

(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2004-518409

(P2004-518409A)

(43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(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 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 108 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-521482 (P2002-521482)	(71) 出願人	399009929
(86) (22) 出願日	平成13年8月22日 (2001.8.22)		アルバート・アインシュタイン・ヘルスケ
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月19日 (2003.2.19)		ア・ネットワーク
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/026213		ALBERT EINSTEIN HEA
(87) 国際公開番号	W02002/016385		LTHCARE NETWORK
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		アメリカ合衆国19141ペンシルベニア
(31) 優先権主張番号	60/226,993		州 フィラデルフィア、オールド・ヨーク
(32) 優先日	平成12年8月22日 (2000.8.22)		・ロード 5501番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062144
			弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100086405
			弁理士 河宮 治
		(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な腫瘍抑制因子をコードする核酸、PTX1、およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒト染色体12に位置付けられる、PTX1をコードする新規な核酸分子を提供する。PTX1をコードする核酸分子、それによってコードされるタンパク質およびそれに対する抗体は、癌の診断、予知および治療を容易にするために有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の配列を含む、P T X 1 をコードする核酸分子。

【請求項 2】

c D N A である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

R N A である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

ゲノム D N A に存在するエキソンをコードする、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

二本鎖 D N A である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

以下の群から選択される配列を含む、P T X 1 をコードする単離核酸分子：

a) 配列番号 1 ；

b) 配列番号 1 に特異的にハイブリダイズする配列；

c) 配列番号 2 のポリペプチドをコードする配列；

d) 配列番号 1 の相補鎖；および、

d) a)、b)、c) および d) からなる群から選択される配列の自然対立遺伝子変異体。

【請求項 7】

10 から 50 の間のヌクレオチドを有し、請求項 6 に記載の核酸分子に特異的に結合する、アンチセンス分子をコードする核酸分子。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の核酸分子を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 9】

前記ベクターが、プラスミド、大腸菌 (E . c o l i)、出芽酵母 (S . c e r e v i s i a e) およびレトロウイルスからなる群から選択される、請求項 8 に記載の発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞。

【請求項 11】

前記宿主細胞が、細菌、菌類細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞からなる群から選択される、請求項 10 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の核酸分子の発現産物である、単離ポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 14】

ポリペプチドの生産および精製方法であって、以下の工程、

a) 前記ポリペプチドが生産される条件下で請求項 10 に記載の宿主細胞を培養する工程

；

b) 前記ポリペプチドを前記宿主細胞培養物から回収する工程、

を含む方法。

【請求項 15】

請求項 12 に記載のポリペプチドに対して免疫学的に特異的な抗体。

【請求項 16】

請求項 12 に記載のポリペプチドに結合する試験化合物を同定する方法であって、以下の工程：

a) 配列番号 1 の核酸分子の発現により生産された精製ポリペプチドを提供する工程；

b) 前記ペプチドを、前記ペプチドに対して結合アフィニティーを有すると推測される試

10

20

30

40

50

験化合物と、反応混合物中で接触させる工程；および、

c) 前記試験化合物と前記ペプチドとの間の複合体形成について前記混合物をアッセイする工程、
を含む方法。

【請求項 17】

前記ペプチドが生物活性を有し、前記試験化合物がそのアゴニスト活性について評価される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ペプチドが生物活性を有し、前記試験化合物がそのアンタゴニスト活性について評価される、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 19】

患者試料中の核酸配列における突然変異を同定する方法であって、以下の工程：

a) 前記患者から核酸試料を単離する工程；
b) 前記核酸試料と配列番号 1 の核酸配列とを、十分な相補性を有する配列間で DNA 二本鎖を形成するような低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；
c) 存在すれば前記 DNA 二本鎖を単離する工程、および、
d) ミスマッチ塩基対 (mismatched base pairing) について前記二本鎖を評価する工程、
を含む方法。

20

【請求項 20】

前記ミスマッチ塩基対が、前記患者試料からの前記核酸における欠失の存在によるものである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記ミスマッチ塩基対が、前記患者試料からの前記核酸における挿入の存在によるものである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ミスマッチ塩基対が、ポイントミューテーションの存在によるものである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

配列番号 1 の相補配列に特異的にハイブリダイズすることができる、配列番号 1 の核酸配列由来の核酸プローブを用いて、試験試料中の標的核酸分子を同定する方法であって、プローブと試験試料とをハイブリダイズする条件下で接触させる工程、およびハイブリダイゼーションが起こったか否かを観察する工程、を含む方法。

30

【請求項 24】

前記プローブが、PTX1 をコードする核酸またはその突然変異遺伝子を同定するために用いられる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

PTX1 活性を調節する薬剤を同定する方法であって、以下の工程：

a) PTX1 を発現する細胞と、PTX1 活性を調節できると推測される薬剤とを、細胞成長を支持することができる培地で接触させる工程；
b) 前記 PTX1 を発現する細胞の増殖を、前記薬剤の存在下と非存在下の両方で測定する工程；および、
c) 前記薬剤の存在下における PTX1 を発現する細胞の増殖と、前記薬剤の非存在下における PTX1 を発現する細胞の成長とを比較して、細胞増殖における上昇または減少が、前記薬剤が PTX1 活性を調節できると示すものであるという工程を含む方法。

40

【請求項 26】

癌の感受性に関連する PTX1 遺伝子の発現を検出するためのキットであって、少なくとも 1 つの、発現した PTX1 核酸に特異的に結合することができる核酸プローブを含むキ

50

ット。

【請求項 27】

癌の感受性に関連する P T X 1 遺伝子の発現を検出するためのキットであって、少なくとも 1 つの、発現した P T X 1 核酸によってコードされるポリペプチドに特異的に結合することができる抗体を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、引用により本出願にその全体の開示内容が含有される、2000年8月22日出願の米国仮出願 60/226,993号に対し、35 U.S.C. § 119(e) に基づく優先権を主張するものである。

10

【0002】

発明の分野

本発明は、前立腺癌の診断および治療に関し、より具体的には、前立腺癌の診断および治療のために有用な、新規な核酸分子、タンパク質そして免疫学的にそれに特異的な抗体に関する。

【0003】

発明の背景

本出願において、本発明の属する技術分野の状況をより完全に記載するために、著者名および刊行年をカッコで示していくつかの刊行物を引用する。これらの刊行物の開示内容は、引用により本出願に含有される。

20

【0004】

癌の分子的基础は、過去数年間にわたり大きな研究努力が向けられてきたテーマである。この努力により、異常な細胞増殖は癌遺伝子の活性化のみならず、正常な細胞分裂の維持において重要であると思われる機能を有する特定の遺伝子の破壊によっても起こるということが見出された。周知の例として、p53腫瘍抑制遺伝子における突然変異がヒトの癌において共通にみられ、種々の組織起源の腫瘍タイプにおいて検出されている。

【0005】

本年、米国においておよそ20万人の男性が前立腺癌であると診断され、その結果3万8千人の命が失われると予測される。そのように多数であるため、前立腺癌は米国の男性においてもっとも頻繁に悪性腫瘍であると診断され（皮膚のものを除く）、そのグループにおける癌関連死の第2の主要な原因であるといえる。医者は通常前立腺における塊を発見することにより癌を検出するが、それは精子の生存力を維持させるためにクルミ型の構造を有する。そのような塊は、ありきたりの検査、あるいは突然の排尿不快感または時折の性的不能を訴える患者によって促される検査において発見され得る。

30

【0006】

前立腺癌が、良性の前立腺過形成とよばれる疾患の治療の過程で検出される例もある。この病気、すなわち加齢による前立腺の肥大は、45歳以上の全ての男性の半分以上を冒すものであり、（たとえより漸進的であるとしても）前立腺腫瘍によって起こるものと同じ泌尿器障害を引き起こすものである。症状が非常に苦痛なものとなると、前立腺の一部を削り取る方法である、尿道を横切る前立腺の切除が行われることもある。切除が行われる場合は常に摘出した組織を悪性腫瘍の証拠確認のために顕微鏡での分析にかけるが、時折悪性腫瘍が発見されることがある。

40

【0007】

前立腺特異的抗原（PSA）についての簡単な血液検査が、前立腺癌を検出するための第3の手段である。PSAレベルの上昇は、前立腺異常の症状を示さない人における癌の存在の前兆となり得る。

【0008】

前立腺癌は非常に不均一性を示す疾患である。前立腺の発癌に関連するとして多くの遺伝子が同定されているにもかかわらず（Lara et al., 1999; Scia vo l i n o a n d A b a t e - S h e n , 1998）、前立腺癌の発達の基礎となるメ

50

カニズムはいまだによく理解されていない。しかしそれは、細胞の増殖、分化およびプログラムされた細胞死を調節する遺伝子の遺伝的变化を含む複数工程のプロセスであると考えられている。これらの腫瘍抑制遺伝子の欠失または減少が、しばしば癌の発達を導くのである。

【 0 0 0 9 】

発明の概要

前立腺癌の発達を基礎づける生物学的プロセスをさらに理解するため、本発明者らは正常な前立腺組織に発現しているが悪性前立腺組織には発現していない腫瘍抑制遺伝子を同定した。したがって、本発明により、細胞分化および腫瘍形成の調節に関わる構成成分の同定、検出および/または分子キャラクタリゼーションに有用な新規な生物学的分子が提供される。

10

【 0 0 1 0 】

本発明の好適な態様において、ヒト P T X 1 タンパク質をコードする単離核酸分子が提供される。特に好適な態様において、ヒト P T X 1 タンパク質は配列番号 2 の配列を含むアミノ酸配列を有する。本発明の P T X 1 核酸分子の例は、配列番号 1 の配列を含む。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の態様によると、(1) 配列番号 1、(2) 配列番号 1 の相補鎖のあらかじめ選択された一部または全部と特異的にハイブリダイズする配列、(3) 配列番号 1 のあらかじめ選択された部分を含む配列、(4) 配列番号 1 の相補鎖、および(5) 配列番号 2 の配列を含むポリペプチドの一部または全部をコードする配列、からなる群から選択される配列を有する単離核酸分子が提供される。そのような部分配列は本発明の P T X 1 遺伝子の相同体を同定および単離するためのプローブとして有用である。したがって、配列番号 1 の核酸の自然対立遺伝子変異体をコードする単離核酸配列も本発明の枠内であると考えられる。自然対立遺伝子変異体という語は後で定義する。

20

【 0 0 1 2 】

本発明の P T X 1 をコードする核酸を含む宿主細胞もまた本発明の枠内に含まれる。そのような宿主細胞は、細菌細胞、菌類細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞およびその他の動物細胞を含むが、それらに限定されるものではない。P T X 1 をコードする核酸は、宿主細胞への導入のために簡単にプラスミドまたはレトロウイルスベクターにクローニングすることができる。そのような細胞は P T X 1 発現を調節する化合物を同定するためのスクリーニング方法において有用である。そのように同定された化合物は、前立腺癌の治療において治療的価値を有する可能性がある。

30

【 0 0 1 3 】

本発明の別の態様によると、単離ヒト P T X 1 タンパク質が提供される。この P T X 1 タンパク質の発現の減少は、前立腺癌の成長の調節解除に関係している。

【 0 0 1 4 】

本発明の好適な態様において、タンパク質はヒト起源のものであり、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。さらなる態様において、タンパク質は配列番号 1 の自然対立遺伝子変異体によってコードされてもよい。あるアミノ酸変異が自然対立遺伝子変異体によってコードされるヒト P T X 1 タンパク質に存在している限りは、そのようなタンパク質は本発明の枠内である。上記のヒト P T X 1 タンパク質に免疫学的に特異的な抗体も提供される。

40

【 0 0 1 5 】

本発明のさらに別の態様において、前立腺癌の危険がある、あるいは現在前立腺癌を患っている患者の遺伝子スクリーニングおよび診断評価の方法が提供される。本発明の核酸のハイブリダイゼーション特異性は、前立腺癌に共通の表現型の特徴を示す患者の差異評価のために有用である可能性がある。本発明の好適な態様において、患者試料中の核酸配列における突然変異を同定するための方法が提供される。この方法は、患者から核酸試料を単離する工程、該核酸試料を配列番号 1 の核酸配列と十分な相補性のある配列間で DNA 二本鎖を形成させるような低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程、DNA 二本鎖を単離する工程、および該二本鎖を mismatch 塩基対 (m i

50

s matched base pairing) について評価する工程を含む。

【0016】

別の態様において、本発明の核酸分子は、PTX1またはその突然変異のための、診断ハイブリダイゼーションプロブまたは診断PCR分析のプライマーとして使用することができる。アンチセンス分子も本発明により提供され、PTX1発現の調節において有用でありうる。本発明に含まれるその他の方法には、PTX1タンパク質の存在について生物試料を評価するための免疫検出方法がある。

【0017】

本発明のその他の態様によると、PTX1活性を調節する薬剤を同定するための方法が提供される。この方法は、PTX1を発現する細胞を、PTX1活性を調節することができる 10
と推測される薬剤と接触させる工程、該薬剤の存在下および非存在下の両方で、PTX1を発現する細胞の増殖を測定する工程、および該薬剤の存在下と該薬剤の非存在下での、PTX1を発現する細胞の増殖を比較する工程を含む。該薬剤の存在下での細胞増殖における変化は、その薬剤がPTX1活性を調節する能力を指し示すものである。

【0018】

本発明のさらに別の態様において、癌の感受性に関連するPTX1発現を検出するためのキットが提供される。そのようなキットはヒト前立腺癌の診断に有用であり得る。

【0019】

図面の簡単な説明

図1は、4つの選択されたクローンについてのRT-PCRによるディファレンシャル発 20
現を示すゲルである。ファーストストランドcDNAを正常前立腺(N)および前立腺腫瘍(T)から単離したトータルRNA 10 μg から合成した。cDNAの2 μlのアリコットを各クローンに特異的なプライマーを用いて増幅した。PCR産物を2%アガロースゲルで分析した。分子サイズマーカー(M)はBstNIで消化したpBR322 DNA である。クローン149と348は、正常前立腺(N)においてバンドが存在するが前立腺腫瘍(T)においては存在しないことによって示されるように、正常前立腺においてのみ発現していた。クローン341と394は正常前立腺と前立腺腫瘍の両方で発現していた。クローン348をさらなるキャラクタリゼーションのために選び、本明細書においてPTX1と称する。

【0020】

図2は、全長PTX1 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。オーバーラッ 30
プするcDNAを組み合わせたヌクレオチド配列とそのPTX1タンパク質への翻訳を5'から3'方向において示す。ヌクレオチド配列とアミノ酸配列(配列番号2)の番号付けは、右側に示す。AATAAA配列に下線を引いてある。

【0021】

図3は、PTX1遺伝子がヒト染色体12に位置づけられるということを示すゲルである。24の体細胞雑種のパネルのDNAサンプルと3つのゲノムDNAコントロールを、「方法」において記載したPTX1-特異的プライマーを用いて増幅させた。PCR産物を1%アガロースゲルで分析した。レーン1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22のDNAサンプルは、その番号に対応する単一のヒト染色体を含む。レーン4のサンプルは2つのヒト染色体、4および7を含む。レーン20のサンプルは3つの染色体、20、8および4を含む。レーン23, 24, 25, 26および27のサンプルは、染色体X、染色体Y、ヒトDNA、ハムスターDNAおよびマウスDNAをそれぞれ含む。分子サイズマーカー(M)はHindIIIで消化したラムダDNAである。ヒト染色体12およびヒトDNAを含むサンプルのみにおいて2 kbのバンドが生じ(レーン12および25)、これによりPTX1 40
遺伝子はヒト染色体12に位置付けられることが示される。全てのレーン(レーン25を除く)に存在する小さいサイズのバンドは、げっ歯類PTX1遺伝子に関連するものであるう。

【0022】

10

20

30

40

50

図4は、組換えPTX1タンパク質の、Talon Metal Affinity Resinカラムでの精製を示すゲルである。組換えタンパク質を細菌宿主から抽出し、実施例1に記載のようにTalon Metal Affinity Resinカラムで精製した。レーン1は全タンパク質を含むものであり；レーン2は組換えPTX1タンパク質の第一の溶出を含むものであり；レーン3はPTX1タンパク質の第二の溶出を含むものであり；そしてレーン4は分子量マーカを含むものである。

【0023】

図5は、正常前立腺および前立腺腫瘍におけるPTX1タンパク質の免疫局在性を示す顕微鏡写真である。切片を組換えヒトPTX1に対するウサギ抗血清を用いてPTX1の存在について染色した。赤色部分は陽性の免疫反応性産物を示す。正常腺上皮の細胞質と核の両方が強い染色を示したが、腫瘍領域は染色を示さなかった。

10

【0024】

図6は、PTX1およびCDA14のcDNA（それぞれ配列番号1および4）のヌクレオチド配列比較を示す。アラインメントはPTX1のヌクレオチド配列（上段、本研究）とCDA14の公表配列（下段、Song et al., 2000）とに基づくものである。アラインメントを至適化するために必要な箇所にはギャップを導入した。垂直の線は同一のヌクレオチドを示す。コード配列において単一塩基差が5つあることに注目されたい。

【0025】

図7は、PTX1とCDA14タンパク質との推定アミノ酸配列のアラインメントを示す。PTX1のアミノ酸配列（上段；配列番号2）とCDA14（下段；配列番号5）がアラインされ、相同性を最大化するために必要な箇所にはギャップが導入された。垂直の線は同一の残基を示す。3つの単一塩基挿入により読み枠の変化が起こっていることに注目されたい。

20

【0026】

図8は、様々な発現コンストラクトで形質移入されたPC-3前立腺腫瘍細胞の、インヴェイトロの成長曲線のグラフを示す。PTX1アンチセンスRNAを発現する細胞の増殖を四角で示す；ルシフェラーゼRNAを発現する細胞の成長を丸で示す；そしてPTX1 RNAを発現する細胞の成長を三角で示す。結果は3つの別々の実験の平均である。

