル化塩基などの普通でない塩基の組込みを含むが、これらに限定されない。

40

【 0 0 4 9 】

本発明に関して、ポリペプチドは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸配列を有する組換え、天然及び合成ポリペプチド、または

50

、それらの断片または変異体であって、本発明のポリヌクレオチドによってコードされたアミノ酸配列と同様の活性及び/または癌性組織における同様のレベルを有するものを含むとされる。

【0050】

好ましい変異体としては、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20によりコードされるポリペプチドから、保存的アミノ酸置換により変異したものがある。保存的アミノ酸置換は、典型的にはAla、Val、Leu及びIleなどの脂肪族アミノ酸、ヒドロキシル残基であるSer及びThr、酸性残基であるAsp及びGlu、アミド残基であるAsn及びGln、塩基性残基であるLys及びArg、及び芳香族残基であるPhe及びTyrの相互の置換を含む。 10

【0051】

抑制的サブトラクションハイブリダイゼーションを用いることにより、ここで、これらのポリヌクレオチド及びそれらにコードされるポリペプチドが乳腺癌組織中で上方調節されていること、または乳腺癌組織に特異的であることが見出された。従って、本明細書中で乳腺癌特異遺伝子またはMSGと呼ばれるこれらのポリヌクレオチド及びポリペプチドが、乳腺癌の診断マーカーとして、本明細書中の他の記載と同様に有用であることが考えられる。

【0052】

断片

また本発明のこの側面の好ましい別態様としては、MSGの断片、ならびにMSGの変異体および誘導体の断片を含むポリペプチドがある。 20

この観点では、断片は配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のMSGによってコードされるアミノ酸配列の変異体または誘導体のアミノ酸配列と部分的には完全に同一であるが、全てが同一ではないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0053】

かかる断片は、「独立体(free-standing)」(すなわち他のアミノ酸またはポリペプチドの一部でもなく、融合されてもない)であってもよく、またそれらが大型ポリペプチドの中に含まれてもよく、それらは、その大型ポリペプチドの一部または領域を形成する。大型ポリペプチド内に含まれる場合には、本明細書中に記載の断片は最も好ましくは単一連続領域を形成する。しかしながら、複数の断片が単一の大型ポリペプチド内に含まれてもよい。 30

【0054】

例えば、ある好ましい態様は、宿主内での発現用に設計した前駆体ポリペプチド内に含まれ、MSG断片アミノ末端に融合された異種のプレおよびプロポリペプチド領域、および該断片のカルボキシル末端に融合されたさらなる領域を有する本発明のMSGポリペプチドの断片に関する。したがって、本明細書中に意図する意味の一側面の断片は、本発明のMSGに由来する融合ポリペプチドまたは融合タンパク質の1つまたは2つ以上の部分に関する。 40

本発明のポリペプチド断片の代表例としては、約15～約139個のアミノ酸を有する上記断片が存在し得る。

【0055】

この状況においては、「約」とは、特に引用された範囲、および一方の極値または両極値においていくつか、数個、5、4、3、2または1個のアミノ酸だけ広い、または狭い範囲を含む。この観点において非常に好ましいものは、引用範囲から一極値または両極値が5アミノ酸程度増減する範囲である。特に非常に好ましいものは、引用範囲から一極値または両極値が3アミノ酸程度増減する範囲である。とりわけ好ましいものは、引用範囲から一極値または両極値が1アミノ酸増減する範囲である。この観点においてすべてのうち最も非常に好ましいのは、約15～約45アミノ酸からなる断片である。 50

【0056】

発明の特に好ましい断片としては、MSGの切断突然変異体がある。切断突然変異体としては、アミノ末端を含む連続残基（すなわち連続領域、部分、または一部）またはカルボキシル末端を含む連続残基の欠失、あるいは二重切断突然変異体の場合には、一方がアミノ末端を含み、もう一方がカルボキシル末端を含む2つの連続残基の欠失を除く、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20によりコードされるMSGポリペプチド、またはそれらの変異体もしくは誘導体が挙げられる。上述のサイズ範囲を有する断片もまた、切断断片の好ましい態様であり、一般には断片の中で特に好ましい。

【0057】

また本発明のこの側面において好ましいのは、MSGの構造的または機能的特質を特徴とする断片である。この観点で本発明の好ましい態様は、MSGのアルファヘリックスおよびアルファヘリックス形成領域（「アルファ領域」）、ベータシートおよびベータシート形成領域（「ベータ領域」）、回転および回転形成領域（「回転領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、フレキシブル領域、表面形成領域および高抗原性指数領域を含む断片を包含する。

【0058】

ガルニエ - ロブソン (Garnier - Robson) アルファ領域、ベータ領域、回転領域およびコイル領域、チョウ - ファスマン (Chou - Fasman) アルファ領域、ベータ領域および回転領域、カイト - ドリトル (Kyte - Doolittle) 親水性領域および疎水性領域、アイゼンベルグ (Eisenberg) アルファおよびベータ両親媒性領域、カルパス - シュルツ (Karpplus - Schulz) フレキシブル領域、エミニ (Emini) 表面形成領域およびジャムセン - ウォルフ (Jamsen - Wolf) 高抗原性指数領域が特に好ましい。

【0059】

この観点において非常に好ましい断片としては、上記特徴の幾つかのような複数の構造的特徴を組み合わせるMSGの領域を含む断片である。かかる領域は、大型ポリペプチド内に含まれてもよく、または上記のような本発明の好ましい断片そのものでもよい。この項で用いられる「約」という用語は、断片に関して一般的に記載した上記の意味を有することが理解されるであろう。

【0060】

さらに好ましい領域は、MSGの活性を媒介する領域である。この観点における最も非常に好ましいのは、同様の活性または改良された活性を有するか、あるいは望ましくない活性が低減された断片を含む、MSGの化学的、生物学的、またはその他の活性を有する断片である。この観点において非常に好ましいのは、乳腺特異結合タンパク質を含む、関連ポリペプチドの活性領域に関し、配列または位置にて、あるいはその両方にて、相同的である領域を含む断片である。これら観点において特に好ましい断片としては、上記の切断突然変異体がある。

【0061】

本発明はまたとりわけ、上記断片をコードするポリヌクレオチド、断片をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチド、特にストリンジェントな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチド、およびPCRプライマーのような、断片をコードするポリヌクレオチドを増幅するためのポリヌクレオチドにすることが理解されるであろう。これらの観点において、好ましいポリヌクレオチドは上記好ましい断片に対応するものである。

【0062】

ベクター、宿主細胞、発現

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝的に操作される宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生にも関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

宿主細胞は、ポリヌクレオチドを組み込み、本発明のポリペプチドを発現するように遺伝的に操作することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、感染、形質導入、トランスフェクション、トランスベクション (transvection) および形質転換の周知技術を用いて、宿主細胞内に導入され得る。ポリヌクレオチドは、単独または他のポリヌクレオチドとともに導入されてもよい。かかる他のポリヌクレオチドは、単独で導入されてもよく、共導入されてもよく、または本発明のポリヌクレオチドと結合して導入されてもよい。

【 0 0 6 4 】

したがって、例えば、本発明のポリヌクレオチドは、例えば哺乳動物における、コトランスフェクションおよび選択に関する標準的技術を用いて、選択可能マーカをコードする他の分離したポリヌクレオチドを用いて、宿主細胞内にトランスフェクトされてもよい。この場合、ポリヌクレオチドは一般に、宿主細胞ゲノム内に安定的に組み込まれるであろう。

10

【 0 0 6 5 】

あるいは、ポリヌクレオチドは、宿主内での増殖用の選択可能マーカを含むベクターに結合されてもよい。ベクター構築物は、上記技術により宿主細胞内に導入されてもよい。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿物のような沈殿物中に、または荷電脂質との複合体中にて、DNAとして導入される。エレクトロポレーションもまた宿主内へのポリヌクレオチド導入に利用され得る。ベクターがウイルスの場合には、それは *in vitro* でパッケージングされてもよく、またはパッケージング細胞内に導入され、パッケージングされたウイルスが細胞内に形質導入されてもよい。

20

【 0 0 6 6 】

本発明のこの側面によるポリヌクレオチドの作製およびポリヌクレオチドの細胞内導入に適切な非常に多様な技術が、当業者に既知であり、日常的である。かかる技術は、上記 Sambrook et al. に詳細に参照されているが、これはこれらの技術を詳述する多くの研究用マニュアルの例示である。本発明のこの側面によれば、ベクターは、例えばプラスミドベクター、一本鎖または二本鎖ファージベクター、または一本鎖または二本鎖 RNA あるいは DNA ウイルスベクターであり得る。

【 0 0 6 7 】

かかるベクターは、細胞内への DNA および RNA 導入に関する既知の技術により、細胞内にポリヌクレオチドとして、好ましくは DNA として導入され得る。ベクターは、ファージおよびウイルスベクターの場合、好ましくは、感染および形質導入に関する既知の技術によりパッケージされたウイルス、またはカプシド形成されたウイルスとして細胞内に導入される。ウイルスベクターは、複製適格性または複製欠損性であり得る。後者の場合、ウイルスの増殖は一般に、補完 (complementing) 宿主細胞内でのみ生ずる。

30

【 0 0 6 8 】

ある観点において、ベクターのうちで好ましいものは、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に適したものである。一般に、かかるベクターは、発現されるべきポリヌクレオチドに作動可能に連結された、宿主細胞での発現に効果的なシス作用性の制御領域を含む。適切なトランス作用性因子は、宿主により供給されるか、補完ベクターにより供給されるか、または宿主導入時にベクター自体により供給される。

40

【 0 0 6 9 】

この観点において、ある好ましい態様では、ベクターは特異的発現を提供する。かかる特異的発現は、誘発性発現またはある型の細胞でのみの発現、もしくは誘発性および細胞特異的発現の両方であり得る。誘発性ベクターのうち特に好ましいのは、温度および栄養添加物などの操作が容易である環境因子により発現が誘発できるベクターである。原核生物および真核生物宿主での使用のための構成的および誘発的発現ベクターを含めた本発明のこの態様に適切な各種ベクターは既知であり、当業者により常法として使用されている。

50

【 0 0 7 0 】

操作された宿主細胞は、通常の栄養培地中で培養でき、培地はとりわけプロモーターを活性化すること、形質転換体を選択すること、または遺伝子を増幅することに関して適切に改良してもよい。発現のために選択された宿主細胞とともに従来使用される温度、pH等の培養条件は、当業者にとって明らかであろうように、本発明のポリペプチドの発現に適切であろう。

【 0 0 7 1 】

本発明のポリペプチドの発現には非常に多様な発現ベクターが使用可能である。かかるベクターには、染色体、エピソームおよびウイルス由来ベクター、例えばバクテリアプラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソーム、酵母染色体要素、バキュロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルスに由来するベクター、およびそれらの組合せに由来するベクター、例えばプラスミドと、コスミドおよびファージミドなどのバクテリオファージ遺伝的要素とに由来するベクターが含まれ、これらは全て本発明のこの態様による発現に使用され得る。一般に、宿主内でポリペプチドを発現させるためのポリヌクレオチドの維持、増殖、または発現に適切でないかなるベクターもこの観点での発現に使用してもよい。

10

【 0 0 7 2 】

適切なDNA配列は、各種既知の、かつ日常的な技術のいずれかによりベクター内に挿入される。一般に発現のためのDNA配列は、DNA配列および発現ベクターを1つまたはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで切断し、次にT4DNAリガーゼを使い制限断片を一つに結合させることで、発現ベクターに結合される。この目的に使用できる制限および結合の手法は当業者にとって既知かつ常法である。この観点に適切な手法、および別の方法を用い発現ベクターを構築する手法は、当業者にとって既知かつ常法であり、本明細書の他所に引用したSambrookらに詳細記載されている。

20

【 0 0 7 3 】

発現ベクター内のDNA配列は、例えばmRNA転写に対するプロモーターを含む適切な発現制御配列（複数可）に作動可能に連結されている。かかるプロモーターの代表としてよく知られているものを幾つか列挙すると、ファージラムダPLプロモーター、大腸菌lac、trpおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーターが挙げられる。発明のこの側面での使用に適切である多くの記載外のプロモーターが既知であり、本発明での論議および例に例示される様式によって当業者により容易に使用され得ることが理解されるだろう。

30

【 0 0 7 4 】

一般に発現構築物は転写の開始および終止に関する部位、および転写領域内には翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。構築物により発現される成熟転写体のコード部分は、開始部位に翻訳を開始するAUGを、および翻訳されるポリペプチドの末端に適切に位置する終止コドンを含む。

さらに構築物は発現を制御しかつ発現をもたらす制御領域を含んでもよい。一般には、多くの一般的に実施されている手法によれば、かかる領域は、とりわけリプレッサー結合部位やエンハンサーのように、転写を制御することで作動するであろう。

40

【 0 0 7 5 】

増殖および発現用のベクターは、一般には選択マーカーを含むだろう。かかるマーカーはまた増幅にも適切であり、あるいはベクターはこの目的のためのさらなるマーカーを含んでもよい。この観点では、好ましくは発現ベクターは1つまたはそれ以上の選択マーカー遺伝子を含み、形質転換した宿主細胞の選択に関する表現型の特徴を提供する。好ましいマーカーとしては、真核生物細胞培養についてはジヒドロ葉酸還元酵素あるいはネオマイシン耐性を、大腸菌やその他の細菌の培養についてテトラサイクリンあるいはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。

【 0 0 7 6 】

50

本明細書の他所に記載のような適切なDNA配列、ならびに適切なプロモーター、およびその他の適切な制御配列を含むベクターは、その中での所望ポリペプチドの発現に適切である各種既知の技術を用い、適切な宿主内に導入される。適切な宿主の代表例としては、大腸菌、放線菌およびネズミチフス菌細胞のような細菌細胞、酵母細胞のような真菌細胞、ショウジョウバエS2およびハスモンヨトウ(*Spodoptera*)sf9細胞のような昆虫細胞、CHO、COSおよびボーズ黒色腫細胞などの動物細胞、ならびに植物細胞が挙げられる。非常に多様な発現構築物のための宿主がよく知られており、当業者は本開示により発明のこの側面によりポリペプチドを発現させるのに適した宿主を容易に選択することができるだろう。

【0077】

より具体的には本発明はまた、発現構築物などの1つまたはそれ以上の上記配列を含む組換え構築物も包含する。構築物には、本発明のかかる配列が挿入されている、プラスミドまたはウイルスベクターなどのベクターが含まれる。配列は前向き、または逆向きに挿入され得る。この観点に関し、ある好ましい態様では、構築物は、例えばプロモーターのような配列に作動可能に連結された制御配列をさらに含む。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者に知られており、本発明での使用に適切なベクターが多く市販されている。

【0078】

以下市販のベクターを例示する。細菌での使用にとりわけ好ましいベクターは、Qiagenで市販されているpQE70、pQE60およびpQE-9、Stratageneより入手可能なpBSベクター、ファージスクリプト(*Phagescript*)ベクター、ブルースクリプト(*Bluescript*)ベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、およびPharmaciaより入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5である。とりわけ好ましい真核細胞ベクターは、Stratageneより入手可能なPWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG、およびPharmaciaより入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVLである。これらベクターは、本発明のこの側面での使用に関し、当業者が利用可能な多くの市販されている既知のベクターを例示することのみを目的とし掲載されている。例えば宿主内での、発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの形質導入、維持、増殖または発現に適切なその他のプラスミドまたはベクターは、本発明のこの側面に使用できることが理解されるであろう。

【0079】

プロモーター領域は、プロモーター領域を欠くレポーター転写単位、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(「cat」)転写ユニット、候補プロモーター断片、すなわちプロモーターを含み得る断片を導入するために、1または2以上の下流制限部位などを含むベクターを用いて、所望遺伝子より選択することができる。周知のように、cat遺伝子の上流にある制限部位の、プロモーターを含む断片をベクターに導入すると、標準的なCATアッセイにより検出することができるCAT活性が発生する。この目的に適切なベクターは既知であり、容易に入手できる。かかる2種類のベクターはpKK232-8およびpCM7である。したがって、本発明のポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターには、既知、かつ容易に入手可能なプロモーターだけでなく、レポーター遺伝子を使用した上記技術により容易に入手可能なプロモーターも含まれる。

【0080】

とりわけ知られている、本発明によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に適切な細菌プロモーターは、大腸菌lacIとlacZプロモーター、T3およびT7プロモーター、gpTプロモーター、ラムダPR、PLプロモーター、およびtrpプロモーターである。本観点に適切な、とりわけ知られている真核生物プロモーターは、CMV最初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(「RSV」)のようなレトロウイルスのLTRプロモーター、およびマウスメタロチオネイン-Iプロモーターのようなメタロチオネインプロモ-

10

20

30

40

50

ターである。

【0081】

宿主細胞での発現に適切であるベクターおよびプロモーターを選択することは既知の手法であり、発現ベクター構築、宿主内へのベクターの導入および宿主での発現に必要な技術は、当該技術分野で日常の技術である。

本発明はまた、上記構築物を含む宿主細胞にも関する。宿主細胞は哺乳動物細胞のような高等真核生物細胞、または酵母細胞のような下等真核生物細胞であるか、あるいは宿主細胞は細菌細胞のような原核細胞である。

【0082】

宿主細胞内への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染またはその他の方法により実行できる。かかる方法は、Davis et al., 分子生物の基礎的方法 (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY), (1986)などの標準的研究室マニュアルに記載されている。

宿主細胞内の構築物は従来の様式で用いられ、組換え配列にコードされる遺伝子産物を産生できる。あるいは、発明のポリペプチドは従来のペプチド合成装置により合成的に作製ことができる。

【0083】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下において、哺乳動物細胞、酵母、細菌またはその他の細胞中で発現させることができる。無細胞翻訳系は、本発明のDNA構築物に由来するRNAを利用することで、かかるタンパク質の産生に利用することができる。原核生物および真核生物宿主とともに使用することに適したクローニングおよび発現ベクターは、Sambrook et al., 分子クローニング：研究室マニュアル (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL), 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されている。

【0084】

一般に、組換え発現ベクターは複製起点、下流の構造配列の転写を指示するための高発現遺伝子由来プロモーター、およびベクター暴露後にベクター含有細胞を単離できるようにする選択マーカを含むだろう。特に適切なプロモーターは、とりわけ3-ホスホグリセレートキナーゼ (「PGK」) のような糖分解酵素、 α -因子、酸性ホスファターゼ、および熱ショックタンパク質をコードする遺伝子に由来するプロモーターである。選択マーカとしては、大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子および *S. cerevisiae* の *trp1* 遺伝子が挙げられる。

【0085】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することで高められる。エンハンサーはDNAのシス作用性要素であり、通常約10~300bpであり、所定の宿主細胞型においてプロモーターの転写活性を高める。エンハンサーの例としては、bp100ないし270にある複製起点の後方に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後方にあるポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

【0086】

発明のポリペプチドの異種構造配列をコードする発明のポリヌクレオチドは、標準的技術を用いることで、発現のためのプロモーターと作動可能に連結されるようにベクター内に挿入されるだろう。ポリヌクレオチドは、転写開始部位がリボソーム結合部位に対しほぼ5'側に位置するように配置される。リボソーム結合部位は発現されるべきポリペプチドの翻訳を開始するAUGに対して5'側になる。一般に通常AUGである1つの開始コドンから開始し、リボソーム結合部位と開始AUGの間に存在するような他のオープンリー

ディングフレームは存在しない。また一般にポリペプチドの末端には翻訳停止コドンがあり、さらに転写領域の3'末端に適切に配置されたポリアデニル化シグナルおよび転写終止シグナルが存在するだろう。

【0087】

小胞体内腔内、細胞周辺腔、または細胞外環境に翻訳タンパク質を分泌するためには、発現ポリペプチド中に適切な分泌シグナルを組み込むことができる。シグナルはポリペプチドに対し同種でも、あるいは異種シグナルでもよい。

【0088】

ポリペプチドは融合タンパク質のような修飾型として発現されてもよく、分泌シグナルだけでなくさらなる異種機能領域を含んでもよい。すなわち、例えば宿主細胞内、精製中、あるいはその後の取り扱いや保存中での安定性および持久性を改善するために、さらなるアミノ酸領域、特に荷電アミノ酸をポリペプチドのN末端に付加してもよい。さらに、精製を容易にするためにポリペプチドに領域を付加してもよい。かかる領域は、ポリペプチドの最終調製前に取り除かれるだろう。分泌または排出を起こさせるために、あるいは安定性を向上させ、とりわけ精製を容易にするために、ポリペプチドにペプチド部分を加えることは、当該分野に一般的であり、日常的な技術である。

10

【0089】

発明によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの増殖、維持または発現に適切な原核動物宿主には、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) やネズミサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) が挙げられる。シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、放線菌 (*Streptomyces*) およびブドウ球菌 (*Staphylococcus*) の数種はこの観点における適切な宿主である。さらに、当業者に既知のその他の多くの宿主も、この観点において使用できるだろう。

20

【0090】

例示の代表的であるが、非限定例としては、細菌での応用に有用な発現ベクターは、選択マーカーおよび既知のクローニングベクターであるpBR322の遺伝要素を含む市販プラスミド由来の細菌複製起点を含むことができる。かかる市販ベクターとしては、例えばpKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) およびGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., USA) が挙げられる。これらのpBR322「主鎖」部分は適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と合わせられる。

30

【0091】

適切な宿主株を形質転換し、宿主株を選択したプロモーターが誘発可能な適切な細胞密度まで増殖させた後に、適切な手段でプロモーターを誘発し (例えば温度変化、または化学的誘発物質への暴露)、細胞はさらなる期間培養される。

次に細胞は一般には、遠心分離により集められ、物理的または化学的手段により破壊され、そして得られた粗抽出物はさらなる精製のために保持される。タンパク質の発現に用いた微生物細胞は凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む任意の従来の方法により破壊することができ、かかる方法は当業者に既知である。

40

【0092】

同様に、発現には様々な哺乳動物細胞培養系が使用できる。哺乳動物発現系の例としては、Gluzman et al., Cell 23: 175 (1981) に記載されている、サル腎臓線維芽細胞のCOS-7細胞系が含まれる。適合性ベクターを発現させることができるその他の細胞系には、例えばC127、3T3、CHO、HeLa、ヒト腎臓293およびBHK細胞系が挙げられる。

哺乳動物発現ベクターは複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、さらに発現に必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終止配列、および5'フランキング非転写配列を含むだろう。この観点にお

50

けるある好ましい態様では、SV40 スプライス部位に由来するDNA 配列およびSV40 ポリアデニル化部位がこれらの型の必須非転写遺伝要素として利用される。

【0093】

MSG ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む、既知の方法により組換え細胞培養物より回収および精製され得る。最も好ましくは、精製には高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が用いられる。単離または精製中にポリペプチドが変性させられた場合には、活性立体構造を再生するためにタンパク質のリフォールディングに関する既知の技術が利用されるてもよい。

10

【0094】

本発明のポリペプチドには、天然精製産物、化学合成産物、および例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物を含む原核生物または真核生物宿主から組換え技術により生産された産物が含まれる。組換え体の産生手法に用いた宿主に応じて、本発明のポリペプチドはグリコシル化されていてもよく、あるいはグリコシル化されていなくてもよい。さらに、発明のポリペプチドはさらに幾つかの例では宿主媒介性プロセスの結果である初期修飾メチオニン残基を含んでもよい。

【0095】

MSG ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、本発明によれば、各種用途、特にMSG の化学的および生物学的に特性を利用する用途に使用され得る。さらなる用途は、細胞、組織および生物体の障害の診断および治療に関する。これらの発明の側面は、以下の論議によってさらに例示される。

20

【0096】

抗体

本発明のMSG ポリペプチドまたはそれらの断片またはその変異体、またはそれらを発現する細胞は、MSG ポリペプチドに免疫特異的な抗体を生産するための免疫原として使用することができる。「免疫特異的」という用語は、抗体が従来技術における他の関連するポリペプチドに対する親和性に比べ、本発明のポリペプチドに対し実質的に大きな親和性を有することを意味する。これらの抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであることができる。加えて、「抗体」という用語は、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体及び完全ヒト抗体、ならびに、Fab フラグメントまたはFab 発現ライブラリーの産物を含むとされる。

30

【0097】

MSG ポリペプチドに対し生成された抗体は、動物、好ましくは非ヒト動物に、常法の手順を用いて、ポリペプチドまたはエピトープ担持断片、変異体または細胞を投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体の調製では、連続細胞系培養により産生された抗体を提供する技術が使用できる。例としては、ハイブリドーマ技術（Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975)）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983)）およびEBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al., モノクローナル抗体と癌治療（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY）, Alan R. Liss, Inc. pg. 77-96 (1985)）が挙げられる。

40

【0098】

一本鎖抗体の製造技法（米国特許第4,946,778号）もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体の製造に適用することができる。また、トランスジェニックマウス、または他の哺乳類を含む他の生物も、ヒト化抗体を発現するために用いることができる。

上記の抗体は、ポリペプチドを発現するクローンの単離または同定、または、アフィニテ

50

マイクロマトグラフィによるポリペプチドの精製にも用いることができる。

M S G ポリペプチドに対する抗体はまた、中でも、乳腺癌の治療に用いることができる。

【 0 0 9 9 】

診断ツール

本発明はまた、M S G に免疫特異的な抗体またはM S G にハイブリダイズする標識オリゴヌクレオチドプローブなどの診断ツールにも関する。

M S G に免疫特異的な抗体は、前節に詳細に記載されている。

本発明のポリペプチドの部分にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、自動オリゴヌクレオチド合成装置により化学的に合成することができ、または、*i n v i t r o*の組換えD N A誘導技法などの代替的な方法を介し、細胞及び生物中でD N Aを
10
発現させることにより生産することができる。多くの場合、オリゴヌクレオチドは一本鎖デオキシリボヌクレオチドを含む。しかしながら、オリゴヌクレオチドはまた、一本鎖または二本鎖リボヌクレオチド、R N A : D N Aハイブリッド、及び二本鎖D N Aを含んでもよい。

【 0 1 0 0 】

使用方法

本発明はまた、ヒト患者のM S Gのレベルを正常ヒト対象のM S Gレベルと比較することにより、癌を検出、診断、モニタリング、ステージング及び予後判定するための量的及び
20
質的両方のアッセイ及び方法にも関する。本発明に関して、「M S Gレベル」は、なかでも、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20を含むポリヌクレオチド配列により発現するネイティブタンパク質を意味する。

【 0 1 0 1 】

「M S G」はまた、本明細書中では、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20に比べヌクレオチド配列中に変化を含むが、依然として同一タンパク質をコードするポリヌクレオチドを意味する。検出されるネイティブタンパク質は、全体、分解産物、分子の複合体、または化学的に修飾されたものであってもよい。

【 0 1 0 2 】

あるいは、「M S G」は、本明細書中では、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のポリヌ
30
クレオチド配列を含む遺伝子によってコードされたネイティブm R N A、または、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のアンチセンス配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを意味する。

【 0 1 0 3 】

かかるレベルは、好ましくは細胞、組織及び/または体液の少なくとも1つにおいて決定され、正常および異常レベルの決定を含む。従って、例えばM S Gタンパク質の、正常対
40
照体液、細胞又は組織試料に比較した過剰発現を診断するための本発明の診断アッセイは、乳腺癌の存在の診断に用いてもよい。

本発明の全ての方法は、随意的に、M S Gと同様に、他の癌マーカーのレベルを決定することを含んでもよい。M S G以外の、本発明に有用な他の癌マーカーは試験される癌に依存し、当業者に知られている。

【 0 1 0 4 】

診断アッセイ

本発明は、好ましくは正常ヒト対照由来の同種類の細胞、組織または体液中のM S Gレベルと比較した、細胞、組織または体液中のM S Gレベルの変化を分析することにより、癌、特に乳腺癌の存在を診断する方法であって、正常ヒト対照に対する患者におけるM S G
50
レベルの増加が、乳腺癌の存在に関連する方法を提供する。

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

本発明を限定するものではないが、典型的に、定量的診断アッセイにおいて、試験される患者が癌を有することを示す陽性の結果は、MSGなどの癌マーカーの細胞、組織または体液レベルが、正常ヒト対照の好ましくは同種の細胞、組織または体液中により、少なくとも2倍高く、最も好ましくは少なくとも5倍高い結果である。

本発明はまた、転移の発症に関して、いまだ転移していない乳腺癌を有する患者での、転移性乳腺癌を診断する方法も提供する。本発明の方法では、転移した乳腺癌を持つと疑われる（しかしそれまでに転移したことはわかっていない）ヒト癌患者が同定される。このことは当業者に既知の各種手段により達成される。

【0106】

本発明では、細胞、組織または体液中のMSGレベルの存在を決定することは、特に転移をしていない乳腺癌と転移をしている乳腺癌とを区別するのに有用である。従来技術は、転移をしている乳腺癌と転移をしていない乳腺癌とを区別することが難しく、適切な治療選択はかかる知識に依存することが多い。

【0107】

本発明では、かかる細胞、組織または体液にて測定される癌マーカーレベルはMSGであり、正常ヒト対照の好ましくは同種類の細胞、組織または体液中のMSGレベルと比較される。すなわち、観察される癌マーカーが血清中のMSGである場合、このレベルは好ましくは、正常ヒト対照の血清中のMSGレベルと比較される。正常ヒト対照に対する患者におけるMSGの増加は、転移した乳腺癌に関連する。

【0108】

本発明を限定するものではないが、典型的に、定量的診断アッセイにおいて試験またはモニターされる患者における癌が転移していることを示す陽性結果は、MSGなどの癌マーカーの細胞、組織または体液レベルが、正常患者の好ましくは同種の細胞、組織または体液中よりも、少なくとも2倍高く、最も好ましくは少なくとも5倍高い結果である。

【0109】

本明細書中で用いる正常ヒト対照には、癌を持たないヒト患者および/または患者由来の非癌性試料が含まれる。転移を診断またはモニタリングする方法では、正常ヒト対照はまた、好ましくは、信頼性の高い方法により転移していない乳腺癌を有することが決定されているヒト患者由来の試料を含んでもよい。

【0110】

ステージング

本発明はまた、ヒト患者における乳腺癌をステージングする方法も提供する。この方法は、かかる癌を持つヒト患者を同定することと、かかるヒト患者由来の細胞、組織または体液をMSGについて分析することを含む。次に、患者において決定されたMSGレベルを、正常ヒト対照の好ましくは同種類の細胞、組織または体液中のMSGレベルと比較し、ここで、正常ヒト対照に対するヒト患者のMSGレベルの増加が進行している癌に関連し、MSGレベルの低下（それでも真の正常レベルよりは高い）が、消退または寛解している癌に関連する。