【0027】

図9は、受託番号AC009318（Muzny et al., 2000）で寄託されたゲノム配列から決定したヒトPTX1遺伝子のエキソン-イントロンジャンクションを示す。ここに示すエキソン-イントロンジャンクションの配列は、公表されたゲノム配列（配列番号6-31）に対して相補的である。エキソン配列は大文字で示し、イントロン配列は小文字で示す。エキソン配列の上に示す数字は、ゲノム配列上のエキソンの境界を示す。

30

【0028】

発明の詳細な記載

本発明によると、ヒト染色体12から、PTX1と命名される新規な遺伝子が、サブトラクティブハイブリダイゼーションによって単離された。正常組織において発現しているが前立腺腫瘍組織においては発現していないPTX1は、前立腺腫瘍発達の抑制における役割を果たしている。

40

【0029】

PTX1をコードする全長cDNAが5'-および3'-RACEによって単離された。この1327-bp cDNA（配列番号1）のヌクレオチド配列分析により、377アミノ酸残基のタンパク質（配列番号2）が予測され、該タンパク質は推定核内移行シグナル（RRLNRRKK；配列番号3）をそのアミノ-末端に有する。

【0030】

PTX1遺伝子はヒト染色体12に位置しており、いたるところに発現している。cDNAのセグメントを大腸菌で発現させ、特異的抗体の作成のためにPTX1タンパク質の断

50

片を作った。免疫組織化学分析を用いたところ、PTX1タンパク質は正常前立腺の腺上皮（特に基底細胞）の核に位置しており、前立腺癌にはなかった。PTX1の遺伝子構成は、該cDNA配列を、機能が未知の公表されたヒトゲノム配列と比較することによって確立された。

【0031】

本発明の組成物は、前立腺癌の診断および治療において有用であろう。本発明の核酸は、染色体および遺伝子マッピングアッセイにおいてPCRのために；遺伝子発現レベルを変化させるためのセンスおよびアンチセンス核酸の生成のために；および/またはペプチド断片の作成のために；そして免疫特異的抗体の作成のために利用できる。PTX1活性における遺伝子的および生化学的変化をアッセイするための方法、そしてPTX1活性を変化させることができる薬剤の同定のための方法も提供される。そのような薬剤は前立腺癌の治療のための治療薬として有用であろう。最後に、PTX1遺伝子置換療法も本発明の枠内に含まれる。

10

【0032】

I. 定義

本発明の理解を容易にするために以下の定義が与えられる。

【0033】

本明細書に用いられる「核酸」または「核酸分子」は、一本鎖であれ二本鎖であれ、そして一本鎖の場合は直鎖状または環状形態のその相補配列の分子を含む、あらゆるDNAまたはRNA分子を指す。核酸分子について議論する場合、特定の核酸分子の配列または構造は、5'から3'方向に配列を表す通常の慣行に従って本明細書中に記載され得る。本発明の核酸について言及する際、「単離核酸」という語を用いる場合がある。この語は、DNAについて適用する場合、それが由来する生物の天然のゲノムにおいてすぐ近くに隣接する配列から分離されたDNA分子を指す。例えば、「単離核酸」は、プラスミドまたはウイルスベクターなどのベクターに挿入されたDNA分子、または原核または真核細胞あるいは宿主生物のゲノムDNAに組み入れられたDNA分子を含む。

20

【0034】

RNAについて適用する場合、「単離核酸」という語は第一に上記の単離DNA分子によってコードされるRNA分子を指す。その他にその語は、その天然状態（即ち細胞または組織内）において結合している他の核酸から十分に分離されたRNA分子のことを指す場合もある。単離核酸（DNAまたはRNA）はさらに生物学的または合成手法によって直接生成され、そしてその生成過程において存在するその他の構成成分から分離された分子のことを指すこともある。

30

【0035】

核酸の特定配列の「自然対立遺伝子変異体」、「突然変異体」および「誘導体」は、特定の配列に密接に関連するが、自然にまたは計画的に配列または構造において変化を有している核酸配列を指す。密接に関連とは、配列のヌクレオチドの少なくとも約75%、しかししばしば90%以上が、特定の配列認識番号（配列番号）を用いて称される核酸配列の規定された長さによって一致することを意味する。密接に関連する核酸配列の間のヌクレオチド配列における変化または差異は、特定の核酸配列の性質において通常の複製または重複の過程において起こる配列におけるヌクレオチド変化を表し得る。その他の変化を特定の目的のために配列中に特別にデザインおよび導入することができ、例えば、核酸の調節領域においてアミノ酸コドンまたは配列を変化させることができる。そのような特定の変化は様々な突然変異誘発技術を用いてインヴィトロで作ることができ、あるいは、変化を誘発あるいは選抜する特定の選抜状況に置いた宿主生物体において作ることができる。そのような特別に作成された配列変異体は、元の配列の「突然変異体」または「誘導体」と称される。

40

【0036】

特定の配列について言及する場合の、「パーセント類似性」、「パーセント同一性」および「パーセント相同性」という語は、ウィスコンシン大学のGCGソフトウェアプログラ

50

ムに示されているのと同様に用いられる。

【0037】

本発明は、PTX1ポリペプチド、即ち本発明のタンパク質の、活性部分、断片、誘導体および機能的あるいは非機能的擬似体(mimetics)も含む。そのようなポリペプチドの「活性部分」とは、全長ポリペプチドより短いペプチドであるが、測定可能な生物活性を保持するペプチドを意味する。

【0038】

PTX1ポリペプチドの「断片」または「部分」とは、少なくとも約5から7の連続するアミノ酸、しばしば少なくとも約7から9の連続するアミノ酸、典型的には少なくとも約9から13の連続するアミノ酸、そして最も好ましくは少なくとも約20から30またはそれ以上の連続するアミノ酸の、一続きのアミノ酸残基を意味する。PTX1ポリペプチド配列の断片、抗原決定基、あるいはエピトープはPTX1タンパク質アミノ酸配列の部分に対して免疫応答を引き起こすために有用である。

10

【0039】

PTX1ポリペプチドの様々な「変異体」が本質的に存在する。これらの変異体は、タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列における差異によって特徴付けられる対立遺伝子であってもよいし、異なるRNAプロセッシングまたは翻訳後修飾を含むものであってもよい。当業者であれば、1または複数のアミノ酸置換、欠失、付加または交換を有する変異体を作成することができる。これらの変異体はとりわけ、(a)1または複数のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸によって置換されている変異体、(b)1または複数のアミノ酸がポリペプチドに付加している変異体、(c)1または複数のアミノ酸が置換基を含んでいる変異体、および(d)例えば抗体に対するエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分などの、PTX1ポリペプチドに有用な特性を与えることのできる、融合パートナー、タンパク質タグ、またはその他の化学的部分などの、別のペプチドまたはポリペプチドと該ポリペプチドとが融合した変異体を含む。本発明のその他のPTX1ポリペプチドは、ある種からのアミノ酸残基が他の種の対応する残基と、保存または非保存部分において置換している変異体を含む。その他の態様において非保存部分のアミノ酸残基が、保存または非保存残基と置換される。遺伝的(抑制、削除、突然変異など)、化学的および酵素的技術を含む、これらの変異体を得るための技術は当業者に知られている。そのような対立遺伝子変異体、類似体、断片、誘導体、突然変異体および、選択的核酸プロセッシング形態および選択的翻訳後修飾形態を含む修飾が、PTX1ポリペプチドの生物学的性質のいくらかを保持するPTX1ポリペプチドの誘導体に帰結する程度まで、それらは本発明の枠内に含まれる。

20

30

【0040】

本明細書で用いられる「機能的」という語は、列挙されたアッセイまたは目的のために核酸またはアミノ酸配列が機能し得ることを意味する。

【0041】

「本質的に~からなる」という語は、特定のヌクレオチドまたはアミノ酸について言及する場合は、所与の配列番号の性質を有する配列を意味する。例えば、アミノ酸配列に言及して用いられる場合、この語は、配列それ自体およびその配列の基礎的および新規な特性に影響を与えないような分子修飾を含む。

40

【0042】

「レプリコン」とは例えば、プラスミド、コスミド、バクミド(bacmid)、ファージまたはウイルスなどの、主にそれ自身の制御下で複製することができるあらゆる遺伝的要素である。レプリコンはRNAでもDNAでもよく、一本鎖でも二本鎖でもよい。

【0043】

「ベクター」とは例えば、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージまたはウイルスのような、他の遺伝子配列または要素(DNAまたはRNA)が付加してその付加した配列または要素の複製を引き起こすような、レプリコンである。

【0044】

50

「発現オペロン」とは、例えばプロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル（例えば A T G または A U G コドン）、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなどの、転写および翻訳制御配列を有し、そして宿主細胞または生物体においてポリペプチドをコードする配列の発現を促進する、核酸セグメントのことを指す。

【0045】

本明細書で用いる「オリゴヌクレオチド」という語は、本発明の配列、プライマーおよびプローブを指し、2 またはそれ以上、好ましくは3 以上の、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドからなる核酸分子と定義される。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは様々な因子およびそのオリゴヌクレオチドの特定の適用および使用などに依存する。

【0046】

本明細書で用いる「プローブ」という語は、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸であって、RNA でも DNA でもよく、精製制限酵素消化産物として天然に生じたものでも合成によって作成されたものでもよく、該プローブに相補的な配列を有する核酸にアニーリングあるいは特異的にハイブリダイズすることのできるものを指す。プローブは一本鎖でも二本鎖でもよい。プローブの正確な長さは、温度、プローブの出所および使用方法を含む様々な因子に依存する。例えば、診断用としては、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプローブは典型的には15 - 25 またはそれ以上のヌクレオチドを含むが、より少ないヌクレオチドを含むものでもよい。本明細書におけるプローブは特定の標的核酸配列の異なる鎖に「実質的に」相補的なものとなるよう選択される。これは、プローブはあらかじめ定められた一連の条件の下でそれらのそれぞれの標的鎖に「特異的にハイブリダイズする」あるいはアニーリングすることができるように十分相補的であればならないことを意味する。したがって、プローブ配列は標的の正確な相補配列を反映するものである必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片をプローブの5' または3' 末端に連結させることができ、残りのプローブ配列が標的鎖に対して相補的であればよい。その他に、プローブ配列が標的核酸配列に特異的にアニーリングするように十分に相補性を有していれば、非相補的塩基またはより長い配列をプローブ中に散在させることができる。

【0047】

「特異的にハイブリダイズする」という語は、当該技術分野において通常に用いられるあらかじめ定められた条件下でハイブリダイゼーションが可能なほど十分に相補的な配列を有する2つの一本鎖核酸分子の間の結合を指す（「実質的に相補的」ということもある）。特に、この語はオリゴヌクレオチドと本発明の一本鎖DNA またはRNA 分子に含まれる実質的に相補的な配列とのハイブリダイゼーションを指し、オリゴヌクレオチドと、非相補配列を有する一本鎖核酸とのハイブリダイゼーションを実質的に除外するものである。

【0048】

本明細書において使用する「プライマー」という語は、RNA またはDNA である一本鎖または二本鎖の、生物系由来、制限酵素消化または合成によって生じたオリゴヌクレオチドであって、適切な環境におかれるとテンプレート依存核酸合成のイニシエーターとして機能的に作用することができるものを指す。適切な核酸テンプレート、好適な核酸のヌクレオシド三リン酸前駆体、ポリメラーゼ酵素、好適な補因子および適切な温度およびpH などの条件とともに存在すれば、プライマーはポリメラーゼの作用またはプライマー伸長産物を生成する類似の活性による、ヌクレオチドの付加によってその3' 末端において伸長し得る。プライマーは特定の条件および適用するものの要求に依存して、その長さが変動し得る。例えば、診断適用においては、オリゴヌクレオチドプライマーは通常15 - 25 またはそれ以上の長さのヌクレオチドである。プライマーは所望の伸長産物の合成を開始するために、すなわち、ポリメラーゼまたは類似の酵素による合成の開始における使用のために適切な並置に、プライマーの3' ヒドロキシル部分を提供するのに十分な態様で所望のテンプレート鎖とアニーリングすることができるように、所望のテンプレートに対して十分に相補的であらねばならない。プライマー配列が所望のテンプレートの正確な相

10

20

30

40

50

補鎖を表すものである必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド配列をその他においては相補的なプライマーの5'末端に連結させてもよい。その他に、プライマー配列が伸長産物の合成のためのテンプレート-プライマー複合体を機能的に提供するのに十分に、所望のテンプレート鎖との配列と相補性を有していれば、非相補的塩基をオリゴヌクレオチドプライマー配列中に散在させてもよい。

【0049】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、引用により本出願にその全体の開示を包含させる、米国特許第4,683,195号、4,800,195号および4,965,188号において記載されている。

【0050】

本明細書において用いられる、「レポーター」、「レポーターシステム」、「レポーター遺伝子」または「レポーター遺伝子産物」という語は、核酸が、発現した場合に、例えば生物学的アッセイ、イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイにより、あるいは比色、蛍光発生、化学発光、その他の方法により簡単に測定可能なレポーターシグナルを生じる産物をコードする遺伝子を含む、操作的遺伝子システムを意味する。核酸はRNAでもDNAでもよく、直鎖状でも環状でもよく、一本鎖でも二本鎖でもよく、アンチセンス方向でもセンス方向でもよいが、レポーター遺伝子産物の発現のための必要な調節要素に操作的にリンクしているものである。必要な調節要素はレポーターシステムの性質およびレポーター遺伝子がDNAかRNAの形態であるかにより変化するが、プロモーター、エンハンサー、翻訳調節配列、ポリA付加シグナル、転写終止シグナルなどの要素を含むものであつてそれらに限定されるものではない。

10

20

【0051】

「形質転換」、「形質移入」、「形質導入」の語は、核酸が細胞または宿主生物に導入されるあらゆる方法または手段を指し、同じ意味を表すために互換的に用いられる。そのような方法には、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、PEG-融合などが含まれるがそれらに限定されるものではない。

【0052】

導入された核酸はレシピエント細胞または生物の核酸に統合(共有結合)していてもしていなくてもよい。例えば細菌、酵母、植物および哺乳類細胞においては、導入された核酸はエピソーム要素としてすなわち、プラスミドのような独立のレプリコンとして維持される。そうではなく、導入された核酸がレシピエント細胞または生物の核酸に統合されて、その細胞または生物に安定に維持され、さらにレシピエント細胞または生物の子孫細胞または生物に伝えられ、あるいは、受け継がれることもある。最後に、導入された核酸がレシピエント細胞または宿主生物に一過性にのみ存在することもある。

30

【0053】

本出願においてアミノ酸残基は以下の表の3文字または1文字省略によって特定される。

【0054】

【表1】

アミノ酸	3文字省略	1文字省略
L-アラニン	A l a	A
L-アルギニン	A r g	R
L-アスパラギン	A s n	N
L-アスパラギン酸	A s p	D
L-システイン	C y s	C
L-グルタミン	G l n	Q
L-グルタミン酸	G l u	E
グリシン	G l y	G
L-ヒスチジン	H i s	H
L-イソロイシン	I l e	I
L-ロイシン	L e u	L
L-メチオニン	M e t	M
L-フェニルアラニン	P h e	F
L-プロリン	P r o	P
L-セリン	S e r	S
L-スレオニン	T h r	T
L-トリプトファン	T r p	W
L-チロシン	T y r	Y
L-バリン	V a l	V
L-リジン	L y s	K

10

20

30

【0055】

本明細書において記載されるアミノ酸残基は好ましくは" L " 異性体型である。しかし、所望のポリペプチドの特性が保持される限りは、" D " 異性体型の残基が L - アミノ酸残基と置換してもよい。本明細書に表示するすべてのアミノ酸残基配列は、通常のように左から右にアミノ末端からカルボキシ末端方向であることを確認しておく。

40

【0056】

「単離タンパク質」または「単離および精製タンパク質」という語が本明細書中に用いられることがある。この語は、第一に、本発明の単離核酸分子の発現によって生じたタンパク質のことを言う。そうではなくて、この語を「実質的に純粋な」形態で存在するために十分に、それが自然に結合している他のタンパク質から分離されているタンパク質のことを指すこともある。「単離」とは、他の化合物または物質との人工または合成混合物を排除するものではなく、例えば不完全な精製、安定剤の付加、または例えば免疫原性調製物や医薬上許容される調製物へと混合することによって存在し得る、基本的活性を阻害しないような不純物の存在を排除するものではない。

50

【0057】

「実質的に純粋な」という語は、所与の物質（例えば核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク質など）を重量で少なくとも50 - 60%含む調製物を指す。より好ましくは、該調製物は所与の化合物を少なくとも重量で75%含み、最も好ましくは重量で90 - 95%含む。純度は所与の化合物について適切な方法（例えばクロマトグラフィー法、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC分析、その他）によって測定される。

【0058】

「成熟タンパク質」または「成熟ポリペプチド」とは、ポリタンパク質前駆体からのタンパク分解性プロセッシングのような、その起源の過程においてポリペプチドに対して通常起こるあらゆるプロセッシング現象の後のポリペプチド配列を有するポリペプチドを意味する。成熟タンパク質の配列または境界の命名において、成熟タンパク質配列の第一アミノ酸はアミノ酸残基1と命名される。本明細書において用いられる場合、成熟タンパク質に結合しており、通常はそのタンパク質への結合がみられないような、アミノ酸1に先行するアミノ酸残基は、アミノ酸-1、-2、-3などと命名される。組換え発現系について、メチオニン開始コドンはしばしば効率的な翻訳の目的で利用される。その結果得られるポリペプチドにおけるこのメチオニン残基は、本明細書において用いられる場合、成熟PTX1タンパク質配列に対して-1と位置付けられる。