【0111】

モニタリング

さらにかかる癌を持つヒト患者において、転移の発症に関して乳腺癌をモニタリングする方法が提供される。この方法は、転移していることがわかっていないかかる癌を持つヒト患者を同定することと、かかる患者由来の細胞、組織または体液を定期的にMSGレベルについて分析することと、ヒト患者において決定されたMSGレベルを、正常ヒト対照の好ましくは同種類の細胞、組織または体液中のMSGレベルと比較することとを含み、ここで正常ヒト対照に対するヒト患者のMSGレベルの増加が、転移している癌に関連する。この方法では、正常ヒト対照試料にはまた以前の患者試料も含まれ得る。

【0112】

さらに本発明は、乳腺癌のステージの変化を、かかる癌を有するヒト患者においてモニタリングする方法を提供する。この方法は、かかる癌を有するヒト患者を同定することと、

かかるヒト患者由来の細胞、組織または体液をMSGについて定期的に分析することと、ヒト患者において決定されたMSGレベルを、正常ヒト対照の好ましくは同種類の細胞、組織または体液中のMSGレベルと比較することを含み、ここで正常ヒト対照に対するヒト患者におけるMSGレベルの増加が、ステージにおいて進行している癌に関連し、MSGレベルの減少が、ステージが後退しているまたは寛解している癌に関連する。この方法では、正常ヒト対照試料には、以前の患者試料も含まれ得る。

【0113】

転移の発症に関し患者をモニタリングすることは、定期的であり、好ましくは4半期ごとに実施される。しかしながら、これは、癌、特定患者および癌のステージに依存して、より高頻度で、またはより低頻度で実施されてもよい。

10

【0114】

予後試験および臨床試験モニタリング

本明細書中に記載の方法はさらに、MSGレベル増加に関連した疾患または障害を発症する対象、またはその危険性を有する対象を同定するための予後アッセイとしても利用できる。本発明は、試験試料をヒト患者より得て、MSGを検出する方法を提供する。正常ヒト対照に比べ高レベルのMSGの存在は、癌、特に乳癌を発症する危険性があるヒト患者のための診断である。

【0115】

本発明のMSGの発現または活性を低下させる治療薬の有効性は、臨床試験中における、またはヒト細胞におけるような*in vitro*スクリーニングアッセイにおける、ヒト患者のMSGの発現レベルを分析することによりモニタリングすることもできる。このようにして、遺伝子発現パターンは、ヒト患者、場合によっては細胞の、試験される薬剤に対する生理学的応答を示すマーカーとして利用できる。

20

【0116】

遺伝子損傷および突然変異の検出

本発明の方法はまた、MSGにおける遺伝子損傷、または突然変異の検出にも使用することができ、これにより遺伝子損傷を持つヒトが乳癌に対する危険性を有するか、または乳癌を有するかどうかを決定することができる。遺伝子損傷は例えば、本発明のMSGからの1つまたはそれ以上のヌクレオチドの欠失、および/または付加および/または置換の存在、MSGの染色体再配列、MSGの異常修飾（例えばゲノムDNAのメチル化パターン）、MSGのmRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、MSGの対立遺伝子により検出することができる。本発明のMSGにおけるかかる損傷を検出する方法は、当業者に既知である。

30

【0117】

アッセイ技術

患者由来の試料における、本発明のMSGのような遺伝子の発現（タンパク質レベルを含む）レベルを決定するのに使用可能なアッセイ技術は、当業者に既知である。かかるアッセイ方法としては、ラジオイムノアッセイ、逆転写酵素PCR（RT-PCR）アッセイ、免疫組織化学アッセイ、インサイチュハイブリダイゼーションアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、ELISAアッセイおよびプロテオミクスアプローチ、二次元ゲル電気泳動法（2D電気泳動）およびマスペクトロメトリーまたはタンパク質相互作用プロファイリングなどの非ゲルベースのアプローチが挙げられるが、これらに限定されない。これらの中でも、ELISAは生物学的液体中の遺伝子の発現タンパク質の診断に好まれることが多い。

40

【0118】

ELISAアッセイはまず、市販のソースから容易に入手できない場合には、MSGに特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を調製することを含む。さらにMSGに特異的に結合するレポーター抗体が一般には調製される。レポーター抗体は、検出可能な試薬、例えば放射性、蛍光または酵素試薬（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素あるいはアルカリホスファターゼ）に結合される。

50

【0119】

E L I S Aを実施するには、M S Gに特異的な抗体を、抗体を結合する固体支持体、例えばポリスチレンディッシュ上でインキュベートする。次に、ディッシュの上のフリーなタンパク質結合部位をウシ血清アルブミンのような非特異的タンパク質とインキュベートすることにより覆う。次に、分析する試料をこのディッシュにてインキュベートし、その間にM S Gはポリスチレンディッシュに結合した特異抗体に結合する。

【0120】

未結合試料は、緩衝液で洗い流す。M S Gに特異的に指向し、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの検出可能な試薬と連結されたレポーター抗体をディッシュに設置し、その結果、M S Gに結合した任意のモノクローナル抗体にレポーター抗体が結合する。次に未結合のレポーター抗体が洗い流される。次に、比色基質を含むペルオキシダーゼ活性用試薬をディッシュに添加する。M S G抗体に結合した固定化ペルオキシダーゼが着色反応産物を生ずる。所定時間中に発色した色の量は、試料中に存在するM S Gタンパク質の量に比例する。定量的な結果は典型的に、標準曲線を参照することで得られる。

10

【0121】

競合アッセイもまた使用されるが、この場合M S Gに特異的な抗体は、固体支持体に結合され、標識M S Gおよび宿主由来の試料を固体支持体の上を通過させる。固体支持体に結合した検出される標識量は試料中のM S G量に相関する。

【0122】

また、本発明のM S Gの核酸配列の全て、または一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、核酸法を、乳がんに関するマーカーとしてのM S Gのm R N Aの検出に使用することもできる。ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)およびその他の核酸法、例えばリガーゼ連鎖反応(L C R)および核酸配列ベースの増幅法(N A S B A)は、各種悪性腫瘍の診断およびモニタリングについて悪性細胞を検出することに使用できる。

20

【0123】

例えば、逆転写酵素P C R(R T - P C R)は、数千の他のm R N A種の複雑な混合物中において特異的なm R N A集団の存在を検出するのに使用可能な強力な技術である。R T - P C Rでは、m R N A種はまず、酵素、逆転写酵素を用いて相補的D N A(c D N A)に逆転写され、次にc D N Aは標準的P C R反応で増幅される。したがって、R T - P C Rは増幅することにより、単一のm R N A種の存在を示すことができる。したがって、m R N Aがそれを産生する細胞に非常に特異である場合、R T - P C Rを用いて、特定型の細胞の存在を同定することができる。

30

【0124】

固体支持体上に配列された(すなわちグリidding)クローンまたはオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションは、その遺伝子の発現の検出、およびその発現レベルの定量化の両方に使用できる。このアプローチでは、M S G遺伝子をコードするc D N Aは、基板上に固定される。この基板はガラス、ニトロセルロース、ナイロンまたはプラスチックを含むが、これらに限定されない任意の適切な型であり得る。M S G遺伝子をコードするD N Aの少なくとも一部がこの基板に結合され、次にR N AまたはR N Aの相補的D N A(c D N A)コピーであり得る、当該組織から単離された検体とインキュベートされる。

40

【0125】

基板に結合したD N Aと分析体との間のハイブリダイゼーションは、検体の放射性標識または蛍光標識、またはハイブリッドを検出するために設計した二次分子を含むが、これらに限定されない複数の手段により検出および定量化することができる。遺伝子発現レベルの定量化は、分析体からのシグナル強度を既知の標準物質から決定されたシグナル強度と比較することで実施できる。標準物質は標的遺伝子のi n v i t r o転写により得ることができ、その収量を定量化し、次にその物質を使って標準曲線を作成する。

【0126】

プロテオミクスアプローチのうち、2 D電気泳動法が当業者に既知の技術である。血清な

50

どの試料からの個別のタンパク質の単離は、通常ポリアクリルアミドゲル上で、異なる特性によりタンパク質を順次分離することで達成される。まずタンパク質は、電流を用いて大きさにより分離される。電流は全てのタンパク質に均一に作用し、その結果小型のタンパク質ほど大型のタンパク質に比べゲル上を遠くへ移動する。

【0127】

第二の次元は、第一の次元に対し垂直方向に電流を作用させ、タンパク質の大きさに基づいてではなく、各タンパク質の持つ特異的電荷により分離する。異なる配列を持つ2つのタンパク質は、大きさと電荷の両方に基づいて、同一であることはないので、2D分離の結果は、各タンパク質が特有のスポットを占有する方形のゲルである。このスポットの化学的または抗体プローブによる分析、あるいはそれに引き続くタンパク質のマイクロシー

10

【0128】

上記試験は各種細胞、体液および/または組織抽出物（例えば患者より得たホモジネートまたは可溶化組織）由来の試料について実施できる。組織抽出物は、組織生検および剖検材料から常法により得られる。本発明に有用な体液には、血液、尿、唾液またはそれらの任意の他の体分泌物または派生物が含まれる。血液とは、全血、血漿、血清または血液の任意の派生物を含むことを意味している。

【0129】

MSGのin vitroターゲティング/乳腺癌治療

20

このMSGの同定はまた、癌、特に乳腺癌のイメージングおよび治療のための新規治療物質の合理的設計において有用である。例えば、一側面では、MSGに特異的に結合する抗体を産生し、乳腺癌を患うことが疑われる患者にin vivoで使用することができる。MSGを特異的に結合する抗体は、診断および/または治療目的で乳腺癌が疑われる患者に注射することができる。したがって、本発明の別の側面は、ヒト患者に対し有効量の抗体を投与することにより、かかる治療を必要としている患者の乳腺癌の発症を防止し、治療するための方法に関する。

【0130】

「有効量」とは、腫瘍上に発現した標的抗原に結合し、外科的除去のための腫瘍の退縮または腫瘍の消失をもたらすのに必要な抗体量または濃度を意味する。過剰発現されたMSGへの抗体の結合は、かかるMSGを発現する癌細胞に死をもたらすと考えられる。in vivo診断および治療のための抗体の調製および使用は、当該技術分野で既知である。例えば、インジウム-111で標識された抗体-キレーターは、癌胎児抗原発現腫瘍のラジオイムノシンチグラフィイメージングでの使用について記載されている(Sumerdon et al., Nucl. Med. Biol. 1990 17: 247-254)。

30

【0131】

特に、これらの抗体-キレーターは、再発性結腸直腸癌が疑われる患者における腫瘍検出に使用されている(Griffin et al., J. Clin. Onc. 1991 9: 631-640)。磁気共鳴イメージングにおける使用のための標識として常磁性イオンを持つ抗体も記載されている(Lauffer, R. B. Magnetic Resonance in Medicine 1991 22: 339-342)。MSGに対する抗体は、同様に使用することができる。MSGを特異的に結合する標識抗体は、患者の疾患状態の診断またはステージングを目的として、乳腺癌が疑われる患者に注射することができる。

40

【0132】

使用される標識は、使用すべきイメージング様式に応じ選択されるであろう。例えば、インジウム-111、テクネチウム-99mまたはヨウ素-131などの放射性標識体が平面スキャンまたは単光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)に使用できる。フッ素-19のような陽電子放射標識は、陽電子放射断層撮影法に使用できる。ガドリニウ

50

ム (I I I) またはマンガン (I I) のような常磁性イオンは、磁気共鳴イメージング (M R I) に使用できる。正常組織のイメージングと比べた標識の存在から、癌の広がりを決定することができる。器官または組織内の標識量からはまた、その器官または組織中の癌の有無を決定できる。

【 0 1 3 3 】

i n v i v o の方法で使用可能な抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびオムニクローナル抗体、ならびに分子生物学的技術により調製される抗体が含まれる。抗体断片およびアプトマー、ならびに S E L E X と呼ばれる、当業者に既知のインビトロ進化プロトコルより得た一本鎖オリゴヌクレオチドも利用できる。

【 0 1 3 4 】

10

ワクチン

本発明の別の側面は、哺乳類において免疫応答を誘発するための組成物および方法に関する。1つの態様では、哺乳類に、M S G ポリペプチドに対する抗体の産生および/または T 細胞性の免疫応答を惹起するのに適切な量で、M S G ポリペプチド、またはその断片または変異体を接種する。他の態様では、i n v i v o で M S G ポリヌクレオチドの発現を指向するベクターを、このような免疫応答を誘発するため、および抗体を産生するために用いる。M S G ポリペプチドに対する免疫応答は、哺乳類を疾患、特に乳腺癌から保護することが期待される。

【 0 1 3 5 】

従って、本発明はまた、免疫学的 / ワクチン製剤 (組成物) であって、哺乳類に導入された場合、該哺乳類において M S G ポリペプチドに対し免疫応答を誘発し、ここで該組成物が M S G ポリペプチド、その断片または変異体、または M S G 遺伝子またはその断片を発現しているベクターを含むものにも関する。ワクチン製剤は、さらに好適な担体を含んでも良い。

20

【 0 1 3 6 】

M S G ポリペプチドは胃で分解され得るので、ワクチン製剤は、好ましくは、皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射を介して非経口的に投与される。非経口投与に好適な製剤は、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤および製剤をレシピエントの血液と等張にする溶質を含んでもよい水性および非水性無菌注射溶液、および懸濁化剤または増粘剤を含んでもよい水性および非水性無菌懸濁液を含む。

30

【 0 1 3 7 】

製剤は、単位用量または多用量の容器で、例えば、密封アンプルおよびバイアルとして提示されてもよく、使用直前に無菌液体担体の添加のみを要する凍結乾燥条件下で保管してもよい。ワクチン製剤はまた、該製剤の免疫原性を増強するための、油中水システムおよび当該技術分野で知られている他のシステムなどの、アジュバントシステムを含んでもよい。用量は、ワクチンの具体的な活性に依存し、常法による実験により容易に決定できる。

【 0 1 3 8 】

スクリーニングアッセイ

本発明の M S G ポリペプチドはまた、本発明の M S G ポリペプチドを活性化し (アゴニスト) または阻害する (アンタゴニスト、または、さもないければ阻害剤と呼ばれる) 化合物のためのスクリーニング方法に用いることができる。従って、本発明のポリペプチドは、例えば、細胞、細胞非含有調製物、化学ライブラリーおよび天然産物混合物から、アゴニストまたはアンタゴニストを同定するのに用いることができる。これらのアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によっては、本発明のポリペプチドの天然または修飾された基質、リガンド、レセプター、酵素などであってもよく、または、本発明のポリペプチドの構造的または機能的類似物であってもよい。C o l i g a n e t a l . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y 1 (2) : C h a p t e r 5 (1 9 9 1) を参照。

40

【 0 1 3 9 】

50

M S G ポリペプチドは、乳がんなどの病態を含む、様々な生物学的機能の原因である。従って、一方で、M S G ポリペプチドを刺激する化合物（アゴニスト）を、他方でM S G ポリペプチドの機能を阻害できる化合物（アンタゴニスト）を同定することが望まれている。アゴニストおよびアンタゴニストは、乳がんなどの状態の治療および予防の目的で用いることができる。

【0140】

一般的に、このようなスクリーニング手順は、M S G ポリペプチドを発現するまたは本発明のM S G ポリペプチドに反応する適切な細胞を用いることを伴う。このような細胞は、哺乳類、酵母、ショウジョウバエおよび大腸菌からのものを含む。M S G ポリペプチドを発現する細胞（または発現したポリペプチドを含む細胞膜）、または、M S G ポリペプチドに反応する細胞を、次に、候補化合物と接触させ、結合、または機能的な反応の刺激または阻害を観察する。候補化合物と接触させた細胞のM S G 活性を、候補化合物と接触させなかった同種の細胞のM S G 活性と比較する。

10

【0141】

アッセイは、候補化合物の結合を単純に試験してもよく、ここで、M S G ポリペプチドを担持する細胞への接着が、候補化合物に直接または間接に結合した標識により、または標識競合物による競合を伴うアッセイにおいて、検出される。さらに、これらのアッセイは、M S G ポリペプチドを担持する細胞に適切な検出系を用いて、候補化合物が、M S G ポリペプチドの活性化により発生したシグナルをもたらすかどうかを試験することができる。活性化の阻害剤は、一般的に既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、アゴニストによる活性化への候補化合物の効果が観察される。

20

【0142】

あるいは、アッセイは、候補化合物をM S G ポリペプチドを含む液と混合し、混合物を形成する工程、M S G 活性を該混合物中で測定する工程、そして、混合物のM S G 活性を標準物質と比較する工程を含んでもよい。

【0143】

M S G ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび該ポリペプチドに免疫特異的な抗体はまた、細胞中のM S G m R N A およびポリペプチドの産生に対する、添加化合物の効果を検出するためのアッセイを設定することに用いることができる。例えば、分泌されたまたは細胞に結びついたM S G ポリペプチドのレベルを測定するための、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いたE L I S A は、当該技術分野に知られた標準的な方法により構築することができる。そして、該E L I S A は、適切に操作された細胞または組織からのM S G 産生を阻害または増強し得る剤を発見するために使用することができる。これらのスクリーニングアッセイを遂行する標準的な方法は、当該技術分野でよく理解されている。

30

【0144】

M S G ポリペプチドはまた、場合によっては、当該技術分野で知られた標準的な受容体結合技法を介して、膜結合または可溶性受容体の同定に用いることができる。これらは、限定されることなく、リガンド結合および架橋アッセイを含み、ここで、M S G は放射性同位体（例えば、 ^{125}I ）で標識され、化学的に修飾され（例えばビオチン化）、または検出または精製に好適なペプチド配列に融合され、そして、推定される受容体（細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液）のソースとインキュベートされる。他の方法は、表面プラズモン共鳴法および分光法などの生物物理学的技法を含む。受容体の精製およびクローニングに用いられるほか、これらの結合アッセイは、M S G のレセプターへの結合と競合するM S G のアゴニストおよびアンタゴニストの同定に用いることができる。これらのスクリーニングアッセイを遂行する標準的な方法は、当該技術分野でよく理解されている。

40

【0145】

潜在的なM S G ポリペプチドのアンタゴニストの例は、抗体、M S G に深く関係するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、M S G ポリペプチドのリガンド、基質、受容体、およ

50

び酵素、これらのリガンド、基質、受容体および酵素の断片、および、本発明のポリペプチドに結合し、該ポリペプチドの活性を抑制する小分子を含むが、これらに限定されない。

【0146】

従って、本発明はまた、MSGポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、または、MSGポリペプチドの産生を減少または増強させる化合物を同定するためのスクリーニングキットにも関する。かかるキットは、好ましくは、MSGポリペプチド、MSGポリペプチドを発現している組換え細胞、またはMSGポリペプチドを発現している細胞膜、およびMSGポリペプチドに対する抗体を含む。

【0147】

予防および治療方法

本発明はまた、MSGポリペプチド活性の過剰および不十分な量のMSGポリペプチド活性の両方に関係する、乳がんなどの異常な状態を処置する方法にも関する。

MSGポリペプチドの活性が過剰な場合、複数のアプローチが可能である。1つのアプローチは、対象に上述の阻害化合物（アンタゴニスト）を、薬学的に許容し得る担体とともに、例えば、リガンド、基質、酵素、レセプターなどの結合を遮断することにより、または、二次的シグナルを阻害することによりMSGポリペプチドの機能を阻害するための十分な量で投与し、それにより異常な状態を軽減することを含む。他のアプローチでは、内因性のMSGポリペプチドと競合し、リガンド、基質、酵素、受容体などと依然結合することができるMSGポリペプチドの可溶形態を投与することができる。このような競合体の典型的な態様は、MSGポリペプチドの断片を含む。

【0148】

さらに別のアプローチでは、発現阻止（expression blocking）技法を用いて、内因性MSGポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害することができる。既知の阻止技法は、内部で生成した、または、別個に投与されたアンチセンス配列の使用を伴う。例えば、「遺伝子発現のアンチセンス阻害剤としてのオリゴデオキシヌクレオチド」のO'Connor, J Neurochem (1991) 56:560, CRC Press, Boca Raton, FL (1998)を参照。あるいは、遺伝子と3重らせんを形成するオリゴヌクレオチドが提供できる。例えば、Lee et al., Nucleic Acids Res (1979) 6:3073、Cooney et al., Science (1988) 241:456、Dervan et al., Science (1991) 251:1360を参照。これらのオリゴマーは、それ自身投与されることができ、または、関係するオリゴマーはin vivoで発現されることができる。

【0149】

また、複数のアプローチが、MSGおよびその活性の過少発現に関する異常な状態を処置するために使用可能である。1つのアプローチは、対象に、MSGポリペプチドを活性化させる化合物、つまり上述のアゴニストを、治療に有効な量で、薬学的に許容し得る担体と組み合わせて投与し、それにより異常な状態を軽減することを含む。あるいは、対象内の関係する細胞によるMSGの内因性の産生をもたらすために遺伝子療法を用いることができる。

【0150】

例えば、本発明のポリヌクレオチドは、複製欠損レトロウイルスベクターなどのウイルスベクター内での発現のために操作され得る。次にレトロウイルス発現構築物が単離され、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入されたパッケージング細胞内に、そのパッケージング細胞が次に所望遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生するように導入され得る。

【0151】

これらの産生細胞は、in vivoで細胞を操作し、in vivoにてポリペプチドを発現させることを目的として、対象に投与され得る。遺伝子療法の概要は、T Stra

10

20

30

40

50

chanおよびA P Read、ヒト分子遺伝学、B I O S S c i e n t i f i c P u b l i s h e r s L t d (1 9 9 6) の第20章「遺伝子療法およびその他の分子遺伝学に基づく治療アプローチ」(およびそこに引用されている参考文献)を参照。他のアプローチは、好適な薬学的担体と組み合わせて治療量のMSGポリペプチドを投与することである。

【0152】

製剤および投与

MSGポリペプチドの可溶性形態などのペプチド、およびアゴニストおよびアンタゴニストペプチドまたは小分子は、好適な薬学的担体との様々な組合せで製剤することができる。これらの製剤は、治療的に有効な量のペプチドまたは小分子、および薬学的に許容し得る担体または賦形剤を含む。このような担体は、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。製剤は、投与方法に従って選択され、当該技術の範囲内である。本発明は、さらに前述の本発明の組成物の1種または2種以上の成分が満たされた1個または2個以上の容器を含む薬学的パックおよびキットに関する。

10

【0153】

本発明の組成物は、単独で、または、他の治療化合物などの他の化合物とともに用いることができる。

これらの医薬組成物の全身投与の好ましい形態は、注射、典型的には静脈内注射を含む。皮下、筋肉内または腹腔内などの他の注射経路もまた、用いることができる。全身投与のための代替的な手段は、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤などの浸透剤を用いた経粘膜および経皮投与を含む。加えて、経腸製剤またはカプセル製剤に適正に製剤された場合、経口投与も可能となり得る。これらの組成物はまた、軟膏、ペースト、ゲルなどの形態で局所的に投与することもできる。

20

【0154】

要求される用量範囲は、組成物、投与経路、製剤の性質、対象の状態の性質、および主治医の判断に依存する。しかしながら、好適な用量は、一般的に対象1kgあたり0.1~100μgのペプチドまたは小分子の範囲である。しかしながら、入手可能な化合物の多様性、および種々の投与経路の異なる効率を考慮すると、必要な容量の大きな変化が予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与よりも高い容量を要することが予想される。これらの容量レベル内の変化は、当該技術でよく理解されているように、最適化のための標準的で経験的な常法を用いて調整することができる。

30

【0155】

処置に用いられるポリペプチドはまた、上述のとおり、しばしば「遺伝子療法」と呼ばれる処置様式において、対象内で内因性に生成されることもできる。従って、例えば、対象からの細胞を、DNAまたはRNAなどの本発明のMSGポリヌクレオチドにより、体外でポリペプチドをコードするように、そして例えば、レトロウイルス性プラスミドベクターの使用により*in vivo*でポリペプチドをコードするように操作してもよい。次に、これらの細胞を対象に導入する。

40

【0156】

例

本発明を以下の例によりさらに詳細に説明する。例は具体的な態様を参照することで発明を例示するためにのみ提供される。これらの例示は発明のある特定の側面を記述するものの、開示された発明の範囲を限定あるいは制限するものではない。

例は、特に詳細記載された場合を除き、当業者にとって既知、かつ日常的である標準的な技術を用いて実施した。以下の例の日常的な分子生物学的技術は、例えばSambrook et al., 分子クローニング; ラボラトリーマニュアル(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL), 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)などの標準的な実験室マニュアルに記載されたとおり

50

に実施した。

【0157】

例1：抑制サブストラクションハイブリダイゼーション (suppression subtractive hybridization) (Clontech PCR-SELECT)

Clontech PCR-SELECTは、2種類のmRNA集団の間で異なって発現されたmRNAに対応するcDNAについて、選択的に富化するために設計されたPCRベースのサブストラクションハイブリダイゼーション法である (Diatchenko et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 6025-6030, 1996)。

10

【0158】

この方法において、cDNAは比較すべき2種のmRNA集団から調製する(テスター：差別的に発現されたメッセージが探索されるcDNA集団、および、ドライバー：差別的に発現された転写物がないかまたは少ないcDNA集団)。テスター試料は、2つの部分に分けられ、5'末端に異なるPCRアダプターが連結される。それぞれのテスターは、別々に、過剰のドライバーとアニーリング(第1アニーリング)した後プールされ、再度過剰のドライバーとアニーリングさせる(第2アニーリング)。

【0159】

第1アニーリングの最中、両集団に共通の配列がアニーリングする。さらに、大量または少量のメッセージの濃度は、ハイブリダイゼーションの2次元動態により、豊富な分子についてアニーリングが早いため、標準化される。第2アニーリングの最中、テスターにユニークなまたはテスターに対し過剰なcDNAと一緒にアニーリングすることができる。このような分子は、その末端に異なるアダプターを有する。

20

【0160】

第2アニーリングの最中に追加のドライバーを添加すると、所望の差別的に発現された配列の富化が増強される。引き続くPCRの最中に、各末端に異なるアダプターを有する分子は、指数関数的に増幅される。同一のアダプターを有するか、または1末端にだけアダプターを有するか、またはアダプターを有さない分子(ドライバー配列)は、増幅されないか、または、線形性に増幅される。最終的な結果は、差別的に発現された(テスターにユニークなまたはテスターで上方調節された)メッセージに対応するcDNAの富化である。

30

【0161】

この技法は、乳腺組織にユニークな転写物または乳腺癌で過剰発現されているメッセージの同定に使用した。同一の患者から単離した対応(matched)試料の組、癌試料および同種の組織からの「正常」隣接組織を用いた。癌組織からのmRNAを「テスター」として、そして、非ガン性mRNAを「ドライバー」として用いた。非癌性「ドライバー」は、癌試料と同一の個体および組織からのものである(対応)。あるいは、「ドライバー」は、異なる個体だが腫瘍試料と同種の組織からのものであることができる(非対応)。いくつかのケースでは、癌組織の種類とは異なる種類の非癌性組織に由来するmRNAの混合物を「ドライバー」として用いた。このアプローチにより、その発現が、分析した癌組織の種類に特異的な、または、そこで上方調節されている転写物の同定が可能になる。

40

【0162】

複数のサブストラクションライブラリーが乳腺から生成される。サブストラクション実験の産物をcDNAライブラリーの作成に用いた。これらのcDNAライブラリーは、乳腺癌に特異的な遺伝子、または乳腺で上方調節されている遺伝子からの発現配列タグ(ETS)を含む。各cDNA PCR Selectライブラリーからの選択されたクローンの配列を決定し、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20として表した。

【0163】

50

例 2 : 遺伝子発現の相対的定量

蛍光タックマン (Taqman) プローブを用いたリアルタイム定量 PCR は、Taq DNA ポリメラーゼの 5' - 3'ヌクレアーゼ活性を利用する定量検出システムである。この方法は、5' をレポーター色素で、下流の 3' をクエンチャー色素で標識した内部蛍光オリゴヌクレオチドプローブ (Taqman) を用いる。PCR の間に Taq DNA ポリメラーゼの 5' - 3'ヌクレアーゼ活性がレポーターを放出し、次にその蛍光をモデル 7700 シークエンス検出システム (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) のレーザー検出器により検出することができる。

【0164】

内因性対照の増幅を使用し、反応に添加された試料 RNA の量が標準化され、逆転写酵素 (RT) の効率が正規化される。シクロフィリン、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、または 18S リボソーム RNA (rRNA) のいずれかがこの内部対照として用いられる。研究される全試料間の相対定量化を計算するために、1 つのサンプル試料のための標的 RNA レベルを結果比較のための基準 (キャリブレーター) として用いた。「キャリブレーター」に対する定量化は、標準曲線法または比較法 (User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 シークエンス検出システム) を用いて得ることができる。

【0165】

標的遺伝子の組織分布およびレベルを、正常組織および癌組織の全ての試料について評価した。全 RNA は、正常組織、癌組織、および癌とそれに対応する対応隣接組織から抽出された。続いて逆転写酵素を用いて第 1 鎖 cDNA が調製され、各標的遺伝子に特異的なプライマーとタックマンプローブとを用いてポリメラーゼ連鎖反応が行われた。結果は、ABI PRISM 7700 シークエンス検出装置を用いて分析された。無名数は、キャリブレーター組織と比較した場合の特定組織中にある標的遺伝子の相対発現レベルである。

【0166】

リアルタイム定量 PCR を用いて評価されたリード (leads) は、後ろに番号が続く「mam」と命名した (例えば: mam028)。

比較のために、同様の mRNA 発現分析を、診断マーカー PSA (前立腺特異抗原) および PLA2 (ホスホリパーゼ A2) をコードする遺伝子について行なった。PSA は、臨床検査室で入手可能な唯一の癌スクリーニングマーカーである。正常プール組織のパネルを分析すると、PSA は前立腺において非常に高レベルに発現されており、乳房および精巣での発現は非常に低かった。

【0167】

14 の異なる組織からの 55 より多い対応サンプルを分析した後、正常組織試料に関してみた、データの組織特異性が確認された。前立腺組織の 12 の対応試料の癌および正常隣接組織における PSA の発現もまた対比した。PSA の相対レベルは、10 個の癌試料で高かった (83%)。最近得られた臨床データは、遅いステージの前立腺癌のステージングマーカーとしての PLA2 の使用を支持している。

【0168】

これらの実験からの mRNA 発現データは、分析した 12 個の前立腺対応試料のうち 8 個において mRNA の過剰発現を示した (66%)。PLA2 の組織特異性は、PSA について記載されたものほどは良くなかった。前立腺の他、小腸、肝臓および脾臓も、PLA2 について高いレベルの mRNA の発現を示した。

【0169】例 3 : 半定量ポリメラーゼ連鎖反応 (SQ - PCR)

SQ - PCR は、エンドポイント PCR を連続希釈 cDNA 試料に用い、複数の試料において対象となる遺伝子の相対発現パターンを決定する方法である。ランダムヘキサマープライムド (random hexamer primed) 逆転写により cDNA パネルが