【0059】

「タグ」、「タグ配列」または「タンパク質タグ」という語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸、ペプチド、タンパク質あるいはその他の化学物質のいずれかの化学的部分であって、他の配列に付加された場合に、特にその配列の検出または単離において、さらなる有用性を提供したり有用な特性を与えたりするものを指す。したがって、例えば、ホモポリマー核酸配列または捕獲オリゴヌクレオチドに相補的な核酸配列は、プライマーまたはプローブ配列に付加されて、次なる伸長産物やハイブリダイズした産物の単離を容易にすることができる。タンパク質タグの場合、ヒスチジン残基（例えば4から8の連続するヒスチジン残基）をタンパク質のアミノ末端かカルボキシ末端に付加して、キレート金属クロマトグラフィーによるタンパク質単離を容易にすることができる。その他に、特異的抗体分子やその他の分子（例えば、フラッグエピトープ、c-mycエピトープ、インフルエンザAウイルスの膜貫通エピトープ、ヘマグルチニンタンパク質、タンパク質A、セルロース結合ドメイン、カルモジュリン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質、キチン結合ドメイン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、その他）に反応性のエピトープや結合決定基を表すアミノ酸配列、ペプチド、タンパク質または融合パートナーをタンパク質に付加して、アフィニティーまたはイムノアフィニティークロマトグラフィーなどの方法によるタンパク質単離を容易にすることができる。化学的タグ部分は、核酸またはタンパク質に付加されてアビジン試薬との相互作用によって単離または検出を容易にするビオチンなどの分子やその他のものを含む。多くのその他のタグ部分が当業者に知られており、想像され得るものであり、本定義の枠内に含まれる。

【0060】

「クローン」または「クローン細胞集団」とは、単一の細胞または共通の祖先から有糸分裂によって生じた細胞の集団のことである。

【0061】

「細胞系」とは、一次細胞または細胞集団のクローンであって、多世代に渡ってインビトロで安定に成長することができるもののことである。

【0062】

「免疫応答」は、機能している免疫系を有する宿主において、ウイルス性抗原などの抗原によって生じるあらゆる反応を意味する。免疫応答は、体液性の性質、すなわち免疫グロブリンまたは抗体の産生を伴うものであってもよいし、細胞性の性質、すなわち様々なタイプのBおよびTリンパ球、樹状細胞、マクロファージ、抗原提示細胞その他を伴うものであってもよいし、それらの両方であってよい。免疫応答はサイトカイン、リンホカイ

10

20

30

40

50

ン、その他の様々なエフェクター分子の産生または生成も伴う。免疫応答は、インヴィトロおよび様々な細胞または動物システムの両方において測定することができる。そのような免疫応答は、障害からの宿主の保護において重要であり、予防的および治療的に利用することができる。

【0063】

「抗体」または「抗体分子」とは、抗体およびその断片を含む、特異的抗原に結合するあらゆる免疫グロブリンのことをいう。この語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異的 (b i s p e c i f i c) 抗体を含むものである。本明細書において用いる場合、抗体または抗体分子は、無処置の免疫グロブリン分子および当該技術分野において F a b、F a b'、F (a b')₂ および F (v) として知られている部分のような免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の両方を含む。

10

【0064】

本明細書において用いる、「生体宿主」の語は、あらゆる非 - ヒト自律生物のことを意味する。

【0065】

I I . P T X 1 をコードする核酸分子、P T X 1 タンパク質およびそれに対する抗体の調製

A . 核酸分子

本発明の P T X 1 タンパク質をコードする核酸分子は2つの一般的な方法によって調製することができる：(1)適切なヌクレオチド三リン酸から合成することができるし、(2)生物ソースから得ることもできる。両方法は、当該技術分野に周知のプロトコールを利用するものである。

20

【0066】

配列番号1を有する全長 c D N A のような、ヌクレオチド配列情報が入手可能であれば、オリゴヌクレオチド合成により本発明の単離核酸分子を調製することができる。合成オリゴヌクレオチドは、アプライドバイオシステム38A DNA合成装置 (A p p l i e d B i o s y s t e m s 3 8 A D N A S y n t h s i z e r) または類似の装置を用いてホスホラマダイト法によって調製することができる。その結果得られたコンストラクトを、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) のような当該技術分野で公知の方法によって精製すればよい。本発明の D N A 分子のように長い二本鎖ポリヌクレオチドは、現在のオリゴヌクレオチド合成方法に固有のサイズ制限のため、段階的に合成しなければならない。したがって、例えば2.6 kbの二本鎖分子は適切な相補性を有するいくつかのより小さいセグメントとして合成すればよい。作成した相補的セグメントを次に、隣接するセグメントとの付着のために、各セグメントが適当な付着末端を有するようにアニーリングさせればよい。隣接するセグメントを D N A リガーゼの存在下で付着末端をアニーリングさせることによって連結させて、全体の2.6 kb二本鎖分子を構築することができる。そのように構築された合成 D N A 分子は次いでクロニングして適切なベクター中で増幅させるとよい。

30

【0067】

P T X 1 をコードする核酸配列は、当該技術分野に公知の方法を用いて適当な生物ソースから単離することができる。好適な態様において、c D N A クローンをヒト起源の発現ライブラリーから単離する。別の態様において P T X 1 をコードするゲノムクローンを単離してもよい。また、その他の動物種からの P T X 1 をコードする c D N A またはゲノムクローンを得ることもできる。

40

【0068】

本発明によると、配列番号1のタンパク質コード領域と適当なレベルの配列相同性を有する核酸は、適当なストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件によって同定することができる。例えば、ハイブリダイゼーションは S a m b r o o k e t a l . 1 9 8 9 の方法によって行うことができ、これは、5 x S S C、5 x デンハルト試薬、0.5 - 1.0 % S D S、100 μ g / m l 変性断片化サケ精子 D N A、0.05 % ピ

50

ロリン酸ナトリウムおよび50%のホルムアミド：を含むハイブリダイゼーション溶液を用いるものである。ハイブリダイゼーションは37 - 42 で少なくとも6時間行う。ハイブリダイゼーションの後、フィルターを以下のように洗浄する：(1)室温で5分間、2 x SSCおよび1% SDS；(2)室温で15分間、2 x SSCおよび0.1% SDS；(3)37 で30分 - 1時間、1 x SSCおよび1% SDS；(4)30分ごとに溶液を変えながら42 - 65 で2時間、1 x SSCおよび1% SDS。

【0069】

特定の配列相同性を有する核酸分子間のハイブリダイゼーションを得るために要求されるストリンジェンシー条件の計算のための1つの一般式は(Sambrook et al., 1989)下記式である：

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\%G + C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{二本鎖におけるbp数}$$

【0070】

上記式を実例により説明すると、 $[Na^+] = [0.368]$ および50%ホルムアミドを用い、GC含量が42%で平均プローブサイズが200塩基の場合、 T_m は57である。DNA二本鎖の T_m は相同性が1%低下すると1 - 1.5 低下する。したがって、配列同一性が約75%以上の標的であれば、42 のハイブリダイゼーション温度を用いれば観察される。そのような配列は、本発明の核酸配列と実質的に相同的なものと考えられる。

【0071】

本発明の核酸はあらゆる適切なクローニングベクターにおいてDNAとして維持され得る。好適な態様において、クローンはpBluescript (Stratagene, La Jolla, CA)のようなプラスミドクローニング/発現ベクターに維持され、適当な大腸菌宿主細胞において増殖する。

【0072】

本発明のPTX1をコードする核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、RNAおよび一本鎖または二本鎖のそれらの断片を含む。したがって、本発明は、配列番号1の配列を含むcDNAの選択されたセグメントのような、本発明の核酸分子の少なくとも1つの配列にハイブリダイズすることができる配列を有するオリゴヌクレオチド(DNAまたはRNAのセンスまたはアンチセンス鎖)を提供する。そのようなオリゴヌクレオチドは、その他の種におけるPTX1遺伝子または相同体を検出または単離するためのプローブとして有用である。

【0073】

上述の核酸配列を、1または複数のヌクレオチドの付加、置換、挿入または欠失によって修飾してもよいが、好ましくは、配列番号1に示す配列を有する核酸分子またはその相補配列と選択的にハイブリダイズする能力を失わず、即ちオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと所与の配列の1つとの相同性の程度が十分に高いように修飾してもよい。

【0074】

好適な態様のいくつかにおいて、配列番号1に示す配列またはその相補配列あるいは癌感受性に関連する対立遺伝子の断片である、本発明によるオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチドの長さであり、より好ましくは少なくとも15ヌクレオチドの長さであり、最も好ましくは少なくとも20ヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドのデザインは当業者の能力の範囲内のものである。好適なオリゴヌクレオチドは10から100の間のヌクレオチド塩基の長さのものである。そのような断片はそれぞれ本発明の態様を表す。

【0075】

断片およびその他のオリゴヌクレオチドは、上述のようにプライマーまたはプローブとして使用可能であるが、試験試料における癌感受性の指標となる配列の存在を判定することに関する方法においても(例えばPCRによって)作成することもできる。

【0076】

10

20

30

40

50

そのようなオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーは全長配列（および突然変異体、対立遺伝子、変異体および誘導体）と同様に、PTX1、対立遺伝子、突然変異体またはその変異体の存在について、核酸を含む試験試料をスクリーニングする方法においても有用であり、特に、癌に対する感受性や素因を示す方法において有用であって、プローブは試験される個体から得た試料からの標的配列とハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件は、非特異的結合が最小になるように調節され、好ましくはストリンジェントから中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が用いられる。当業者であれば、簡単にそのようなプローブをデザインし、それらを標識し、そして Sambrook et al (1989) および Ausubel et al (1992) などのテキストを参考にハイブリダイゼーション反応についての好適な条件を考案することができる。 10

【0077】

アミノ酸配列情報（配列番号2）に基づいて、遺伝暗号の縮重を考慮してオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーをデザインすることができる。核酸増幅における使用のためのオリゴヌクレオチドは、約10またはそれ以下の（例えば6、7または8）コドン、即ち約30またはそれ以下の長さのヌクレオチド（例えば18、21または24）を有していればよい。一般に特異的プライマーは14ヌクレオチド以上の長さであるが18から20を超えないものである。当業者であればPCRなどの方法における使用のためのプライマーのデザインについて精通している。

【0078】

全長コード配列またはオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーなどの本発明による核酸分子は、例えば、その中身が外界の環境から保護されているようなバイアルなどの好適な容器中において、キットの一部として提供することができる。キットは例えば、PCRおよび/または試験試料における目的の核酸の存在を判定するための方法における、核酸分子の利用のための説明書を含んでもよい。核酸分子がPCRにおける使用を目的としているキットは、ポリメラーゼ、ヌクレオシド、緩衝溶液などの、反応に必要な1または複数のその他の試薬を含んでもよい。核酸分子は、当該技術分野において標準的に用いられる、放射性、蛍光、生物的または酵素のタグあるいは標識などの、検出可能な標識またはマーカーで標識しておいてもよい。そのような標識の使用に関する米国特許には、米国特許第3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 および 4,366,241 号が含まれ、そのそれぞれが引用により本出願に含まれる。 20 30

【0079】

本発明によるポリペプチドを作る簡便な方法は、発現系における核酸分子の使用により、それをコードする核酸分子を発現させることである。これについては後述する。本発明の核酸分子を含むベクターおよびそのようなベクターおよび/または本発明による核酸を含む宿主細胞は、本発明のさらなる態様を構成するものである。

【0080】

例えば細胞または細胞の祖先への核酸分子の導入および/または細胞または祖先に内因する配列の遺伝的変化の結果として（そのような導入はインヴィトロでもインヴィヴォでも起こり得る）、本発明による核酸分子を含む宿主細胞は、（例えば細胞体において）動物、特にヒトであっても非ヒトであってもよい、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタなどの哺乳動物またはニワトリなどの鳥類である生物体に含まれていてもよい。そのような細胞を含む、遺伝的に改変された、あるいはトランスジェニックの動物または鳥類もまた、本発明のさらなる態様として提供される。 40

【0081】

本発明のトランスジェニック動物は、癌の治療に有効である可能性のある治療薬の評価のための動物疾患モデルとして有用であり得る。しかし、そのような改変された動物またはトランスジェニック動物はおそらく、研究の点から、特にその改変が、PTX1またはその対立遺伝子に対応する核酸分子の欠失（「ノックアウト」）または突然変異である、遺伝的に改変された動物の場合さらに有用である。 50

【0082】

B. タンパク質

本発明の全長PTX1タンパク質は公知の方法により、いろいろな手段で調製することができる。該タンパク質は、例えばヒトまたは動物培養細胞あるいは組織などの適当なソースからイムノアフィニティー精製によって精製することができる。

【0083】

PTX1をコードする核酸分子またはそのスプライス変異体が入手可能であれば、当該技術分野で公知のインヴィトロ発現方法を用いてコードされるタンパク質を作ることができる。例えば、cDNAまたは遺伝子をインヴィトロ転写のために、pSP64またはpSP65などの適当なインヴィトロ転写ベクターにクローニングし、次いでコムギ胚芽またはウサギ網状赤血球などの好適な無細胞翻訳系において無細胞翻訳させることができる。インヴィトロ転写および翻訳系は、例えば、Promega Biotech, Madison, Wisconsin または BRL, Rockville, Maryland から市販されている。

10

【0084】

また、好適な態様によると、好適な原核生物または真核生物系における発現により大量のPTX1を作ることができる。例えば、配列番号1を有するcDNAなどのDNA分子の一部または全部を、大腸菌などの細菌細胞およびサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母細胞における発現に適したプラスミドベクターに挿入してもよいし、昆虫細胞における発現のためにバキュロウイルスベクターに挿入してもよい。そのようなベクターは宿主細胞（例えば大腸菌または昆虫細胞）におけるDNAの発現のために必要な調節要素を含んでおり、調節要素は宿主細胞においてDNAを発現させるように位置付けられる。そのような発現のために必要とされる調節要素は、プロモーター配列、転写開始および終結配列を含み、そして任意にエンハンサー配列を含む。

20

【0085】

組換え原核生物または真核生物系における核酸発現によって生産されたPTX1タンパク質は、当該技術分野において公知の方法によって精製することができる。好適な態様において、市販の発現/分泌系が使用でき、組換えタンパク質が発現した後、宿主細胞から分泌され、周囲の培地から簡単に精製することができる。発現/分泌ベクターを用いない場合、それに替わるアプローチとして、組換えタンパク質に特異的に結合する抗体との免疫相互作用、あるいはN-末端またはC-末端に6-8のヒスチジン残基をタグ付加した組換えタンパク質の単離のためのニッケルカラムなどによる、アフィニティー分離によって組換えタンパク質を精製するものが含まれる。さらに別の態様において、GST融合タンパク質を用いて精製を容易にすることができる。そのような方法は組換えタンパク質精製の分野における専門家によって一般的に用いられるものである。

30

【0086】

上述の方法によって調製された、本発明のPTX1タンパク質は標準的方法によって分析することができる。例えば、そのようなタンパク質はアミノ酸配列分析および/またはゲル電気泳動にかけることができる。

40

【0087】

上述のように、本発明は、製薬、薬剤の開発、診断キットにおける使用およびインヴィヴォでのその特性と役割のさらなる研究のための、PTX1ポリペプチドまたはその断片またはその活性部分も提供する。

【0088】

アミノ酸配列変異体、対立遺伝子、誘導体または突然変異体であるポリペプチドも本発明によって提供される。変異体、対立遺伝子、誘導体または突然変異体であるポリペプチドは1または複数のアミノ酸の付加、置換、欠失および挿入により配列番号2において与えられる配列とは異なるアミノ酸配列を有しているであろう。そのようなポリペプチドのうち好適なものはPTX1機能、すなわち、以下の特性の1または複数を含む：配列

50

番号 2 にその配列が示されているポリペプチドに反応する抗体との免疫交差反応性、および配列番号 2 にそのアミノ酸配列が示されているポリペプチドとのエピトープの共有（例えば、2 つのポリペプチド間の免疫交差反応性によって判定される）。

【0089】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列の、アミノ酸配列変異体、対立遺伝子、誘導體または突然変異体であるポリペプチドは、示された配列と約 35% 以上、約 40% 以上、約 50% 以上、約 60% 以上、約 70% 以上、約 80% 以上、約 90% 以上または約 95% 以上の配列同一性を共有するアミノ酸配列を含むものであってよい。特定のアミノ酸配列変異体は、1, 2, 3, 4, 5 - 10, 10 - 20, 20 - 30, 30 - 40, 40 - 50, 50 - 100, 100 - 150 アミノ酸または 150 アミノ酸以上の挿入、付加、置換または欠失により配列番号 2 に示す配列と異なっているであろう。アミノ酸「相同性/同一性」について、これは（例えばアルゴリズム G A P (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , M a d i s o n , W I) を用いて決定される、アミノ酸類似性の確立した法則による) 類似性または同一性であると理解すればよい。G A P は 2 つの完全な配列をマッチの数を最大化させてギャップの数を最小化させるようにアラインさせる、N e e d l e m a n a n d W u n s c h a l g o r i t h m を用いるものである。一般的に、ギャップ作成ペナルティ = 12 でギャップ伸長ペナルティ = 4 の、デフォルトパラメーターが用いられる。G A P の使用が好ましいが、一般的にデフォルトパラメーターを用いる、B L A S T (A l t s c h u l e t a l . (1 9 9 0 J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 5 - 4 1 0) ; F A S T A (P e a r s o n a n d L i p m a n (1 9 9 8) P N A S U S A 8 5 : 2 4 4 4 - 2 4 4 8) または t h e S m i t h W a t e r m a n アルゴリズム (S m i t h a n d W a t e r m a n (1 9 8 1) J . M o l . B i o l . 1 4 7 : 1 9 5 - 1 9 7) を含むがそれらに限定されるものではない、その他のアルゴリズムを用いてもよい。本明細書における「相同性」および「相同的」という語のいずれかの使用は、比較する配列間に必要な進化的関連があることを意味するものではない。これらの語は、「相同的組換え」という句におけるのと同じように用いられ、すなわち単にこの語は適当な条件下で組換わる程度に十分に類似している 2 つのヌクレオチド配列を要求するものにすぎない。

10

20

【0090】

本発明によるポリペプチドはその活性または機能を調節する分子のスクリーニングにおいて使用することができる。そのような分子は、治療（おそらく予防も含む）上有用であろう。

30

【0091】

本発明はまた、本発明のタンパク質に免疫特異的に結合することができる抗体も提供する。P T X 1 に対するポリクローナル抗体が標準的方法によって調製できる。好適な態様において、P T X 1 の様々なエピトープと免疫特異的に反応するモノクローナル抗体が調製される。モノクローナル抗体は K o h l e r および M i l s t e i n の一般的方法によって、標準的プロトコールに従って調製できる。P T X 1 に免疫特異的に相互作用するポリクローナルまたはモノクローナル抗体はそのようなタンパク質の同定および精製に利用することができる。例えば、抗体はそれらと免疫特異的に相互作用するタンパク質のアフィニティー分離のために利用できる。抗体はまた、タンパク質およびその他の生物学的分子との混合物を含むサンプルから、タンパク質を免疫沈降させるために使用することができる。抗 - P T X 1 抗体のその他の使用は後述する。

40

【0092】

本発明による抗体は様々な方法で改変させたものでもよい。実際、「抗体」という語は要求される特異性を備えた結合ドメインを有するあらゆる結合物質を含むものと解釈されるべきである。したがって、本発明では、合成分子および形態が抗体の模倣であって抗原またはエピトープに結合できるようにした分子を含む、抗体断片、抗体の誘導體、機能的同等体および相同体が包含される。

【0093】

50

抗原またはその他の結合パートナーと結合することができる抗体断片の例には、V L、V H、C 1 および C H 1 ドメインからなる F a b 断片；V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片；抗体の腕の V L および V H ドメインからなる F v 断片；V H ドメインからなる d A b 断片；単離 C D R 領域および F (a b ') 2 断片、ヒンジ領域でのジスルフィド結合により連結した 2 つの F a b 断片を含む二価断片がある。一本鎖 F v 断片も含まれる。

【 0 0 9 4 】

その親である非 - ヒト抗体よりも免疫原性が少ない抗体を提供するために、通常、骨格アミノ酸残基の一部の変更を伴う、ヒト骨格領域に非 - ヒトソースからの C D R s を接合した、ヒト化抗体も本発明の枠内に含まれる。

10

【 0 0 9 5 】

I I I . P T X 1 をコードする核酸、P T X 1 タンパク質およびそれに対する抗体の利用腫瘍抑制遺伝子、P T X 1 の同定により、前立腺癌の診断、予知、遺伝子治療のための利用が提供される。P T X 1 をコードする核酸、タンパク質およびそれに対する抗体の単離により、新形成疾患の予知指標として、および多くの種類の癌の治療のための治療剤としての広範な利用が提供される。

【 0 0 9 6 】

さらに、本発明による P T X 1 - 関連核酸、タンパク質およびそれに対する抗体は、その他の腫瘍抑制遺伝子の同定のためのリサーチツールとして利用できる。

【 0 0 9 7 】

A . P T X 1 をコードする核酸

P T X 1 をコードする核酸は本発明による様々な目的のために利用することができる。P T X 1 をコードする D N A、R N A またはそれらの断片は、P T X 1 タンパク質をコードする遺伝子の存在および / または発現を検出するためのプローブとして利用できる。そのようなアッセイのために P T X 1 をコードする核酸がプローブとして利用される方法は、以下のものを含むがそれらに限定されるものではない：(1) インサイチュハイブリダイゼーション；(2) サザンハイブリダイゼーション；(3) ノザンハイブリダイゼーション；そして(4) ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) などの多種の増幅反応。

20

【 0 0 9 8 】

本発明の P T X 1 をコードする核酸は、本明細書において示すように他の種からの関連遺伝子を同定するためのプローブとして利用することもできる。当該技術分野において周知であるように、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、核酸プローブと様々な程度の相同性を有する相補配列とのハイブリダイゼーションを許容するように調整することができる。したがって、P T X 1 をコードする核酸は P T X 1 と様々な程度の関連を有するその他の遺伝子の同定および特徴づけに有用であり、それによって前立腺癌のさかんな進行に關与する、観察される遺伝子発現の変化をさらに特徴付けることが可能になる。さらに、それらを用いて P T X 1 と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を同定することができ (例えば、「相互作用トラップ」技術による；米国特許第 5, 580, 736 号を参照されたい。)、それによってさらに癌の進行に關与する細胞シグナル伝達機構の解明が促進される (G o l e m i s e t a l . , 1 9 9 6) 。

30

40

【 0 0 9 9 】

P T X 1 をコードする核酸分子、またはその断片は、P T X 1 の生産を制御するためにも利用可能であり、したがって、疾患シグナル伝達経路に關与し得るタンパク質の量を調節することができる。P T X 1 タンパク質の生理的量的変化は、腫瘍進行を停止させるのに用いられるその他の薬剤と共同的に作用することができる。前立腺癌の疾患モデルにおいて本発明の核酸分子は P T X 1 の発現を減少させるために用いることができる。この態様において、P T X 1 をコードする遺伝子の発現制御配列を標的とするアンチセンス分子を用いる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは核酸、プレ - m R N A または成熟 m R N A の相補配列にハイブリダイズするようにデザインされ、所与の D N A 配列によってコードされるポリペプチド (例えば自然 P T X 1 ポリペプチドまたはその突然変異体または変異体

50

形態のいずれか)の産生を阻害し、それによってその発現が減少するか全く阻害される。P T X 1をコードする配列に加えて、アンチセンス技術をP T X 1遺伝子の制御配列、例えば翻訳開始部位などのP T X 1コード配列の5'側方配列を標的化するのに利用することができる。アンチセンスオリゴマーは、標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズして、例えばmRNA分子の翻訳を阻害するなどの所望の効果を発揮するのに十分な長さである必要がある。しかし、小さいオリゴマーの方がインヴィヴォではより効率的に細胞に取り込まれる傾向があり、より多数のアンチセンスオリゴマーが標的mRNAの位置に送達され得るということに注意しなければならない。好ましくは、アンチセンスオリゴマーは十分な特異性を達成するために少なくとも15ヌクレオチド長でなければならない。アンチセンス技術に用いられるオリゴヌクレオチドは好ましくは15から30ヌクレオチドの間の長さである。あらかじめ決定された遺伝子の発現レベルを減少させるためのアンチセンス分子の使用は当該技術分野において公知である。アンチセンス配列の構築およびそれらの使用は、Peyman and Ulman, Chemical Reviews, 90: 543-584 (1990), Crooke, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 329-376 (1992)およびZamecnik and Stephenson, P. N. A. S., 75: 280-284 (1974)において記載されている。完全なP T X 1 cDNAを逆方向に含むアンチセンスコンストラクトを作成することができる。

10

【0100】

別の態様において、P T X 1遺伝子の過剰発現を、過剰発現が、コードされるタンパク質であるP T X 1の過剰生産を導くことができる細胞において、P T X 1活性の回復を評価するための実験において、前立腺癌細胞に導入する。P T X 1の細胞における過剰生産は免疫蛍光またはその他の当該技術分野で公知の標準的技術によって評価することができる。また、この方法によるP T X 1の過剰発現は、細胞が徐々に悪性になる際に起こる、タンパク質-タンパク質複合体形成に關与するその他の成分の単離および特徴づけを容易にすることができる。

20

【0101】

上述のように、P T X 1をコードする核酸は、実質的に純粋なP T X 1タンパク質またはその選択された部分を大量に生産するためにも有用である。

【0102】

B. P T X 1タンパク質および抗体

精製P T X 1タンパク質またはその断片を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作成することができ、これら抗体は、P T X 1(またはP T X 1を含む複合体)の、生検試料または培養細胞における存在および蓄積についての感度のよい検出試薬としても役立つものである。組換え技術によりP T X 1タンパク質の一部または全部を含む融合タンパク質の発現が可能である。全長タンパク質またはタンパク質の断片を利用して、このタンパク質の様々なエピトープに対して特異的な一連のモノクローナル抗体を作成することができ、それによって前立腺細胞におけるこのタンパク質の検出の感度をより高くすることができる。

30

【0103】

P T X 1に免疫学的に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を、このタンパク質の検出および定量のために計画された様々なアッセイに用いることができる。そのようなアッセイには以下のものが含まれるがそれらに限定されるものではない:(1)フローサイトメトリー分析;(2)前立腺細胞におけるP T X 1の免疫化学的位置決定;および(3)前立腺細胞からの抽出物のイムノプロット分析(例えば、ドットプロット、ウェスタンプロット)。さらに、上述のように、抗-P T X 1はP T X 1の精製のために使用することができる(例えば、アフィニティーカラム精製、免疫沈降)。

40

【0104】

上述の議論より、本発明の、P T X 1をコードする核酸、P T X 1発現ベクター、P T X 1タンパク質および抗-P T X 1抗体を利用して、前立腺進行の危険にある患者の評価の

50

目的で、P T X 1 遺伝子発現を検出し、そして P T X 1 タンパク質蓄積を変化させることが可能であることが理解できる。本発明はまた、正常前立腺細胞が悪性腫瘍を引き起こす際の、疾患進行の調節に關与する、遺伝子およびタンパク質の相互作用の解明を容易にする材料を提供するものである。

【 0 1 0 5 】

P T X 1 をコードする核酸分子またはポリペプチド / タンパク質を検出するための例示的な方法には以下のものが含まれる：

a) 患者からの試料における、本発明の核酸分子の存在を判定すること；または、
b) 患者からの試料における、P T X 1 遺伝子によってコードされるポリペプチドの存在を判定し、そして存在する場合はそのポリペプチドが全長であるか、および / または突然変異しているか、および / または正常レベルで発現しているか、を判定すること；または

10

c) D N A 制限マッピングを用いて、患者からの核酸分子の試料を制限酵素が切断した場合に生じる制限酵素切断パターンと、P T X 1 をコードする核酸配列から得られる制限酵素切断パターンとを比較すること；または、

d) P T X 1 核酸配列に結合することができる特異的結合メンバーを使用するか（この特異的結合メンバーは、P T X 1 配列にハイブリダイズすることができる核酸あるいは P T X 1 核酸配列に対する特異性を有する抗体ドメインを含む物質を含むものである）、あるいはそれによってコードされるポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーを使用すること（この特異的結合メンバーは、特異的結合メンバーのその結合パートナーに対する結合が検出できるように標識されたものである）；または、

20

e) 患者からの試料における P T X 1 配列をスクリーニングするために P T X 1 核酸配列に基づく 1 または複数のプライマーを用いる P C R を使用すること。

【 0 1 0 6 】

「特異的結合ペア」は、特異的結合メンバー（s b m）と結合パートナー（b p）からなり、それらは互いに特別の特異性を有し、正常な条件においてその他の分子に優先して互いに結合するものである。特異的結合ペアの例には、抗原と抗体、リガンドと受容体および相補的ヌクレオチド配列がある。当業者であれば、多くのほかの例を知っており、本明細書において列挙する必要はない。さらに、「特異的結合ペア」という語は、特異的結合メンバーと結合パートナーのいずれかまたは両方が、大きな分子の一部をなすときも適用される。特異的結合ペアが核酸配列である態様において、それらはアッセイの条件下で互いにハイブリダイズするのに十分な長さである必要があり、好ましくは 10 ヌクレオチド長以上であり、より好ましくは 15 または 20 ヌクレオチド長以上のものである。

30

【 0 1 0 7 】

癌感受性対立遺伝子のスクリーニングのための大抵の態様において、試料中の P T X 1 をコードする核酸分子は、最初に、その他の試料中に存在する配列と比べて分析物の量を増加させるために、例えば P C R を用いて増幅される。これによって標的配列が試料中に存在する場合、標的配列はより高い感度で検出できることになる。この最初の工程は、当該技術分野において重要になりつつある高感度のアレイ技術を用いることによって回避することができる。

40

【 0 1 0 8 】

P T X 1 をコードする核酸配列の同定とその前立腺癌との関連により、本発明の態様による、試験試料における P T X 1 をコードする核酸分子の変異体形態、具体的には癌、特に前立腺癌に特異的に關連する対立遺伝子または変異体の存在または不存在を確かめるための上述の材料と方法の使用の提供が可能となる。これは個人の癌の素因を診断するためのものとすることができる。それは P T X 1 に關連する疾患を患う患者の癌の診断のためのものとすることができる。

【 0 1 0 9 】

これによって適切な治療および / または予防方法の計画が可能となり、治療の能率化が図られる。このアプローチはさらに、もっとも利益を受けるであろう患者に標的をしぼるこ

50

とによって、治療を能率的にすることができる。

【0110】

本発明の別の態様によると、PTX1産物の機能を回復させるための好適な薬剤を同定するための、癌治療用薬剤のスクリーニング方法が提供される。遺伝子移入または薬理学的手段（例えば、PTX1の構造および/または機能を真似た小分子）によるPTX1機能の回復によって、前立腺癌細胞の異常成長特性が改良されると期待できる。

【0111】

薬剤スクリーニングアッセイにおいて用いられるPTX1ポリペプチドまたは断片は、溶液中の遊離のものでもよく、個体支持体に付着したのものでもよく、あるいは細胞内におけるものでもよい。薬剤スクリーニングの1つの方法は、好ましくは競合結合アッセイにおいて、当該ポリペプチドまたは断片を発現する組換えポリヌクレオチドによって安定に形質転換された真核または原核宿主細胞を利用するものである。そのような細胞は生細胞でも固定形態であっても、標準的結合アッセイに用いることができる。例えば、PTX1ポリペプチドまたは断片と試験されている薬剤との間の複合体形成を判定してもよいし、PTX1ポリペプチドまたは断片と既知のリガンドとの間の複合体の形成が、試験されている薬剤によって阻害される程度を調べてもよい。

10

【0112】

薬剤スクリーニングの別の技術は、PTX1ポリペプチドと適当な結合アフィニティーを有する化合物の高処理量スクリーニングを提供するものであり、1984年9月13日に公開された、GeysenのPCT公開出願WO84/03564号に詳細に説明されている。簡単に述べると、プラスチックピンまたはその他の表面などの固体基体上で多くの異なる小さいペプチド試験化合物が合成される。このペプチド試験化合物をPTX1ポリペプチドと反応させて洗浄する。結合したPTX1ポリペプチドは次に当該技術分野で周知の方法によって検出される。

20

【0113】

精製PTX1を上述の薬剤スクリーニング技術における使用のためにプレートに直接コーティングすることができる。しかし、ポリペプチドに対する非中和抗体を用いて抗体を捕獲してPTX1ポリペプチドを固相に固定化することができる。

【0114】

本発明は、PTX1ポリペプチドに特異的に結合することができる中和抗体が、試験化合物と、PTX1ポリペプチドまたはその断片に対する結合について競合する、競合薬剤スクリーニングアッセイの使用をも考慮するものである。この方法では、PTX1ポリペプチドの1または複数の抗原決定基を共有する、あらゆるペプチドの存在を検出するために抗体を利用できる。

30

【0115】

薬剤スクリーニングのさらなる技術は、非機能的PTX1遺伝子を有する宿主真核細胞系または細胞（上述のようなもの）の使用を含む。これらの宿主細胞系または細胞はPTX1ポリペプチドレベルが欠損している。この宿主細胞系または細胞を、薬剤化合物の存在下で培養する。宿主細胞の成長速度を測定して、該化合物がPTX1欠損細胞の成長を調節することができるかを判定する。

40

【0116】

合理的な薬剤デザインの目的は、問題の生物学的に活性なポリペプチドの、または、それらと相互作用する小分子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤）の構造的アナログを作って、例えば薬剤をより活性または安定な形態のポリペプチドにしたり、例えば薬剤をインヴィヴォでのポリペプチドの機能を促進または阻害するようにしたりすることである。例えば、Hodgson, (1991) Bio/Technology 9: 19-21を参照されたい。1つのアプローチにおいて、まず、X線結晶解析、核磁気共鳴、コンピュータモデリングまたはより一般的にはいくつかのアプローチの組み合わせにより、目的のタンパク質（例えばPTX1ポリペプチド）または例えばPTX1-DNA複合体の三次元構造を決定する。相同的タンパク質の構造に基づくモデリングによってポ

50

リペプチドの構造に関する有用な情報が得られる場合もある。合理的薬剤デザインの例は、HIVプロテアーゼ阻害剤の開発がある (Erickson et al., (1990) Science 249: 527-533)。さらにペプチド (例えばPTX1ポリペプチド) をアラニンスキャン (Wells, 1991 Meth. Enzym. 202: 390-411) によって分析することもできる。この技術では、アミノ酸残基がアラニンに置換され、そのペプチド活性に対する効果が判定される。ペプチドの各アミノ酸残基をこのように分析して、ペプチドの重要な領域を決定する。

【0117】

機能アッセイによって選択された標的特異的抗体を単離してその結晶構造を解明することも可能である。原則として、このアプローチは、次なる薬剤デザインの基礎となり得るファーマコア (pharmacore) を生成するものである。機能的で薬理的に活性の抗体に対する抗-遺伝子型抗体 (抗-id) を作成することによってタンパク質結晶解析を全くしないことも可能である。鏡像の鏡像であるため、抗-idの結合部位は元の分子のアナログであると予測される。抗-idを用いて、化学的または生物学的に作られたペプチドのバンクからペプチドを同定および単離することができる。選択されたペプチドはファーマコアとして作用するであろう。

10

【0118】

したがって、例えば改良されたPTX1ポリペプチド活性または安定性を有する薬剤や、PTX1ポリペプチド活性の、阻害剤、アゴニスト、アンタゴニストなどとして作用する薬剤をデザインすることができる。クローニングされたPTX1配列を利用可能なために、X線結晶解析などの分析研究などを行うのに十分な量のPTX1ポリペプチドを作ることが可能である。さらに、本明細書において提供するPTX1タンパク質配列の知識は、X線結晶解析の代わりに、またはそれに加えて、コンピュータモデリング技術の使用を導くものであろう。