10

20

30

40

50

、総RNA試料から作成される。次に、デュプリケートした4段階10倍連続希釈cDNAからポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技法により断片を増幅するために、遺伝子特異的プライマーを用いた。

【0170】

0、1、10、100および1000の相対発現レベルを、遺伝子発現の評価に用いた。最も希釈された試料における陽性反応は、最も高い相対発現値を示す。これは、試料反応を2～4%のアガロースゲル上で分析することにより決定する。用いた組織試料は、12個の正常試料、12個の癌試料および6組の組織特異的癌および対応試料を含む。この方法により評価されたリードは、後に番号が続くsqmamと命名した(例えば: sqmam022)。

10

【0171】

【表1】

配列番号：	クローンID：	リードID：
1	Mamc00000385	mam021
4	Mam600369434F1	mam019
11	Mam600372192F1	sqmam022
15	Mam600370727F1	sqmam023
17	Mam600356265F1	mam018
18	Mam600370568F1	mam028

20

【0172】

配列番号1、クローンID：Mamc00000385(Mam021)

以下のプライマーを用い、リアルタイム定量PCRを行なった。

Mam021フォワード：

5'CCATCGTCTTCTTTATCCAACT 3'(配列番号21)

30

Mam021リバーズ：

5'TGGGTGATTTTCAGAGAACTGCT 3'(配列番号22)

Q-PCRプローブ

5'TCAATTATAGGCAAAGGAACCTCACAGAGAGAAAC 3'(配列番号23)

【0173】

表1は、25種の異なる組織からの36個の正常試料におけるmam021の相対発現レベルである、無名数を示す。全ての数値は、正常精巢(キャリブレータ)と比較されている。これらのRNA試料は、異なる個体からの特定の組織の試料をプールすることにより作成された、商業的に入手可能なプールである。ただし、血液試料は、単一の個体からの正常試料である。

40

【0174】

【表2】

表 1 : プール組織試料におけるMam021

組織	正常
副腎	0.00
膀胱	0.00
脳	0.00
子宮頸管	0.54
大腸	0.20
子宮内膜	0.00
食道	0.03
心臓	0.00
腎臓	0.12
肝臓	0.00
肺	0.00
乳腺	0.00

10

【 0 1 7 5 】

【 表 3 】

筋肉	0.00
卵巢	0.00
膀胱	0.00
前立腺	1.39
直腸	0.00
小腸	0.00
脾臓	0.00
胃	0.27
精巣	1.00
胸腺	0.38
気管	0.00
子宮	0.00
血液 B1	0.00
血液 B10	0.00
血液 B11	0.00
血液 B12	0.13
血液 B13	0.00
血液 B14	0.00
血液 B15	0.00
血液 B4	0.00
血液 B5	0.00
血液 B6	0.00
血液 B7	0.00
血液 B8	0.00

20

30

0.00 = 陰性

40

【 0 1 7 6 】

表 1 の発現の相対レベルは、mam021 mRNA の発現が、少数の分析された正常組織のプールで検出されたことを示す。

表 1 の無名数は、血液試料を除き、異なる個体からの特定の組織の試料のプールを分析することにより得た。これらは、表 2 の単一の個体からの組織試料から得た RNA に由来する無名数と比較することができない。

【 0 1 7 7 】

表 2 は、78 組の対応試料におけるmam021の相対発現レベルである無名数を示す。全ての数値は、正常精巣（キャリブレータ - ）と比較されている。対応ペアは、特定組織

50

の癌試料からの mRNA、および同一個体の同一組織の正常隣接試料からの mRNA で形成される。さらに、1 個の非対応癌試料（卵巣由来）および 1 個の非対応正常試料（卵巣由来）もまた試験した。

【 0 1 7 8 】

【 表 4 】

試料ID	組織	癌	正常隣接組織	正常	TNM分類	ステージ	腺癌の種類
Mam497M	乳腺	1	7.89		T1 N0 M0	ステージI	導管状
Mam173M	乳腺	2	0.00		T1 N0 M0	ステージI	導管状
MamS621	乳腺	3	37.27		T1c N0 MX	ステージI	導管状
MamS516	乳腺	4	1.43		T1c N0 MX	ステージI	導管状
Mam726M	乳腺	5	2.88		T1 N1-2 MX	ステージIIA	導管状
MamS079	乳腺	6	0.13		T1c N1-2 MX		導管状
Mam517	乳腺	7	0.64		T1c N1-2 MX		導管状
Mam59X	乳腺	8	1.64	204.36	T1c NX MX		導管状
Mam19DN	乳腺	9	11.04		T2 N0 M0	ステージIIA	導管状
Mam522	乳腺	10	0.39		T2 N0 MX	ステージIIA	導管状
MamS127	乳腺	11	0.07		T2 N0 MX	ステージIIA	導管状
MamB011X	乳腺	12	0.12		T2 N0 MX	ステージIIA	導管状
Mam51DN	乳腺	13	1.58		T2 N1 M0		導管状
Mam162X	乳腺	14	0.14		T2 N1-2 MX		導管状
MamS123	乳腺	15	23.67		T2 N1-2 MX		導管状
MamS997	乳腺	16	0.00		T2 N1-2 MX		導管状
Mam220	乳腺	17	1.85		T2 N1-2 MX		導管状
Mam245M	乳腺	18	83.29		T2 N1-2 MX	ステージIIB	導管状
Mam543M	乳腺	19	0.09		T2 NX MX	ステージIIB	導管状
Mam976M	乳腺	20	0.22		T2 NX MX		導管状
Mam76DN	乳腺	21	1.94		T3 N1 M0		導管状
Mam699F	乳腺	22	0.27		T3 NX MX		導管状
Mam42DN	乳腺	23	663.98		T3a N1 M0	ステージIIIA	導管状
MamS570	乳腺	24	0.47	5.64	T1c N1-2 MX		導管状 + 小葉状
MamS918	乳腺	25	0.00	0.00	T1c NX MX		導管状 + 管状

【 0 1 7 9 】

【 表 5 】

10

20

30

40

MamS854	乳腺	26	6.45	0.00	T1c N0 MX	ステージI	小葉状
MamS967	乳腺	27	0.00	0.00	T2 N0 MX	ステージIIA	小葉状
Mam986	乳腺	28	0.26	0.14	T2 N0 M0	ステージIIB	小葉状
Mam355	乳腺	29	20.53	0.00	T2 N1-2 MX	ステージIIB	小葉状
MamS699	乳腺	30	1.04	0.00	T2 N1-2 MX	ステージIIB	小葉状
MamA06X	乳腺	31	0.69	0.00	T3 N0 MX	ステージIIB	小葉状
Bld32XK	膀胱 1		0.00	0.05			
Bld66X	膀胱 2		1.55	0.14			
BldTR17	膀胱 3		0.00	0.00			
Bld46XK	膀胱 4		0.39	0.15			
BldTR14	膀胱 5		0.24	0.11			
ClnB56	大腸 1		0.00	0.00			
ClnDC63	大腸 2		0.00	0.00			
CvxKS52	子宮頸管 1		0.00	0.00			
CvxNK24	子宮頸管 2		0.04	0.00			
CvxKS83	子宮頸管 3		0.00	0.32			
CvxNK23	子宮頸管 4		0.00	0.00			
Endo10479	子宮内膜 1		0.13	0.27			
Endo12XA	子宮内膜 2		6.41	0.00			
Endo28XA	子宮内膜 3		0.04	0.00			
Endo3AX	子宮内膜 4		0.00	0.00			
Endo5XA	子宮内膜 5		0.00	0.00			
Endo65RA	子宮内膜 6		0.00	0.00			
Kid6XD	腎臓 1		0.00	0.01			
Kid710K	腎臓 2		0.00	0.06			
Liv175L	肝臓 1		0.05	0.38			
Liv187L	肝臓 2		0.00	0.00			
Liv15XA	肝臓 3		0.04	0.00			
Lng47XQ	肺 1		0.00	0.00			
LngAC88	肺 2		0.00	0.00			
LngAC90	肺 3		0.00	0.00			
LngSQ80	肺 4		0.00	0.00			
Ovr103X	卵巣 1		14.93	5.24			

【 0 1 8 0 】

【 表 6 】

10

20

30

40

- 58 -

OvrA084	卵巣 2		15.51	8.51				
OvrG010	卵巣 3		0.15	1.60				
OvrG021	卵巣 4		0.96	4.21				
Ovr1118	卵巣 5		0.00					
Ovr32RA	卵巣 6			0.00				
Pan77X	膵臓 1		0.00	0.00				
Pan82XP	膵臓 2		0.00	0.00				
Pro109XB	前立腺 1		0.00	0.00				
Pro125XB	前立腺 2		0.28	0.15				
Skn248S	皮膚 1		0.00	0.00				
Skn287S	皮膚 2		0.01	0.00				
SmIntH89	小腸 1		0.00	0.02				
SmInt21XA	小腸 2		2.69	0.04				
Sto115S	胃 1		0.00	0.00				
Sto15S	胃 2		0.27	0.00				
StoMT54	胃 3		0.00	0.00				
Thr590D	甲状腺 1		0.00	0.00				
Tst647T	精巣 1		0.03	0.00				
Utr141XO	子宮 1		0.00	0.00				
Utr23XU	子宮 2		0.00	0.00				
Utr85XU	子宮 3		0.00	0.20				
Utr135XO	子宮 4		0.06	0.00				

0.00= 陰性

【 0 1 8 1 】

表 2 は、17 種の異なる組織における 158 個の試料を表している。表 1 および表 2 は、合わせて 27 種のヒト組織における 194 個の試料を表している。

同一個体からの乳癌試料および正常隣接組織における mRNA 発現レベルの比較は、表 2 に示してある。Mam021 は正常隣接組織に比べ、31 個の癌試料中 21 個で (68 %

10

20

30

40

50

）高レベルに発現されていた（乳腺 1、3～5、9～11、13～15、17～21、23、26、28～31）。特に、Mam021は、6個の小葉癌のうち5個（83%）で過剰発現を示した（乳腺 26、28～31）。

染色体位置：ヒトゲノムデータベースに対するBLASTの結果は、mam021の配列（配列番号1）が、第16染色体の配列と95～100%の同一性を有することを示した。

【0182】

配列番号4、クローンID：Mam600369434F1（mam019）

以下のプライマーを用い、リアルタイム定量PCRを行なった。

Mam019フォワード：

5' GTGGCTCTTTCTTTTCCCTCAG3'（配列番号24）

Mam019リバーズ：

5' CGCAGAGAGACAAACCCAGA3'（配列番号25）

Q-PCRプローブ

5' ACCTGCTGTTGCTCCTGGCTAGTCTTG3'（配列番号26）

【0183】

表3は、25種の異なる組織からの36個の正常試料におけるmam019の相対発現レベルである無名数を示す。全ての数値は、正常子宮（キャリブレータ）と比較されている。これらのRNA試料は、異なる個体からの特定の組織の試料をプールすることにより作成した、商業的に入手可能なプールである。ただし、血液試料は、単一の個体からの正常試料である。

【0184】

【表7】

10

20

表 3 : プール組織試料におけるMam019

組織	正常
副腎	0.11
膀胱	0.25
脳	0.54
子宮頸管	0.27
大腸	0.27
子宮内膜	0.63
食道	0.03
心臓	0.81
腎臓	0.13
肝臓	0.04
肺	15.62
乳腺	6.92
筋肉	0.07
卵巣	0.51
脾臓	0.00
前立腺	2.23
直腸	0.13
小腸	0.08
脾臓	2.94
胃	0.23
精巣	0.72
胸腺	0.43
気管	0.40
子宮	1.00
血液 B1	2.69
血液 B10	5.43
血液 B11	5.12
血液 B12	7.94
血液 B13	3.73
血液 B14	11.59
血液 B15	5.45
血液 B4	5.78
血液 B5	7.67
血液 B6	1.59
血液 B7	5.43
血液 B8	5.88

0.00=陰性

【 0 1 8 5 】

表 3 の発現の相対レベルは、mam019 mRNA の発現が、分析されたほとんどの正常組織のプールで検出されたことを示しており、肺および乳腺が最も高く発現した。単一の個体からの血液試料は、1.59 ~ 11.59 の範囲の発現レベルを示した。

表 3 の無名数は、血液試料を除き、異なる個体からの特定の組織の試料のプールを分析す

10

20

30

40

50

ることにより得た。これらは、表 4 の単一の個体からの組織試料から得た R N A に由来する無名数と比較することができない。

【 0 1 8 6 】

表 4 は、7 8 組の対応試料における m a m 0 1 9 の相対発現レベルである無名数を示す。全ての数値は、正常子宮（キャリブレータ - ）と比較されている。対応ペアは、特定組織の癌試料からの m R N A、および同一個体の同一組織の正常隣接試料からの m R N A で形成される。さらに、1 個の非対応癌試料（卵巣由来）および 1 個の非対応正常試料（卵巣由来）もまた試験した。

【 0 1 8 7 】

【表 8】

表 4: 個別の組織試料におけるMam 019

試料ID	組織	癌	正常 隣接組織	正常	TNM分類	ステージ	腺癌の種類
Mam497M	乳腺 1	17.57	2.89		T1 N0 M0	ステージI	導管状
Mam173M	乳腺 2	0.41	1.73		T1 N0 M0	ステージI	導管状
Mam516	乳腺 3	0.71	1.92		T1c N0 MX	ステージI	導管状
Mam5621	乳腺 4	6.32	1.14		T1c N0 MX	ステージI	導管状
Mam726M	乳腺 5	0.12	2.27		T1 N1-2 MX	ステージ IIA	導管状
MamS079	乳腺 6	3.71	2.34		T1c N1-2 MX		導管状
Mam517	乳腺 7	1.04	1.44		T1c N1-2 MX		導管状
Mam59X	乳腺 8	2.11	5.05		T1c NX MX		導管状
Mam19DN	乳腺 9	6.94	5.45		T2 N0 M0	ステージ IIA	導管状
Mam522	乳腺 10	11.04	0.55		T2 N0 MX	ステージ IIA	導管状
MamS127	乳腺 11	0.00	0.04		T2 N0 MX	ステージ IIA	導管状
MamB011X	乳腺 12	0.96	11.55		T2 N0 MX	ステージ IIA	導管状
Mam51DN	乳腺 13	75.32	34.66		T2 N1 M0		導管状
Mam162X	乳腺 14	0.00	0.00		T2 N1-2 MX		導管状
MamS123	乳腺 15	0.00	0.00		T2 N1-2 MX		導管状
MamS997	乳腺 16	0.00	0.00		T2 N1-2 MX		導管状
Mam220	乳腺 17	6.28	37.27		T2 N1-2 MX		導管状
Mam245M	乳腺 18	14.72	3.78		T2 N1-2 MX	ステージ IIB	導管状
Mam543M	乳腺 19	0.32	0.05		T2 NX MX	ステージ IIB	導管状
Mam976M	乳腺 20	0.00	0.00		T2 NX MX		導管状
Mam76DN	乳腺 21	0.22	1.39		T3 N1 M0		導管状

【 0 1 8 8 】

【 表 9 】

Mam699F	乳腺	22	1.06	2.59	T3 NX MX		導管状
Mam42DN	乳腺	23	6.02	10.63	T3a N1 M0	ステージ IIIA	導管状
mamS570	乳腺	24	3.05	70.28	T1c N1-2 MX		導管状 + 小葉状
MamS918	乳腺	25	80.17	9.51	T1c NX MX		導管状 + 管状
MamS854	乳腺	26	0.00	0.03	T1c N0 MX	ステージ I	小葉状
MamS967	乳腺	27	0.00	0.00	T2 N0 MX	ステージ IIA	小葉状
Mam986	乳腺	28	4.68	7.09	T2 N0 M0	ステージ IIB	小葉状
Mam355	乳腺	29	24.34	0.06	T2 N1-2 MX	ステージ IIB	小葉状
MamS699	乳腺	30	7.36	1.78	T2 N1-2 MX		小葉状
MamA06X	乳腺	31	76.90	1.34	T3 N0 MX	ステージ IIB	小葉状
Bld32XK	膀胱 1		0.72	0.24			
Bld66X	膀胱 2		0.13	0.09			
BldTR17	膀胱 3		0.72	0.38			
Bld46XK	膀胱 4		0.14	0.19			
BldTR14	膀胱 5		0.61	0.21			
ClnB56	大腸 1		0.84	1.13			
ClnDC63	大腸 2		0.36	1.50			
CvxKS52	子宮頸管 1		11.27	1.52			
CvxNK24	子宮頸管 2		0.83	0.64			
CvxKS83	子宮頸管 3		0.18	1.48			
CvxNK23	子宮頸管 4		0.08	0.28			
Endo10479	子宮内膜 1		0.32	0.80			
Endo12XA	子宮内膜 2		0.30	1.61			
Endo5XA	子宮内膜 3		0.22	2.40			
Endo65RA	子宮内膜 4		0.00	0.00			
Endo28XA	子宮内膜 5		0.61	0.66			

【 0 1 8 9 】

【 表 1 0 】

10

20

30

40

Endo3AX	子宮内膜	6	0.43	0.00				
Kid6XD	腎臓	1	0.15	0.27				
Kid710K	腎臓	2	0.10	0.18				
Liv175L	肝臓	1	1.65	1.05				
Liv187L	肝臓	2	0.21	8.94				
Liv15XA	肝臓	3	0.13	0.06				
Lng47XQ	肺	1	0.20	11.20				
LngAC88	肺	2	5.22	9.58				
LngAC90	肺	3	0.90	1.03				
LngSQ80	肺	4	2.76	1.61				
Ovr103X	卵巣	1	0.36	0.08				
OvrA084	卵巣	2	0.39	0.11				
OvrG010	卵巣	3	0.32	0.03				
OvrG021	卵巣	4	0.05	0.21				
Ovr1118	卵巣	5	0.03					
Ovr32RA	卵巣	6			0.00			
Pan77X	膵臓	1	0.61	0.47				
Pan82XP	膵臓	2	0.50	1.59				
Pro109XB	前立腺	1	1.69	2.87				
Pro125XB	前立腺	2	0.91	0.38				
Skn248S	皮膚	1	55.33	0.26				
Skn287S	皮膚	2	0.97	1.70				
SmIntH89	小腸	1	4.63	0.09				
SmInt21XA	小腸	2	0.94	0.29				
Sto115S	胃	1	1.78	0.62				
Sto15S	胃	2	0.17	0.20				
StoMT54	胃	3	0.25	0.29				
Thr590D	甲状腺	1	0.70	0.45				
Tst647T	精巣	1	0.20	0.00				
Utr141XO	子宮	1	1.06	0.47				
Utr23XU	子宮	2	1.19	0.39				
Utr85XU	子宮	3	0.00	0.26				
Utr135XO	子宮	4	0.90	0.38				

【0190】

表4は、17種の異なる組織における158個の試料を表している。表3および表4は、合わせて26種のヒト組織における194個の試料を表している。

同一個体からの乳癌試料および正常隣接組織におけるmRNA発現レベルの比較は、表4に示してある。Mam019は正常隣接組織に比べ、31個の癌試料中11個で(35%)高レベルに発現されていた(乳腺1、4、6、10、13、18、19、25、29~31)。小葉癌のみを考慮に入れた場合、50%の組織が、正常隣接組織に比べ癌組織において過剰発現を示した(乳腺29~31)。

10

20

30

40

50

染色体位置：ヒトゲノムデータベースに対するBLASTの結果は、mam019について以下に挙げた配列（配列番号4）が、第10染色体の配列と95～100%の同一性を有することを示した。

【0191】

配列番号17、クローンID：Mam600356265F1 (mam018)

以下のプライマーを用い、リアルタイム定量PCRを行なった。

Mam018フォワード：

5' TCCATCTCCACGAGGTTGTG 3' (配列番号27)

Mam018リバーズ：

5' GCCTTGCCCTGTCTCACCAT 3' (配列番号28)

Q-PCRプローブ

5' TGTCTAACTGATGGCTCTCATGCTGTAGTG 3' (配列番号29)

【0192】

表5は、25種の異なる組織からの36個の正常試料におけるmam018の相対発現レベルである無名数を示す。全ての数値は、正常筋肉（キャリブレータ）と比較されている。これらのRNA試料は、異なる個体からの特定の組織の試料をプールすることにより作成した、商業的に入手可能なプールである。ただし、血液試料は、単一の個体からの正常試料である。

【0193】

【表11】

10

20

表 5 : プール組織試料におけるMam018

組織	正常
副腎	0.00
膀胱	0.00
脳	0.02
子宮頸管	0.00
大腸	0.00
子宮内膜	0.00
食道	0.15
心臓	0.00
腎臓	0.00
肝臓	0.00
肺	0.16
乳腺	0.78
筋肉	1.00
卵巣	0.00
膵臓	0.00
前立腺	0.00
直腸	0.00
小腸	0.00
脾臓	0.00
胃	0.00
精巣	0.00
胸腺	0.20
気管	0.14
子宮	0.00
血液 B1	0.00
血液 B10	0.00
血液 B11	0.03
血液 B12	0.00
血液 B13	0.01
血液 B14	0.05
血液 B15	0.06
血液 B4	0.00
血液 B5	0.00
血液 B6	0.00
血液 B7	0.03
血液 B8	0.05

0.00=陰性

【0194】

表5の発現の相対レベルは、mam018 mRNAの発現が、少数の分析された正常組織のプールで検出されたことを示している。

表5の無名数は、血液試料を除き、異なる個体からの特定の組織の試料のプールを分析することにより得た。これらは、表6の単一の個体からの組織試料から得たRNAに由来する無名数と比較することができない。

【0195】

表6は、73組の対応試料におけるmam018の相対発現レベルである無名数を示す。全ての数値は、正常筋肉（キャリブレータ）と比較されている。対応ペアは、特定組織の癌試料からのmRNA、および同一個体の同一組織の正常隣接試料からのmRNAで形成される。さらに、1個の非対応癌試料（卵巣由来）および1個の非対応正常試料（卵巣由来）もまた試験した。

【0196】

【表12】

表 6 : 個別の組織試料におけるMam018

試料ID	組織	癌	正常 隣接組織	正常	TNM分類	ステージ	腺癌の種類
Mam497M	乳腺	1	0.11	0.64	T1 N0 M0	ステージI	導管状
Mam173M	乳腺	2	0.08	0.56	T1 N0 M0	ステージI	導管状
MamS516	乳腺	3	0.15	0.00	T1c N0 MX	ステージI	導管状
MamS621	乳腺	4	0.05	0.00	T1c N0 MX	ステージI	導管状
Mam726M	乳腺	5	0.10	3.66	T1 N1-2 MX	ステージIIA	導管状
MamS079	乳腺	6	0.49	0.14	T1c N1-2 MX		導管状
Mam517	乳腺	7	0.00	0.00	T1c N1-2 MX		導管状
Mam59X	乳腺	8	57.68	1.14	T1c NX MX		導管状
Mam19DN	乳腺	9	1.08	0.70	T2 N0 M0	ステージIIA	導管状
Mam522	乳腺	10	0.06	0.04	T2 N0 MX	ステージIIA	導管状
MamS127	乳腺	11	0.10	0.29	T2 N0 MX	ステージIIA	導管状
MamB011X	乳腺	12	36.76	0.25	T2 N0 MX	ステージIIA	導管状
Mam51DN	乳腺	13	0.22	1.60	T2 N1 M0		導管状
Mam162X	乳腺	14	0.04	0.13	T2 N1-2 MX		導管状
MamS123	乳腺	15	0.28	0.00	T2 N1-2 MX		導管状
MamS997	乳腺	16	105.79	3.82	T2 N1-2 MX		導管状
Mam220	乳腺	17	0.22	0.00	T2 N1-2 MX		導管状
Mam245M	乳腺	18	2.94	0.38	T2 N1-2 MX	ステージIIB	導管状
Mam543M	乳腺	19	0.00	0.01	T2 NX MX	ステージIIB	導管状
Mam976M	乳腺	20	0.00	0.16	T2 NX MX		導管状
Mam76DN	乳腺	21	0.31	1.21	T3 N1 M0		導管状
Mam699F	乳腺	22	7.49	9.99	T3 NX MX		導管状
Mam42DN	乳腺	23	0.03	0.24	T3a N1 M0	ステージIIIA	導管状
MamS570	乳腺	24	0.00	0.79	T1c N1-2 MX		導管状 + 小葉状
MamS918	乳腺	25	0.07	0.22	T1c NX MX		導管状 + 管状
MamS854	乳腺	26	0.53	0.00	T1c N0 MX	Stage I	小葉状

【 0 1 9 7 】

【 表 1 3 】

MamS967	乳腺	27	0.00	0.09		T2 N0 MX	ステージIIA	小葉状
Mam986	乳腺	28	0.00	0.01		T2 N0 M0	ステージIIB	小葉状
Mam355	乳腺	29	0.04	0.04		T2 N1-2 MX	ステージIIB	小葉状
MamS699	乳腺	30	0.26	0.16		T2 N1-2 MX		小葉状
MamA06X	乳腺	31	0.07	0.05		T3 N0 MX	ステージIIB	小葉状
Bld32XK	膀胱	1	0.00	0.00				
Bld66X	膀胱	2	0.00	0.00				
BldTR17	膀胱	3	0.00	0.00				
Bld46XK	膀胱	4	0.09	0.05				
BldTR14	膀胱	5	0.12	0.15				
ClnB56	大腸	1	0.00	0.00				
ClnDC63	大腸	2	0.00	0.00				
CvxKS52	子宮頸管	1	0.01	0.00				
CvxNK24	子宮頸管	2	0.01	0.00				
CvxKS83	子宮頸管	3	0.00	0.00				
CvxNK23	子宮頸管	4	0.07	0.00				
Endo10479	子宮内膜	1	0.00	0.00				
Endo12XA	子宮内膜	2	0.00	0.06				
Endo5XA	子宮内膜	3	0.00	0.00				
Endo65RA	子宮内膜	4	0.00	0.00				
Endo28XA	子宮内膜	5	0.00	0.00				
Endo3AX	子宮内膜	6	0.00	0.00				
Kld6XD	腎臓	1	0.01	0.00				
Kld710K	腎臓	2	0.00	0.00				
Liv175L	肝臓	1	0.00	0.00				
Liv187L	肝臓	2	0.00	0.00				
Liv15XA	肝臓	3	0.00	0.00				
Lng47XQ	肺	1	0.01	0.00				
LngAC88	肺	2	0.04	0.00				
LngAC90	肺	3	0.00	0.00				
LngSQ80	肺	4	0.01	0.00				
Ovr1118	卵巣	1	0.00					
Ovr32RA	卵巣	2	0.00		0.05			

【 0 1 9 8 】

【 表 1 4 】

10

20

30

40

Pan77X	脾臓	1		0.00	0.00				
Pan82XP	脾臓	2		0.00	0.00				
Pro109XB	前立腺	1		0.00	0.00				
Skn248S	皮膚	1		0.04	0.01				
Skn287S	皮膚	2		0.09	0.01				
SmIntH89	小腸	1		0.00	0.00				
SmInt21XA	小腸	2		0.00	0.00				
Sto115S	胃	1		0.01	0.00				
Sto15S	胃	2		0.00	0.00				
StoMT54	胃	3		0.00	0.00				
Thr590D	甲状腺	1		0.00	0.00				
Tst647T	精巣	1		0.00	0.00				
Utr141XO	子宮	1		0.00	0.00				
Utr23XU	子宮	2		0.00	0.00				
Utr85XU	子宮	3		0.00	0.00				
Utr135XO	子宮	4		0.00	0.00				

0.00= 陰性

10

20

30

40

【 0 1 9 9 】

表 6 は、17 種の異なる組織における 148 個の試料を表している。表 5 および表 6 は、合わせて 27 種のヒト組織における 184 個の試料を表している。

同一個体からの乳癌試料および正常隣接組織における mRNA 発現レベルの比較は、表 6 に示してある。Mam018 は正常隣接組織に比べ、31 個の癌試料中 13 個で (42 %

50

）高レベルに発現されていた（乳腺 3、4、6、8～10、12、15～18、および 30）。

染色体位置：ヒトゲノムデータベースに対する B L A S T の結果は、m a m 0 1 8 について以下に挙げた配列（配列番号 17）が、第 2 染色体の配列と 95～100% の同一性を有することを示した。

【0200】

配列番号 18、クローン I D : M a m 6 0 0 3 7 0 5 6 8 F 1 (m a m 0 2 8)

以下のプライマーを用い、リアルタイム定量 P C R を行なった。

M a m 0 2 8 フォワード：

5' A G A G G C T A A A A G C A A C T T G T C C 3' (配列番号 30)

M a m 0 2 8 リバース：

5' G G A A A A A C T C T C A G C A A A C C T T 3' (配列番号 31)

Q - P C R プローブ

5' A G C C G T A A A C T T T C T C A T A C A C T T T G T C C A 3' (配列番号 32)

【0201】

表 7 は、24 種の異なる組織からの 24 個の正常試料における m a m 0 2 8 の相対発現レベルである無名数を示す。全ての数値は、正常脾臓（キャリブプレート）と比較されている。これらの R N A 試料は、異なる個体からの特定の組織の試料をプールすることにより作成した、商業的に入手可能なプールである。

【0202】

【表 15】

表 7：プール組織試料における Mam 028

組織	正常
副腎	0.00
膀胱	0.00
脳	0.00
子宮頸管	0.01
大腸	0.00
子宮内膜	0.00
食道	0.00
心臓	0.00
腎臓	0.00
肝臓	0.00
肺	0.14
乳腺	0.00
筋肉	0.00
卵巣	0.01
脾臓	0.01
前立腺	0.01
直腸	0.01
小腸	0.00
脾臓	1.00
胃	0.00
精巣	0.00
胸腺	9.85
気管	0.01
子宮	0.01

0.00 = 陰性

【0203】

表 7 の発現の相対レベルは、m a m 0 2 8 m R N A の発現が、少数の分析された正常組織のプールで検出されたことを示している。

表 7 の無名数は、血液試料を除き、異なる個体からの特定の組織の試料のプールを分析することにより得た。これらは、表 8 の単一の個体からの組織試料から得た R N A に由来する無名数と比較することができない。

【 0 2 0 4 】

表 8 は、4 9 組の対応試料における m a m 0 2 8 の相対発現レベルである無名数を示す。全ての数値は、正常脾臓（キャリブプレート - ）と比較されている。対応ペアは、特定組織の癌試料からの m R N A、および同一の個体の同一の組織の正常隣接試料からの m R N A で形成される。さらに、1 個の非対応癌試料（卵巣由来）および 1 個の非対応正常試料（卵巣由来）もまた試験した。

【 0 2 0 5 】

【表 1 6 】

表 8：個別の組織試料におけるMam028

試料ID	組織	癌	正常 隣接組織	正常	TNM分類	ステージ	腺癌の種類
Mam497M	乳腺 1	0.00	0.00		T1 N0 M0	ステージ I	導管状
Mam173M	乳腺 2	0.01	0.07		T1 N0 M0	ステージ I	導管状
MamS516	乳腺 3	0.03	0.00		T1c N0 MX	ステージ I	導管状
MamS621	乳腺 4	0.04	0.00		T1c N0 MX	ステージ I	導管状
Mam726M	乳腺 5	0.04	0.04		T1 N1-2 MX	ステージ IIA	導管状
MamS079	乳腺 6	0.14	0.00		T1c N1-2 MX		導管状
Mam19DN	乳腺 7	0.00	0.00		T2 N0 M0	ステージ IIA	導管状
Mam522	乳腺 8	0.01	0.00		T2 N0 MX	ステージ IIA	導管状
MamS127	乳腺 9	0.15	0.00		T2 N0 MX	ステージ IIA	導管状
Mam162X	乳腺 10	0.02	0.01		T2 N1-2 MX		導管状
MamS123	乳腺 11	0.08	0.00		T2 N1-2 MX		導管状
MamS997	乳腺 12	0.10	0.01		T2 N1-2 MX		導管状
Mam543M	乳腺 13	0.00	0.00		T2 NX MX	ステージ IIB	導管状
Mam976M	乳腺 14	0.00	0.00		T2 NX MX		導管状
Mam76DN	乳腺 15	0.63	0.07		T3 N1 M0		導管状
MamS918	乳腺 16	0.02	0.02		T1c NX MX		導管状 + 管状
MamS854	乳腺 17	0.00	0.00		T1c N0 MX	ステージ I	小葉状
MamS967	乳腺 18	0.34	0.04		T2 N0 MX	ステージ IIA	小葉状
Mam986	乳腺 19	0.02	0.00		T2 N0 M0	ステージ IIB	小葉状
Mam355	乳腺 20	0.02	0.00		T2 N1-2 MX	ステージ IIB	小葉状
MamA06X	乳腺 21	0.01	0.00		T3 N0 MX	ステージ IIB	小葉状
Blid46XK	膀胱 1	0.00	0.00				
BlidTR14	膀胱 2	0.24	0.04				
ClInB56	大腸 1	0.00	0.00				
ClInDC63	大腸 2	0.00	0.00				
CvxKS83	子宮頸管 1	0.03	0.04				
CvxNK23	子宮頸管 2	0.01	0.02				

【 0 2 0 6 】

【 表 1 7 】

10

20

30

40

Endo10479	子宮内膜	1	0.06	0.07					
Endo12XA	子宮内膜	2	0.24	0.00					
Endo5XA	子宮内膜	3	0.00	0.00					
Endo65RA	子宮内膜	4	0.00	0.00					
Endo28XA	子宮内膜	5	0.00	0.01					
Endo3AX	子宮内膜	6	0.19	0.00					
Kld6XD	腎臓	1	0.01	0.02					
Kld710K	腎臓	2	0.00	0.00					
Llv15XA	肝臓	1	0.00	0.00					
Lng47XQ	肺	1	0.04	0.00					
LngAC88	肺	2	0.84	0.09					
LngAC90	肺	3	0.24	0.00					
LngSQ80	肺	4	0.00	0.00					
Ovr1118	卵巣	1	0.01						
Ovr32RA	卵巣	2			0.06				
Pan77X	膵臓	1	0.00	0.00					
Pan82XP	膵臓	2	0.01	0.00					
SmInt21XA	小腸	1	0.01	0.01					
Sto115S	胃	1	0.57	0.25					
Sto15S	胃	2	0.01	0.07					
StoMT54	胃	3	0.00	0.00					
Thr590D	甲状腺	1	0.14	0.00					
Tst647T	精巣	1	0.01	0.00					
Utr135XO	子宮	1	0.02	0.00					

0.00= 陰性

【 0 2 0 7 】

表 8 は、15 種の異なる組織における 100 個の試料を表している。表 7 および表 8 は、合わせて 25 種のヒト組織における 124 個の試料を表している。

同一個体からの乳癌試料および正常隣接組織における mRNA 発現レベルの比較は、表 8 に示してある。Mam019 は正常隣接組織に比べ、21 個の癌試料中 13 個で (62%) 高レベルに発現されていた (乳腺 3、4、6、8~12、15、18~21)。小葉癌

10

20

30

40

50

のみを考慮に入れた場合、80%の試料が、正常隣接組織に比べ癌組織において過剰発現を示した（乳腺18～21）。

染色体位置：ヒトゲノムデータベースに対するBLASTの結果は、mam028について以下に挙げた配列（配列番号18）が、第6および第15染色体の配列と95～100%の同一性を有することを示した。

【0208】

配列番号11、クローンID：Mam600372192F1 (sqmam022)

以下のプライマーを用い、半定量PCRを行なった。

sqmam022フォワード：

5' GCAGCCTGAGGTGACTAATATCC 3' (配列番号33)

sqmam022リバーズ：

5' GCTTGTGTGAGAGTGTGCCCTAAT 3' (配列番号34)

【0209】

表9は、12種の異なる組織からの12個の正常試料におけるsqmam022の相対発現レベルである無名数を示す。これらのRNA試料は、異なる個体からの特定の組織の試料をプールすることにより作成した、商業的に入手可能なプールである。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法を用いて、デュプリケートした4段階10倍連続希釈cDNAから発現レベルを分析した。遺伝子発現を評価するために、0、1、10、100および1000の相対発現レベルを用いた。最も希釈された試料における陽性反応が、最も高い相対発現値を示す。

【0210】

【表18】

表9：正常組織試料におけるSqmam022

組織	正常
乳房	1
大腸	1
子宮内膜	0
腎臓	0
肝臓	0
肺	0
卵巣	0
前立腺	1
小腸	0
胃	0
精巣	10
子宮	0

【0211】

表9の発現の相対レベルは、正常精巣が最も高いsqmam022の発現を示し、次いで乳房、大腸および前立腺が続くことを示している。

表10は、12種の異なる組織からの12個の癌試料におけるsqmam022の発現の相対レベルである無名数を示す。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法を用いて、デュプリケートした4段階10倍連続希釈cDNAから発現レベルを分析した。遺伝子発現を評価するために、0、1、10、100および1000の相対発現レベルを用いた。最も希釈された試料における陽性反応が、最も高い相対発現値を示す。

【0212】

【表19】

表 10 : 癌組織試料におけるSqmam022

組織	癌
膀胱	0
乳房	1
大腸	0
腎臓	0
肝臓	1
肺	0
卵巣	0
脾臓	0
前立腺	0
胃	0
精巣	1
子宮	0

10

20

【0213】

表10の発現の相対レベルは、sqmam022が、乳癌、肝癌および精巣癌で発現していることを示す。

表11は、6個の乳腺癌対応試料におけるsqmam022の発現の相対レベルである無名数を示す。対応ペアは、特定組織の癌試料からのmRNA、および同一個体の同一組織の正常隣接試料からのmRNAで形成される。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技法を用いて、デュプリケートした4段階10倍連続希釈cDNAから発現レベルを分析した。遺伝子発現を評価するために、0、1、10、100および1000の相対発現レベルを用いた。最も希釈された試料における陽性反応が、最も高い相対発現値を示す。

30

【0214】

【表20】

表 11 : 乳腺癌試料におけるSqmam022

試料ID	組織	癌	正常隣接組織
S99522A/B	乳腺	1	0
4005724A2/B3	乳腺	2	0
4005599A4/B2	乳腺	3	0
4005629A2/B2	乳腺	4	1
S9822245A/B	乳腺	5	0
S9819997A/B	乳腺	6	0

40

【0215】

表11の発現の相対レベルは、sqmam022が、6個の乳腺癌試料のうち4個で発現されており、対応正常隣接組織(NAT)には発現していないことを示している。このアッセイは、sqmam022が、分析した対応試料の67%で上方調節されていることを示している。

染色体位置：ヒトゲノムデータベースに対するBLASTの結果は、sqmam022について以下に挙げた配列(配列番号11)が、第11染色体の配列と95~100%の同

50

一性を有することを示した。

【0216】

配列番号15、クローンID：Mam600370727F1 (sqmam023)

以下のプライマーを用い、半定量PCRを行なった。

sqmam023フォワード：

5' TTCCAATTATTCCTTTCTTTTGCTC 3' (配列番号35)

sqmam023リバーズ：

5' AGTGCGTGGTGATGTC TAGTG 3' (配列番号36)

【0217】

表12は、12種の異なる組織からの12個の正常試料におけるsqmam023の相対発現レベルである無名数を示す。これらのRNA試料は、異なる個体からの特定の組織の試料をプールすることにより作成した、商業的に入手可能なプールである。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技法を用いて、デュプリケートした4段階10倍連続希釈cDNAから発現レベルを分析した。遺伝子発現を評価するために、0、1、10、100および1000の相対発現レベルを用いた。最も希釈された試料における陽性反応が、最も高い相対発現値を示す。

10

【0218】

【表21】

表12：正常組織試料におけるSqmam023

20

組織	正常
乳房	100
大腸	0
子宮内膜	0
腎臓	1
肝臓	0
肺	0
卵巣	0
前立腺	1
小腸	0
胃	0
精巣	0
子宮	1

30

【0219】

表12の発現の相対レベルは、正常乳房が最も高いsqmam022の発現を示し、次いで肝臓、前立腺および子宮が続くことを示している。

表13は、12種の異なる組織からの12個の癌試料におけるsqmam023の発現の相対レベルである無名数を示す。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技法を用いて、デュプリケートした4段階10倍連続希釈cDNAから発現レベルを分析した。遺伝子発現を評価するために、0、1、10、100および1000の相対発現レベルを用いた。最も希釈された試料における陽性反応が、最も高い相対発現値を示す。

40

【0220】

【表22】

表 1 3 : 癌組織試料におけるSqmam023

組織	癌
膀胱	0
乳房	10
大腸	0
腎臓	1
肝臓	0
肺	0
卵巣	0
脾臓	0
前立腺	0
胃	0
精巣	0
子宮	0

10

【 0 2 2 1 】

20

表 1 3 の発現の相対レベルは、s q m a m 0 2 3 が、乳癌、次いで肝癌で高く発現していることを示す。

表 1 4 は、6 の乳腺癌対応試料における s q m a m 0 2 3 の発現の相対レベルである無名数を示す。対応ペアは、特定組織の癌試料からの m R N A、および同一の個体の同一の組織の正常隣接試料からの m R N A で形成される。ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 技法を用いて、デュプリケートした 4 段階 1 0 倍連続希釈 c D N A から発現レベルを分析した。遺伝子発現を評価するために、0、1、10、100 および 1000 の相対発現レベルを用いた。最も希釈された試料における陽性反応が、最も高い相対発現値を示す。

【 0 2 2 2 】

【表 2 3 】

30

表 1 4 : 乳腺癌試料におけるSqmam023

試料ID	組織	癌	正常隣接組織
S99522A/B	乳腺	1	0
4005724A2/B3	乳腺	2	1
4005599A4/B2	乳腺	3	0
4005629A2/B2	乳腺	4	1
S9822245A/B	乳腺	5	10
S9819997A/B	乳腺	6	0

40

【 0 2 2 3 】

表 1 4 の発現の相対レベルは、s q m a m 0 2 3 が、6 個の乳腺癌試料のうち 3 個で過剰発現されており、対応正常隣接組織 (N A T) には発現していないか、または、低く発現していることを示している。このアッセイは、s q m a m 0 2 2 が、分析した対応試料の 5 0 % で上方調節されていることを示している。

染色体位置 : ヒトゲノムデータベースに対する B L A S T の結果は、s q m a m 0 2 3 について以下に挙げた配列 (配列番号 1 5) が、第 1 0 染色体の配列と 9 5 ~ 1 0 0 % の同一性を、そして、同じ染色体の別の配列と 8 5 ~ 9 0 % の同一性を有することを示した。

【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
4 October 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/72780 A2

- (51) International Patent Classification: **C07K 14/00** CA 94583 (US), **RECIPON**, Herve [FR/US]; 85 Fortuna Avenue, San Francisco, CA 94115 (US), **CAFFERKEY**, Robert [IE/US]; 350 Elan Village Lane, Apartment 218, San Jose, CA 95134 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/09525
- (22) International Filing Date: 26 March 2001 (26.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/192,277 27 March 2000 (27.03.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **DI-ADEXUS, INC.**, [US/US]; 3303 Octavius Drive, Santa Clara, CA 95054 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **SALCEDA, Susana** [AR/US]; 4118 Crescendo Avenue, San Jose, CA 95136 (US), **HU, Ping** [US/US]; 108 Palmer Street, San Ramon, CA 94583 (US), **RECIPON, Herve** [FR/US]; 85 Fortuna Avenue, San Francisco, CA 94115 (US), **CAFFERKEY, Robert** [IE/US]; 350 Elan Village Lane, Apartment 218, San Jose, CA 95134 (US).
- (74) Agents: **LICATA, Jane, Massey** et al.; Licata & Tyrrell P.C., 66 E. Main Street, Marlton, NJ 08053 (US).
- (81) Designated States (national): AU, CA, JP, US.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 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 01/72780 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS OF DIGANOSING, MONITORING, STAGING, IMAGING AND TREATING MAMMARY GLAND CANCER

(57) Abstract: The present invention provides polynucleotides and polypeptides which are diagnostic markers for mammary gland cancer. In addition, antibodies immunospecific for these markers are provided. Vectors, hosts cells and methods for producing these markers, as well as methods and tools for using these markers in detecting, diagnosing, monitoring, staging, prognosticating, imaging and treating mammary gland cancer are also provided.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 1 -

COMPOSITIONS AND METHODS OF DIAGNOSING,
MONITORING, STAGING, IMAGING AND TREATING
MAMMARY GLAND CANCER

FIELD OF THE INVENTION

5 This invention relates, in part, to newly identified polynucleotides and polypeptides encoded thereby, as well as methods for producing and using these polynucleotides and polypeptides. Antibodies which are immunospecific for these polypeptides are also described. Expression of the newly
10 identified polynucleotides and levels of the polypeptides encoded thereby are upregulated in or specific to mammary gland cancer tissue. These new polynucleotides and polypeptides, referred to herein as Mammary Gland Cancer Specific Genes or MSGs are believed to be useful in assays for
15 detecting, diagnosing, monitoring, staging, prognosticating, imaging and treating cancers, particularly mammary gland cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

It is estimated that one out of every nine women in
20 America will develop mammary gland cancer sometime during her life based on a lifespan of 85 years. Annually, over 180,000 women in the United States are diagnosed with mammary gland cancer and approximately 46,000 die from this disease. Every woman is at risk for mammary gland cancer. However, a woman's
25 chances of developing this cancer increase as she grows older; 80 percent of all cancers are found in women over the age of 50. There are also several risk factors that can increase a woman's chances of developing mammary gland cancer. These include a family history of mammary gland cancer, having no
30 children or the first child after the age of 30, and an early start of menstruation. However, more than 70 percent of women

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 2 -

who develop mammary gland cancer have no known risk factors. Less than 10 percent of mammary gland cancer cases are thought to be related to the BRCA1 gene discovered in 1994. Researchers are now investigating the role of other factors
5 such as nutrition, alcohol, exercise, smoking, and oral contraceptives in development of this gynecologic cancer. Mammograms, or special x-rays of the breast, can detect more than 90 percent of all cancers.

Procedures used for detecting, diagnosing, monitoring,
10 staging, and prognosticating mammary gland cancer are of critical importance to the outcome of the patient. Patients diagnosed early generally have a much greater five-year survival rate as compared to the survival rate for patients diagnosed with distant metastasized mammary gland cancer. New
15 diagnostic methods which are more sensitive and specific for detecting early mammary gland cancer are clearly needed.

Cancer patients are closely monitored following initial therapy and during adjuvant therapy to determine response to therapy and to detect persistent or recurrent disease or
20 metastasis. Thus, there is also clearly a need for cancer markers which are more sensitive and specific in detecting mammary gland cancer recurrence.

Another important step in managing mammary gland cancer is to determine the stage of the patient's disease. Stage
25 determination has potential prognostic value and provides criteria for designing optimal therapy. Generally, pathological staging of cancer is preferable over clinical staging because the former gives a more accurate prognosis. However, clinical staging would be preferred were it at least
30 as accurate as pathological staging because it does not depend on an invasive procedure to obtain tissue for pathological evaluation. Staging of cancer would be improved by detecting new markers in cells, tissues or bodily fluids which could differentiate between different stages of invasion.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 3 -

The present invention relates to newly identified polynucleotides and polypeptides encoded thereby which are referred to herein as Mammary Gland Cancer Specific Genes or MSGs, as well as antibodies which are immunospecific for the polypeptides. The present invention also relates to methods for use of these MSGs in detecting, diagnosing, monitoring, staging, prognosticating, imaging and treating mammary gland cancer. For purposes of the present invention, MSG refers, among other things, to native protein expressed by the gene comprising a polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20. By MSG it is also meant herein polynucleotides which, due to degeneracy in genetic coding, comprise variations in nucleotide sequence as compared to SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, but which still encode the same protein. In the alternative, what is meant by MSG as used herein, means the native mRNA encoded by the gene comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, or a polynucleotide which is capable of hybridizing under stringent conditions to the antisense sequence of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20.

Other objects, features, advantages and aspects of the present invention will become apparent to those of skill in the art from the following description. It should be understood, however, that the following description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention are given by way of illustration only. Various changes and modifications within the spirit and scope of the disclosed invention will become readily apparent to those skilled in the art from reading the following description and from reading the other parts of the present disclosure.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 4 -

SUMMARY OF THE INVENTION

Toward these ends, and others, it is an object of the present invention to provide isolated polynucleotide sequences comprising SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20; fragments or portions of such sequences which contain at least 15 contiguous nucleobases of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20; nucleic acid sequences which, due to degeneracy in genetic coding, comprise variations in polynucleotide sequence as compared to SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, but which still encode the same protein; and nucleic acid sequences which are capable of hybridizing under stringent conditions to the antisense sequence of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20. The present invention further relates to isolated polypeptides encoded by the above-described polynucleotides. These polynucleotides and/or the polypeptides encoded thereby are referred to generally herein as Mammary Gland Cancer Specific Genes or MSGs.

It is another object of the present invention to provide vectors containing the MSG polynucleotides and host cells for expression and recovery of the MSG polypeptides encoded thereby.

It is another object of the present invention to provide antibodies which are immunospecific for MSG polypeptides.

It is another object of the present invention to provide tools for detection of MSGs. Such tools include, but are not limited to, antisense oligonucleotides which specifically hybridize with the MSGs and antibodies which are immunospecific for the MSGs.

It is another object of the present invention to provide a method for diagnosing the presence of mammary gland cancer by analyzing for changes in levels of MSG in cells, tissues or bodily fluids compared with levels of MSG in preferably the

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 5 -

same cells, tissues, or bodily fluid type of a normal human control, wherein a change in levels of MSG in the patient versus the normal human control is associated with mammary gland cancer.

5 Further provided is a method of diagnosing metastatic cancer in a patient having mammary gland cancer which is not known to have metastasized by identifying a human patient suspected of having mammary gland cancer that has metastasized; analyzing a sample of cells, tissues, or bodily
10 fluid from such patient for MSG; comparing the MSG levels in such cells, tissues, or bodily fluid with levels of MSG in preferably the same cells, tissues, or bodily fluid type of a normal human control, wherein an increase in MSG levels in the patient versus the normal human control is associated with
15 mammary gland cancer which has metastasized.

Also provided by the invention is a method of staging mammary gland cancer in a human which has such cancer by identifying a human patient having such cancer; analyzing a sample of cells, tissues, or bodily fluid from such patient
20 for MSG; comparing MSG levels in such cells, tissues, or bodily fluid with levels of MSG in preferably the same cells, tissues, or bodily fluid type of a normal human control sample, wherein an increase in MSG levels in the patient versus the normal human control is associated with a cancer
25 which is progressing and a decrease in the levels of MSG is associated with a cancer which is regressing or in remission.

Further provided is a method of monitoring mammary gland cancer in a human having such cancer for the onset of metastasis. The method comprises identifying a human patient
30 having such cancer that is not known to have metastasized; periodically analyzing a sample of cells, tissues, or bodily fluid from such patient for MSG; comparing the MSG levels in such cells, tissue, or bodily fluid with levels of MSG in preferably the same cells, tissues, or bodily fluid type of
35 a normal human control sample, wherein an increase in MSG

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 6 -

levels in the patient versus the normal human control is associated with a cancer which has metastasized.

Further provided is a method of monitoring the change in stage of mammary gland cancer in a human having such cancer by looking at levels of MSG in a human having such cancer. The method comprises identifying a human patient having such cancer; periodically analyzing a sample of cells, tissues, or bodily fluid from such patient for MSG; comparing the MSG levels in such cells, tissue, or bodily fluid with levels of MSG in preferably the same cells, tissues, or bodily fluid type of a normal human control sample, wherein an increase in MSG levels in the patient versus the normal human control is associated with a cancer which is progressing and a decrease in the levels of MSG is associated with a cancer which is regressing or in remission.

Further provided are new therapeutic agents and methods of identifying therapeutic agents targeted to MSGs for use in imaging and treating disease relating to MSGs such as mammary gland cancer. For example, in one embodiment, therapeutic agents such as antibodies targeted against MSG or fragments of such antibodies can be used to detect or image localization of MSG in a patient for the purpose of detecting or diagnosing a disease or condition. Such antibodies can be polyclonal, monoclonal, or omniclonal or prepared by molecular biology techniques. The term "antibody", as used herein and throughout the instant specification, is also meant to include aptamers and single-stranded oligonucleotides such as those derived from an *in vitro* evolution protocol referred to as SELEX and well known to those skilled in the art. Antibodies can be labeled with a variety of detectable labels including, but not limited to, radioisotopes and paramagnetic metals. Therapeutic agents such as small molecules or antibodies or fragments thereof which decrease the concentration and/or activity of MSG can also be used in the treatment of diseases characterized by expression of MSG. In these applications,

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 7 -

the antibody can be used without or with derivatization to a cytotoxic agent such as a radioisotope, enzyme, toxin, drug or a prodrug. Therapeutic agents of the present invention also include agonists and antagonists of MSG polypeptides and
5 vaccines capable of inducing an immune response against MSG polypeptides. Such agents can be readily identified in accordance with the teachings herein.

Other objects, features, advantages and aspects of the present invention will become apparent to those of skill in
10 the art from the following description. It should be understood, however, that the following description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only. Various changes and modifications within the spirit and scope of the
15 disclosed invention will become readily apparent to those skilled in the art from reading the following description and from reading the other parts of the present disclosure.

GLOSSARY

The following illustrative explanations are provided to
20 facilitate understanding of certain terms used frequently herein. The explanations are provided as a convenience and are not limitative of the invention.

DIGESTION of DNA refers to catalytic cleavage of the DNA with a restriction enzyme that acts only at certain sequences
25 in the DNA. The various restriction enzymes referred to herein are commercially available and their reaction conditions, cofactors and other requirements for use are known and routine to the skilled artisan.

For analytical purposes, typically, 1 μ g of plasmid or
30 DNA fragment is digested with about 2 units of enzyme in about 20 μ l of reaction buffer. For the purpose of isolating DNA fragments for plasmid construction, typically 5 to 50 μ g of DNA are digested with 20 to 250 units of enzyme in proportionately larger volumes.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 8 -

Appropriate buffers and substrate amounts for particular restriction enzymes are described in standard laboratory manuals, such as those referenced below, and they are specified by commercial suppliers.

5 Incubation times of about 1 hour at 37°C are ordinarily used, but conditions may vary in accordance with standard procedures, the supplier's instructions and the particulars of the reaction. After digestion, reactions may be analyzed, and fragments may be purified by electrophoresis through an
10 agarose or polyacrylamide gel, using well known methods that are routine for those skilled in the art.

GENETIC ELEMENT generally means a polynucleotide comprising a region that encodes a polypeptide or a region that regulates transcription or translation or other processes
15 important to expression of the polypeptide in a host cell, or a polynucleotide comprising both a region that encodes a polypeptide and a region operably linked thereto that regulates expression.

Genetic elements may be comprised within a vector that
20 replicates as an episomal element; that is, as a molecule physically independent of the host cell genome. They may be comprised within mini-chromosomes, such as those that arise during amplification of transfected DNA by methotrexate selection in eukaryotic cells. Genetic elements also may be
25 comprised within a host cell genome; not in their natural state but, rather, following manipulation such as isolation, cloning and introduction into a host cell in the form of purified DNA or in a vector, among others.

ISOLATED means altered "by the hand of man" from its
30 natural state; i.e., that, if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both.

For example, a naturally occurring polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living animal in its natural state is not "isolated," but the same polynucleotide
35 or polypeptide separated from the coexisting materials of its

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 9 -

natural state is "isolated", as the term is employed herein. For example, with respect to polynucleotides, the term isolated means that it is separated from the chromosome and cell in which it naturally occurs.

5 As part of or following isolation, such polynucleotides can be joined to other polynucleotides, such as DNAs, for mutagenesis, to form fusion proteins, and for propagation or expression in a host, for instance. The isolated polynucleotides, alone or joined to other polynucleotides such
10 as vectors, can be introduced into host cells, in culture or in whole organisms. When introduced into host cells in culture or in whole organisms, such DNAs still would be isolated, as the term is used herein, because they would not be in their naturally occurring form or environment. Similarly, the
15 polynucleotides and polypeptides may occur in a composition, such as media formulations, solutions for introduction of polynucleotides or polypeptides, for example, into cells, compositions or solutions for chemical or enzymatic reactions, for instance, which are not naturally occurring compositions,
20 and, therein remain isolated polynucleotides or polypeptides within the meaning of that term as it is employed herein.

LIGATION refers to the process of forming phosphodiester bonds between two or more polynucleotides, which most often are double-stranded DNAs. Techniques for ligation are well
25 known to the art and protocols for ligation are described in standard laboratory manuals and references, such as, for instance, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Maniatis et al., pg. 146, as
30 cited below.

OLIGONUCLEOTIDE(S) refers to relatively short polynucleotides of about 8 to about 50 nucleobases. Often the term refers to single-stranded deoxyribonucleotides, but it can refer as well to single- or double-stranded

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 10 -

ribonucleotides, RNA:DNA hybrids and double-stranded DNAs, among others.

Oligonucleotides, such as single-stranded DNA probe oligonucleotides, often are synthesized by chemical methods, such as those implemented on automated oligonucleotide synthesizers. However, oligonucleotides can be made by a variety of other methods, including *in vitro* recombinant DNA-mediated techniques and by expression of DNAs in cells and organisms.

10 Initially, chemically synthesized DNAs typically are obtained without a 5' phosphate. The 5' ends of such oligonucleotides are not substrates for phosphodiester bond formation by ligation reactions that employ DNA ligases typically used to form recombinant DNA molecules. Where
15 ligation of such oligonucleotides is desired, a phosphate can be added by standard techniques, such as those that employ a kinase and ATP.

The 3' end of a chemically synthesized oligonucleotide generally has a free hydroxyl group and, in the presence of
20 a ligase, such as T4 DNA ligase, readily will form a phosphodiester bond with a 5' phosphate of another polynucleotide, such as another oligonucleotide. As is well known, this reaction can be prevented selectively, where desired, by removing the 5' phosphates of the other
25 polynucleotide(s) prior to ligation.

PLASMIDS generally are designated herein by a lower case "p" preceded and/or followed by capital letters and/or numbers, in accordance with standard naming conventions that are familiar to those of skill in the art. Starting plasmids
30 disclosed herein are either commercially available, publicly available on an unrestricted basis, or can be constructed from available plasmids by routine application of well known, published procedures. Many plasmids and other cloning and expression vectors that can be used in accordance with the
35 present invention are well known and readily available to

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 11 -

those of skill in the art. Moreover, those of skill readily may construct any number of other plasmids suitable for use in the invention. The properties, construction and use of such plasmids, as well as other vectors, in the present invention will be readily apparent to those of skill from the present disclosure.

POLYNUCLEOTIDE(S) generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. Thus, for instance, polynucleotides as used herein refers to, among others, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, polynucleotide as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide.

As used herein, the term polynucleotide includes DNAs or RNAs as described above that contain one or more modified bases. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotides" as that term is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritylated bases, to name just two examples, are polynucleotides as the term is used herein.

It will be appreciated that a great variety of modifications have been made to DNA and RNA that serve many useful purposes known to those of skill in the art. The term polynucleotide as it is employed herein embraces such

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 12 -

chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells, including simple and complex cells, inter alia.

5 POLYPEPTIDES, as used herein, includes all polypeptides as described below. The basic structure of polypeptides is well known and has been described in innumerable textbooks and other publications in the art. In this context, the term is used herein to refer to any peptide or protein comprising two
10 or more amino acids joined to each other in a linear chain by peptide bonds. As used herein, the term refers to both short chains, which also commonly are referred to in the art as peptides, oligopeptides and oligomers, for example, and to longer chains, which generally are referred to in the art as
15 proteins, of which there are many types. It will be appreciated that polypeptides often contain amino acids other than the 20 amino acids commonly referred to as the 20 naturally occurring amino acids, and that many amino acids, including the terminal amino acids, may be modified in a given
20 polypeptide, either by natural processes, such as processing and other post-translational modifications, or by chemical modification techniques which are well known to the art. Even the common modifications that occur naturally in polypeptides are too numerous to list exhaustively here, but they are well
25 described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in voluminous research literature, and they are well known to those of skill in the art.

Known modifications which may be present in polypeptides of the present invention include, to name an illustrative few,
30 acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent
attachment of phosphatidylinositol, cross-linking,
35 cyclization, disulfide bond formation, demethylation,

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 13 -

formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, 5 proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination.

Such modifications are well known to those of skill and 10 have been described in great detail in the scientific literature. Several particularly common modifications, glycosylation, lipid attachment, sulfation, gamma-carboxylation of glutamic acid residues, hydroxylation and ADP-ribosylation, for instance, are described in most basic 15 texts, such as, for instance PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993). Many detailed reviews are available on this subject, such as, for example, those provided by Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and 20 Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990) and Rattan et al., Protein Synthesis: 25 Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992).

It will be appreciated, as is well known and as noted above, that polypeptides are not always entirely linear. For instance, polypeptides may be branched as a result of 30 ubiquitination, and they may be circular, with or without branching, generally as a result of posttranslation events, including natural processing events and events brought about by human manipulation which do not occur naturally. Circular, branched and branched circular polypeptides may be synthesized

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 14 -

by non-translation natural process and by entirely synthetic methods, as well.

Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. In fact, blockage of the amino or carboxyl group in a polypeptide, or both, by a covalent modification, is common in naturally occurring and synthetic polypeptides and such modifications may be present in polypeptides of the present invention, as well. For instance, the amino terminal residue of polypeptides made in *E. coli*, prior to proteolytic processing, almost invariably will be N-formylmethionine.