20

【0119】

本発明はさらに、生物学的に融和性の溶液、医薬上許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤、または当業者に周知のその他の物質中の、「組成物」であって、本発明の核酸、ポリペプチド、ベクターまたは抗体を含むものを提供する。生物学的に融和性の溶液は、本発明のポリペプチド、核酸、ベクターまたは抗体が、例えば生物活性を発揮できる形態などの活性形態で維持される溶液のことをいう。一般的にそのような生物学的に融和性の溶液は、塩イオンを含む、例えば、Tris、リン酸、HEPESバッファーなどの水性バッファーであろう。通常塩イオンの濃度は生理的レベルと類似のものであろう。生物学的に融和性の溶液は、安定剤および保存料を含んでもよい。

30

【0120】

そのような組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、皮下、および眼内経路による投与のために調剤することができる。非経口投与とは、静脈注射、筋内注射、動脈注射または注入技術を含む意味である。組成物は、所望であれば標準的な周知の非毒性の生理的に許容される担体、アジュバントおよび媒体を含む投薬単位調剤において非経口的に投与できる。

【0121】

好適な滅菌注射調製物は非毒性の非経口的に許容される溶媒または希釈液中の溶液または懸濁液であろう。医薬上許容される担体の例は、塩水、緩衝塩水、等張塩水 (例えばリン酸1ナトリウムまたはリン酸2ナトリウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはマグネシウム塩化物またはそのような塩の混合物)、リンゲル液、ブドウ糖、水、滅菌水、グリコール、エタノールおよびそれらの混合物である。1,3-ブタンジオールおよび滅菌固定油が溶媒または懸濁媒体として簡便に用いられる。合成モノ-またはジ-グリセリドを含むあらゆる低刺激の固定油が用いられる。オレイン酸などの脂肪酸も注射調製物において有用である。

40

【0122】

組成物の媒体は、薬剤吸収物として作用可能な親水性ポリアクリル酸ポリマーなどの、あ

50

らゆる生物学的適合性または非細胞毒性の（ホモまたはヘテロの）ポリマーから調製されるヒドロゲルであってもよい。そのようなポリマーは例えば引用により本出願にその内容全体が含まれる、出願W093/08845号において記載されている。それらのいくつか、具体的には、エチレンおよび/またはプロピレンオキシドから得られるものなどが、市販されている。ヒドロゲルは例えば外科切除の間に処置されている組織の表面に直接おいてもよい。

【0123】

本発明は、ヒトまたはその他の動物に有効量の本発明の組成物を投与することを含む「治療方法」を提供するものである。

【0124】

有効量は、年齢、治療されるべき症状のタイプおよび重症度、体重、所望の治療時間、投与方法およびその他のパラメーターによって変動する。有効量は内科医またはその他の適当な医学専門家によって決定される。

【0125】

本発明のPTX1ポリペプチドは、生物学的に融和性の緩衝液において、一日当たり体重との比較で、約0.01mg/kgから約100mg/kg、好ましくは約0.1mg/kgから約50mg/kg、そして最も好ましくは約1mg/kgから約10mg/kgの用量で腫瘍内注入によって投与してもよい。また、本発明のペプチドを発現する核酸を、前立腺腫瘍癌細胞への取り込みを促進するようなベクターまたはリポソーム中で、腫瘍に直接送達してもよい。

【0126】

以下の実施例は本発明の実施の例示的な方法を提供するものであって、本発明の範囲を制限する意図のものではない。

【0127】

実施例1

染色体12上の腫瘍抑制遺伝子の候補、PTX1の同定

本実施例はサブトラクティブハイブリダイゼーションを用いて、正常な前立腺には存在するが前立腺癌においては存在しない、染色体12に位置する新規な遺伝子PTX1を同定したことを記載するものである。

【0128】

I. 材料と方法

以下のプロトコールを本発明の実施を容易にするために提供する。

【0129】

サブトラクティブハイブリダイゼーション：トータルRNAをヒト正常前立腺（National Diabetes Research Interchangeによる善意の提供）および前立腺癌（我々の部門からの病理標本の残り）からChomczynski and Sacchi（1987）に従って抽出した。ポリA⁺mRNAを、オリゴテックmRNAミニキット（Oligotex mRNA Mini Kit）（Qiagen）を用いてトータルRNAから精製した。サブトラクティブハイブリダイゼーションをPCR-選択cDNAサブトラクションキット（the PCR-Select cDNA Subtraction Kit）（Clontech Laboratories）を用いて行い、製造業者により提供される手法に厳密にしたがった。正常前立腺cDNAを「テスター」として用い、前立腺腫瘍cDNAを「ドライバー」として用いた。共通の配列を除くためのハイブリダイゼーションの後、テスターcDNAには存在しており、ドライバーcDNAには存在していない、差別的に発現しているcDNAをPfuDNAポリメラーゼを用いて増幅した。PCR産物はT4ポリヌクレオチドキナーゼによってリン酸化し、平滑末端を、SmaIで切断され脱リン酸化されたpUC18ベクター（Amersham Pharmacia Biotech）に連結し、XL1-Blueコンピテンセル（Stratagene）に形質転換した。ランダムに取り上げたコロニーからのプラスミドDNAのミニ調製物を、PCR-選択ディファレンシャルスクリーニングキッ

10

20

30

40

50

ト (the PCR-Select Differential Screening Kit) (Clontech Laboratories) に付属のマニュアルに記載されているようにサブトラクトされたプローブを用いてドットプロット形式でスクリーニングした。陽性クローンをさらにヌクレオチド配列分析によってスクリーニングした。

【0130】

5' - および 3' - RACE : 全長 cDNA を単離するために、SMART RACE cDNA 増幅キット (SMART RACE cDNA Amplification Kit) (Clontech Laboratories) を用いた。ポリ A⁺ mRNA を、230 μg の正常前立腺トータル RNA からオリゴテックス mRNA ミニキット (the Oligotex mRNA Mini Kit) (Qiagen) を用いて単離した。ポリ A⁺ RNA の半分を 5' - RACE レディ cDNA の合成のために用い、残りの半分を 3' - RACE レディ cDNA の合成のために用いた。5' - および 3' - RACE を SMART RACE cDNA 増幅キットのマニュアルにしたがって行った。PCR 断片を上述のように pUC18 にサブクローニングした。

10

【0131】

PTX1 の組織発現 : ヒト組織における PTX1 の発現を Clontech Laboratories, Inc. から購入したファーストストランド cDNA (ヒト多組織 cDNA パネル I および II) を用いて RT-PCR によって調べた。5 μl の cDNA のアリコットを、PTX1 - 特異的または - アクチン - 特異的プライマーを用いて総容量 75 μl で増幅した。PCR 条件は以下の通りであった : 96 1分を 1 サイクル ; 94 1分、59 1分、72 2分を 35 サイクル ; その後 72 7分を 1 サイクル。PCR 産物の 20 μl のアリコットを 2% アガロースゲルで分析した。試験した組織は以下の通りであった : 脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、胎盤、骨格筋、大腸、卵巣、末梢白血球、前立腺、小腸、脾臓、精巣および胸腺。

20

【0132】

PTX1 遺伝子のヒト染色体での位置決定 : 単染色体体細胞雑種 PCR 可能 DNA (Monochromosomal Somatic Cell Hybrid PCRable DNAs) (Quantum Biotechnologies) を、PTX1 遺伝子のヒト染色体上での位置決定に用いた。24 雑種と 3 コントロールのパネルの 250 ng の DNA のアリコットを PTX1 - 特異的プライマーを用いて総容量 75 μl で増幅した。PCR 条件は以下の通りであった : 96 1分を 1 サイクル : 94 1分、55 1分、72 2分を 30 サイクル ; その後 72 7分を 1 サイクル。PCR 産物の 10 μl のアリコットを 1% アガロースゲルで分析した。

30

【0133】

組換え PTX1 の発現と抗血清の産生 : PTX1 タンパク質の残基 121 - 208 に対応するコード配列を、5' 末端に NcoI 部位および 3' 末端に BamHI 部位を備えた合成プライマーを用いて増幅した。増幅された断片をアガロースゲルから精製して、細菌発現プラスミドベクター pCAL-c (Stratagene) の NcoI / BamHI 部位にサブクローニングした。組換えタンパク質の精製を容易にするために BamHI および KpnI 部位の間の pCAL-c ベクターの配列を、連続する 6 つの His コドンとその後終止コドンを含む配列に置換した。発現プラスミドを BL21-Codon Plus (DE3) - RIL コンピテントセル (Stratagene) に形質転換した。

40

【0134】

組換え PTX1 タンパク質を生産するために、発現プラスミドを有する細菌を 100 μg / ml のアンピシリンを含む 200 ml の LB 培地で OD₆₀₀ が 0.6 - 1.0 になるまで生育させ、2 mM IPTG で 2 時間誘導をかけた。細胞を収集し、20 ml の B-Per 試薬 (Pierce) で溶解し、インクルージョンボディを遠心分離によって集め、B-Per 試薬の 1 / 10 希釈液で 3 回洗浄した。組換えタンパク質をインクルージョンボディから、10 ml の抽出バッファー (6 M グアニジン HCl、50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、5 mM メルカプトエタノール、pH 8.0) を用いて 4

50

で一晩かけて抽出した。タンパク質抽出物を1mlの予め平衡化しておいたTalon Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories, Inc)と室温で20分間混合した。この樹脂を10mlの洗浄バッファー(6M グアニジンHCl、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、5mMイミダゾール、5mMメルカプトエタノール、pH7.0)で2回洗浄し、小カラムに充填した。カラムを5mlの洗浄バッファーで3回洗浄し、5mlの溶出バッファー(6M グアニジンHCl、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、150mMイミダゾール、pH7.0)で溶出した。精製したタンパク質を4で3回、4リットルの10mM重炭酸アンモニウム中で透析し、そして凍結乾燥した。乾燥したタンパク質をウサギ中でポリクローナル抗体を注文生産するためにAlpha Diagnostic Internationalに送った。

10

【0135】

PTX1の免疫組織化学位置決定：指示した場合を除き全工程を室温で行った。ヒト前立腺癌切片をキシレン中で3回それぞれ5分間脱パラフィン処理し、特級エタノール中で再水和させ、抗原回収溶液(10mMクエン酸ナトリウム/クエン酸、pH6.0)中で15psiの圧力で10分間煮沸した。切片をバッファー1(100mM TrisHCl、150mM NaCl、pH7.5)でそれぞれ5分間、2回洗浄した。切片を200µlのブロッキング溶液(1%ブロッキング試薬[Roche Biochemical]、100mMマレイン酸、150mM NaCl、pH7.5)で1時間インキュベートし、次いで200µlのブロッキング溶液中の2%ヤギ血清で30分間インキュベートした。これを次に100µlの1次抗血清(ブロッキング溶液中1:100に希釈)で1時間インキュベートした。バッファー1で5分間の洗浄を3回した後、切片を100µlのヤギ抗-ウサギIgG/アルカリフォスファターゼ接合体(ブロッキング溶液中1:100に希釈)で1時間インキュベートした。切片をバッファー1で5分間、3回洗浄し、APバッファー(100mM TrisHCl、150mM NaCl、50mM MgCl₂、pH9.5)で1回洗浄し、そして200µlの新たに調製したVega Red Chromogen (Biomedica Corp)で30-60分インキュベートした。最後に切片をヘマトキシリンで対比染色し、特級エタノール中で脱水し、キシレンで浄化してPermount (Fisher Scientific)にマウントした。

20

【0136】

30

II. 結果：

PTX1 cDNAの分子クローニングおよびキャラクタリゼーション：多数のクローンがサブトラクティブハイブリダイゼーションから得られた。396のランダムに取り上げたコロニーのうち、57がサブトラクトされたcDNAプローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより陽性であることが判明した。これらをさらにヌクレオチド配列分析によりスクリーニングした。これら57クローンのうち、56%がセメノジェリン(semenogelin) cDNAであった。その他のクローンは、ミトコンドリアDNA(11%)、28SリボゾームRNA(7%)、プロラクチン-誘導タンパク質(7%)およびムチン(5%)であった。残りのクローン(14%)は独特の配列であった。これらのクローンのうち4つ(#149、341、348および394)が新規な配列であった。正常前立腺と前立腺腫瘍のcDNAを用いたRT-PCRにより、クローン149と348が正常前立腺において差異的に発現しているcDNAであることが示された(図1)。クローン348をさらなる特徴づけのために選択し、そしてPTX1と再命名した。

40

【0137】

クローン348は167bp長しかなかったので、全長cDNAを5'-および3'-RACEを用いて単離した。5'-RACEにより180bp断片が得られ、3'-RACEにより1.3kb断片が得られた。これら2つのクローンを組み合わせたヌクレオチド配列は、3'末端に26bpのポリ(A)テイルを含む、1327bpのcDNA配列(配列番号1)からなるものである(図2)。連続するオープンリーディングフレームが存

50

在し、塩基 87 の A T G コドンから開始して塩基 1218 の T A A コドンで終結する。他に可能性のある A T G コドンが塩基 21、51 および 59 と、上流に 3 つあるが、これらのコドンを用いた場合、タンパク質が途中で終結してしまう。したがって、このヌクレオチド配列は、377 アミノ酸残基からなるタンパク質（配列番号 2）をコードしているようである。5' - 非翻訳領域は 86 塩基対（b p）長である。一方、3' - 非翻訳領域は 107 b p 長であって塩基 1278 と 1283 の間に 1 つの A A T A A A 配列を含む。この配列はポリ（A）テイルの 18 b p 上流に過ぎず、おそらく R N A プロセッシングおよびポリアデニル化に用いられている（P r o u d f o o t a n d B r o w n l e e , 1976）。

【0138】

P T X 1 遺伝子の組織発現および染色体位置決定：P T X 1 - 特異的プライマーおよびヒト多組織 c D N A パネルを用いた R T - P C R による発現研究によって、P T X 1 はテストした 16 の全てのヒト組織において発現していることが示された（データは示さず）。単染色体体細胞雑種パネルを用いた P C R による染色体位置決定研究では、ヒト染色体 12 またはヒトゲノム D N A コントロールを含むサンプルにおいてのみ予測されたサイズのバンドが生じた（図 3）。これらの結果は、P T X 1 遺伝子がヒト染色体 12 に位置していることを示すものである。

【0139】

P T X 1 タンパク質の細菌での発現および免疫学的位置決定：P T X 1 に対する特異的抗体を作成するために、まず、P T X 1 配列のセグメントを、カルモジュリン結合ペプチド（C B P）タグとの 12.4 k D a の融合タンパク質として p C A L - c 発現ベクター中で発現させた。しかし、この融合タンパク質は、R e d d y e t a l . (1992) に記載されているようにリフォールディングさせてグアニジン H C l を除去するために透析したところ、不溶性となった。これによってカルモジュリン樹脂を用いて融合タンパク質を精製するのが不可能となった。この問題を解決するために、p C A L - c ベクターのトロンピン切断配列を、6 つの連続する H i s コドンとその後終止コドンを含む配列と置換した。これによって組換えタンパク質を変性条件下で T a l o n M e t a l A f f i n i t y R e s i n によって精製することが可能となった（図 4）。この方法を用いると、およそ 3 m g の組換えタンパク質を 200 m l の培養液から常套手段によって得ることができる。

【0140】

P T X 1 に対する抗血清を用いた、ヒト前立腺および前立腺腫瘍組織の切片の免疫組織化学的分析により、正常前立腺の腺上皮の細胞質および核が染色されるが、前立腺腫瘍については陰性であることが示された（図 5）。正常前立腺の切片についての免疫前血清を用いた免疫染色も、陰性の結果を示した（データは示さず）。これは、P T X 1 抗血清による正常前立腺の免疫染色が特異的であったことを示すものである。

【0141】

P T X 1 遺伝子の P C - 3 腫瘍細胞系発現：P T X 1 の機能を解明するために、P T X 1 をコードする核酸分子のコード配列を、テトラサイクリン - 抑制性発現プラスミド、p T R E 2 (T e t - O f f G e n e E x p r e s s i o n S y s t e m ; C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s) に「センス」および「アンチセンス」の両方の方向性で挿入した。その結果得られた発現コンストラクトを、p T K - H y g プラスミドとともに、G 4 1 8 耐性、T e t - O f f - 形質移入 P C - 3 前立腺腫瘍細胞系に共形質移入した。次いで安定な形質移入体を G 4 1 8 とハイグロマイシンで選抜した。培地からテトラサイクリンを除去することによって、アンチセンスまたはセンス P T X 1 R N A の誘導を行った。誘導により、センス P T X 1 コンストラクトを形質移入された細胞の増殖速度と生存細胞数はともに減少したが、アンチセンス P T X 1 コンストラクトを形質移入された細胞は、コントロール細胞（ルシフェラーゼ発現コンストラクトを形質移入された P C - 3 細胞）よりも速く増殖した。センス、アンチセンスおよびルシフェラーゼコンストラクトを形質移入された P C - 3 細胞の成長曲線を図 8 に示す。センスおよびアンチセンス P

10

20

30

40

50

PTX1 RNAの誘導は、PTX1および発現ベクターに特異的なプライマーを用いたRT-PCRによって確かめられた。誘導されたRNAのPTX1翻訳への効果も、免疫組織化学によって確かめられた(データは示さず)。

【0142】

軟寒天アッセイにおいてアンチセンスPTX1コンストラクトを形質移入された細胞はすぐにコロニーを形成したが、ルシフェラーゼまたはセンスPTX1コンストラクトで形質移入された細胞はほとんどまたは全くコロニーを形成しなかった。これらの結果はPTX1が足場依存細胞増殖に対する抑制タンパク質である可能性を示している。

【0143】

III. 議論

本発明は、新規なヒト核タンパク質をコードするPTX1の全長cDNAの単離および配列キャラクタリゼーションに関する。このcDNAは、正常前立腺において発現しているが前立腺癌においては発現していないということに基づいて選択された。それは正常ヒト組織においてはいたるところに発現している。前立腺癌におけるその発現は下方制御されており、そのことはRT-PCRと免疫組織化学的分析の両方によって確かめられた。推定タンパク質配列はRRLNRRKK配列(配列番号3)を含み、これは推定二分核定位シグナルである(Melchior and Gerace, 1995)。PTX1が核に所在することは免疫組織化学的分析によって確かめられた。さらにそれは高度に保存されているため、ヒトPTX1-特異的プライマーはげっ歯類の対応物も検出することができる(図3)。PTX1が核に所在することおよび前立腺癌において下方制御されていることは、PTX1が腫瘍抑制遺伝子の候補であることを示唆する。