The modifications that occur in a polypeptide often will be a function of how it is made. For polypeptides made by expressing a cloned gene in a host, for instance, the nature and extent of the modifications in large part will be determined by the host cell posttranslational modification capacity and the modification signals present in the polypeptide amino acid sequence. For instance, as is well known, glycosylation often does not occur in bacterial hosts such as *E. coli*. Accordingly, when glycosylation is desired, a polypeptide should be expressed in a glycosylating host, generally a eukaryotic cell. Insect cells often carry out the same posttranslational glycosylations as mammalian cells and, for this reason, insect cell expression systems have been developed to express efficiently mammalian proteins having native patterns of glycosylation, *inter alia*. Similar considerations apply to other modifications.

It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degree at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications.

In general, as used herein, the term polypeptide encompasses all such modifications, particularly those that

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 15 -

are present in polypeptides synthesized by expressing a polynucleotide in a host cell.

VARIANT(S) of polynucleotides or polypeptides, as the term is used herein, are polynucleotides or polypeptides that
5 differ from a reference polynucleotide or polypeptide, respectively. Variants in this sense are described below and elsewhere in the present disclosure in greater detail.

A variant may comprise a polynucleotide that differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide.
10 Generally, differences are limited so that the nucleotide sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical.

As noted below, changes in the nucleotide sequence of the variant may be silent. That is, they may not alter the amino
15 acids encoded by the polynucleotide. Where alterations are limited to silent changes of this type a variant will encode a polypeptide with the same amino acid sequence as the reference. Also as noted below, changes in the nucleotide sequence of the variant may alter the amino acid sequence of
20 a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Such nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below.

25 A variant may also comprise a polypeptide that differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical.

30 A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions, fusions and truncations, which may be present in any combination.

RECEPTOR MOLECULE, as used herein, refers to molecules
35 which bind or interact specifically with MSG polypeptides of

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 16 -

the present invention and is inclusive not only of classic receptors, which are preferred, but also other molecules that specifically bind to or interact with polypeptides of the invention (which also may be referred to as "binding molecules" and "interaction molecules," respectively and as "MSG binding or interaction molecules". Binding between polypeptides of the invention and such molecules, including receptor or binding or interaction molecules may be exclusive to polypeptides of the invention, which is very highly preferred, or it may be highly specific for polypeptides of the invention, which is highly preferred, or it may be highly specific to a group of proteins that includes polypeptides of the invention, which is preferred, or it may be specific to several groups of proteins at least one of which includes polypeptides of the invention.

Receptors also may be non-naturally occurring, such as antibodies and antibody-derived reagents that bind to polypeptides of the invention.

20 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Polynucleotides and polypeptides

The present invention relates to newly identified isolated polynucleotides and polypeptides encoded thereby which are upregulated in or specific to mammary gland cancer tissue. These polynucleotides and the polypeptides encoded thereby are believed to be useful as diagnostic markers for cancer, and in particular mammary gland cancer. The polynucleotides and polypeptides are also useful in the development of imaging agents and therapeutic agents for cancer, and in particular mammary gland cancer.

For purposes of the present invention, by polynucleotides it is meant to include isolated nucleic acid sequences comprising single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single and double-stranded RNA or hybrids thereof wherein the sequences

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 17 -

comprise SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, fragments of at least 15 contiguous nucleobases of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, nucleic acid sequences which, due to degeneracy in genetic coding, comprise variations in polynucleotide sequence as compared to SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, but which still encode the same protein, and nucleic acid sequences which are capable of hybridizing under stringent conditions to the antisense sequence of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20. By stringent conditions it is meant that hybridization will occur only if there is at least 95%, and more preferably at least 97% identity between the sequences. RNA sequences may be in the form of mRNA while DNA sequences may be in the form of cDNA or genomic DNA obtained by cloning or produced by chemical synthetic techniques or by a combination thereof. As used herein, the term polynucleotide also includes DNAs or RNAs, as described above, that contain one or more modified bases. Examples of modified bases include, but are not limited to, backbone modifications to increase stability and incorporation of unusual bases such as inosine or tritylated bases.

For purposes of the present invention, by polypeptides it is meant to include the recombinant, natural and synthetic polypeptides with amino acid sequences encoded by the polynucleotides of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, or fragments or variants thereof with similar activities and/or levels in cancerous tissues to the amino acid sequences encoded by the polynucleotides of the present invention. Among preferred variants are those that vary from the polypeptides encoded by SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20 by conservative amino acid substitutions. Conservative amino acid substitutions typically include

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 18 -

replacement, one for another, of the aliphatic amino acids such as Ala, Val, Leu and Ile, the hydroxyl residues Ser and Thr, the acidic residues Asp and Glu, the amide residues Asn and Gln, the basic residues Lys and Arg, and the aromatic
5 residues Phe and Tyr.

Using suppression subtractive hybridization, it has now been found that these polynucleotides, and the polypeptides encoded thereby, are upregulated in, or specific to, mammary gland cancer tissue. Thus, it is believed that these
10 polynucleotides and polypeptides, also referred to herein as Mammary Gland Cancer Specific Genes or MSGs, are useful as diagnostic markers for mammary gland cancer, as well as otherwise described herein.

Fragments

15 Also among preferred embodiments of this aspect of the present invention are polypeptides comprising fragments of MSGs, and fragments of variants and derivatives of the MSGs.

In this regard a fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that entirely is the same as part but not
20 all of the amino acid sequences encoded by the MSGs of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20 and variants or derivatives thereof.

Such fragments may be "free-standing," i.e., not part of or fused to other amino acids or polypeptides, or they may be
25 comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region. When comprised within a larger polypeptide, the presently discussed fragments most preferably form a single continuous region. However, several fragments may be comprised within a single larger polypeptide. For instance,
30 certain preferred embodiments relate to a fragment of a MSG polypeptide of the present comprised within a precursor polypeptide designed for expression in a host and having heterologous pre- and pro-polypeptide regions fused to the amino terminus of the MSG fragment and an additional region
35 fused to the carboxyl terminus of the fragment. Therefore,

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 19 -

fragments in one aspect of the meaning intended herein, refers to the portion or portions of a fusion polypeptide or fusion protein derived from a MSG of the present invention.

As representative examples of polypeptide fragments of the invention, there may be mentioned those which have from about 15 to about 139 amino acids.

In this context "about" includes the particularly recited range and ranges larger or smaller by several, a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid at either extreme or at both extremes. Highly preferred in this regard are the recited ranges plus or minus as many as 5 amino acids at either or at both extremes. Particularly highly preferred are the recited ranges plus or minus as many as 3 amino acids at either or at both the recited extremes. Especially preferred are ranges plus or minus 1 amino acid at either or at both extremes or the recited ranges with no additions or deletions. Most highly preferred of all in this regard are fragments from about 15 to about 45 amino acids.

Among especially preferred fragments of the invention are truncation mutants of the MSGs. Truncation mutants include MSG polypeptides encoded by SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20, or variants or derivatives thereof, except for deletion of a continuous series of residues (that is, a continuous region, part or portion) that includes the amino terminus, or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or, as in double truncation mutants, deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus. Fragments having the size ranges set out above also are preferred embodiments of truncation fragments, which are especially preferred among fragments generally.

Also preferred in this aspect of the invention are fragments characterized by structural or functional attributes of the MSGs. Preferred embodiments of the invention in this

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 20 -

regard include fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions ("alpha-regions"), beta-sheet and beta-sheet-forming regions ("beta-regions"), turn and turn-forming regions ("turn-regions"), coil and coil-forming regions ("coil-regions"), hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions and high antigenic index regions of MSGs. Garnier-Robson alpha-regions, beta-regions, turn-regions and coil-regions, Chou-Fasman alpha-regions, beta-regions and turn-regions, Kyte-Doolittle hydrophilic regions and hydrophilic regions, Eisenberg alpha and beta amphipathic regions, Karplus-Schulz flexible regions, Emini surface-forming regions and Jameson-Wolf high antigenic index regions are particularly preferred. Among highly preferred fragments in this regard are those that comprise regions of MSGs that combine several structural features, such as several of the features set out above. Such regions may be comprised within a larger polypeptide or may be by themselves a preferred fragment of the present invention, as discussed above. It will be appreciated that the term "about" as used in this paragraph has the meaning set out above regarding fragments in general.

Further preferred regions are those that mediate activities of MSGs. Most highly preferred in this regard are fragments that have a chemical, biological or other activity of a MSG, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Highly preferred in this regard are fragments that contain regions that are homologs in sequence, or in position, or in both sequence and to active regions of related polypeptides, and which include mammary gland specific-binding proteins. Among particularly preferred fragments in these regards are truncation mutants, as discussed above.

It will be appreciated that the invention also relates to, among others, polynucleotides encoding the aforementioned

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 21 -

fragments, polynucleotides that hybridize to polynucleotides encoding the fragments, particularly those that hybridize under stringent conditions, and polynucleotides, such as PCR primers, for amplifying polynucleotides that encode the fragments. In these regards, preferred polynucleotides are those that correspondent to the preferred fragments, as discussed above.

Vectors, host cells, expression

The present invention also relates to vectors which include polynucleotides of the present invention, host cells which are genetically engineered with vectors of the invention and the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques.

Host cells can be genetically engineered to incorporate polynucleotides and express polypeptides of the present invention. For instance, polynucleotides may be introduced into host cells using well known techniques of infection, transduction, transfection, transvection and transformation. The polynucleotides may be introduced alone or with other polynucleotides. Such other polynucleotides may be introduced independently, co-introduced or introduced joined to the polynucleotides of the invention.

Thus, for instance, polynucleotides of the invention may be transfected into host cells with another, separate, polynucleotide encoding a selectable marker, using standard techniques for co-transfection and selection in, for instance, mammalian cells. In this case the polynucleotides generally will be stably incorporated into the host cell genome.

Alternatively, the polynucleotides may be joined to a vector containing a selectable marker for propagation in a host. The vector construct may be introduced into host cells by the aforementioned techniques. Generally, a plasmid vector is introduced as DNA in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid. Electroporation also may be used to introduce polynucleotides

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 22 -

into a host. If the vector is a virus, it may be packaged *in vitro* or introduced into a packaging cell and the packaged virus may be transduced into cells. A wide variety of techniques suitable for making polynucleotides and for introducing polynucleotides into cells in accordance with this aspect of the invention are well known and routine to those of skill in the art. Such techniques are reviewed at length in Sambrook et al. cited above, which is illustrative of the many laboratory manuals that detail these techniques. In accordance with this aspect of the invention the vector may be, for example, a plasmid vector, a single- or double-stranded phage vector, or a single- or double-stranded RNA or DNA viral vector. Such vectors may be introduced into cells as polynucleotides, preferably DNA, by well known techniques for introducing DNA and RNA into cells. The vectors, in the case of phage and viral vectors also may be and preferably are introduced into cells as packaged or encapsidated virus by well known techniques for infection and transduction. Viral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

Preferred among vectors, in certain respects, are those for expression of polynucleotides and polypeptides of the present invention. Generally, such vectors comprise *cis*-acting control regions effective for expression in a host operatively linked to the polynucleotide to be expressed. Appropriate trans-acting factors either are supplied by the host, supplied by a complementing vector or supplied by the vector itself upon introduction into the host.

In certain preferred embodiments in this regard, the vectors provide for specific expression. Such specific expression may be inducible expression or expression only in certain types of cells or both inducible and cell-specific. Particularly preferred among inducible vectors are vectors that can be induced for expression by environmental factors

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 23 -

that are easy to manipulate, such as temperature and nutrient additives. A variety of vectors suitable to this aspect of the invention, including constitutive and inducible expression vectors for use in prokaryotic and eukaryotic hosts, are well
5 known and employed routinely by those of skill in the art.

The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media, which may be modified as appropriate for, inter alia, activating promoters, selecting transformants or amplifying genes. Culture conditions, such as temperature, pH
10 and the like, previously used with the host cell selected for expression generally will be suitable for expression of polypeptides of the present invention as will be apparent to those of skill in the art.

A great variety of expression vectors can be used to
15 express a polypeptide of the invention. Such vectors include chromosomal, episomal and virus-derived vectors e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from yeast episomes, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia
20 viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids, all may be used for expression in accordance with this aspect of the
25 present invention. Generally, any vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides to express a polypeptide in a host may be used for expression in this regard.

The appropriate DNA sequence may be inserted into the vector by any of a variety of well-known and routine
30 techniques. In general, a DNA sequence for expression is joined to an expression vector by cleaving the DNA sequence and the expression vector with one or more restriction endonucleases and then joining the restriction fragments together using T4 DNA ligase. Procedures for restriction and
35 ligation that can be used to this end are well known and

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 24 -

routine to those of skill. Suitable procedures in this regard, and for constructing expression vectors using alternative techniques, which also are well known and routine to those skill, are set forth in great detail in Sambrook et al. cited
5 elsewhere herein.

The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to appropriate expression control sequence(s), including, for instance, a promoter to direct mRNA transcription. Representatives of such promoters include the
10 phage lambda PL promoter, the *E. coli* lac, trp and tac promoters, the SV40 early and late promoters and promoters of retroviral LTRs, to name just a few of the well-known promoters. It will be understood that numerous promoters not mentioned are suitable for use in this aspect of the invention
15 are well known and readily may be employed by those of skill in the manner illustrated by the discussion and the examples herein.

In general, expression constructs will contain sites for transcription initiation and termination, and, in the
20 transcribed region, a ribosome binding site for translation. The coding portion of the mature transcripts expressed by the constructs will include a translation initiating AUG at the beginning and a termination codon appropriately positioned at the end of the polypeptide to be translated.

25 In addition, the constructs may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, in accordance with many commonly practiced procedures, such regions will operate by controlling transcription, such as repressor binding sites and enhancers, among others.

30 Vectors for propagation and expression generally will include selectable markers. Such markers also may be suitable for amplification or the vectors may contain additional markers for this purpose. In this regard, the expression vectors preferably contain one or more selectable marker genes
35 to provide a phenotypic trait for selection of transformed

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 25 -

host cells. Preferred markers include dihydrofolate reductase or neomycin resistance for eukaryotic cell culture, and tetracycline or ampicillin resistance genes for culturing *E. coli* and other bacteria.

5 The vector containing the appropriate DNA sequence as described elsewhere herein, as well as an appropriate promoter, and other appropriate control sequences, may be introduced into an appropriate host using a variety of well known techniques suitable to expression therein of a desired
10 polypeptide. Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces* and *Salmonella typhimurium* cells; fungal cells, such as yeast cells; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS and Bowes melanoma cells;
15 and plant cells. Hosts for a great variety of expression constructs are well known, and those of skill will be enabled by the present disclosure readily to select a host for expressing a polypeptides in accordance with this aspect of the present invention.

20 More particularly, the present invention also includes recombinant constructs, such as expression constructs, comprising one or more of the sequences described above. The constructs comprise a vector, such as a plasmid or viral vector, into which such a sequence of the invention has been
25 inserted. The sequence may be inserted in a forward or reverse orientation. In certain preferred embodiments in this regard, the construct further comprises regulatory sequences, including, for example, a promoter, operably linked to the sequence. Large numbers of suitable vectors and promoters are
30 known to those of skill in the art, and there are many commercially available vectors suitable for use in the present invention.

 The following vectors, which are commercially available, are provided by way of example. Among vectors preferred for
35 use in bacteria are pQE70, pQE60 and pQE-9, available from

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 26 -

Qiagen; pBS vectors, Phagescript vectors, Bluescript vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, available from Stratagene; and ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 available from Pharmacia. Among preferred eukaryotic vectors are PWLNEO, 5 pSV2CAT, pOG44, pXT1 and pSG available from Stratagene; and pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL available from Pharmacia. These vectors are listed solely by way of illustration of the many commercially available and well known vectors that are available to those of skill in the art for use in accordance 10 with this aspect of the present invention. It will be appreciated that any other plasmid or vector suitable for, for example, introduction, maintenance, propagation or expression of a polynucleotide or polypeptide of the invention in a host may be used in this aspect of the invention.

15 Promoter regions can be selected from any desired gene using vectors that contain a reporter transcription unit lacking a promoter region, such as a chloramphenicol acetyl transferase ("cat") transcription unit, downstream of restriction site or sites for introducing a candidate promoter 20 fragment; i.e., a fragment that may contain a promoter. As is well known, introduction into the vector of a promoter-containing fragment at the restriction site upstream of the cat gene engenders production of CAT activity, which can be detected by standard CAT assays. Vectors suitable to this end 25 are well known and readily available. Two such vectors are pKK232-8 and pCM7. Thus, promoters for expression of polynucleotides of the present invention include not only well known and readily available promoters, but also promoters that readily may be obtained by the foregoing technique, using a 30 reporter gene.

Among known bacterial promoters suitable for expression of polynucleotides and polypeptides in accordance with the present invention are the *E. coli* lacI and lacZ and promoters, the T3 and T7 promoters, the gpt promoter, the lambda PR, PL 35 promoters and the trp promoter. Among known eukaryotic

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 27 -

promoters suitable in this regard are the CMV immediate early promoter, the HSV thymidine kinase promoter, the early and late SV40 promoters, the promoters of retroviral LTRs, such as those of the Rous sarcoma virus ("RSV"), and 5 metallothionein promoters, such as the mouse metallothionein-I promoter.

Selection of appropriate vectors and promoters for expression in a host cell is a well known procedure and the requisite techniques for expression vector construction, 10 introduction of the vector into the host and expression in the host are routine skills in the art.

The present invention also relates to host cells containing the above-described constructs discussed above. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian 15 cell, or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell.

Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, 20 electroporation, transduction, infection or other methods. Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al. BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986).

Constructs in host cells can be used in a conventional 25 manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence. Alternatively, the polypeptides of the invention can be synthetically produced by conventional peptide synthesizers.

Mature proteins can be expressed in mammalian cells, 30 yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and 35 eukaryotic hosts are described by Sambrook et al., MOLECULAR

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 28 -

CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication, a promoter derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence, and a selectable marker to permit isolation of vector containing cells after exposure to the vector. Among suitable promoters are those derived from the genes that encode glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase ("PGK"), α -factor, acid phosphatase, and heat shock proteins, among others. Selectable markers include the ampicillin resistance gene of *E. coli* and the *trp1* gene of *S. cerevisiae*.

Transcription of the DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp that act to increase transcriptional activity of a promoter in a given host cell-type. Examples of enhancers include the SV40 enhancer, which is located on the late side of the replication origin at bp 100 to 270, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.

Polynucleotides of the invention, encoding the heterologous structural sequence of a polypeptide of the invention generally will be inserted into the vector using standard techniques so that it is operably linked to the promoter for expression. The polynucleotide will be positioned so that the transcription start site is located appropriately 5' to a ribosome binding site. The ribosome binding site will be 5' to the AUG that initiates translation of the polypeptide to be expressed. Generally, there will be no other open reading frames that begin with an initiation codon, usually AUG, and lie between the ribosome binding site and the initiating AUG. Also, generally, there will be a translation

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 29 -

stop codon at the end of the polypeptide and there will be a polyadenylation signal and a transcription termination signal appropriately disposed at the 3' end of the transcribed region.

5 For secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be incorporated into the expressed polypeptide. The signals may be endogenous to the polypeptide or they may
10 be heterologous signals.

The polypeptide may be expressed in a modified form, such as a fusion protein, and may include not only secretion signals but also additional heterologous functional regions. Thus, for instance, a region of additional amino acids,
15 particularly charged amino acids, may be added to the N-terminus of the polypeptide to improve stability and persistence in the host cell, during purification or during subsequent handling and storage. A region also may be added to the polypeptide to facilitate purification. Such regions
20 may be removed prior to final preparation of the polypeptide. The addition of peptide moieties to polypeptides to engender secretion or excretion, to improve stability and to facilitate purification, among others, are familiar and routine techniques in the art.

25 Suitable prokaryotic hosts for propagation, maintenance or expression of polynucleotides and polypeptides in accordance with the invention include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium*. Various species of *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus* are suitable
30 hosts in this regard. Moreover, many other hosts also known to those of skill may be employed in this regard.

As a representative but non-limiting example, useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from
35 commercially available plasmids comprising genetic elements

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 30 -

of the well known cloning vector pBR322. Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with
5 an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed.

Following transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, where the selected promoter is inducible it is induced by
10 appropriate means (e.g., temperature shift or exposure to chemical inducer) and cells are cultured for an additional period.

Cells typically then are harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting
15 crude extract retained for further purification. Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents, such methods are well know to those skilled in the
20 art.

Various mammalian cell culture systems can be employed for expression, as well. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblast, described in Gluzman et al., Cell 23: 175 (1981). Other cell
25 lines capable of expressing a compatible vector include for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa, human kidney 293 and BHK cell lines.

Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any
30 necessary ribosome binding sites, polyadenylation sites, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking non-transcribed sequences that are necessary for expression. In certain preferred embodiments in this regard DNA sequences derived from the SV40 splice sites,

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 31 -

and the SV40 polyadenylation sites are used for required non-transcribed genetic elements of these types.

The MSG polypeptide can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography ("HPLC") is employed for purification. Well known techniques for refolding protein may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during isolation and or purification.

Polypeptides of the present invention include naturally purified products, products of chemical synthetic procedures, and products produced by recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host, including, for example, bacterial, yeast, higher plant, insect and mammalian cells. Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. In addition, polypeptides of the invention may also include an initial modified methionine residue, in some cases as a result of host-mediated processes.

MSG polynucleotides and polypeptides may be used in accordance with the present invention for a variety of applications, particularly those that make use of the chemical and biological properties of the MSGs. Additional applications relate to diagnosis and to treatment of disorders of cells, tissues and organisms. These aspects of the invention are illustrated further by the following discussion.

Antibodies

The MSG polypeptides of the invention or their fragments or variants thereof, or cells expressing them can be used as immunogens to produce antibodies immunospecific for the MSG

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 32 -

polypeptides. The term "immunospecific" means that the antibodies have substantially greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art. These antibodies can be polyclonal or monoclonal. In addition, by the term "antibody", it is meant to include chimeric, single chain and humanized and fully human antibodies as well as Fab fragments or products of Fab expression libraries.

Antibodies generated against the MSG polypeptides can be obtained by administering the polypeptides or epitope-bearing fragments, variants or cells to an animal, preferably a nonhuman, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* (1975) 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., *Immunology Today* (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Techniques for the production of single chain antibodies (U.S. Patent No. 4,946,778) can also be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms including other mammals, can be used to express humanized antibodies.

The above-described antibodies can be used to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or to purify the polypeptides by affinity chromatography.

Antibodies against MSG polypeptides can also be used to treat mammary gland cancer, among others.

Diagnostic Tools

The present invention also relates to diagnostic tools such as antibodies which are immunospecific for MSGs or labeled oligonucleotide probes which hybridize to MSGs.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 33 -

Antibodies immunospecific for MSGs are described in detail in the preceding section.

Antisense oligonucleotides which hybridize to a portion of a polynucleotide of the present invention can be chemically synthesized via an automated oligonucleotide synthesizer or produced via alternative methods such as *in vitro* recombinant DNA-mediated techniques and by expression of DNA in cells and organisms. Most often oligonucleotides comprise single-stranded deoxyribonucleotides. However, oligonucleotides may also comprise single-or double-stranded ribonucleotide, RNA:DNA hybrids and double-stranded DNAs.

Methods of Use

The present invention also relates to assays and methods, both quantitative and qualitative, for detecting, diagnosing, monitoring, staging and prognosticating cancers by comparing levels of MSG in a human patient with those of MSG in a normal human control. For purposes of the present invention, what is meant by "MSG levels" is, among other things, native protein expressed by a polynucleotide sequence comprising SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20. By "MSG" it is also meant herein polynucleotides which, due to degeneracy in genetic coding, comprise variations in nucleotide sequence as compared to SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, but which still encode the same protein. The native protein being detected may be whole, a breakdown product, a complex of molecules or chemically modified. In the alternative, what is meant by "MSG" as used herein, means the native mRNA encoded by the gene comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, or a polynucleotide which is capable of hybridizing under stringent conditions to the antisense sequence of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20. Such levels are preferably determined in at least one of

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 34 -

cells, tissues and/or bodily fluids, including determination of normal and abnormal levels. Thus, for instance, a diagnostic assay in accordance with the invention for diagnosing overexpression of MSG protein compared to normal control bodily fluids, cells, or tissue samples may be used to diagnose the presence of mammary gland cancer.

All the methods of the present invention may optionally include determining the levels of other cancer markers as well as MSG. Other cancer markers, in addition to MSG, useful in the present invention will depend on the cancer being tested and are known to those of skill in the art.

Diagnostic Assays

The present invention provides methods for diagnosing the presence of cancer, and in particular mammary gland cancer, by analyzing for changes in levels of MSG in cells, tissues or bodily fluids compared with levels of MSG in cells, tissues or bodily fluids of preferably the same type from a normal human control, wherein an increase in levels of MSG in the patient versus the normal human control is associated with the presence of mammary gland cancer.

Without limiting the instant invention, typically, for a quantitative diagnostic assay a positive result indicating the patient being tested has cancer is one in which cells, tissues or bodily fluid levels of the cancer marker, such as MSG, are at least two times higher, and most preferably are at least five times higher, than in preferably the same cells, tissues or bodily fluid of a normal human control.

The present invention also provides a method of diagnosing metastatic mammary gland cancer in a patient having mammary gland cancer which has not yet metastasized for the onset of metastasis. In the method of the present invention, a human cancer patient suspected of having mammary gland cancer which may have metastasized (but which was not previously known to have metastasized) is identified. This

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 35 -

is accomplished by a variety of means known to those of skill in the art.

In the present invention, determining the presence of MSG levels in cells, tissues or bodily fluid, is particularly useful for discriminating between mammary gland cancer which has not metastasized and mammary gland cancer which has metastasized. Existing techniques have difficulty discriminating between mammary gland cancer which has metastasized and mammary gland cancer which has not metastasized and proper treatment selection is often dependent upon such knowledge.

In the present invention, the cancer marker levels are measured in such cells, tissues or bodily fluid is MSG, and are then compared with levels of MSG in preferably the same cells, tissue or bodily fluid type of a normal human control. That is, if the cancer marker being observed is MSG in serum, this level is preferably compared with the level of MSG in serum of a normal human control. An increase in the MSG in the patient versus the normal human control is associated with mammary gland cancer which has metastasized.

Without limiting the instant invention, typically, for a quantitative diagnostic assay a positive result indicating the cancer in the patient being tested or monitored has metastasized is one in which cells, tissues or bodily fluid levels of the cancer marker, such as MSG, are at least two times higher, and most preferably are at least five times higher, than in preferably the same cells, tissues or bodily fluid of a normal patient.

Normal human control as used herein includes a human patient without cancer and/or non cancerous samples from the patient. In the methods for diagnosing or monitoring for metastasis, normal human control may preferably also include samples from a human patient that is determined by reliable methods to have mammary gland cancer which has not metastasized.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 36 -

Staging

The invention also provides a method of staging mammary gland cancer in a human patient. The method comprises identifying a human patient having such cancer and analyzing
5 cells, tissues or bodily fluid from such human patient for MSG. The MSG levels determined in the patient are then compared with levels of MSG in preferably the same cells, tissues or bodily fluid type of a normal human control, wherein an increase in MSG levels in the human patient versus
10 the normal human control is associated with a cancer which is progressing and a decrease in the levels of MSG (but still increased over true normal levels) is associated with a cancer which is regressing or in remission.

Monitoring

15 Further provided is a method of monitoring mammary gland cancer in a human patient having such cancer for the onset of metastasis. The method comprises identifying a human patient having such cancer that is not known to have metastasized; periodically analyzing cells, tissues or bodily fluid from
20 such human patient for MSG; and comparing the MSG levels determined in the human patient with levels of MSG in preferably the same cells, tissues or bodily fluid type of a normal human control, wherein an increase in MSG levels in the human patient versus the normal human control is associated
25 with a cancer which has metastasized. In this method, normal human control samples may also include prior patient samples.

Further provided by this invention is a method of monitoring the change in stage of mammary gland cancer in a human patient having such cancer. The method comprises
30 identifying a human patient having such cancer; periodically analyzing cells, tissues or bodily fluid from such human patient for MSG; and comparing the MSG levels determined in the human patient with levels of MSG in preferably the same cells, tissues or bodily fluid type of a normal human control,
35 wherein an increase in MSG levels in the human patient versus

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 37 -

the normal human control is associated with a cancer which is progressing in stage and a decrease in the levels of MSG is associated with a cancer which is regressing in stage or in remission. In this method, normal human control samples may
5 also include prior patient samples.

Monitoring a patient for onset of metastasis is periodic and preferably done on a quarterly basis. However, this may be done more or less frequently depending on the cancer, the particular patient, and the stage of the cancer.

10 ***Prognostic Testing and Clinical Trial Monitoring***

The methods described herein can further be utilized as prognostic assays to identify subjects having or at risk of developing a disease or disorder associated with increased levels of MSG. The present invention provides a method in
15 which a test sample is obtained from a human patient and MSG is detected. The presence of higher MSG levels as compared to normal human controls is diagnostic for the human patient being at risk for developing cancer, particularly mammary gland cancer.

20 The effectiveness of therapeutic agents to decrease expression or activity of the MSGs of the invention can also be monitored by analyzing levels of expression of the MSGs in a human patient in clinical trials or in *in vitro* screening assays such as in human cells. In this way, the gene
25 expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the human patient, or cells as the case may be, to the agent being tested.

Detection of genetic lesions or mutations

The methods of the present invention can also be used to
30 detect genetic lesions or mutations in MSG, thereby determining if a human with the genetic lesion is at risk for mammary gland cancer or has mammary gland cancer. Genetic lesions can be detected, for example, by ascertaining the existence of a deletion and/or addition and/or substitution
35 of one or more nucleotides from the MSGs of this invention,

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 38 -

a chromosomal rearrangement of MSG, aberrant modification of MSG (such as of the methylation pattern of the genomic DNA), the presence of a non-wild type splicing pattern of a mRNA transcript of MSG, allelic loss of MSG, and/or inappropriate post-translational modification of MSG protein. Methods to detect such lesions in the MSGs of this invention are known to those of skill in the art.

Assay Techniques

Assay techniques that can be used to determine levels of gene expression (including protein levels), such as MSG of the present invention, in a sample derived from a patient are well known to those of skill in the art. Such assay methods include, without limitation, radioimmunoassays, reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assays, immunohistochemistry assays, *in situ* hybridization assays, competitive-binding assays, Western Blot analyses, ELISA assays and proteomic approaches: two-dimensional gel electrophoresis (2D electrophoresis) and non-gel based approaches such as mass spectrometry or protein interaction profiling. Among these, ELISAs are frequently preferred to diagnose a gene's expressed protein in biological fluids.