【0144】

GenBankデータベースに対してPTX1配列をサーチしたところ、機能が未知のタンパク質をコードする、CDA14として知られる他のcDNAが見つかった(Song et al., 2000)。PTX1とCDA14のヌクレオチド配列相同性分析により、これらは高度に類似していることが判明した。しかし、これら2つのcDNAにはいくつかの重要な違いがある(図6)。CDA14は5'末端においてPTX1よりも2塩基対(bp)長い。しかし、これら2つの余分な塩基対はゲノム配列には存在しない(以下により詳細に説明する)。その3'-非翻訳領域もPTX1よりも42bp長い。これは異なるポリアデニル化部位の利用による可能性がある。mRNAに多数のポリアデニル化部位が存在することは珍しくなく、ブタプロホルモン転換酵素PC1/3(Dai et al., 1995)などの他のmRNAにおいて存在していることが報告されている。CDA14のコード領域において塩基696, 715および731に3つの1塩基挿入があり、これは推定タンパク質配列の位置203-211における11残基を変化させるものである(図7)。このアミノ酸配列の変化はタンパク質の構造と機能を有意に変化させるものである。塩基239および887においても2つの1塩基相違があり、それぞれ1コドンに影響を及ぼしている。これらの配列の不一致の1つの可能性のある説明は、CDA14が、クロム親和細胞腫から単離されたことより、自然突然変異体である可能性があるということである。

【0145】

GenBankデータベースでのサーチによりヒト染色体12pの203kb断片においてPTX1遺伝子が同定された(Muzny et al., 2000)。これもまた、PTX1遺伝子の染色体位置決定を確認するものである。このゲノム配列とcDNA配列とを比較することにより、エキソンの位置と大きさを決定することができる。PTX1遺伝子は40kbを少し超えて広がっており、41-143bpの14のエキソンと、0.5-9.4kbの13のイントロンを含んでいる(図9; 配列番号6-31)。TATAまたはCAATプロモーター要素は5'-側方配列において存在しない。ゲノム配列はまた、CDA14のコード領域の塩基696, 715および731における3つの1塩基挿入を否定するが、塩基239および887におけるCDA14の2つの1塩基変化は肯定する(図6)。

10

20

30

40

50

【0146】

染色体17の喪失が前立腺の腫瘍形成の初期段階で起こることがあるが、染色体12（特に12p）の喪失はより進行した段階で起こることがある（Brothman et al., 1994; Kibel et al., 1998）。微量キュベット-媒介染色体移行を用いて、12pter-q13に対応するヒト染色体12の部分が前立腺腫瘍抑制活性を有することが示された（Berube et al., 1994）。一方、同じ技術を用いて、ヒト染色体12の70-cM部分が転移を抑制するが腫瘍形成は抑制しないことが示された（Luu et al., 1998）。

【0147】

別の実験によりPTX1はヒト前立腺組織における足場依存細胞増殖も抑制することが示唆される。PTX1をコードする核酸分子のPC-3前立腺腫瘍細胞系における発現の結果、細胞増殖が低下したが、PTX1をコードする核酸のアンチセンスの発現は、細胞増殖の上昇を引き起こした（図8）。したがって、PTX1の翻訳がアンチセンスRNAによって阻害されると細胞は制御を失って成長することになる。しかし、PTX1を過剰発現させると、細胞増殖は抑止される。これらの結果から、PTX1がヒト前立腺癌における細胞成長および腫瘍進行の抑制において重要な役割を有することが強く示唆される。

【0148】

参考文献

Berube, N. G., Speevak, M. D., and Chevrette, M. (1994). Suppression of tumorigenicity of human prostate cancer cells by introduction of human chromosome del(12)(q13). *Cancer Res.* 54, 3077-3081.

【0149】

Brothman, A. R., Watson, M. J., Zhu, X. L., Williams, B. J., and Rohr, L. R. (1994). Evaluation of 20 archival prostate tumor specimens by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cancer Genet. Cytogenet.* 75, 40-44.

【0150】

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

【0151】

Dai, G., Smeekens, S. P., Steiner, D. F., McMurry, J. P., and Kwok, S. C. M. (1995). Characterization of multiple prohormone convertase PC1/3 transcripts in porcine ovary. *Biochem. Biophys. Acta* 1264, 1-6.

【0152】

Golemis et al., (1996) Yeast Interaction Trap/Two Hybrid Systems to Identify Interacting Proteins, Unit 20. 1.1-20.1.28 in *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel, F. M et al., John Wiley & Sons, NY.

【0153】

Kibel, A. S., Schutte, M., Kern, S. E., Isaacs, W. B., and Bova, G. S. (1998). Identific

ation of 12p as a region of frequent deletion in advanced prostate cancer. *Cancer Res.* 58, 5652-5655.

【0154】

Lara, P. N., Jr. Kung, H.-J., Gumerlock, P. H., and Meyers, F. J. (1999). Molecular biology of prostate carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 32, 197-208.

【0155】

Luu, H. H., Zagaja, G. P., Dubauskas, Z., Chen, S. L., Smith, R. C., Watabe, K., Ichikawa, Y., Ichikawa, T., Davis, E. M., Beau, M. M. L., and Rinker-Schaeffer, C. W. (1998). Identification of a novel metastasis-suppressor region on human chromosome 12. *Cancer Res.* 58, 3561-3565. 10

【0156】

Melchior, F., and Gerace, L. (1995). Mechanism of nuclear protein import. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 310-318. 20

【0157】

Muzny, D. M., Adams, C., Bailey, M., Barbaria, J., Blankenburg, K., Bodota, B., Bouck, J., Bowie, S. et al. (2000). Homo sapiens 12p BAC RP11-996F15 complete sequence. GenBank database, accession number: AC009318.

【0158】

Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G. (1976). 3'-Noncoding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211-214. 30

【0159】

Reddy, G. K., Gunwar, S., Green, C. B., Fei, D. T. W., Chen, A. B., and Kwok, S. C. M. (1992). Purification and characterization of recombinant porcine prorelaxin expressed in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 579-585.

【0160】

Sciavolino, P. J. and Abate-Shen C. (1998). Molecular biology of prostate development and prostate cancer. *Ann. Med.* 30, 357-368. 40

【0161】

Song, H., Gao, G., Peng, Y., Ren, S., Chen, Z., and Han, Z. (2000). A novel gene expressed in human pheochromocytoma. GenBank database, accession numbers: NM_016570 and AF216751.

【0162】

本発明のいくつかの好適な態様について上記に詳細に例証したが、本発明がそれらの態様に限定されることを意図したものではない。特許請求の範囲に記載する、本発明の範囲お 50

よび精神から逸脱することなく、それらに対する様々な改変が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、4つの選択されたクローンについてのRT-PCRによるディファレンシャル発現を示すゲルである。ファーストストランドcDNAを正常前立腺(N)および前立腺腫瘍(T)から単離したトータルRNA 10 μgから合成した。cDNAの2 μlのアリコットを各クローンに特異的なプライマーを用いて増幅した。PCR産物を2%アガロースゲルで分析した。分子サイズマーカー(M)はBstNIで消化したpBR322 DNAであった。クローン149と348は、正常前立腺(N)においてバンドが存在するが前立腺腫瘍(T)においては存在しないことによって示されるように、正常前立腺においてのみ発現していた。クローン341と394は正常前立腺と前立腺腫瘍の両方で発現していた。クローン348をさらなるキャラクタリゼーションのために選び、本明細書においてPTX1と称する。

10

【図2】図2は、全長PTX1 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。オーバーラップするcDNAを組み合わせたヌクレオチド配列とそのPTX1タンパク質への翻訳を5'から3'方向において示す。ヌクレオチド配列とアミノ酸配列(配列番号2)の番号付けは、右側に示す。AATAAA配列に下線を引いてある。

【図3】図3は、PTX1遺伝子がヒト染色体12に位置づけられるということを示すゲルである。24の体細胞雑種のパネルのDNAサンプルと3つのゲノムDNAコントロールを、方法において記載したPTX1-特異的プライマーを用いて増幅させた。PCR産物を1%アガロースゲルで分析した。レーン1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22のDNAサンプルは、その番号に対応する単一のヒト染色体を含む。レーン4のサンプルは2つのヒト染色体、4および7を含む。レーン20のサンプルは3つの染色体、20、8および4を含む。レーン23, 24, 25, 26および27のサンプルは、染色体X、染色体Y、ヒトDNA、ハムスターDNAおよびマウスDNAをそれぞれ含む。分子サイズマーカー(M)はHindIIIで消化したラムダDNAであった。ヒト染色体12およびヒトDNAを含むサンプルのみにおいて2 kbのバンドが生じ(レーン12および25)、これによりPTX1遺伝子はヒト染色体12に位置付けられることが示される。全てのレーン(レーン25を除く)に存在する小さいサイズのバンドは、げっ歯類PTX1遺伝子に関連するものである。

20

30

【図4】図4は、組換えPTX1タンパク質の、Talon Metal Affinity Resinカラムでの精製を示すゲルである。組換えタンパク質を細菌宿主から抽出し、実施例1に記載のようにTalon Metal Affinity Resinカラムで精製した。レーン1は全タンパク質を含むものであり；レーン2は組換えPTX1タンパク質の第一の溶出を含むものであり；レーン3はPTX1タンパク質の第二の溶出を含むものであり；そしてレーン4は分子量マーカーを含むものであった。

【図5】図5は、正常前立腺および前立腺腫瘍におけるPTX1タンパク質の免疫局在性を示す顕微鏡写真である。切片を組換えヒトPTX1に対するウサギ抗血清を用いてPTX1の存在について染色した。赤色部分は陽性の免疫反応性産物を示す。正常腺上皮の細胞質と核の両方が強い染色を示したが、腫瘍領域は染色を示さなかった。

40

【図6】図6は、PTX1およびCDA14のcDNA(それぞれ配列番号1および4)のヌクレオチド配列比較を示す。アラインメントはPTX1のヌクレオチド配列(上段、本研究)とCDA14の公表配列(下段、Song et al., 2000)とに基づくものであった。アラインメントを至適化するために必要な箇所にはギャップを導入した。垂直の線は同一のヌクレオチドを示す。コード配列において単一塩基差が5つあることに注目されたい。

【図7】図7は、PTX1とCDA14タンパク質との推定アミノ酸配列のアラインメントを示す。PTX1のアミノ酸配列(上段；配列番号2)とCDA14(下段；配列番号5)がアラインされ、相同性を最大化するために必要な箇所にはギャップが導入された。垂直の線は同一の残基を示す。3つの単一塩基挿入により読み枠の変化が起こっているこ

50

とに注目されたい。

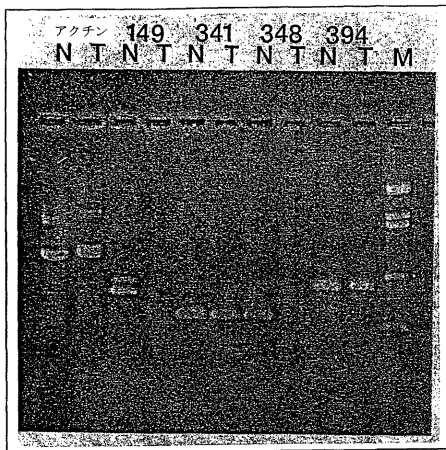
【図 8】図 8 は、様々な発現コンストラクトで形質移入された P C - 3 前立腺腫瘍細胞の、インヴィトロの成長曲線のグラフを示す。P T X 1 アンチセンス R N A を発現する細胞の増殖を四角で示す；ルシフェラーゼ R N A を発現する細胞の成長を丸で示す；そして P T X 1 R N A を発現する細胞の成長を三角で示す。結果は 3 つの別々の実験の平均である。

【図 9】図 9 は、受託番号 A C 0 0 9 3 1 8 (M u z n y e t a l . , 2 0 0 0) で寄託されたゲノム配列から決定したヒト P T X 1 遺伝子のエキソン - イントロンジャンクションを示す。ここに示すエキソン - イントロンジャンクションの配列は、公表されたゲノム配列 (配列番号 6 - 3 1) に対して相補的である。エキソン配列は大文字で示し、イントロン配列は小文字で示す。エキソン配列の上に示す数字は、ゲノム配列上のエキソンの境界を示す。

10

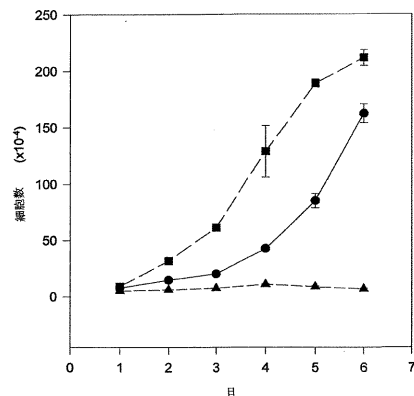
【 図 1 】

Figure 1



【 図 8 】

Figure 8



【 9 】

Figure 9

5. 3. 2. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14.		3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14.					
1	49	1	9.4	148957	ttttattcttag	148952	ttttattcttag
2	143	2	1.3	149110	ttttattcttag	149104	ttttattcttag
3	109	3	1.8	147696	ttttattcttag	147690	ttttattcttag
4	47	4	1.3	145823	ttttattcttag	145817	ttttattcttag
5	71	5	5.2	144459	ttttattcttag	144453	ttttattcttag
6	41	6	3.9	139777	ttttattcttag	139771	ttttattcttag
7	102	7	1.1	135246	ttttattcttag	135240	ttttattcttag
8	96	8	6.3	133964	ttttattcttag	133958	ttttattcttag
9	56	9	0.8	127595	ttttattcttag	127589	ttttattcttag
10	99	10	3.5	126661	ttttattcttag	126655	ttttattcttag
11	98	11	2.2	123025	ttttattcttag	123019	ttttattcttag
12	143	12	1.3	120702	ttttattcttag	120696	ttttattcttag
13	83	13	0.5	117316	ttttattcttag	117310	ttttattcttag
14	140	14					

【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
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16385 A1

- (51) International Patent Classification: C07H 21/02, 21/04, C12N 1/20, 15/00, C07K 1/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/26213
- (22) International Filing Date: 22 August 2001 (22.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/226,993 22 August 2000 (22.08.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): ALBERT EINSTEIN HEALTHCARE NETWORK [US/US]; 5501 Old York Road, Philadelphia, PA 19141 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KWOK, Simon [US/US]; 322 N. Fairfield Road, Devon, PA 19333 (US); DASKAL, Ioerachitel [US/US]; 707 Ashborne Road, Elkins Park, PA 19027 (US).
- (74) Agent: RIGAUT, Kathleen, D.; Dann, Dorfman, Herrell and Skillman, Suite 720, 1601 Market Street, Philadelphia, PA 19103 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/16385 A1

(54) Title: NOVEL TUMOR SUPPRESSOR ENCODING NUCLEIC ACID, PTX1, AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: This invention provides a novel nucleic acid molecule encoding PTX1, which has been mapped to human chromosome 12. The PTX1-encoding nucleic acid molecule, along with its encoded protein and antibodies thereto may be used to advantage to facilitate the diagnosis, prognosis and treatment of cancer.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

**Novel Tumor Suppressor Encoding Nucleic Acid, PTX1, and
Methods of Use Thereof**

5

This application claims priority under 35 U.S.C. §119(e) to US Provisional Application 60/226,993 filed August 22, 2000, the entire disclosure of which is incorporated by reference herein.

10

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the diagnosis and treatment of prostate cancer, and more specifically, to novel nucleic acid molecules, proteins and antibodies immunologically specific therefore which may be used to advantage for the diagnosis and treatment of prostate cancer.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

20

Several publications are referenced in this application by author name and year of publication in parentheses in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosure of each of these publications is incorporated by reference herein.

25

The molecular basis of cancer has been the subject of a massive research effort over the past several years. Through this effort, it has been discovered that abnormal cellular proliferation results not only from activation of oncogenes, but from disruption of certain genes whose function appears to be important in maintaining normal cell division. As a well-known example, mutations in the p53 tumor suppressor gene are common in human cancer and have been detected in tumor types from many different tissue sources.

30

35

This year prostate cancer is expected to be

WO 02/16385

PCT/US01/26213

diagnosed in approximately 200,000 men in the U.S. and to result in the loss of 38,000 lives. Such numbers make prostate cancer the most frequently diagnosed malignancy (other than that of the skin) in American males and the second leading cause of cancer-related death in that group. Physicians usually detect cancers by finding a lump in the prostate gland, which is a walnut shaped structure that helps to maintain the viability of sperm. Such lumps may be discovered during a routine checkup or during examinations prompted by a patient's complaint of sudden urinary discomfort or occasional impotence.

In some instances, prostate cancer is detected in the course of treatment for a disorder called benign prostatic hyperplasia. This condition, an aging-related enlargement of the prostate, affects more than half of all men older than 45 and gives rise (albeit more gradually) to the same urinary troubles caused by a prostate tumor. If the symptoms become too troublesome, a transurethral resection of the prostate, a process whereby parts of the gland are scraped away, may be performed. Whenever resection is done, the excised tissue is analyzed under a microscope for evidence of malignancy, which is occasionally found.

A simple blood test for prostate specific antigen (PSA) constitutes a third means of detecting prostate cancer. Increased PSA levels can signal the presence of cancer in individuals who display no symptoms of prostate abnormalities.