An ELISA assay initially comprises preparing an antibody, if not readily available from a commercial source, specific to MSG, preferably a monoclonal antibody. In addition a reporter antibody generally is prepared which binds specifically to MSG. The reporter antibody is attached to a detectable reagent such as radioactive, fluorescent or enzymatic reagent, for example horseradish peroxidase enzyme or alkaline phosphatase.

To carry out the ELISA, antibody specific to MSG is incubated on a solid support, e.g. a polystyrene dish, that binds the antibody. Any free protein binding sites on the dish are then covered by incubating with a non-specific protein such as bovine serum albumin. Next, the sample to be analyzed is incubated in the dish, during which time MSG binds

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 39 -

to the specific antibody attached to the polystyrene dish. Unbound sample is washed out with buffer. A reporter antibody specifically directed to MSG and linked to a detectable reagent such as horseradish peroxidase is placed in the dish
5 resulting in binding of the reporter antibody to any monoclonal antibody bound to MSG. Unattached reporter antibody is then washed out. Reagents for peroxidase activity, including a colorimetric substrate are then added to the dish. Immobilized peroxidase, linked to MSG
10 antibodies, produces a colored reaction product. The amount of color developed in a given time period is proportional to the amount of MSG protein present in the sample. Quantitative results typically are obtained by reference to a standard curve.

15 A competition assay can also be employed wherein antibodies specific to MSG are attached to a solid support and labeled MSG and a sample derived from the host are passed over the solid support. The amount of label detected which is attached to the solid support can be correlated to a quantity
20 of MSG in the sample.

Using all or a portion of a nucleic acid sequence of a MSG of the present invention as a hybridization probe, nucleic acid methods can also be used to detect MSG mRNA as a marker for mammary gland cancer. Polymerase chain reaction (PCR) and
25 other nucleic acid methods, such as ligase chain reaction (LCR) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA), can be used to detect malignant cells for diagnosis and monitoring of various malignancies. For example, reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) is a powerful technique which can
30 be used to detect the presence of a specific mRNA population in a complex mixture of thousands of other mRNA species. In RT-PCR, an mRNA species is first reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) with use of the enzyme reverse transcriptase; the cDNA is then amplified as in a standard PCR
35 reaction. RT-PCR can thus reveal by amplification the

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 40 -

presence of a single species of mRNA. Accordingly, if the mRNA is highly specific for the cell that produces it, RT-PCR can be used to identify the presence of a specific type of cell.

- 5 Hybridization to clones or oligonucleotides arrayed on a solid support (i.e. gridding) can be used to both detect the expression of and quantitate the level of expression of that gene. In this approach, a cDNA encoding the MSG gene is fixed to a substrate. The substrate may be of any suitable type including but not limited to glass, nitrocellulose, nylon or plastic. At least a portion of the DNA encoding the MSG gene is attached to the substrate and then incubated with the analyte, which may be RNA or a complementary DNA (cDNA) copy of the RNA, isolated from the tissue of interest.
- 10 Hybridization between the substrate bound DNA and the analyte can be detected and quantitated by several means including but not limited to radioactive labeling or fluorescence labeling of the analyte or a secondary molecule designed to detect the hybrid. Quantitation of the level of gene expression can be done by comparison of the intensity of the signal from the analyte compared with that determined from known standards. The standards can be obtained by *in vitro* transcription of the target gene, quantitating the yield, and then using that material to generate a standard curve.
- 15 Of the proteomic approaches, 2D electrophoresis is a technique well known to those in the art. Isolation of individual proteins from a sample such as serum is accomplished using sequential separation of proteins by different characteristics usually on polyacrylamide gels.
- 20 First, proteins are separated by size using an electric current. The current acts uniformly on all proteins, so smaller proteins move farther on the gel than larger proteins. The second dimension applies a current perpendicular to the first and separates proteins not on the basis of size but on the specific electric charge carried by each protein. Since
- 25
- 30
- 35

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 41 -

no two proteins with different sequences are identical on the basis of both size and charge, the result of a 2D separation is a square gel in which each protein occupies a unique spot. Analysis of the spots with chemical or antibody probes, or
5 subsequent protein microsequencing can reveal the relative abundance of a given protein and the identity of the proteins in the sample.

The above tests can be carried out on samples derived from a variety of cells, bodily fluids and/or tissue extracts
10 such as homogenates or solubilized tissue obtained from a patient. Tissue extracts are obtained routinely from tissue biopsy and autopsy material. Bodily fluids useful in the present invention include blood, urine, saliva or any other bodily secretion or derivative thereof. By blood it is meant
15 to include whole blood, plasma, serum or any derivative of blood.

In Vivo Targeting of MSG/Mammary Gland Cancer Therapy

Identification of these MSGs is also useful in the rational design of new therapeutics for imaging and treating
20 cancers, and in particular mammary gland cancer. For example, in one embodiment, antibodies which specifically bind to a MSG can be raised and used *in vivo* in patients suspected of suffering from mammary gland cancer. Antibodies which specifically bind MSG can be injected into a patient suspected
25 of having mammary gland cancer for diagnostic and/or therapeutic purposes. Thus, another aspect of the present invention provides for a method for preventing the onset and treatment of mammary gland cancer in a human patient in need of such treatment by administering to the patient an effective
30 amount of antibody. By "effective amount" it is meant the amount or concentration of antibody needed to bind to the target antigens expressed on the tumor to cause tumor shrinkage for surgical removal, or disappearance of the tumor. The binding of the antibody to the overexpressed MSG is
35 believed to cause the death of the cancer cell expressing such

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 42 -

MSG. The preparation and use of antibodies for *in vivo* diagnosis and treatment is well known in the art. For example, antibody-chelators labeled with Indium-111 have been described for use in the radioimmunosintographic imaging of carcinoembryonic antigen expressing tumors (Sumerdon et al. Nucl. Med. Biol. 1990 17:247-254). In particular, these antibody-chelators have been used in detecting tumors in patients suspected of having recurrent colorectal cancer (Griffin et al. J. Clin. Onc. 1991 9:631-640). Antibodies with paramagnetic ions as labels for use in magnetic resonance imaging have also been described (Lauffer, R.B. Magnetic Resonance in Medicine 1991 22:339-342). Antibodies directed against MSG can be used in a similar manner. Labeled antibodies which specifically bind MSG can be injected into patients suspected of having mammary gland cancer for the purpose of diagnosing or staging of the disease status of the patient. The label used will be selected in accordance with the imaging modality to be used. For example, radioactive labels such as Indium-111, Technetium-99m or Iodine-131 can be used for planar scans or single photon emission computed tomography (SPECT). Positron emitting labels such as Fluorine-19 can be used in positron emission tomography. Paramagnetic ions such as Gadolinium (III) or Manganese (II) can be used in magnetic resonance imaging (MRI). Presence of the label, as compared to imaging of normal tissue, permits determination of the spread of the cancer. The amount of label within an organ or tissue also allows determination of the presence or absence of cancer in that organ or tissue.

Antibodies which can be used in *in vivo* methods include polyclonal, monoclonal and omniconal antibodies and antibodies prepared via molecular biology techniques. Antibody fragments and aptamers and single-stranded oligonucleotides such as those derived from an *in vitro* evolution protocol referred to as SELEX and well known to those skilled in the art can also be used.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 43 -

Vaccines

Another aspect of the invention relates to compositions and methods for inducing an immunological response in a mammal. In one embodiment, a mammal is inoculated with a MSG polypeptide, or a fragment or variant thereof, in an amount adequate to produce an antibody and/or T cell immune response against MSG polypeptide. In another embodiment, a vector directing expression of MSG polynucleotide *in vivo* is used to induce such an immunological response and to produce antibody. The immune response against the MSG polypeptide is expected to protect the mammal from diseases, in particular mammary gland cancer.

Thus, the present invention also relates to an immunological/vaccine formulation (composition) which, when introduced into a mammal, induces an immunological response in that mammal to MSG polypeptide wherein the composition comprises a MSG polypeptide, fragment or variant thereof or a vector expressing a MSG gene or fragment thereof. The vaccine formulation may further comprise a suitable carrier. Since MSG polypeptide may be broken down in the stomach, the vaccine formulation is preferably administered parenterally via subcutaneous, intramuscular, intravenous, or intradermal injection. Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, as sealed ampules and vials, and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 44 -

systems and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

Screening Assays

5 The MSG polypeptides of the present invention can also be employed in screening processes for compounds which activate (agonists) or inhibit activation of (antagonists, or otherwise called inhibitors) the MSG polypeptides of the present invention. Thus, polypeptides of the invention can
10 be used to identify agonists or antagonists from, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, and natural product mixtures. These agonists or antagonists may be natural or modified substrates, ligands, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptides of the present
15 invention; or may be structural or functional mimetics of the polypeptide of the present invention. See Coligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1(2):Chapter 5 (1991).

MSG polypeptides are responsible for various biological functions, including pathologies such as mammary gland cancer.
20 Accordingly, it is desirable to identify compounds which stimulate MSG polypeptides on the one hand (agonists) and which can inhibit the function of MSG polypeptides (antagonists) on the other hand. Agonists and antagonists can be employed for therapeutic and prophylactic purposes for
25 conditions such as mammary gland cancer.

In general, such screening procedures involve using appropriate cells which express the MSG polypeptide or respond to MSG polypeptide of the present invention. Such cells include those from mammals, yeast, *Drosophila* and *E. coli*.
30 Cells which express the MSG polypeptide (or cell membranes containing the expressed polypeptide) or respond to MSG polypeptides are then contacted with a candidate compound to observe binding, or stimulation or inhibition of a functional response. The MSG activity of the cells which were contacted
35 with the candidate compounds is compared with the MSG activity

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 45 -

in the same type of cells which were not contacted with the candidate compounds.

The assays may simply test binding of a candidate compound wherein adherence to the cells bearing the MSG polypeptide is detected by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound or in an assay involving competition with a labeled competitor. Further, these assays can test whether the candidate compound results in a signal generated by activation of the MSG polypeptide using detection systems appropriate to the cells bearing the MSG polypeptide. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist and the effect of the candidate compound upon activation by the agonist is observed.

Alternatively, the assays may comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a MSG polypeptide to form a mixture, measuring MSG activity in the mixture, and comparing the MSG activity of the mixture to a standard.

The MSG polynucleotide, polypeptides and antibodies immunospecific for the polypeptides can also be used to configure assays for detecting the effect of added compounds on the production of MSG mRNA and polypeptides in cells. For example, an ELISA for measuring secreted or cell associated levels of MSG polypeptide using monoclonal and polyclonal antibodies can be constructed by standard methods known in the art. The ELISA can then be used to discover agents which may inhibit or enhance the production of MSG from suitably manipulated cells or tissues. Standard methods for conducting these screening assays are well understood in the art.

The MSG polypeptides can also be used to identify membrane bound or soluble receptors, if any, through standard receptor binding techniques known in the art. These include, but are not limited to, ligand binding and crosslinking assays in which the MSG is labeled with a radioactive isotope (e.g.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 46 -

¹²⁵I), chemically modified (e.g. biotinylated), or fused to a peptide sequence suitable for detection or purification, and incubated with a source of the putative receptor (cells, cell membranes, cell supernatants, tissue extracts, bodily fluids).
5 Other methods include biophysical techniques such as surface plasmon resonance and spectroscopy. In addition to being used for purification and cloning of the receptor, these binding assays can be used to identify agonists and antagonists of MSG which compete with the binding of MSG to receptors. Standard
10 methods for conducting these screening assays are well understood in the art.

Examples of potential MSG polypeptide antagonists include, but are not limited to: antibodies; oligonucleotides or proteins which are closely related to the MSGs; ligands,
15 substrates, receptors, and enzymes of the MSG polypeptides; fragment of these ligands, substrates, receptors and enzymes; and small molecules which bind to the polypeptide of the present invention so that the activity of the polypeptide is prevented.

20 Thus, the present invention also relates to screening kits for identifying agonists, antagonists, ligands, receptors, substrates, enzymes, etc. for MSG polypeptides; or compounds which decrease or enhance the production of MSG polypeptides. Such kits preferably comprise a MSG
25 polypeptide; a recombinant cell expressing a MSG polypeptide or a cell membrane expressing a MSG polypeptide; and an antibody to a MSG polypeptide.

Prophylactic and Therapeutic Methods

This invention also relates to methods of treating
30 abnormal conditions such as, mammary gland cancer, related to both an excess of and insufficient amounts of MSG polypeptide activity.

If the activity of MSG polypeptide is in excess, several approaches are available. One approach comprises
35 administering to a subject an inhibitor compound (antagonist)

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 47 -

as hereinabove described along with a pharmaceutically acceptable carrier in an amount effective to inhibit the function of the MSG polypeptide, such as, for example, by blocking the binding of ligands, substrates, enzymes, receptors, etc., or by inhibiting a second signal, and thereby alleviating the abnormal condition. In another approach, soluble forms of MSG polypeptides still capable of binding the ligand, substrate, enzymes, receptors, etc. in competition with endogenous MSG polypeptide can be administered. Typical embodiments of such competitors comprise fragments of the MSG polypeptide.

In still another approach, expression of the gene encoding endogenous MSG polypeptide can be inhibited using expression blocking techniques. Known blocking techniques involve the use of antisense sequences, either internally generated or separately administered. See, for example, O'Connor, *J Neurochem* (1991) 56:560 in Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Alternatively, oligonucleotides which form triple helices with the gene can be supplied. See, for example, Lee et al., *Nucleic Acids Res* (1979) 6:3073; Cooney et al., *Science* (1988) 241:456; Dervan et al., *Science* (1991) 251:1360. These oligomers can be administered *per se* or the relevant oligomers can be expressed *in vivo*.

Several approaches are also available for treating abnormal conditions related to an under-expression of MSG and its activity. One approach comprises administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound which activates MSG polypeptide, i.e., an agonist as described above, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, to thereby alleviate the abnormal condition. Alternatively, gene therapy can be employed to effect the endogenous production of MSG by the relevant cells in the subject. For example, a polynucleotide of the invention can be engineered for expression in a viral vector such as a

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 48 -

replication defective retroviral vector. The retroviral expression construct can then be isolated and introduced into a packaging cell transduced with a retroviral plasmid vector containing RNA encoding a polypeptide of the present invention
5 such that the packaging cell now produces infectious viral particles containing the gene of interest. These producer cells can be administered to a subject for engineering cells *in vivo* and expression of the polypeptide *in vivo*. For an overview of gene therapy, see Chapter 20, *Gene Therapy and*
10 *other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches*, (and references cited therein) in *Human Molecular Genetics*, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996). Another approach is to administer a therapeutic amount of MSG polypeptides in combination with a suitable pharmaceutical
15 carrier.

Formulation and Administration

Peptides, such as a soluble form of MSG polypeptide, and agonist and antagonist peptides or small molecules, can be formulated in various combinations with suitable
20 pharmaceutical carriers. These formulations comprise a therapeutically effective amount of the peptide or small molecule, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Such carriers include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol,
25 and combinations thereof. The formulation is selected in accordance with the mode of administration, and is well within the skill of the art. The invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the
30 aforementioned compositions of the invention.

The compositions of present invention can be employed alone or in conjunction with other compounds, such as other therapeutic compounds.

Preferred forms of systemic administration of these
35 pharmaceutical compositions include injection, typically by

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 49 -

intravenous injection. Other injection routes, such as subcutaneous, intramuscular, or intraperitoneal, can also be used. Alternative means for systemic administration include transmucosal and transdermal administration using penetrants
5 such as bile salts or fusidic acids or other detergents. In addition, if properly formulated in enteric or encapsulated formulations, oral administration may also be possible. These compositions can also be administered topically in the form of salves, pastes, gels and the like.

10 The dosage range required depends on the composition, the route of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject's condition, and the judgment of the attending practitioner. Suitable dosages, however, are generally in the range of 0.1-100 μ g of peptide or small
15 molecule per kg of subject. Wide variations in the needed dosage, however, are to be expected in view of the variety of compounds available and the differing efficiencies of various routes of administration. For example, oral administration is expected to require higher dosages than administration by
20 intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization, as is well understood in the art.

Polypeptides used in treatment can also be generated endogenously in the subject, in treatment modalities often
25 referred to as "gene therapy" as described above. Thus, for example, cells from a subject may be engineered with a MSG polynucleotide of the present invention, such as a DNA or RNA, to encode a polypeptide *ex vivo*, and for example, by the use of a retroviral plasmid vector to encode a polypeptide *in*
30 *vivo*. The cells are then introduced into the subject.

EXAMPLES

The present invention is further described by the following examples. The examples are provided solely to illustrate the invention by reference to specific embodiments.

These exemplifications, while illustrating certain aspects of the invention, do not portray the limitations or circumscribe the scope of the disclosed invention.

Examples are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. Routine molecular biology techniques of the following example can be carried out as described in standard laboratory manuals, such as Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Example 1: Suppression subtractive hybridization
 (Clontech PCR-SELECT)

Clontech PCR-SELECT is a PCR based subtractive hybridization method designed to selectively enrich for cDNAs corresponding to mRNAs differentially expressed between two mRNA populations (Diatchenko et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 6025-6030, 1996).

In this method, cDNA is prepared from the two mRNA populations which are to be compared (Tester: cDNA population in which the differentially expressed messages are sought and Driver: cDNA population in which the differentially expressed transcripts are absent or low). The tester sample is separated in two parts and different PCR adapters are ligated to the 5' ends. Each tester is separately annealed to excess driver (first annealing) and then pooled and again annealed (second annealing) to excess driver. During the first annealing, sequences common to both populations anneal. Additionally, the concentration of high and low abundance messages are normalized since annealing is faster for abundant molecules due to the second order kinetics of hybridization. During the second annealing, cDNAs unique or overabundant to the tester can anneal together. Such molecules have different adapters at their ends. The addition of additional driver during the second annealing enhances the enrichment of the

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 51 -

desired differentially expressed sequences. During subsequent PCR, molecules that have different adapters at each end amplify exponentially. Molecules which have identical adapters, or adapters at only one end, or no adapters (driver sequences) either do not amplify or undergo linear amplification. The end result is enrichment for cDNAs corresponding to differentially expressed messages (unique to the tester or upregulated in the tester).

This technique was used to identify transcripts unique to mammary gland tissues or messages overexpressed in mammary gland cancer. Pairs of matched samples isolated from the same patient, a cancer sample, and the "normal" adjacent tissue from the same tissue type were utilized. The mRNA from the cancer tissue is used as the "tester", and the non-cancer mRNA as a "driver". The non-cancer "driver" is from the same individual and tissue as the cancer sample (Matched). Alternatively the "driver" can be from a different individual but the same tissue as the tumor sample (unmatched). In some cases, mixtures of mRNAs derived from non-cancer tissue types different from the cancer tissue type were used as the "driver". This approach allows the identification of transcripts whose expression is specific or upregulated in the cancer tissue type analyzed.

Several subtracted libraries were generated for mammary gland. The product of the subtraction experiments was used to generate cDNA libraries. These cDNA libraries contain Expressed Sequence Tags (ESTs) from genes that are mammary gland cancer specific, or upregulated in mammary gland. Selected clones from each cDNA PCR Select library were sequenced and are depicted as SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20.

Example 2: Relative Quantitation of Gene Expression

Real-Time quantitative PCR with fluorescent Taqman probes is a quantitation detection system utilizing the 5'- 3' nuclease activity of Taq DNA polymerase. The method uses an

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 52 -

internal fluorescent oligonucleotide probe (Taqman) labeled with a 5' reporter dye and a downstream, 3' quencher dye. During PCR, the 5'-3' nuclease activity of Taq DNA polymerase releases the reporter, whose fluorescence can then be detected
5 by the laser detector of the Model 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Amplification of an endogenous control is used to standardize the amount of sample RNA added to the reaction and normalize for Reverse Transcriptase (RT) efficiency. Either
10 cyclophilin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or 18S ribosomal RNA (rRNA) is used as this endogenous control. To calculate relative quantitation between all the samples studied, the target RNA levels for one sample are used as the basis for comparative results (calibrator).
15 Quantitation relative to the "calibrator" can be obtained using the standard curve method or the comparative method (User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System).

The tissue distribution and the level of the target gene was examined for every example in normal and cancer tissue.
20 Total RNA was extracted from normal tissues, cancer tissues, and from cancers and the corresponding matched adjacent tissues. Subsequently, first strand cDNA was prepared with reverse transcriptase and the polymerase chain reaction was done using primers and Taqman probe specific to each target
25 gene. The results were analyzed using the ABI PRISM 7700 Sequence Detector. The absolute numbers are relative levels of expression of the target gene in a particular tissue compared to the calibrator tissue.

Leads evaluated using real-time quantitative PCR are
30 named "mam" followed by a number (for example: mam028).

For comparison, similar mRNA expression analysis was performed for genes coding for the diagnostic markers PSA (Prostate Specific Antigen) and PLA2 (Phospholipase A2). PSA is the only cancer screening marker available in clinical
35 laboratories. When the panel of normal pooled tissues was

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 53 -

analyzed, PSA was expressed at very high levels in prostate, with a very low expression in breast and testis. After more than 55 matching samples from 14 different tissues were analyzed, the data corroborated the tissue specificity seen with normal tissue samples. PSA expression in cancer and normal adjacent tissue for 12 matching samples of prostate tissue was also compared. The relative levels of PSA were higher in 10 cancer samples (83%). Clinical data recently obtained support the utilization of PLA2 as a staging marker for late stages of prostate cancer. The mRNA expression data from these experiments showed overexpression of the mRNA in 8 out of the 12 prostate matching samples analyzed (66%). The tissue specificity for PLA2 was not as good as the one described for PSA. In addition to prostate, small intestine, liver, and pancreas also showed high levels of mRNA expression for PLA2.

Example 3: Semi-quantitative Polymerase Chain Reaction (SQ-PCR)

SQ-PCR is a method that utilizes end point PCR on serial dilutions of cDNA samples in order to determine relative expression patterns of genes of interest in multiple samples. Using random hexamer primed Reverse Transcription (RT) cDNA panels are created from total RNA samples. Gene specific primers are then used to amplify fragments using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology from four 10x serial cDNA dilutions in duplicate. Relative expression levels of 0, 1, 10, 100 and 1000 are used to evaluate gene expression. A positive reaction in the most dilute sample indicates the highest relative expression value. This is determined by analysis of the sample reactions on a 2-4% agarose gel. The tissue samples used include 12 normal, 12 cancer and 6 pairs of tissue specific cancer and matching samples. Leads evaluated through this method are named sqmam followed by a number (for example: sqmam022)

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 54 -

SEQ ID NO:	CLONE ID NO:	LEAD ID NO:
1	Mamc00000385	mam021
4	Mam600369434F1	mam019
11	Mam600372192F1	sqmam022
5 15	Mam600370727F1	sqmam023
17	Mam600356265F1	mam018
18	Mam600370568F1	mam028

SEQ ID NO:1; Clone ID: Mamc00000385 (Mam021)

Real-Time quantitative PCR was done using the following

10 primers:

Mam021forward:

5' CCATCGTCTTCCTTTATCCAAC 3' (SEQ ID NO:21)

Mam021 reverse:

5' TGGGTGATTTCAGAGAACTGCT 3' (SEQ ID NO:22)

15 Q-PCR probe

5' TCAATTATAGGCAAAGGAACACAGAGAAAAC 3' (SEQ ID NO:23)

Table 1 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of mam021 in 36 normal samples from 25 different tissues. All the values are compared to normal testis (calibrator). These RNA samples are commercially available pools, originated by pooling samples of a particular tissue from different individuals; except for the blood samples that they are normal samples from a single individual.

Table 1: Mam021 in Pooled Tissue Samples

	Tissue	Normal
25	Adrenal Gland	0.00
	Bladder	0.00
	Brain	0.00
	Cervix	0.54
30	Colon	0.20
	Endometrium	0.00
	Esophagus	0.03
	Heart	0.00
	Kidney	0.12
35	Liver	0.00
	Lung	0.00
	Mammary gland	0.00

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 55 -

	Muscle	0.00
	Ovary	0.00
	Pancreas	0.00
	Prostate	1.39
5	Rectum	0.00
	Small Intestine	0.00
	Spleen	0.00
	Stomach	0.27
	Testis	1.00
10	Thymus	0.38
	Trachea	0.00
	Uterus	0.00
	Blood B1	0.00
	Blood B10	0.00
15	Blood B11	0.00
	Blood B12	0.13
	Blood B13	0.00
	Blood B14	0.00
	Blood B15	0.00
20	Blood B4	0.00
	Blood B5	0.00
	Blood B6	0.00
	Blood B7	0.00
	Blood B8	0.00

25 0.00= Negative

The relative levels of expression in Table 1 show that mam021 mRNA expression is detected in the pool of a few normal tissue analyzed.

The absolute numbers in Table 1 were obtained analyzing 30 pools of samples of a particular tissue from different individuals, except for the blood samples. They can not be compared to the absolute numbers originated from RNA obtained from tissue samples of a single individual in Table 2.

Table 2 shows the absolute numbers which are relative 35 levels of expression of mam021 in 78 pairs of matching samples. All the values are compared to normal testis (calibrator). A matching pair is formed by mRNA from the cancer sample for a particular tissue and mRNA from the normal adjacent sample for that same tissue from the same individual. 40 In addition, 1 unmatched cancer sample (from ovary) and 1 unmatched normal sample (from ovary) were also tested.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 56 -

Table 2: Mam021 in Individual Tissue Samples

Sample ID	Tissue	Cancer	Normal Adjacent Tissue	Nor-mal	TNM stage	Stage	Type of adenocarcinoma
Mam497M	mammary gland 1	7.89	0.16		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam173M	mammary gland 2	0.00	0.18		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam5621	mammary gland 3	37.27	0.00		T1c N0 Mx	Stage I	Ductal
Mam5516	mammary gland 4	1.43	0.00		T1c N0 Mx	Stage I	Ductal
Mam726M	mammary gland 5	2.88	0.00		T1 N1-2 Mx	Stage IIA	Ductal
Mam8079	mammary gland 6	0.13	0.12		T1c N1-2 Mx		Ductal
Mam517	mammary gland 7	0.64	0.98		T1c N1-2 Mx		Ductal
Mam59X	mammary gland 8	1.64	204.36		T1c N1-2 Mx		Ductal
Mam192M	mammary gland 9	11.04	0.18		T2 N0 M0	Stage IIA	Ductal
Mam522	mammary gland 10	0.39	0.00		T2 N0 Mx	Stage IIA	Ductal
Mam5127	mammary gland 11	0.07	0.00		T2 N0 Mx	Stage IIA	Ductal
MamB011X	mammary gland 12	0.12	1.21		T2 N0 Mx	Stage IIA	Ductal
Mam512N	mammary gland 13	1.58	0.00		T2 N1 M0		Ductal
Mam162X	mammary gland 14	0.14	0.00		T2 N1-2 Mx		Ductal
Mam5123	mammary gland 15	23.67	5.48		T2 N1-2 Mx		Ductal
MamS997	mammary gland 16	0.00	0.00		T2 N1-2 Mx		Ductal
Mam220	mammary gland 17	1.85	0.57		T2 N1-2 Mx		Ductal
Mam245M	mammary gland 18	83.29	13.59		T2 N1-2 Mx	Stage IIB	Ductal
Mam543M	mammary gland 19	0.09	0.00		T2 N1 Mx	Stage IIB	Ductal
Mam976M	mammary gland 20	0.22	0.00		T2 N1 Mx		Ductal
Mam760N	mammary gland 21	1.94	0.00		T3 N1 M0		Ductal
Mam699F	mammary gland 22	0.27	1.32		T3 N1 Mx		Ductal
Mam420N	mammary gland 23	663.98	0.71		T3a N1 M0	Stage IIIA	Ductal
MamS570	mammary gland 24	0.47	5.64		T1c N1-2 Mx		Ductal + Lobular
MamS918	mammary gland 25	0.00	0.00		T1c N1 Mx		Ductal + Tubular

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 57 -

	MamS854	mammary gland 26	6.45	0.00	T1c N0 MX	Stage I	Lobular
	MamS967	mammary gland 27	0.00	0.00	T2 N0 MX	Stage IIA	Lobular
	Mam986	mammary gland 28	0.26	0.14	T2 N0 M0	Stage IIB	Lobular
	Mam355	mammary gland 29	20.53	0.00	T2 N1-2 MX	Stage IIB	Lobular
5	MamS699	mammary gland 30	1.04	0.00	T2 N1-2 MX	Stage IIB	Lobular
	MamA06X	mammary gland 31	0.69	0.00	T3 N0 MX	Stage IIB	Lobular
	Bl322XK	bladder 1	0.00	0.05			
	Bl366X	bladder 2	1.55	0.14			
10	Bl3TR17	bladder 3	0.00	0.00			
	Bl346XX	bladder 4	0.39	0.15			
	Bl3TR14	bladder 5	0.24	0.11			
	ClbB56	colon 1	0.00	0.00			
	ClbDC63	colon 2	0.00	0.00			
	CvxKS52	cervix 1	0.00	0.00			
15	CvxNK24	cervix 2	0.04	0.00			
	CvxKS83	cervix 3	0.00	0.32			
	CvxNK23	cervix 4	0.00	0.00			
20	Endo10479	endometrium 1	0.13	0.27			
	Endo12XA	endometrium 2	6.41	0.00			
	Endo28XA	endometrium 3	0.04	0.00			
	Endo3AX	endometrium 4	0.00	0.00			
	Endo5XA	endometrium 5	0.00	0.00			
	Endo65RA	endometrium 6	0.00	0.00			
25	Kid8XD	kidney 1	0.00	0.01			
	Kid710K	kidney 2	0.00	0.06			
	Liv175L	liver 1	0.05	0.38			
	Liv187L	liver 2	0.00	0.00			
	Liv15XA	liver 3	0.04	0.00			
30	Lung47XQ	lung 1	0.00	0.00			
	LungAC88	lung 2	0.00	0.00			
	LungAC90	lung 3	0.00	0.00			
	LungSQ80	lung 4	0.00	0.00			
	Ovri103X	ovary 1	14.93	5.24			

5	Ovra084	ovary 2	15.51	8.51	
	OvrG010	ovary 3	0.15	1.60	
	OvrG021	ovary 4	0.96	4.21	
	OvrI118	ovary 5	0.00		
	OvrI32RA	ovary 6		0.00	
	Pan77X	pancreas 1	0.00	0.00	
	Pan82XP	pancreas 2	0.00	0.00	
	ProI09XB	prostate 1	0.00	0.00	
	ProI25XB	prostate 2	0.28	0.15	
	SKn248S	skin 1	0.00	0.00	
	SKn287S	skin 2	0.01	0.00	
	SmnH89	small intestine 1	0.00	0.02	
	SmnI21XA	small intestine 2	2.69	0.04	
	StoI15S	stomach 1	0.00	0.00	
	StoI5S	stomach 2	0.27	0.00	
	StoMT54	stomach 3	0.00	0.00	
	Thr590D	thyroid 1	0.00	0.00	
	TstF647T	testis 1	0.03	0.00	
	UtrI41XO	uterus 1	0.00	0.00	
	UtrI23XU	uterus 2	0.00	0.00	
	UtrI85XU	uterus 3	0.00	0.20	
	UtrI135XO	uterus 4	0.06	0.00	
	0.00= Negative				

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 59 -

Table 2 represents 158 samples in 17 different tissues. Table 1 and Table 2 represent a combined total of 194 samples in 27 human tissue types.

Comparisons of the level of mRNA expression in breast cancer samples and the normal adjacent tissue from the same individuals are shown in Table 2. Mam021 is expressed at higher levels in 21 of 31 (68%) cancer samples (mammary gland 1, 3-5, 9-11, 13-15, 17-21, 23, 26, 28-31) compared to normal adjacent tissue. In particular, Mam021 shows overexpression in 5 out of 6 (83%) lobular adenocarcinomas (mammary gland 26, 28-31).

CHROMOSOME LOCALIZATION: Blast result against the human genome database, showed that the sequence for mam021 (SEQ ID NO:1) has 95-100% identity with a sequence in chromosome 16.

15 SEQ ID NO:4; Clone ID: Mam600369434F1(mam019)

Real-Time quantitative PCR was done using the following primers:

Mam019forward:

5' GTGGCTCTTTCTTTCCCTCAG 3' (SEQ ID NO:24)

20 Mam019 reverse:

5' CGCAGAGAGACAACCAAGA 3' (SEQ ID NO:25)

Q-PCR probe

5' ACCTGCTGTTGCTCCTGGCTAGTCTTG 3' (SEQ ID NO:26)

Table 3 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of mam019 in 36 normal samples from 25 different tissues. All the values are compared to normal uterus (calibrator). These RNA samples are commercially available pools, originated by pooling samples of a particular tissue from different individuals; except for the blood samples that they are normal samples from a single individual.

Table 3: Mam019 in Pooled Tissue Samples

Tissue	Normal
Adrenal Gland	0.11
Bladder	0.25
Brain	0.54

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 60 -

	Cervix	0.27
	Colon	0.27
	Endometrium	0.63
	Esophagus	0.03
5	Heart	0.81
	Kidney	0.13
	Liver	0.04
	Lung	15.62
	Mammary gland	6.92
10	Muscle	0.07
	Ovary	0.51
	Pancreas	0.00
	Prostate	2.23
	Rectum	0.13
15	Small Intestine	0.08
	Spleen	2.94
	Stomach	0.23
	Testis	0.72
	Thymus	0.43
20	Trachea	0.40
	Uterus	1.00
	Blood B1	2.69
	Blood B10	5.43
	Blood B11	5.12
25	Blood B12	7.94
	Blood B13	3.73
	Blood B14	11.59
	Blood B15	5.45
	Blood B4	5.78
30	Blood B5	7.67
	Blood B6	1.59
	Blood B7	5.43
	Blood B8	5.88
	0.00= Negative	

35 The relative levels of expression in Table 3 show that mam019 mRNA expression is detected in the pool of most of the normal tissue analyzed, being lung and mammary gland the highest expressers. Blood samples from single individuals showed expression levels that ranged from 1.59 to 11.59.

40 The absolute numbers in Table 3 were obtained analyzing pools of samples of a particular tissue from different individuals, except for the blood samples. They can not be compared to the absolute numbers originated from RNA obtained from tissue samples of a single individual in Table 4.

45 Table 4 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of mam019 in 78 pairs of matching samples. All the values are compared to normal uterus

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 61 -

(calibrator). A matching pair is formed by mRNA from the cancer sample for a particular tissue and mRNA from the normal adjacent sample for that same tissue from the same individual. In addition, 1 unmatched cancer sample (from ovary) and 1
5 unmatched normal sample (from ovary) were also tested.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 62 -

Table 4: Mam019 in Individual Tissue Samples

Sample ID	Tissue	Cancer	Normal Adjacent Tissue	Nor-mal	TNM stage	Stage	Type of Adenocar-cinoma
Mam497M	mammary gland 1	17.57	2.89		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam173M	mammary gland 2	0.41	1.73		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam516	mammary gland 3	0.71	1.92		T1c N0 MX	Stage I	Ductal
Mam5621	mammary gland 4	6.32	1.14		T1c N0 MX	Stage I	Ductal
Mam726M	mammary gland 5	0.12	2.27		T1 N1-2 MX	Stage IIA	Ductal
Mam3079	mammary gland 6	3.71	2.34		T1c N1-2 MX		Ductal
Mam517	mammary gland 7	1.04	1.44		T1c N1-2 MX		Ductal
Mam59X	mammary gland 8	2.11	5.05		T1c NX MX		Ductal
Mam19DN	mammary gland 9	6.94	5.45		T2 N0 M0	Stage IIA	Ductal
Mam522	mammary gland 10	11.04	0.55		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam5127	mammary gland 11	0.00	0.04		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam8011X	mammary gland 12	0.96	11.55		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam51DN	mammary gland 13	75.32	34.66		T2 N1 M0		Ductal
Mam162X	mammary gland 14	0.00	0.00		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam5123	mammary gland 15	0.00	0.00		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam5997	mammary gland 16	0.00	0.00		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam220	mammary gland 17	6.28	37.27		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam245M	mammary gland 18	14.72	3.78		T2 N1-2 MX	Stage IIB	Ductal
Mam543M	mammary gland 19	0.32	0.05		T2 NX MX	Stage IIB	Ductal
Mam976M	mammary gland 20	0.00	0.00		T2 NX MX		Ductal
Mam76DN	mammary gland 21	0.22	1.39		T3 N1 M0		Ductal

5

10

15

20

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 63 -

5	Mam699F	mammary gland 22	1.06	2.59	T3 NX MX	Stage I	Ductal
	Mam42DN	mammary gland 23	6.02	10.63	T3a N1 M0	Stage IIA	Ductal
	Mam570	mammary gland 24	3.05	70.28	T1c N1-2 MX		Ductal+ Lobular
	Mam518	mammary gland 25	80.17	9.51	T1c NX MX		Ductal+ Tubular
	Mam5854	mammary gland 26	0.00	0.03	T1c N0 MX	Stage I	Lobular
10	Mam5967	mammary gland 27	0.00	0.00	T2 N0 MX	Stage IIA	Lobular
	Mam5986	mammary gland 28	4.68	7.09	T2 N0 M0	Stage IIB	Lobular
	Mam355	mammary gland 29	24.34	0.06	T2 N1-2 MX	Stage IIB	Lobular
	Mam5699	mammary gland 30	7.36	1.78	T2 N1-2 MX	Stage IIB	Lobular
	MamA06X	mammary gland 31	76.90	1.34	T3 N0 MX	Stage IIB	Lobular
15	BlD32XK	bladder 1	0.72	0.24			
	BlD66X	bladder 2	0.13	0.09			
	BlDTR17	bladder 3	0.72	0.38			
	BlD46XK	bladder 4	0.14	0.19			
	BlDTR14	bladder 5	0.61	0.21			
20	ClnB56	colon 1	0.84	1.13			
	ClnD63	colon 2	0.36	1.50			
	CvxK552	cervix 1	11.27	1.52			
	CvxNK24	cervix 2	0.83	0.64			
	CvxK583	cervix 3	0.18	1.48			
25	CvxNK23	cervix 4	0.08	0.28			
	Endo10479	endometrium 1	0.32	0.80			
	Endo12XA	endometrium 2	0.30	1.61			
	Endo5XA	endometrium 3	0.22	2.40			
	Endo65PA	endometrium 4	0.00	0.00			
	Endo28XA	endometrium 5	0.61	0.66			

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 64 -

	Endo3AX	endometrium 6	0.43	0.00				
	Kid6XD	kidney 1	0.15	0.27				
	Kid710K	kidney 2	0.10	0.18				
	Liv175L	liver 1	1.65	1.05				
5	Liv187L	liver 2	0.21	8.94				
	Liv15XA	liver 3	0.13	0.06				
	Lung47XQ	lung 1	0.20	11.20				
	LungAC88	lung 2	5.22	9.58				
10	LungAC90	lung 3	0.90	1.03				
	LungSQ80	lung 4	2.76	1.61				
	Ovr103X	ovary 1	0.36	0.08				
	OvrA084	ovary 2	0.39	0.11				
	OvrG010	ovary 3	0.32	0.03				
	OvrG021	ovary 4	0.05	0.21				
15	Ovr1118	ovary 5	0.03					
	Ovr12RA	ovary 6		0.00				
	Pan77X	pancreas 1	0.61	0.47				
	Pan82XP	pancreas 2	0.50	1.59				
	Pro109XB	prostate 1	1.69	2.87				
20	Pro125XB	prostate 2	0.91	0.38				
	Skn248S	skin 1	55.33	0.26				
	Skn287S	skin 2	0.97	1.70				
	SmIntH89	small intestine 1	4.63	0.09				
25	SmInt21XA	small intestine 2	0.94	0.29				
	Sto115S	stomach 1	1.78	0.62				
	Sto15S	stomach 2	0.17	0.20				
	StoMT54	stomach 3	0.25	0.29				
	Thr590D	thyroid 1	0.70	0.45				
	Tet647T	testis 1	0.20	0.00				
30	Utr141XO	uterus 1	1.06	0.47				
	Utr23XU	uterus 2	1.19	0.39				
	Utr85XU	uterus 3	0.00	0.26				
	Utr135XO	uterus 4	0.90	0.38				

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 65 -

Table 4 represents 158 samples in 17 different tissues. Table 3 and Table 4 represent a combined total of 194 samples in 26 human tissue types.

Comparisons of the level of mRNA expression in breast cancer samples and the normal adjacent tissue from the same individuals are shown in Table 4. Mam019 is expressed at higher levels in 11 of 31 (35%) cancer samples (mammary gland 1, 4, 6, 10, 13, 18, 19, 25, 29-31) compared to normal adjacent tissue. If only the lobular adenocarcinomas samples are taken into account, 50% of the samples showed overexpression in cancer compared to normal adjacent tissue (mammary gland 29-31).

CHROMOSOME LOCALIZATION: Blast result against the human genome database, showed that the sequence listed below for mam019 (SEQ ID NO:4) has 95-100% identity with a sequence in chromosome 10.

SEQ ID NO:17; Mam600356265F1 (mam018)

Real-Time quantitative PCR was done using the following primers:

20 Mam018forward:
5' TCCATCTCCACGAGGTGTG 3' (SEQ ID NO:27)
Mam018 reverse:
5' GCCTTGCTGTCTCACCAT 3' (SEQ ID NO:28)
Q-PCR probe
25 5' TGTCTAACTGATGGCTCTCATGCTGTAGTG 3' (SEQ ID NO:29)

Table 5 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of mam018 in 36 normal samples from 25 different tissues. All the values are compared to normal muscle (calibrator). These RNA samples are commercially available pools, originated by pooling samples of a particular tissue from different individuals; except for the blood samples that they are normal samples from a single individual.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 66 -

Table 5: Mam018 in Pooled Tissue Samples

	Tissue	Normal
	Adrenal Gland	0.00
	Bladder	0.00
5	Brain	0.02
	Cervix	0.00
	Colon	0.00
	Endometrium	0.00
	Esophagus	0.15
10	Heart	0.00
	Kidney	0.00
	Liver	0.00
	Lung	0.16
	Mammary gland	0.78
15	Muscle	1.00
	Ovary	0.00
	Pancreas	0.00
	Prostate	0.00
	Rectum	0.00
20	Small Intestine	0.00
	Spleen	0.00
	Stomach	0.00
	Testis	0.00
	Thymus	0.20
25	Trachea	0.14
	Uterus	0.00
	Blood B1	0.00
	Blood B10	0.00
	Blood B11	0.03
30	Blood B12	0.00
	Blood B13	0.01
	Blood B14	0.05
	Blood B15	0.06
	Blood B4	0.00
35	Blood B5	0.00
	Blood B6	0.00
	Blood B7	0.03
	Blood B8	0.05

0.00= Negative

40 The relative levels of expression in Table 5 show that mam018 mRNA expression is detected in the pool of a few normal tissue analyzed.

The absolute numbers in Table 5 were obtained analyzing pools of samples of a particular tissue from different
 45 individuals, except for the blood samples. They can not be compared to the absolute numbers originated from RNA obtained from tissue samples of a single individual in Table 6.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 67 -

Table 6 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of mam018 in 73 pairs of matching samples. All the values are compared to normal muscle (calibrator). A matching pair is formed by mRNA from the
5 cancer sample for a particular tissue and mRNA from the normal adjacent sample for that same tissue from the same individual. In addition, 1 unmatched cancer sample (from ovary) and 1 unmatched normal sample (from ovary) were also tested.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 68 -

Table 6: Mam018 in Individual Tissue Samples

Sample ID	Tissue	Cancer	Normal Adjacent Tissue	Nor-mal	TNM stage	Stage	Type of Adenocarcinoma
Mam497M	mammary gland 1	0.11	0.64		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam173M	mammary gland 2	0.08	0.56		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam516	mammary gland 3	0.15	0.00		T1c N0 MX	Stage I	Ductal
Mam5621	mammary gland 4	0.05	0.00		T1c N0 MX	Stage I	Ductal
Mam726M	mammary gland 5	0.10	3.66		T1 N1-2 MX	Stage IIA	Ductal
Mam5079	mammary gland 6	0.49	0.14		T1c N1-2 MX		Ductal
Mam517	mammary gland 7	0.00	0.00		T1c N1-2 MX		Ductal
Mam59X	mammary gland 8	57.68	1.14		T1c NX MX		Ductal
Mam19DN	mammary gland 9	1.08	0.70		T2 N0 M0	Stage IIA	Ductal
Mam522	mammary gland 10	0.06	0.04		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam5127	mammary gland 11	0.10	0.29		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam8011X	mammary gland 12	36.76	0.25		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam51DN	mammary gland 13	0.22	1.60		T2 N1 M0		Ductal
Mam162X	mammary gland 14	0.04	0.13		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam5123	mammary gland 15	0.28	0.00		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam5997	mammary gland 16	105.79	3.82		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam220	mammary gland 17	0.22	0.00		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam245M	mammary gland 18	2.94	0.38		T2 N1-2 MX	Stage IIB	Ductal
Mam543M	mammary gland 19	0.00	0.01		T2 NX MX	Stage IIB	Ductal
Mam976M	mammary gland 20	0.00	0.16		T2 NX MX		Ductal
Mam76DN	mammary gland 21	0.31	1.21		T3 N1 M0		Ductal
Mam699F	mammary gland 22	7.49	9.99		T3 NX MX		Ductal
Mam42DN	mammary gland 23	0.03	0.24		T3a N1 M0	Stage IIA	Ductal
Mam570	mammary gland 24	0.00	0.79		T1c N1-2 MX		Ductal+
Mam5918	mammary gland 25	0.07	0.22		T1c NX MX		Lobular
Mam5854	mammary gland 26	0.53	0.00		T1c N0 MX	Stage I	Tubular

5

10

15

20

25

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 69 -

5	MamS967	mammary gland 27	0.00	0.09	T2 N0 MX	Stage IIA	Lobular
	Mam986	mammary gland 28	0.00	0.01	T2 N0 M0	Stage IIB	Lobular
	Mam355	mammary gland 29	0.04	0.04	T2 N1-2 MX	Stage IIB	Lobular
	MamS699	mammary gland 30	0.26	0.16	T2 N1-2 MX	Stage IIB	Lobular
	MamA06X	mammary gland 31	0.07	0.05	T3 N0 MX	Stage IIB	Lobular
10	BlD32XK	bladder 1	0.00	0.00			
	BlD66X	bladder 2	0.00	0.00			
	BlDR17	bladder 3	0.00	0.00			
	BlD46XK	bladder 4	0.09	0.05			
	BlDR14	bladder 5	0.12	0.15			
15	ClnB56	colon 1	0.00	0.00			
	ClnD063	colon 2	0.00	0.00			
	CvxKS52	cervix 1	0.01	0.00			
	CvxNK24	cervix 2	0.01	0.00			
	CvxKS83	cervix 3	0.00	0.00			
20	CvxNR23	cervix 4	0.07	0.00			
	Endo10479	endometrium 1	0.00	0.00			
	Endo12XA	endometrium 2	0.00	0.06			
	Endo5XA	endometrium 3	0.00	0.00			
	Endo65RA	endometrium 4	0.00	0.00			
25	Endo28XA	endometrium 5	0.00	0.00			
	Endo3AX	endometrium 6	0.00	0.00			
	Kid8XD	kidney 1	0.01	0.00			
	Kid710K	kidney 2	0.00	0.00			
	Liv175L	liver 1	0.00	0.00			
30	Liv187L	liver 2	0.00	0.00			
	Liv15XA	liver 3	0.00	0.00			
	Lug47XQ	lung 1	0.01	0.00			
	LugAC88	lung 2	0.04	0.00			
	LugAC90	lung 3	0.00	0.00			
	LugSQ80	lung 4	0.01	0.00			
	Ovr111B	ovary 1	0.00	0.00			
	Ovr32RA	ovary 2	0.00	0.05			

5	Pan77X	pancreas 1	0.00	0.00					
	Pan62XP	pancreas 2	0.00	0.00					
	Pro109XB	prostate 1	0.00	0.00					
	SKn248S	skin 1	0.04	0.01					
	SKn287S	skin 2	0.09	0.01					
	SmIntH69	small intestine 1	0.00	0.00					
	SmInt21XA	small intestine 2	0.00	0.00					
	Sto115S	stomach 1	0.01	0.00					
	Sto15S	stomach 2	0.00	0.00					
	StoMT54	stomach 3	0.00	0.00					
10	Thr590D	thyroid 1	0.00	0.00					
	Tet647T	testis 1	0.00	0.00					
	Utr141XO	uterus 1	0.00	0.00					
	Utr23XU	uterus 2	0.00	0.00					
15	Utr85XU	uterus 3	0.00	0.00					
	Utr135XO	uterus 4	0.00	0.00					
0.00= Negative									

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 71 -

Table 6 represents 148 samples in 17 different tissues. Table 5 and Table 6 represent a combined total of 184 samples in 27 human tissue types.

Comparisons of the level of mRNA expression in breast cancer samples and the normal adjacent tissue from the same individuals are shown in Table 6. Mam018 is expressed at higher levels in 13 of 31 (42%) cancer samples (mammary gland 3, 4, 6, 8-10, 12, 15-18, and 30) compared to normal adjacent tissue.

10 CHROMOSOME LOCALIZATION: Blast result against the human genome database, showed that the sequence listed below for mam018 (SEQ ID NO:17) has 95-100% identity with a sequence in chromosome 2.

SEQ ID NO:18; Mam600370568F1 (Mam028)

15 Real-Time quantitative PCR was done using the following primers:

Mam028forward:

5' AGAGGCTAAAAGCAACTTGTCC 3' (SEQ ID NO:30)

Mam028 reverse:

20 5' GGAAAACTCTCAGCAACCTT 3' (SEQ ID NO:31)

Q-PCR probe

5' AGCCGTAAACTTTCTCATACACTTTGTCCA 3' (SEQ ID NO:32)

Table 7 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of mam028 in 24 normal samples from 24 different tissues. All the values are compared to normal spleen (calibrator). These RNA samples are commercially available pools, originated by pooling samples of a particular tissue from different individuals.

Table 7: mam028 in Pooled Tissue Samples

	Tissue	Normal
30	Adrenal Gland	0.00
	Bladder	0.00
	Brain	0.00
	Cervix	0.01
35	Colon	0.00
	Endometrium	0.00

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 72 -

	Esophagus	0.00
	Heart	0.00
	Kidney	0.00
	Liver	0.00
5	Lung	0.14
	Mammary gland	0.00
	Muscle	0.00
	Ovary	0.01
	Pancreas	0.01
10	Prostate	0.01
	Rectum	0.01
	Small Intestine	0.00
	Spleen	1.00
	Stomach	0.00
15	Testis	0.00
	Thymus	9.85
	Trachea	0.01
	Uterus	0.01

0.00= Negative

20 The relative levels of expression in Table 7 show that mam028 mRNA expression is detected in the pool of a few of normal tissue analyzed.

The absolute numbers in Table 7 were obtained analyzing pools of samples of a particular tissue from different
25 individuals, except for the blood samples. They can not be compared to the absolute numbers originated from RNA obtained from tissue samples of a single individual in Table 8.

Table 8 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of mam028 in 49 pairs of matching
30 samples. All the values are compared to normal spleen (calibrator). A matching pair is formed by mRNA from the cancer sample for a particular tissue and mRNA from the normal adjacent sample for that same tissue from the same individual. In addition, 1 unmatched cancer sample (from ovary) and 1
35 unmatched normal sample (from ovary) were also tested.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 73 -

Table 8: Mam028 in Individual Tissue Samples

Sample ID	Tissue	Cancer	Normal Adjacent Tissue	Nor- mal	TNM stage	Stage	Type of Adenocarcinoma
Mam497M	mammary gland 1	0.00	0.00		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam173M	mammary gland 2	0.01	0.07		T1 N0 M0	Stage I	Ductal
Mam516	mammary gland 3	0.03	0.00		T1c N0 MX	Stage I	Ductal
Mam5621	mammary gland 4	0.04	0.00		T1c N0 MX	Stage I	Ductal
Mam726M	mammary gland 5	0.04	0.04		T1 N1-2 MX	Stage IIA	Ductal
Mam5079	mammary gland 6	0.14	0.00		T1c N1-2 MX		Ductal
Mam19DN	mammary gland 7	0.00	0.00		T2 N0 M0	Stage IIA	Ductal
Mam522	mammary gland 8	0.01	0.00		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam5127	mammary gland 9	0.15	0.00		T2 N0 MX	Stage IIA	Ductal
Mam162X	mammary gland 10	0.02	0.01		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam5123	mammary gland 11	0.08	0.00		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam5997	mammary gland 12	0.10	0.01		T2 N1-2 MX		Ductal
Mam543M	mammary gland 13	0.00	0.00		T2 NX MX	Stage IIB	Ductal
Mam976M	mammary gland 14	0.00	0.00		T2 NX MX		Ductal
Mam76DN	mammary gland 15	0.63	0.07		T3 N1 M0		Ductal
Mam5918	mammary gland 16	0.02	0.02		T1c NX MX		Ductal+ Tubular
Mam3854	mammary gland 17	0.00	0.00		T1c N0 MX	Stage I	Lobular
Mam5967	mammary gland 18	0.34	0.04		T2 N0 MX	Stage IIA	Lobular
Mam986	mammary gland 19	0.02	0.00		T2 N0 M0	Stage IIB	Lobular
Mam355	mammary gland 20	0.02	0.00		T2 N1-2 MX	Stage IIB	Lobular
MamA06X	mammary gland 21	0.01	0.00		T3 N0 MX	Stage IIB	Lobular
Bld46XK	bladder 1	0.00	0.00				
Bld46XK	bladder 2	0.24	0.04				
ClnB56	colon 1	0.00	0.00				
ClnD663	colon 2	0.00	0.00				
CvxK583	cervix 1	0.03	0.04				
CvxK23	cervix 2	0.01	0.02				

5

10

15

20

25

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 74 -

	Endo10479	endometrium 1	0.06	0.07				
	Endo12XA	endometrium 2	0.24	0.00				
	Endo5XA	endometrium 3	0.00	0.00				
	Endo65RA	endometrium 4	0.00	0.00				
5	Endo28XA	endometrium 5	0.00	0.01				
	Endo3AX	endometrium 6	0.19	0.00				
	Kid8XD	kidney 1	0.01	0.02				
	Kid710K	kidney 2	0.00	0.00				
	Liv15XA	liver 1	0.00	0.00				
10	Lng47XQ	lung 1	0.04	0.00				
	LngAC88	lung 2	0.84	0.09				
	LngAC90	lung 3	0.24	0.00				
	Lng8Q80	lung 4	0.00	0.00				
	Ovr1118	ovary 1	0.01					
15	Ovr32RA	ovary 2		0.06				
	Pan77X	pancreas 1	0.00	0.00				
	Pan82XP	pancreas 2	0.01	0.00				
	Smint21XA	small intestine 1	0.01	0.01				
	Sto115S	stomach 1	0.57	0.25				
20	Sto115S	stomach 2	0.01	0.07				
	StoMT54	stomach 3	0.00	0.00				
	Thr590D	thyroid 1	0.14	0.00				
	Tst647F	testis 1	0.01	0.00				
25	Ucr135XO	uterus 1	0.02	0.00				

0.00= Negative

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 75 -

Table 8 represents 100 samples in 15 different tissues. Table 7 and Table 8 represent a combined total of 124 samples in 25 human tissue types.

Comparisons of the level of mRNA expression in breast cancer samples and the normal adjacent tissue from the same individuals are shown in Table 8. Mam019 is expressed at higher levels in 13 of 21 (62%) cancer samples (mammary gland 3, 4, 6, 8-12, 15, 18-21) compared to normal adjacent tissue. If only the lobular adenocarcinomas samples are taken into account, 80% of the samples showed overexpression in cancer compared to normal adjacent tissue (mammary gland 18-21). CHROMOSOME LOCALIZATION: Blast result against the human genome database, showed that the sequence listed below for mam028 (SEQ ID NO:18) has 95-100% identity with a sequence in chromosomes 6, and 15.

SEQ ID NO:11; Clone ID Mam600372192F1 (sqmam022)

Semi-quantitative PCR was done using the following primers:

sqmam022forward:

20 5' GCAGCCTGAGGTGACTAATATCC 3' (SEQ ID NO:33)

sqmam022 reverse:

5' GCTTGTGTGAGAGTGTGCCTAAT 3' (SEQ ID NO:34)

Table 9 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of sqmam022 in 12 normal samples from 12 different tissues. These RNA samples are from single individual or are commercially available pools, originated by pooling samples of a particular tissue from different individuals. Using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology expression levels were analyzed from four 10x serial cDNA dilutions in duplicate. Relative expression levels of 0, 1, 10, 100 and 1000 are used to evaluate gene expression. A positive reaction in the most dilute sample indicates the highest relative expression value.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 76 -

Table 9: Sqmam022 in Normal Tissue Samples

	TISSUE	NORMAL
	Breast	1
	Colon	1
5	Endometrium	0
	Kidney	0
	Liver	0
	Lung	0
	Ovary	0
10	Prostate	1
	Small Intestine	0
	Stomach	0
	Testis	10
	Uterus	0

15 Relative levels of expression in Table 9 show that normal testes exhibit the highest expression of sqmam022, followed by breast, colon, and prostate.

Table 10 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of sqmam022 in 12 cancer samples from 12
 20 different tissues. Using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology expression levels were analyzed from four 10x serial cDNA dilutions in duplicate. Relative expression levels of 0, 1, 10, 100 and 1000 are used to evaluate gene
 25 expression. A positive reaction in the most dilute sample indicates the highest relative expression value.

Table 10: Sqmam022 in Cancer Tissue Samples

	TISSUE	CANCER
	bladder	0
	breast	1
30	colon	0
	kidney	0
	liver	1
	lung	0
	ovary	0
35	pancreas	0
	prostate	0
	stomach	0
	testes	1
	uterus	0

40 Relative levels of expression in Table 10 show that sqmam022 is expressed in breast, liver and testes carcinomas.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 77 -

Table 11 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of sqmam022 in 6 mammary gland cancer matching samples. A matching pair is formed by mRNA from the cancer sample for a particular tissue and mRNA from the normal adjacent sample for that same tissue from the same individual. Using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology expression levels were analyzed from four 10x serial cDNA dilutions in duplicate. Relative expression levels of 0, 1, 10, 100 and 1000 are used to evaluate gene expression. A positive reaction in the most dilute sample indicates the highest relative expression value.

Table 11: Sqmam022 in Mammary Gland Cancer Samples

SAMPLE ID	TISSUE	CANCER	NORMAL ADJACENT TISSUE
S99522A/B	mammary gland 1	1	0
4005724A2/B3	mammary gland 2	1	0
4005599A4/B2	mammary gland 3	1	0
4005629A2/B2	mammary gland 4	0	1
S9822245A/B	mammary gland 5	0	0
S9819997A/B	mammary gland 6	1	0

Relative levels of expression in Table 11 show that sqmam022 is expressed in four of the six mammary gland cancer samples with no expression in the matching normal adjacent tissue (NAT). This assay shows that sqmam022 is upregulated in 67% of the matching samples analyzed

CHROMOSOME LOCALIZATION: Blast result against the human genome database, showed that the sequence listed below for sqmam022 (SEQ ID NO:11) has 95-100% identity with a sequence in chromosome 11.

SEQ ID NO:15; Clone ID Mam600370727F1 (Sqmam023)

Semi-quantitative PCR was done using the following primers:

sqmam023forward:

5' TTCCAATTATTCTTTCTTTTGCTC 3' (SEQ ID NO:35)

sqmam023 reverse:

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 78 -

5' AGTGCGTGGTGATGCTCTAGTG 3' (SEQ ID NO:36)

Table 12 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of sqmam023 in 12 normal samples from 12 different tissues. These RNA samples are from single individual or are commercially available pools, originated by pooling samples of a particular tissue from different individuals. Using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology expression levels were analyzed from four 10x serial cDNA dilutions in duplicate. Relative expression levels of 0, 1, 10, 100 and 1000 are used to evaluate gene expression. A positive reaction in the most dilute sample indicates the highest relative expression value.

Table 12: Sqmam023 in Normal Tissue Samples

TISSUES	NORMAL
Breast	100
Colon	0
Endometrium	0
Kidney	1
Liver	0
Lung	0
Ovary	0
Prostate	1
Small Intestine	0
Stomach	0
Testis	0
Uterus	1

Relative levels of expression in Table 12 show that normal breast exhibit the highest expression of sqmam022, followed by kidney, prostate and uterus.

Table 13 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of sqmam023 in 12 cancer samples from 12 different tissues. Using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology expression levels were analyzed from four 10x serial cDNA dilutions in duplicate. Relative expression levels of 0, 1, 10, 100 and 1000 are used to evaluate gene expression. A positive reaction in the most dilute sample indicates the highest relative expression value.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 79 -

Table 13: Sqmam023 in Cancer Tissue Samples

	TISSUES	CANCER
	bladder	0
	breast	10
5	colon	0
	kidney	1
	liver	0
	lung	0
	ovary	0
10	pancreas	0
	prostate	0
	stomach	0
	testes	0
	uterus	0

15 Relative levels of expression in Table 13 show that sqmam023 is highly expressed in breast adenocarcinoma, followed by liver carcinoma.

Table 14 shows the absolute numbers which are relative levels of expression of sqmam023 in 6 mammary gland cancer matching samples. A matching pair is formed by mRNA from the cancer sample for a particular tissue and mRNA from the normal adjacent sample for that same tissue from the same individual. Using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology expression levels were analyzed from four 10x serial cDNA dilutions in duplicate. Relative expression levels of 0, 1, 10, 100 and 1000 are used to evaluate gene expression. A positive reaction in the most dilute sample indicates the highest relative expression value.