Prostate cancer is a disease with marked heterogeneity. Although many genes have been identified which are associated with the carcinogenesis of the prostate (Lara et al., 1999; Sciavolino and Abate-Shen, 1998), the mechanism underlying the development of prostate cancer is still poorly understood. However, it is believed to be a multi-step process that involves

WO 02/16385

PCT/US01/26213

genetic alterations of genes controlling cellular proliferation, differentiation and programmed cell death. Deletion or down-regulation of these tumor suppressor genes often leads to the development of cancer.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

To further understand the biological processes underlying the development of prostate cancer, the present inventors have identified a tumor suppressor gene which is expressed in normal but not malignant prostate tissue. Thus, in accordance with the present invention, novel biological molecules useful for identification, detection, and/or molecular characterization of components involved in the regulation of cellular differentiation and tumorigenesis are provided.

In a preferred embodiment of the invention, an isolated nucleic acid molecule is provided which encodes the human PTX1 protein. In a particularly preferred embodiment, the human PTX1 protein has an amino acid sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:2. An exemplary PTX1 nucleic acid molecule of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO:1.

According to another aspect of the present invention, an isolated nucleic acid molecule is provided, which has a sequence selected from the group consisting of: (1) SEQ ID NO: 1; (2) a sequence specifically hybridizing with preselected portions or all of the complementary strand of SEQ ID NO: 1; (3) a sequence comprising preselected portions of SEQ ID NO:1, (4) a complement of SEQ ID NO: 1, and (5) a sequence encoding part or all of a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 2. Such partial sequences are useful as probes to identify and isolate homologues of the PTX1 gene of the invention. Accordingly, isolated nucleic acid sequences encoding natural allelic variants of the

35

WO 02/16385

PCT/US01/26213

nucleic acids of SEQ ID NO: 1 are also contemplated to be within the scope of the present invention. The term natural allelic variants will be defined hereinbelow.

5 Host cells comprising the PTX1-encoding nucleic acids of the invention are also contemplated to be within the scope of the present invention. Such host cells include but are not limited to bacterial cells, fungal cells, yeast cells, plant cells, insect cells and other animal cells. The PTX1-encoding nucleic acids may be
10 conveniently cloned into a plasmid or retroviral vector for introduction into host cells. Such cells are useful in screening methods to identify compounds which modulate PTX1 expression. Compounds so identified may have therapeutic value in the treatment of prostate cancer.

15 According to another aspect of the present invention, an isolated human PTX1 protein is provided. The loss of expression of this PTX1 protein correlates with the deregulated growth of prostate carcinomas.

In a preferred embodiment of the invention, the
20 protein is of human origin, and comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. In a further embodiment, the protein may be encoded by natural allelic variants of SEQ ID NO: 1. Inasmuch as certain amino acid variations may be present in human PTX1 protein encoded by natural
25 allelic variants, such proteins are also contemplated to be within the scope of the invention. Antibodies immunologically specific for the human PTX1 protein described hereinabove are also provided.

In yet another aspect of the invention, methods are
30 provided for genetic screening and diagnostic evaluation of patients at risk for, or currently suffering from, cancer of the prostate. The hybridization specificity of the nucleic acids of the invention may be used to advantage for differential evaluation of patients
35 presenting with phenotypic characteristics common to

WO 02/16385

PCT/US01/26213

prostate cancer. In a preferred embodiment of the invention, a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample is provided. This method comprises isolating a nucleic acid sample
5 from a patient, contacting the nucleic acid sample with a nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1 under low stringency hybridization conditions to allow DNA duplexes to form between sequences of sufficient complementarity, isolating the DNA duplexes and assessing the duplexes for
10 mismatched base pairing.

In another embodiment, the nucleic acid molecules of the invention may be used as diagnostic hybridization probes or as primers for diagnostic PCR analysis for PTX1 or mutations thereof. Antisense molecules are also
15 provided herein and may be useful in the regulation of PTX1 expression. Other methods encompassed by the present invention include immunodetection methods for assessing biological samples for the presence of PTX1 proteins.

According to another aspect of the invention, a method is provided for identifying agents which modulate PTX1 activity. This method comprises contacting cells expressing PTX1 with an agent suspected of being able to modulate PTX1 activity, measuring proliferation of the
25 cells expressing PTX1 in both the presence and absence of the agent and comparing the proliferation of cells expressing PTX1 in the absence of the agent and in the presence of the agent. An alteration in cell proliferation in the presence of the agent is indicative
30 of the agent's ability to modulate PTX1 activity.

In yet another embodiment of the invention, kits are provided for detecting PTX1 expression associated with a susceptibility to cancer. Such kits may be used to
35 advantage to diagnose human prostate cancer.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a gel showing the differential expression of four selected clones by RT-PCR. First strand cDNAs were synthesized from 10 μ g of total RNA isolated from normal prostate (N) and prostate tumor (T). Aliquots of 2 μ l of the cDNA were amplified using primers specific to each clone. The PCR products were analyzed on 2% agarose gel. Molecular size marker (M) was pBR322 DNA digested with *Bst* N I. Clones 149 and 348 were expressed only in normal prostate, as indicated by the presence of a band in normal prostate (N), but not in prostate tumor (T). Clones 341 and 394 were expressed by both normal prostate and prostate tumor. Clone 348 was selected for further characterization and has been designated PTX1 herein.

Figure 2 shows the nucleotide sequence of the full-length PTX1 cDNA (SEQ ID NO: 1). The composite nucleotide sequence of overlapping cDNAs and its translation into the PTX1 protein are presented in the 5' to 3' direction. The numbering of the nucleotide and amino acid sequences (SEQ ID NO: 2) are shown at the right-hand side. The AATAAA sequence is underlined.

Figure 3 is a gel showing that the PTX1 gene is localized to human chromosome 12. DNA samples of a panel of 24 somatic cell hybrids and 3 genomic DNA controls were amplified with PTX1-specific primers as described in the Methods. The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel. DNA samples in lanes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22 contain a single human chromosome corresponding to the number. The sample in lane 4 contains two human chromosomes, 4 and 7. The sample in lane 20 contains three chromosomes, 20, 8, and 4. Samples in lanes 23, 24, 25, 26, and 27

WO 02/16385

PCT/US01/26213

contain chromosome X, chromosome Y, human DNA, hamster DNA, and mouse DNA, respectively. Molecular size markers (M) were Lambda DNA digested with *Hind* III. Only the samples containing human chromosome 12 and human DNA
5 produced a 2 kb band (lanes 12 and 25), which demonstrates that the PTX1 gene is localized on human chromosome 12. The smaller size band that is present in all lanes (except lane 25) may be related to the rodent PTX1 gene.

10

Figure 4 is a gel showing the purification of the recombinant PTX1 protein on Talon Metal Affinity Resin column. The recombinant protein was extracted from the bacterial host and purified on the Talon Metal Affinity
15 Resin column as described in Example 1. Lane 1 contained total protein; lane 2 contained the first elution of recombinant PTX1 protein; lane 3 contained the second elution of PTX1 protein; and lane 4 contained molecular weight markers.

20

Figure 5 is a micrograph showing the immunolocalization of PTX1 protein in normal prostate and prostate tumor. The sections were stained for the presence of PTX1 using a rabbit antiserum against
25 recombinant human PTX1. The red color indicates a positive immunoreactive product. Both the cytoplasm and nuclei of the normal glandular epithelium showed strong staining, while the tumor area showed no staining.

30

Figure 6 shows a comparison of nucleotide sequences of PTX1 and CDA14 cDNAs (SEQ ID NOS: 1 and 4, respectively). Alignment was based on the nucleotide sequences of PTX1 (top, this study) and published
35 sequence of CDA14 (bottom, Song et al., 2000). Gaps were introduced where necessary to maximize the alignment.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

The vertical line indicates identical nucleotides.
Please note the five single base differences in the
coding sequence.

5 Figure 7 shows the alignment of the deduced amino
acid sequences of PTX1 and CDA14 proteins. The amino
acid sequence of PTX1 (top; SEQ ID NO: 2) and CDA14
(bottom; SEQ ID NO: 5) were aligned with gaps introduced
where necessary to maximize the homology. The vertical
10 line indicates identical residues. Please note the
altered reading frame caused by three single base
insertions.

 Figure 8 shows a graph of the *in vitro* growth curves
15 for PC-3 prostate tumor cells transfected with various
expression constructs. Proliferation of cells expressing
PTX1 antisense RNA is indicated with squares (■); growth
of cells expressing luciferase RNA is indicated with
circles (●), and growth of cells expressing PTX1 RNA is
20 indicated by triangles (▲). The results are the averages
of three independent experiments.

 Figure 9 shows the exon-intron junctions of the
25 human PTX1 gene as determined from the genomic sequence
deposited under accession number AC009318 (Muzny et al.,
2000). The sequences of the exon-intron junctions shown
here are complementary to the published genomic sequence
(SEQ ID NOS: 6-31). Exon sequences are in capital
letters; while intron sequences are in lower case
30 letters. The number shown on top of the exon sequences
denotes the boundaries of the exons on the genomic
sequence.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, a new gene from human chromosome 12, designated PTX1, has been isolated by subtractive hybridization. PTX1, which is expressed in normal but not prostate tumor tissue, plays a role in suppression of prostate tumor development.

The full-length cDNA encoding PTX1 was isolated by 5'- and 3'- RACE. Nucleotide sequence analysis of the 1327-bp cDNA (SEQ ID NO: 1) predicts a protein of 377 amino acid residues (SEQ ID NO: 2) with a putative nuclear import signal (RRLNRKK; SEQ ID NO: 3) at its amino-terminus.

The PTX1 gene is localized on human chromosome 12 and is ubiquitously expressed. A segment of the cDNA was expressed in *E. coli* to produce a fragment of the PTX1 protein for the production of specific antibodies. Using immunohistochemical analysis, PTX1 protein was localized to the nuclei of glandular epithelia (especially in basal cells) of normal prostate but not in prostate carcinoma. The gene organization of PTX1 was established by comparing the cDNA sequence with a published human genomic sequence of unknown function.

The composition of the invention may be used to advantage in the diagnosis and treatment of prostate cancer. The nucleic acids of the invention may be used in chromosome and gene mapping assays for PCR; for the production of sense and antisense nucleic acids for altering gene expression levels; and/or for the production of peptide fragments and for the production of immunospecific antibodies. Methods are also provided for assessing genetic and biochemical alterations in PTX1 activity as well as the identification of agents capable of altering PTX1 activity. Such agents may be used to advantage as therapeutic agents for the treatment of prostate cancer. Finally, PTX1 gene replacement

WO 02/16385

PCT/US01/26213

therapies are also within the scope of the present invention.

I. Definitions:

5 The following definitions are provided to facilitate an understanding of the present invention:

"Nucleic acid" or a "nucleic acid molecule" as used herein refers to any DNA or RNA molecule, either single or double stranded and, if single stranded, the molecule of its complementary sequence in either linear or 10 circular form. In discussing nucleic acid molecules, a sequence or structure of a particular nucleic acid molecule may be described herein according to the normal convention of providing the sequence in the 5' to 3' 15 direction. With reference to nucleic acids of the invention, the term "isolated nucleic acid" is sometimes used. This term, when applied to DNA, refers to a DNA molecule that is separated from sequences with which it is immediately contiguous in the naturally occurring 20 genome of the organism in which it originated. For example, an "isolated nucleic acid" may comprise a DNA molecule inserted into a vector, such as a plasmid or virus vector, or integrated into the genomic DNA of a prokaryotic or eukaryotic cell or host organism.

25 When applied to RNA, the term "isolated nucleic acid" refers primarily to an RNA molecule encoded by an isolated DNA molecule as defined above. Alternatively, the term may refer to an RNA molecule that has been sufficiently separated from other nucleic acids with 30 which it would be associated in its natural state (i.e., in cells or tissues). An isolated nucleic acid (either DNA or RNA) may further represent a molecule produced directly by biological or synthetic means and separated from other components present during its production.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

"Natural allelic variants", "mutants" and "derivatives" of particular sequences of nucleic acids refer to nucleic acid sequences that are closely related to a particular sequence but which may possess, either naturally or by design, changes in sequence or structure. By closely related, it is meant that at least about 75%, but often, more than 90%, of the nucleotides of the sequence match over the defined length of the nucleic acid sequence referred to using a specific sequence identification number (SEQ ID NO). Changes or differences in nucleotide sequence between closely related nucleic acid sequences may represent nucleotide changes in the sequence that arise during the course of normal replication or duplication in nature of the particular nucleic acid sequence. Other changes may be specifically designed and introduced into the sequence for specific purposes, such as to change an amino acid codon or sequence in a regulatory region of the nucleic acid. Such specific changes may be made in vitro using a variety of mutagenesis techniques or produced in a host organism placed under particular selection conditions that induce or select for the changes. Such sequence variants generated specifically may be referred to as "mutants" or "derivatives" of the original sequence.

The terms "percent similarity", "percent identity" and "percent homology" when referring to a particular sequence are used as set forth in the University of Wisconsin GCG software program.

The present invention also includes active portions, fragments, derivatives and functional or non-functional mimetics of PTX1 polypeptides, or proteins of the invention. An "active portion" of such a polypeptide means a peptide that is less than the full length polypeptide, but which retains measurable biological activity.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

A "fragment" or "portion" of a PTX1 polypeptide means a stretch of amino acid residues of at least about five to seven contiguous amino acids, often at least about seven to nine contiguous amino acids, typically at least about nine to thirteen contiguous amino acids and, most preferably, at least about twenty to thirty or more contiguous amino acids. Fragments of the PTX1 polypeptide sequence, antigenic determinants, or epitopes are useful for eliciting immune responses to a portion of the PTX1 protein amino acid sequence.

Different "variants" of the PTX1 polypeptides exist in nature. These variants may be alleles characterized by differences in the nucleotide sequences of the gene coding for the protein, or may involve different RNA processing or post-translational modifications. The skilled person can produce variants having single or multiple amino acid substitutions, deletions, additions or replacements. These variants may include inter alia: (a) variants in which one or more amino acids residues are substituted with conservative or non-conservative amino acids, (b) variants in which one or more amino acids are added to the polypeptide, (c) variants in which one or more amino acids include a substituent group, and (d) variants in which the polypeptide is fused with another peptide or polypeptide such as a fusion partner, a protein tag or other chemical moiety, that may confer useful properties to the PTX1 polypeptide, such as, for example, an epitope for an antibody, a polyhistidine sequence, a biotin moiety and the like. Other PTX1 polypeptides of the invention include variants in which amino acid residues from one species are substituted for the corresponding residue in another species, either at the conserved or non-conserved positions. In another embodiment, amino acid residues at non-conserved positions are substituted with conservative or

WO 02/16385

PCT/US01/26213

non-conservative residues. The techniques for obtaining these variants, including genetic (suppressions, deletions, mutations, etc.), chemical, and enzymatic techniques are known to the person having ordinary skill in the art. To the extent such allelic variations, analogues, fragments, derivatives, mutants, and modifications, including alternative nucleic acid processing forms and alternative post-translational modification forms, result in derivatives of the PTX1 polypeptide that retain any of the biological properties of the PTX1 polypeptide, they are included within the scope of this invention.

The term "functional" as used herein implies that the nucleic or amino acid sequence is functional for the recited assay or purpose.

The phrase "consisting essentially of" when referring to a particular nucleotide or amino acid means a sequence having the properties of a given SEQ ID NO. For example, when used in reference to an amino acid sequence, the phrase includes the sequence per se and molecular modifications that would not affect the basic and novel characteristics of the sequence.

A "replicon" is any genetic element, for example, a plasmid, cosmid, bacmid, phage or virus, that is capable of replication largely under its own control. A replicon may be either RNA or DNA and may be single or double stranded.

A "vector" is a replicon, such as a plasmid, cosmid, bacmid, phage or virus, to which another genetic sequence or element (either DNA or RNA) may be attached so as to bring about the replication of the attached sequence or element.

An "expression operon" refers to a nucleic acid segment that may possess transcriptional and translational control sequences, such as promoters,

WO 02/16385

PCT/US01/26213

enhancers, translational start signals (e.g., ATG or AUG codons), polyadenylation signals, terminators, and the like, and which facilitate the expression of a polypeptide coding sequence in a host cell or organism.

5 The term "oligonucleotide," as used herein refers to sequences, primers and probes of the present invention, and is defined as a nucleic acid molecule comprised of two or more ribo- or deoxyribonucleotides, preferably more than three. The exact size of the oligonucleotide
10 will depend on various factors and on the particular application and use of the oligonucleotide.

The term "probe" as used herein refers to an oligonucleotide, polynucleotide or nucleic acid, either RNA or DNA, whether occurring naturally as in a purified
15 restriction enzyme digest or produced synthetically, which is capable of annealing with or specifically hybridizing to a nucleic acid with sequences complementary to the probe. A probe may be either single-stranded or double-stranded. The exact length of
20 the probe will depend upon many factors, including temperature, source of probe and method of use. For example, for diagnostic applications, depending on the complexity of the target sequence, the oligonucleotide probe typically contains 15-25 or more nucleotides,
25 although it may contain fewer nucleotides. The probes herein are selected to be "substantially" complementary to different strands of a particular target nucleic acid sequence. This means that the probes must be sufficiently complementary so as to be able to
30 "specifically hybridize" or anneal with their respective target strands under a set of pre-determined conditions. Therefore, the probe sequence need not reflect the exact complementary sequence of the target. For example, a non-complementary nucleotide fragment may be attached to
35 the 5' or 3' end of the probe, with the remainder of the

WO 02/16385

PCT/US01/26213

probe sequence being complementary to the target strand. Alternatively, non-complementary bases or longer sequences can be interspersed into the probe, provided that the probe sequence has sufficient complementarity with the sequence of the target nucleic acid to anneal therewith specifically.

The term "specifically hybridize" refers to the association between two single-stranded nucleic acid molecules of sufficiently complementary sequence to permit such hybridization under pre-determined conditions generally used in the art (sometimes termed "substantially complementary"). In particular, the term refers to hybridization of an oligonucleotide with a substantially complementary sequence contained within a single-stranded DNA or RNA molecule of the invention, to the substantial exclusion of hybridization of the oligonucleotide with single-stranded nucleic acids of non-complementary sequence.