Table 14: Sqmam023 in Mammary Gland Cancer Samples

	SAMPLE ID	TISSUE	CANCER	NORMAL ADJACENT TISSUE
30	S99522A/B	mammary gland 1	1	0
	4005724A2/B3	mammary gland 2	0	1
	4005599A4/B2	mammary gland 3	0	0
	4005629A2/B2	mammary gland 4	10	1
35	S9822245A/B	mammary gland 5	0	10
	S9819997A/B	mammary gland 6	10	0

Relative levels of expression in Table 14 show that sqmam023 is overexpressed in three of the six mammary gland cancer samples with low or no expression in the matching normal

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 80 -

adjacent tissue (NAT). This assay shows that sqmam023 is upregulated in 50% of the matching samples analyzed.

CHROMOSOME LOCALIZATION: Blast result against the human genome database, showed that the sequence listed below for
5 sqmam023 (SEQ ID NO:15) has 95-100% identity with a sequence in chromosome 10, and 85-90% identity with another sequence in the same chromosome.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 81 -

What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide comprising:
 - (a) SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20;
 - 5 (b) a fragment of at least 15 contiguous nucleobases of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20,
 - (c) a nucleic acid sequence which, due to degeneracy in genetic coding, comprises variations in nucleotide sequence
10 as compared to SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, but which still encodes the same protein; or
 - (d) a nucleic acid sequence which hybridizes under stringent conditions to an antisense sequence of SEQ ID NO:
15 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20.
2. An antisense oligonucleotide which hybridizes to a polynucleotide of claim 1.
3. A vector comprising the polynucleotide of claim 1.
- 20 4. A host cell expressing the vector of claim 3.
5. A method for producing a MSG polypeptide comprising culturing the host cell of claim 4 under conditions which promote expression of the polynucleotide and isolating polypeptide expressed in the cells.
- 25 6. A method for producing a cell expressing a MSG polypeptide comprising transforming or transfecting a cell with the vector of claim 3 so that the cell, under appropriate culture conditions, expresses a MSG polypeptide.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 82 -

7. A polypeptide encoded by the polynucleotide of claim 1.

8. An antibody which is immunospecific for the polypeptide of claim 7.

5 9. A MSG for diagnosing mammary gland cancer comprising a polynucleotide of claim 1 or a polypeptide encoded thereby.

10. A method for diagnosing the presence of mammary gland cancer in a patient comprising:

(a) determining levels of a MSG of claim 9 in cells, tissues or bodily fluids in a patient; and

(b) comparing the determined levels of MSG with levels of a MSG of claim 9 in cells, tissues or bodily fluids from a normal human control, wherein a change in determined levels of MSG in said patient versus normal human control is associated with the presence of mammary gland cancer.

11. A method of diagnosing metastases of mammary gland cancer in a patient comprising:

(a) identifying a patient having mammary gland cancer that is not known to have metastasized;

(b) determining levels of a MSG of claim 9 in a sample of cells, tissues, or bodily fluid from said patient; and

(c) comparing the determined MSG levels with levels of a MSG of claim 9 in cells, tissue, or bodily fluid of a normal human control, wherein an increase in determined MSG levels in the patient versus the normal human control is associated with a cancer which has metastasized.

12. A method of staging mammary gland cancer in a patient having mammary gland cancer comprising:

(a) identifying a patient having mammary gland cancer;

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 83 -

(b) determining levels of a MSG of claim 9 in a sample of cells, tissue, or bodily fluid from said patient; and

(c) comparing determined MSG levels with levels of a MSG of claim 9 in cells, tissues, or bodily fluid of a normal human control, wherein an increase in determined MSG levels in said patient versus the normal human control is associated with a cancer which is progressing and a decrease in the determined MSG levels is associated with a cancer which is regressing or in remission.

10 13. A method of monitoring mammary gland cancer in a patient for the onset of metastasis comprising:

(a) identifying a patient having mammary gland cancer that is not known to have metastasized;

(b) periodically determining levels of a MSG of claim 9 in samples of cells, tissues, or bodily fluid from said patient; and

(c) comparing the periodically determined MSG levels with levels of a MSG of claim 9 in cells, tissues, or bodily fluid of a normal human control, wherein an increase in any one of the periodically determined MSG levels in the patient versus the normal human control is associated with a cancer which has metastasized.

14. A method of monitoring a change in stage of mammary gland cancer in a patient comprising:

25 (a) identifying a patient having mammary gland cancer;

(b) periodically determining levels of a MSG of claim 9 in cells, tissues, or bodily fluid from said patient; and

(c) comparing the periodically determined MSG levels with levels of a MSG of claim 9 in cells, tissues, or bodily fluid of a normal human control, wherein an increase in any one of the periodically determined MSG levels in the patient versus the normal human control is associated with a cancer which is

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 84 -

progressing in stage and a decrease is associated with a cancer which is regressing in stage or in remission.

15. A method of identifying potential therapeutic agents for use in imaging and treating mammary gland cancer comprising screening molecules for an ability to bind to a MSG of claim 9 wherein the ability of a molecule to bind to MSG is indicative of the molecule being useful in imaging and treating mammary gland cancer.

16. A method of imaging mammary gland cancer in a patient comprising administering to the patient the antibody of claim 8.

17. The method of claim 16 wherein said antibody is labeled with paramagnetic ions or a radioisotope.

18. A method of treating mammary gland cancer in a patient comprising administering to the patient the antibody of claim 8.

19. The method of claim 18 wherein the antibody is conjugated to a cytotoxic agent.

20. A method for identifying compounds which antagonize or agonize the MSG polypeptide of claim 7 comprising:

- (a) contacting cells which express the MSG polypeptide of claim 7 or cell membranes expressing the MSG polypeptide of claim 7 with a candidate compound; and
- (b) monitoring the cells for changes in MSG polypeptide activities or binding as compared to cells or cell membranes not contacted with the candidate compound.

21. A MSG polypeptide agonist identified by the method of claim 20.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

- 85 -

22. A MSG polypeptide antagonist identified by the method of claim 20.

23. A vaccine comprising a MSG polypeptide or a vector expressing a MSG polypeptide which induces an immune response
5 against the MSG polypeptide in a mammal.

24. A method of inducing an immune response against a MSG polypeptide in a mammal which comprises administering to the mammal the vaccine of claim 23.

25. A method of treating mammary gland cancer in a
10 patient comprising administering to the patient the vaccine of claim 23.

WO 01/72780

PCT/US01/09525

SEQUENCE LISTING

<110> Salceda, Susana
Hu, Ping
Recipon, Herve
Cafferkey, Robert
diaDexus, Inc.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF DIAGNOSING, MONITORING,
STAGING, IMAGING AND TREATING MAMMARY GLAND CANCER

<130> DEX-0200

<140>

<141>

<150> 60/192,277

<151> 2000-03-27

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 780

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aattacttgt totcttaag taaggcctta caccctacta aaatgtgatc aaaattttat 60
tatgaataga tgaaaagctg tagctataaa ttatgagagt aagtttattt tatatttacc 120
caaatgtagt tcataatagc ataataagcaa ctctactaaa tcttagaata aaaaatgaat 180
aaaatgttaa ttttttgagg gaaatggta attttttcta caaaattgtg tgacagcttt 240
acagacctta ctcttcacaa ttgacttgaa cattaacatc acaaagaggg tctgttttac 300
aaaagaatag tcaagaactt catgaatttt tgacagtgc tcttttctaa ccttttaac 360
caaatatatt taagtgtcca tcgtcttctt ttatccaact catttgtaa ctagttttct 420
tctgtgagtt cctttgcta taattgaagc agttctctga aatcacccaa actgatttta 480
tgaaagccca tgcttttgga aagatttgca ctctggcttt gcaatctatt tacattgact 540
gtacttgcat tgtattgcta gatgttgact atcagttagg acaatcaaaa agatattaga 600
taatgggcag ggataaatca gaagttactg tcaataacaa agttatgttt tatgggtatt 660
ttataggtga taaattcatt actgagcaat ttcatatcat gttttaattc tctgggtgt 720
aatatggtga ctctggagac tcaaatatta aatattggtg taaaggcaaa aaaaaaaaaa 780

<210> 2

<211> 392

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 01/72780

PCT/US01/09525

<400> 2
acaaaattat gcagagacta ctatagatgc attaaaaacc tctctcttct cctcccaaag 60
taatggaatt gaagctgacc acatgggtac ctatgcacac gttcattggc atcctttcat 120
ttctaaattc cctccaatcc aatgtgctgc ggggaagccg ctggtagctt aagatcctcc 180
tggcagctgt cactgtatg taatgggtgc ctatcttaac cagccaacaa tgccatagga 240
gatggtgcag cagatcacctg gaagggaatc ctaattcttt ctaatgtgca cagggaattga 300
gctactcact accaggaacc ttaagactat ggaagaaaaa ataatgatt ttagtcattt 360
tggaggaggg aggcttggag gcttggagc tt 392

<210> 3
<211> 280
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
actatcttta tgatgcttga atccaaactt gttccacact ccaaaatgct tctgcagccc 60
ctatgttctt gaagcaaccc ctcttctctg gctatagga cctccagcag gtgatgggtg 120
caggacccaa cctcaatgaa accagcattg tgtctggtgg ctatgggggc tctggtgatg 180
gactcatccc cacaggtatg aatgttcaga aacaggaatc ttgggtggag gaggggacag 240
gaatggtttg ggaagcata ggatatgtct aggaagctt 280

<210> 4
<211> 242
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ctgagtttca gtccctggct tacccttctt ggctgtggt tctaagcatg ttatttgctt 60
ctctcagctt caactgtgaa gagttcaatt aggtgatcac ttttaacttt ctatgctcga 120
tactctgtgc cagctctgga accatgcttt ttggtgtctg tgtgtatata taggtcacct 180
gtatgtattt aggtctttga gaatctactg gactatcaaa aaaaaaaaaa acccacaata 240
ga 242

<210> 5
<211> 520
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
gccttaggtg atgcagcggc caagagtga aactcatgat tatggtatct tttcttcta 60
atctacaggg tgatgttgat ccttttccat ccggtgtcca ggcactctgt tgagagccaa 120
cgataagatc tgcagcttgc ggctctttct ttccctcag gtgttgcacc tgctgttgct 180
cctggctagt cttgtctca cctcagatcc tactgatgtt acctttcagg gatctagcaa 240
agattctctt ctgatactat cttgggttgt ctctctgcga catttgctat gatgctactc 300

WO 01/72780

PCT/US01/09525

```
actcagctgt tgctagctag ctccacagcc acctctcacc tatttctggg cctcatctaa 360
acatatataaa accaaaattg gttcagaaaa ctaaatatca tggcctccct ctacttgctc 420
cagcaagtag atgtgacctt actcttagtt atctcaggat ggagtgtgc ccaagaagtg 480
atctatttca aaatcctgat tggaggagga agcaaaagctt 520
```

```
<210> 6
<211> 218
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221> unsure
<222> (127)
```

```
<220>
<221> unsure
<222> (129)..(130)
```

```
<220>
<221> unsure
<222> (155)
```

```
<400> 6
accacagcag gttatgggtc atacaggact taaatgacca gtgaatactg caaaaaata 60
aagctattct gcaaaatctg tgtaaaaaca acgcgtagta tcagaataga acagttaaaa 120
cagaagnonn agcagttact gaagacagac ggcanacagg cagctgcgcc acaggggttg 180
gcgtcccata gccatgtaca gcgtctaagg gaccgagt 218
```

```
<210> 7
<211> 526
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 7
actgaataca gtagacaact gtaacacata tggattatgt tgtatcttac catatacaaa 60
ggtaaaagtgt tctgccacaa tatcatgagc tttaacaacg ggtatgactt cattaggcca 120
taggagtttt cagcttcatt ataatttat agaaccacgg atggtatatg cagcctactg 180
ctgatacagt tggatatacag acacgtattc cctctccca caggcctgt tactagccac 240
gagtggtgga ttggctgaga gtaatgcact gtaggcagtt gtggctactt ttacgagaac 300
tgtcttgtca ggggagatgt atttaaacca gggacagatg gcccacagga gaaacataac 360
agctatgggt gaaattcatg tgtattctac aattgccatg gccatttaac tcaataaata 420
tgtgagtttt tttatcatct gccaaagcatt gttcataatt aacaggacaa aaacccaaac 480
tttgccttt ttggagccta cagtctagaa taaggagaga aacaaa 526
```

```
<210> 8
```

WO 01/72780

PCT/US01/09525

<211> 276
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> (96)

<220>
<221> unsure
<222> (113) .. (114)

<220>
<221> unsure
<222> (132)

<220>
<221> unsure
<222> (171)

<220>
<221> unsure
<222> (180) .. (181)

<220>
<221> unsure
<222> (207)

<220>
<221> unsure
<222> (235)

<220>
<221> unsure
<222> (239)

<220>
<221> unsure
<222> (257)

<220>
<221> unsure
<222> (259)

<400> 8
aaaaaaagga ggaggagaaa atggaagtgg atgaggcagg caaaaaggag gaaaaagaga 60
ggaaaaagag aaccgttggg gccaaactta ccaggnttca ttagatacac ccnnagcccg 120
agttatgcct angcccagct taagcgtaca ctaaccatag ccgtgagacc ntagtagatn 180

WO 01/72780

PCT/US01/09525

naccacgect ttcaagaaca cactcantct attgtgagcg cccatcaact caatntccnt 240
 ggacacgggc acttaacnna gcttgacat gaacaa 276

<210> 9
 <211> 662
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 actagaacgt gaagcacctt tatthagcaa ctaattacaa cagagttgct taagattgat 60
 gcagactaaa ctcatcatg acaactagca acaacgatta ctgacactac acttagctaa 120
 gcttccattc acttcacgcg aatcttactg cccaacagca tcacacatta tccctgaaa 180
 ctctcaactc ttctcctctt gacctatgaa gcatcacaac actgacggca tcaaccaagc 240
 tggcgctaac ttctccttca gcgcgcttct gcttatctaa cagcacttct aacactgacc 300
 gcatgactac ctctgctaca acgatactcg taacaaacga acgcgccctg gaccattaac 360
 ttattcacag ttctcccaac tctgaccacc tcttccctac cctctctcac acgcggaacc 420
 cctctgatac acctaaatag cgctccacgc gggcgcgcg ctaaacccact cactggccac 480
 caatcaacaa accactccta aacacttacc agcacttctt ccacgctaca cagtgtcccc 540
 aaaagataac agcccaaaact ccttgcctac actgctcact actacacaca ccccaaccaa 600
 caccaccaca cacaaccccc caccacacc ctaccgccac aaacacaaca cgcaccaacc 660
 ac 662

<210> 10
 <211> 620
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> (195)

<400> 10
 acacatttag gtaatctctg tgttccccag cccctctaaa gagcactact gtgtcctcct 60
 tgccatatac catgcccctc gtcaggaaag gccttgccct ttctctctat gcccaactccc 120
 cactgtccct cctgatacat ctccaatatt acctcttctc caacctccct gggagagtta 180
 attacctcct ccttngggct cctataacaa cttttacatc tcttgcaaga ggttacttga 240
 attacttgtt tacatacatg tctatctccc aaacaagtct aaaaatggta ggcttctaaa 300
 taattatacg ttgataaat atgaatgaat gaccttttct atggaaagct aggcgctaaa 360
 ggtgatagag agataaatg cacatacgag ctctcaaggg aaatagacag acacatagat 420
 aatgtataag tagaataata attctttgaa ttgaaatccc cagggaacaa ttttactca 480
 accgaaaatc taactgcaat ctaagattt tcacatacaa ccacttgga ttgacttaca 540
 actccaccta gataggttca taaagtccga tcttttctt gttacattct tagagctcat 600
 aaagggtggc tgaacaggca 620

<210> 11

WO 01/72780

PCT/US01/09525

<211> 486
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ggccgctgga gctgcgtgag acgccgtcat tctccacac cctgggagca gtggggaacc 60
 ctgtatgcga cttcacagca caccacgctc cgtgtgagct attaaaggcc caccacgcat 120
 cctcgtcttt cagtgacact ttctctgaaga aataatacaa tctggaatgg gctacagaat 180
 ctatccctta gggtagtgga caggaggggg atgggtgaaa caaagtcaaa tggctgtaag 240
 cagctatcta ctgaagcagg atggttaacct ttctctactt ttatgcttga aatttctcac 300
 aaataaagat gagaaaatac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cacacacaaa aaacgccggg 360
 ggaacaccgg gccctacggg tgccccgtgt gaacatggga tacgggccca acaaccggag 420
 aaaaatagca cacacagaga gagaaagaga ccgacgcaga accgacgacg acgcagagac 480
 agacag

<210> 12
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 actacatttc caaccctgag atggagtgtt ataggagcag ggaatcagc cagggtggg 60
 tgtgggcagg aatggttaaa cactactgtt atttcagtaa tgtgataatt ggagttttta 120
 gggtagtgtt gtgtgttttg ggaagtaga gtggagcagg agaaagggtg ttagacaaac 180
 tgtgttagag aaattgaatc tcagatgggt agtgttttat tttccacac tactcttgct 240
 tttttaagtt actactccca caggagattg gctatagact gacatgagtg agtaaagtta 300
 ctcatagggt gaattcaagc tt 322

<210> 13
 <211> 519
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> (146)

<220>
 <221> unsure
 <222> (322)

<400> 13
 acgactaata tcttcaattt actaagaaga taaagaggtc gataaataag gaggtcaagc 60
 ccgctttttg aacggtcaca caccgaaaga aagcagaacc acgaaaactg acacttcgcg 120
 ctgctcaccg tgcggcgtgg gcgcantag aaggctctct tgacactccc ttcggcctac 180
 cgctcgacgg cgattctcga ctgtgcacat cttattctgc gccctgcagc gcgagctaca 240

WO 01/72780

PCT/US01/09525

```

cgacacaggtt cggatatttc catttagctc acggacagga cgcttgctg cttgaaggct 300
tacgcactac agcttactca anggcaacac gcataaccta accaatgaga ctcccgcaag 360
ctttatgccc aaaaaccctc gcgactgctg atggccattc catggccagc gacgctctag 420
gcgataactc cactactgcg actgctagca ctccgtgac taatcccctg gcggcggttg 480
aagcatttgt cataagcttt ccgtgtgcgc tgactcaaa 519

```

```

<210> 14
<211> 248
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 14
acttcagccc tcagaaaatg agaaagaata attttttttg ttccagccac ccagtcatat 60
tagctgtggc agcctgaggt gactaatatc ctgccaaaaa cgcacagcca aacaccaggc 120
agacccaaac tgagggatcg tgagaataga tctggcctat aatcagaagt gtcgaggtca 180
tgaacgtcaa gggaagattg aggaaccatt ccagacaaat gtaattaggc acactctcac 240
acaagctt 248

```

```

<210> 15
<211> 473
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 15
actcctatct aatgtgtgc tctctcattg atgggcctga aaaaaacaa acatttttta 60
aaatgggata gccacattgg caactttcta aaagtcctaa ttttttctag acaaatgat 120
aatatatgct acttattttt agtgaacat ttctcaaat gattaaaatg aatctaaac 180
tattttcacc agttttactt ccaattatct tttcttttgc tctattattt cttagaggtg 240
tcaagggcaa attaattagc agctgtttta attaagaaga attctgattt ctccataata 300
gtgatggcag ctttataatt aatattttta cctgcctgct gacctactaa ttagaatagg 360
aaatggcctt tagacaggat cagttggcac tagacatcac cagcactta cacacacatg 420
ctcaaatcaa cottgggttg agagaacttt aggtgttagt ttatataaag ctt 473

```

```

<210> 16
<211> 394
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 16
acgttgacat gcactattgc acttgattct tgtaacaaat ttgtaagaaa acaagggtag 60
ctattattag tccctcttta tcattattat gaaaacattt ctaaatagaa aaattgagga 120
ccataaatgt atacggaaaa tttgttttta aaagaaatac ccaagtgaag gcacaatgtt 180
ctcaagatcc aggtcaagtt ttcttgata gaaggaataa gttaaataa aaaccataa 240
gtttctatga atatatcttg ttaataaatt taatgatgtg actaatccc aagctctatg 300
ttacttagag aactatactt aggatactgt gtattcatcc atacaataaa gtttttttac 360

```

WO 01/72780 PCT/US01/09525

ccaacgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaag gctg 394

<210> 17
<211> 391
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
gaccaactgt gctccatctc cagaggttg tgaagagaga aaatgggco cctgcactac 60
agcatgagag ccatcagtta gacaaaaaga agcatggtga gacaggcaag gccctccaga 120
gaaagccagg aaggcagtgga gtggctttca aaaccgatgt ggtgcattca gaggctggaa 180
gatggacaat attactttcc cagaaagttt cgcataactt tctcttttgt tggcatgttg 240
aaaatagcaa gccattgcct cttcccccg cgcctgggtc tgcctggcaag catgttaatt 300
tcacagaactc acagaattaa agccagagag gatccttgta actcatcttc tctccctccc 360
cagctcccca cagaaccata cccaaaagct t 391

<210> 18
<211> 634
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
acagtttgat tcttggttgt ctaattttgt agtcaacagc cttctgattt tatagaattc 60
tctcttattt tgtctcatg agatctaaaa tcgtctgtgt aattggcttg tggtaaatat 120
ctcaaaaggag accaatggta aatatctcaa atgagagcat tagagataatt ttaacctctt 180
acaaagaggc taaaagcaac ttgtctctatt agaagtgtat ctttaattaag tattgcttag 240
aaagtcttcta agacatcatg attatactga agttagattc tggacaaagt gtatgagaaa 300
gtttacggct ataaaagggt tgcctgagag ttttccctaa ataacgcag catgaatctt 360
tctttgtct atgaattttt aaagtattta tgggcccctc ggtctcttaa atttaagtt 420
cattttcact ttctactctc ttctattttc aagacaaatc tttttctctc taccgttttt 480
acttttcaaa gtttgggaaa aaatactgat ttttgggaag ctattttatt gccctcttcc 540
atagccatct tgtgctcatt ttctgtccta atatttatcc cggacaattg gcttggggagc 600
caagcataat attttttgag gtcgcgggat ccag 634

<210> 19
<211> 239
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
actagagagc attattcctg attaatgttt aagaaaaagtt ttattaataa cattaattct 60
ctagataatc actttttata tcttttcaag atgtctctat cttgaaacat ttatctgcca 120
cattataaaa atagatatta ttttattcag ttatagaat actcactgtg tttaaggcac 180
tattctggac atcgagctgc aatagtgaac ataatcaagt ttctgtcttc attaatgctt 239

WO 01/72780

PCT/US01/09525

<210> 20
<211> 515
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20
actaccccca tgaagtaggt taattaagaa gacaaatgat cagaaaagta gtgagaaaac 60
tgaaaaatcc taatgccttg taagtcagta ttagaaaact ttaagaacta agatttcagc 120
ctgagggaagc tgattaaaaa ataaaaataa aaaaccacac caagattgat ggcaatagat 180
gtaattgaaa agaggaaaca gaactgagga atgatttttg aatttgagta ggaggaggtc 240
attggtattt ttagaagggt ttctgtggaa tacagaacac agaaatcatg ttacagagtg 300
tatataggag gggaaagtat ttaaaaagca cagtcaaggg atacagggca ctcttgaaaa 360
ttttaacaat taaatgaggt ggcagtagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaac aaaaaaaccc 420
ggggggcgaaa cacgggccaa aggggtaccc gggggacaac cggaaacccg gcacccaaaa 480
ataatctcaa ccacaacact cccgacaaac cacct 515

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 21
ccatcgtctt cctttatcca act 23

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 22
tgggtgattt cagagaactg ct 22

<210> 23
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/72780

PCT/US01/09525

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 23

tcaattatag gcaaaggaac tcacagaaga aaac

34

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 24

gtggctcttt cttttccctc ag

22

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 25

cgcagagaga caacccaaga

20

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 26

acctgctggt gctcctggct agtcttg

27

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/72780 PCT/US01/09525

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 27
tccatctcca cgagggttg 20

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 28
gccttgccctg tctcaccat 19

<210> 29
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 29
tgtctaactg atggctctca tgctgtagtg 30

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 30
agaggctaaa agcaacttgt cc 22

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/72780 PCT/US01/09525

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 31
ggaaaaactc ttagcaaacc tt 22

<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 32
agccgtaaac ttctcatac actttgtcca 30

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 33
gcagcctgag gtgactaata tcc 23

<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 34
gcttgtgtga gactgtgcct aat 23

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/72780

PCT/US01/09525

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 35
ttccaattat tctttctttt gctc

24

【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)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 October 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/72780 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, CA 94583 (US), RECIPON, Herve [FR/US]; 85 Fortuna Avenue, San Francisco, CA 94115 (US), CAFFERKEY, Robert [IE/US]; 350 Elan Village Lane, Apartment 218, San Jose, CA 95134 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/09525
- (22) International Filing Date: 26 March 2001 (26.03.2001) (74) Agents: LICATA, Jane, Massey et al.; Licata & Tyrrell P.C., 66 E. Main Street, Marlton, NJ 08053 (US).
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): AU, CA, JP, US.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Priority Data: 60/192,277 27 March 2000 (27.03.2000) US Published: — with international search report
- (71) Applicant (for all designated States except US): DI-ADEXUS, INC. [US/US]; 343 Oyster Point Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US). (88) Date of publication of the international search report: 11 April 2002
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): SALCEDA, Susana [AR/US]; 4118 Crescendo Avenue, San Jose, CA 95136 (US). HU, Ping [US/US]; 108 Palmer Street, San Ramon, CA 94583 (US).
- 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 01/72780 A3

(54) Title: POLYNUCLEOTIDES FOR DIAGNOSING MAMMARY GLAND CANCER

(57) Abstract: The present invention provides polynucleotides and polypeptides which are diagnostic markers for mammary gland cancer. In addition, antibodies immunospecific for these markers are provided. Vectors, host cells and methods for producing these markers, as well as methods and tools for using these markers in detecting, diagnosing, monitoring, staging, prognosticating, imaging and treating mammary gland cancer are also provided.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/09525
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N5/10 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/574 A61K51/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHORR K ET AL: "BCL-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer" JOURNAL OF MAMMARY GLAND BIOLOGY AND NEOPLASIA, PLENUM PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 4, no. 2, April 1999 (1999-04), pages 153-164, XP000973885 ISSN: 1083-3021 * See pages 159-161 * --- -/--	1-20, 23-25
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 December 2001		Date of mailing of the international search report 27/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-0916		Authorized officer Korsner, S-E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/09525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARMECI ET AL: "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 45, no. 3, 1 November 1997 (1997-11-01), pages 607-617, XP00209963 ISSN: 0888-7543 * See page 607 (Summary + footnote); pages 610-611 (Figure 2) *	1-20, 23-25
A	WO 99 57565 A (BLASCHUCK ET AL; ADHEREX TECHNOLOGIES INC) 11 November 1999 (1999-11-11) * See page 2 (Summary) and Figures 2-3 *	1-20, 23-25

International Application No. PCT/US 01 09525

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 21-22

Present Claims 21-22 relate to agonists and antagonists identified by the method of Claim 20. The claims are merely desiderata and no such compounds have been disclosed. Moreover, it is not possible to search undefined compounds.

Note also that Claim 1(b) and its dependent claims relate to a very large number of possible fragments. These claims too have the character of a desideratum and it is not possible to make a meaningful search of all the fragments covered.

Note finally that Claim 23 have been searched for peptides as defined in preceding claims.

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				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/US 01/09525	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 9957565 A	11-11-1999	AU	3590699 A	23-11-1999	
		AU	3590799 A	23-11-1999	
		WO	9957565 A2	11-11-1999	
		WO	9957149 A2	11-11-1999	
		EP	1075662 A2	14-02-2001	
		EP	1075494 A2	14-02-2001	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 4
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 51/00	A 6 1 K 49/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/82	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 16/32	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 49/02	A

(72)発明者 レシボン, ハーヴ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 5、サン フランシスコ、フォーチュナ アベニュー 8 5

(72)発明者 カファーキー, ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 3 4、サン ホセ、アパートメント 2 1 8、エラン ビレッジ レーン 3 5 0

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB41 CB01 DA14 FA12 FB02 FB12 GC15
 4B024 AA01 AA11 CA04 GA11
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ13 QQ20 QQ53 QQ79 QR77
 QR80 QS25 QS34
 4B064 AG01 CA01 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA19X AA26X AA41X AA46X AA50X AA53X AA90X AA90Y AA91X AA93X
 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
 4C076 AA65 BB11 CC27 CC50 EE59
 4C084 AA13 AA16 MA17 MA23 MA55 MA65 MA66 NA14 ZB262
 4C085 AA03 AA13 AA14 AA16 AA19 AA26 BB11 BB41 CC22 CC23
 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05 HH03 HH07
 4C087 AA01 BC83 MA17 MA23 MA55 MA65 MA66 NA14 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 DA75 EA28 EA53 FA72 FA73
 FA74

专利名称(译)	用于乳腺癌的诊断，监测，分期，成像和治疗的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2004501613A	公开(公告)日	2004-01-22
申请号	JP2001571711	申请日	2001-03-26
申请(专利权)人(译)	Diadekusasu公司		
[标]发明人	サルセダスサーナ ヒューピン レシボンハーヴ カファーキーロバート		
发明人	サルセダ,スサーナ ヒュー,ピン レシボン,ハーヴ カファーキー,ロバート		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/76 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00 A61K51/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/4702		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/76 A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00.C A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A A61K49/02.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB41 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/FA12 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ20 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA19X 4B065/AA26X 4B065/AA41X 4B065/AA46X 4B065/AA50X 4B065/AA53X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA65 4C076/BB11 4C076/CC27 4C076/CC50 4C076/EE59 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA55 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/AA26 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/HH03 4C085/HH07 4C087/AA01 4C087/BC83 4C087/MA17 4C087/MA23 4C087/MA55 4C087/MA65 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA53 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	60/192277 2000-03-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了多核苷酸和多肽，它们是乳腺癌的诊断标志物。另外，提供了对这些标记物免疫特异性的抗体。还提供了载体，宿主细胞和产生这些标志物的方法，以及用于检测，诊断，监测，分期，预测，成像和治疗这些标志物的乳腺癌的方法和工具。。

筋肉	0.00
卵巢	0.00
脾臓	0.00
前立腺	1.39
直腸	0.00
小腸	0.00
脾臓	0.00
胃	0.27
精巣	1.00
胸腺	0.38
気管	0.00
子宮	0.00
血液 B1	0.00
血液 B10	0.00
血液 B11	0.00
血液 B12	0.13
血液 B13	0.00
血液 B14	0.00
血液 B15	0.00
血液 B4	0.00
血液 B5	0.00
血液 B6	0.00
血液 B7	0.00
血液 B8	0.00