The term "primer" as used herein refers to an oligonucleotide, either RNA or DNA, either single-stranded or double-stranded, either derived from a biological system, generated by restriction enzyme digestion, or produced synthetically which, when placed in the proper environment, is able to functionally act as an initiator of template-dependent nucleic acid synthesis. When presented with an appropriate nucleic acid template, suitable nucleoside triphosphate precursors of nucleic acids, a polymerase enzyme, suitable cofactors and conditions such as appropriate temperature and pH, the primer may be extended at its 3' terminus by the addition of nucleotides by the action of a polymerase or similar activity to yield a primer extension product. The primer may vary in length depending on the particular conditions and requirement of the application. For example, in diagnostic

WO 02/16385

PCT/US01/26213

applications, the oligonucleotide primer is typically 15-25 or more nucleotides in length. The primer must be of sufficient complementarity to the desired template to prime the synthesis of the desired extension product, that is, to be able anneal with the desired template strand in a manner sufficient to provide the 3' hydroxyl moiety of the primer in appropriate juxtaposition for use in the initiation of synthesis by a polymerase or similar enzyme. It is not required that the primer sequence represent an exact complement of the desired template. For example, a non-complementary nucleotide sequence may be attached to the 5' end of an otherwise complementary primer. Alternatively, non-complementary bases may be interspersed within the oligonucleotide primer sequence, provided that the primer sequence has sufficient complementarity with the sequence of the desired template strand to functionally provide a template-primer complex for the synthesis of the extension product.

Polymerase chain reaction (PCR) has been described in US Patents 4,683,195, 4,800,195, and 4,965,188, the entire disclosures of which are incorporated by reference herein.

As used herein, the terms "reporter," "reporter system", "reporter gene," or "reporter gene product" shall mean an operative genetic system in which a nucleic acid comprises a gene that encodes a product that when expressed produces a reporter signal that is a readily measurable, e.g., by biological assay, immunoassay, radio immunoassay, or by colorimetric, fluorogenic, chemiluminescent or other methods. The nucleic acid may be either RNA or DNA, linear or circular, single or double stranded, antisense or sense polarity, and is operatively linked to the necessary control elements for the expression of the reporter gene product. The required control elements will vary according to the

WO 02/16385

PCT/US01/26213

nature of the reporter system and whether the reporter gene is in the form of DNA or RNA, but may include, but not be limited to, such elements as promoters, enhancers, translational control sequences, poly A addition signals, transcriptional termination signals and the like.

The terms "transform", "transfect", "transduce", shall refer to any method or means by which a nucleic acid is introduced into a cell or host organism and may be used interchangeably to convey the same meaning. Such methods include, but are not limited to, transfection, electroporation, microinjection, PEG-fusion and the like.

The introduced nucleic acid may or may not be integrated (covalently linked) into nucleic acid of the recipient cell or organism. In bacterial, yeast, plant and mammalian cells, for example, the introduced nucleic acid may be maintained as an episomal element or independent replicon such as a plasmid. Alternatively, the introduced nucleic acid may become integrated into the nucleic acid of the recipient cell or organism and be stably maintained in that cell or organism and further passed on or inherited to progeny cells or organisms of the recipient cell or organism. Finally, the introduced nucleic acid may exist in the recipient cell or host organism only transiently.

Amino acid residues are identified in the present application according to the three-letter or one-letter abbreviations in the following Table:

TABLE I:

Amino Acid	3-letter Abbreviation	1-letter Abbreviation
L-Alanine	Ala	A
L-Arginine	Arg	R
L-Asparagine	Asn	N
L-Aspartic Acid	Asp	D
L-Cysteine	Cys	C

WO 02/16385

PCT/US01/26213

	L-Glutamine	Gln	Q
	L-Glutamic Acid	Glu	E
	Glycine	Gly	G
	L-Histidine	His	H
5	L-Isoleucine	Ile	I
	L-Leucine	Leu	L
	L-Methionine	Met	M
	L-Phenylalanine	Phe	F
	L-Proline	Pro	P
10	L-Serine	Ser	S
	L-Threonine	Thr	T
	L-Tryptophan	Trp	W
	L-Tyrosine	Tyr	Y
	L-Valine	Val	V
15	L-Lysine	Lys	K

Amino acid residues described herein are preferred to be in the "L" isomeric form. However, residues in the "D" isomeric form may be substituted for any L-amino acid residue, provided the desired properties of the polypeptide are retained. All amino-acid residue sequences represented herein conform to the conventional left-to-right amino-terminus to carboxy-terminus orientation.

The term "isolated protein" or "isolated and purified protein" is sometimes used herein. This term refers primarily to a protein produced by expression of an isolated nucleic acid molecule of the invention. Alternatively, this term may refer to a protein that has been sufficiently separated from other proteins with which it would naturally be associated, so as to exist in "substantially pure" form. "Isolated" is not meant to exclude artificial or synthetic mixtures with other compounds or materials, or the presence of impurities that do not interfere with the fundamental activity, and that may be present, for example, due to incomplete purification, addition of stabilizers, or compounding into, for example, immunogenic preparations or pharmaceutically acceptable preparations.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

The term "substantially pure" refers to a preparation comprising at least 50-60% by weight of a given material (e.g., nucleic acid, oligonucleotide, protein, etc.). More preferably, the preparation
5 comprises at least 75% by weight, and most preferably 90-95% by weight of the given compound. Purity is measured by methods appropriate for the given compound (e.g. chromatographic methods, agarose or polyacrylamide gel electrophoresis, HPLC analysis, and the like).

10 "Mature protein" or "mature polypeptide" shall mean a polypeptide possessing the sequence of the polypeptide after any processing events that normally occur to the polypeptide during the course of its genesis, such as proteolytic processing from a polyprotein precursor. In
15 designating the sequence or boundaries of a mature protein, the first amino of the mature protein sequence is designated as amino acid residue 1. As used herein, any amino acid residues associated with a mature protein not naturally found associated with that protein that
20 precedes amino acid 1 are designated amino acid -1, -2, -3 and so on. For recombinant expression systems, a methionine initiator codon is often utilized for purposes of efficient translation. This methionine residue in the resulting polypeptide, as used herein, would be
25 positioned at -1 relative to the mature PTX1 protein sequence.

The term "tag," "tag sequence" or "protein tag" refers to a chemical moiety, either a nucleotide, oligonucleotide, polynucleotide or an amino acid, peptide
30 or protein or other chemical, that when added to another sequence, provides additional utility or confers useful properties, particularly in the detection or isolation, of that sequence. Thus, for example, a homopolymer nucleic acid sequence or a nucleic acid sequence
35 complementary to a capture oligonucleotide may be added

WO 02/16385

PCT/US01/26213

to a primer or probe sequence to facilitate the subsequent isolation of an extension product or hybridized product. In the case of protein tags, histidine residues (e.g., 4 to 8 consecutive histidine residues) may be added to either the amino- or carboxy-terminus of a protein to facilitate protein isolation by chelating metal chromatography. Alternatively, amino acid sequences, peptides, proteins or fusion partners representing epitopes or binding determinants reactive with specific antibody molecules or other molecules (e.g., flag epitope, c-myc epitope, transmembrane epitope of the influenza A virus hemagglutinin protein, protein A, cellulose binding domain, calmodulin binding protein, maltose binding protein, chitin binding domain, glutathione S-transferase, and the like) may be added to proteins to facilitate protein isolation by procedures such as affinity or immunoaffinity chromatography. Chemical tag moieties include such molecules as biotin, which may be added to either nucleic acids or proteins to facilitate isolation or detection by interaction with avidin reagents, and the like. Numerous other tag moieties are known to, and can be envisioned by the trained artisan, and are contemplated to be within the scope of this definition.

A "clone" or "clonal cell population" is a population of cells derived from a single cell or common ancestor by mitosis.

A "cell line" is a clone of a primary cell or cell population that is capable of stable growth in vitro for many generations.

An "immune response" signifies any reaction produced by an antigen, such as a viral antigen, in a host having a functioning immune system. Immune responses may be either humoral in nature, that is, involve production of

WO 02/16385

PCT/US01/26213

immunoglobulins or antibodies, or cellular in nature, involving various types of B and T lymphocytes, dendritic cells, macrophages, antigen presenting cells and the like, or both. Immune responses may also involve the production or elaboration of various effector molecules such as cytokines, lymphokines and the like. Immune responses may be measured both in *in vitro* and in various cellular or animal systems. Such immune responses may be important in protecting the host from disease and may be used prophylactically and therapeutically.

An "antibody" or "antibody molecule" is any immunoglobulin, including antibodies and fragments thereof, that binds to a specific antigen. The term includes polyclonal, monoclonal, chimeric, and bispecific antibodies. As used herein, antibody or antibody molecule contemplates both an intact immunoglobulin molecule and an immunologically active portion of an immunoglobulin molecule such as those portions known in the art as Fab, Fab', F(ab')₂ and F(v).

As used herein, the term "living host" shall mean any non-human autonomous being.

II. Preparation of PTX1-Encoding Nucleic Acid Molecules, PTX1 Proteins, and Antibodies Thereto:

A. Nucleic Acid Molecules

Nucleic acid molecules encoding the PTX1 proteins of the invention may be prepared by two general methods: (1) They may be synthesized from appropriate nucleotide triphosphates, or (2) they may be obtained from biological sources. Both methods utilize protocols well known in the art.

The availability of nucleotide sequence information, such as the full length cDNA having SEQ ID NO: 1, enables preparation of an isolated nucleic acid molecule of the invention by oligonucleotide synthesis. Synthetic

WO 02/16385

PCT/US01/26213

oligonucleotides may be prepared by the phosphoramidite method employed in the Applied Biosystems 38A DNA Synthesizer or similar devices. The resultant construct may be purified according to methods known in the art, such as high performance liquid chromatography (HPLC). Long, double-stranded polynucleotides, such as a DNA molecule of the present invention, must be synthesized in stages, due to the size limitations inherent in current oligonucleotide synthetic methods. Thus, for example, a 2.6 kb double-stranded molecule may be synthesized as several smaller segments of appropriate complementarity. Complementary segments produced may then be annealed such that each segment possesses appropriate cohesive termini for attachment of an adjacent segment. Adjacent segments may be ligated by annealing cohesive termini in the presence of DNA ligase to construct an entire 2.6 kb double-stranded molecule. A synthetic DNA molecule so constructed may then be cloned and amplified in an appropriate vector.

Nucleic acid sequences encoding PTX1 may be isolated from appropriate biological sources using methods known in the art. In a preferred embodiment, a cDNA clone is isolated from an expression library of human origin. In an alternative embodiment, genomic clones encoding PTX1 may be isolated. Alternatively, cDNA or genomic clones encoding PTX1 from other animal species may be obtained.

In accordance with the present invention, nucleic acids having the appropriate level of sequence homology with the protein coding region of SEQ ID NO: 1 may be identified by using hybridization and washing conditions of appropriate stringency. For example, hybridizations may be performed, according to the method of Sambrook et al. 1989, using a hybridization solution comprising: 5X SSC, 5X Denhardt's reagent, 0.5-1.0% SDS, 100 µg/ml denatured, fragmented salmon sperm DNA, 0.05% sodium

WO 02/16385

PCT/US01/26213

pyrophosphate and up to 50% formamide. Hybridization is carried out at 37-42°C for at least six hours. Following hybridization, filters are washed as follows: (1) 5 minutes at room temperature in 2X SSC and 1% SDS; (2) 15 minutes at room temperature in 2X SSC and 0.1% SDS; (3) 30 minutes-1 hour at 37°C in 1X SSC and 1% SDS; (4) 2 hours at 42-65°C in 1X SSC and 1% SDS, changing the solution every 30 minutes.

One common formula for calculating the stringency conditions required to achieve hybridization between nucleic acid molecules of a specified sequence homology is (Sambrook et al., 1989):

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6\text{Log} [\text{Na}^+] + 0.41(\% \text{G+C}) - 0.63 (\% \text{ formamide}) - 600/\#\text{bp in duplex}$$

As an illustration of the above formula, using $[\text{Na}^+] = [0.368]$ and 50% formamide, with GC content of 42% and an average probe size of 200 bases, the T_m is 57°C. The T_m of a DNA duplex decreases by 1 - 1.5°C with every 1% decrease in homology. Thus, targets with greater than about 75% sequence identity would be observed using a hybridization temperature of 42°C. Such a sequence would be considered substantially homologous to the nucleic acid sequence of the present invention.

Nucleic acids of the present invention may be maintained as DNA in any convenient cloning vector. In a preferred embodiment, clones are maintained in plasmid cloning/expression vector, such as pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), which is propagated in a suitable *E. coli* host cell.

PTX1-encoding nucleic acid molecules of the invention include cDNA, genomic DNA, RNA, and fragments thereof which may be single- or double-stranded. Thus, this invention provides oligonucleotides (sense or

WO 02/16385

PCT/US01/26213

antisense strands of DNA or RNA) having sequences capable of hybridizing with at least one sequence of a nucleic acid molecule of the present invention, such as selected segments of the cDNA comprising the sequence of SEQ ID NO: 1. Such oligonucleotides are useful as probes for detecting or isolating PTX1 genes or homologues in other species.

The nucleic acid sequences referred to above may be modified by addition, substitution, insertion or deletion of one or more nucleotides, but preferably without abolition of ability to hybridize selectively with nucleic acid molecules with the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or its complementary sequence, that is wherein the degree of homology of the oligonucleotide or polynucleotide with one of the sequences given is sufficiently high.

In some preferred embodiments, oligonucleotides according to the present invention that are fragments of the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or its complementary sequence, or allele associated with cancer susceptibility, are at least about 10 nucleotides in length, more preferably at least 15 nucleotides in length, most preferably at least about 20 nucleotides in length. The design of oligonucleotides is well within the capabilities of the skilled person. Preferred oligonucleotides are between 10 and 100 nucleotide bases in length. Such fragments individually represent aspects of the present invention.

Fragments and other oligonucleotides may be used as primers or probes as discussed, but may also be generated (e.g. by PCR) in methods concerned with determining the presence in a test sample of a sequence indicative of cancer susceptibility.

Such oligonucleotide probes or primers, as well as the full-length sequence (and mutants, alleles, variants

WO 02/16385

PCT/US01/26213

and derivatives) are also useful in methods screening for a test sample containing nucleic acids for the presence of PTX1, alleles, mutants or variants thereof, especially those that indicate susceptibility or predisposition to cancers, the probes hybridizing with a target sequence from a sample obtained from the individual being tested. The conditions of the hybridization can be controlled to minimize non-specific binding, and preferably stringent to moderately stringent hybridization conditions are employed. The skilled person is readily able to design such probes, label them and devise suitable conditions for the hybridization reactions, assisted by textbooks such as Sambrook et al (1989) and Ausubel et al (1992).

On the basis of amino acid sequence information (SEQ ID NO: 2), oligonucleotide probes or primers may be designed, taking into account the degeneracy of the genetic code. An oligonucleotide for use in nucleic acid amplification may have about 10 or fewer codons (e.g. 6, 7 or 8), i.e. be about 30 or fewer nucleotides in length (e.g. 18, 21 or 24). Generally specific primers are upwards of 14 nucleotides in length, but not more than 18 to 20. Those skilled in the art are well versed in the design of primers for use in processes such as PCR.

Nucleic acid molecules according to the present invention, such as a full-length coding sequence or oligonucleotide probe or primer, may be provided as part of a kit, e.g. in a suitable container such as a vial in which the contents are protected from the external environment. The kit may include instructions for use of the nucleic acid molecules, e.g. in PCR and/or a method for determining the presence of nucleic acids of interest in a test sample. A kit wherein the nucleic acid molecules are intended for use in PCR may include one or more other reagents required for the reaction, such as polymerase, nucleosides, buffer solution etc. The nucleic

WO 02/16385

PCT/US01/26213

acid molecules may also be labeled with a detectable label or marker, such as any radioactive, fluorescent, biological or enzymatic tags or labels of standard use in the art. U.S. Patents concerning the use of such labels include U.S. Pat. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,366,241, each incorporated herein by reference.

A convenient way of producing a polypeptide according to the present invention is to express nucleic acid molecules encoding it, by use of the nucleic acid molecules in an expression system. This is discussed below. Vectors comprising the nucleic acid molecules of the present invention and host cells containing such vectors and/or nucleic acids according to the invention form further aspects of the present invention.

A host cell containing nucleic acid molecules according to the present invention, e.g. as a result of introduction of the nucleic acid molecule into the cell or into an ancestor of the cell and/or genetic alteration of the sequence endogenous to the cell or ancestor (which introduction may take place in vitro or in vivo), may be comprised (e.g. in the soma) within an organism which is an animal, particularly a mammal, which may be human or non-human, such as a rabbit, cat, dog, pig etc, or which is a bird such as a chicken. Genetically modified or transgenic animals or birds comprising such a cell are also provided as further aspects of the present invention.

The transgenic animals of the present invention may be used as animal disease models to assess therapeutic agents that may be efficacious in the treatment of cancer. However, such modified or transgenic animals are probably more useful in terms of research, particularly genetically modified animals wherein the modification is

WO 02/16385

PCT/US01/26213

the deletion ("knock-out") or mutation of nucleic acid molecules corresponding to PTX1 or an allele thereof.

B. Proteins

5 A full-length PTX1 protein of the present invention may be prepared in a variety of ways, according to known methods. The protein may be purified from appropriate sources, e.g., human or animal cultured cells or tissues, by immunoaffinity purification.

10 The availability of nucleic acid molecules encoding PTX1 or splice variants thereof enables production of the encoded proteins using *in vitro* expression methods known in the art. For example, a cDNA or gene may be cloned into an appropriate *in vitro* transcription vector, such as pSP64 or pSP65 for *in vitro* transcription, followed by cell-free translation in a suitable cell-free translation system, such as wheat germ or rabbit reticulocytes. *In vitro* transcription and translation systems are commercially available, e.g., from Promega Biotech, Madison, Wisconsin or BRL, Rockville, Maryland.

20 Alternatively, according to a preferred embodiment, larger quantities of PTX1 may be produced by expression in a suitable prokaryotic or eukaryotic system. For example, part or all of a DNA molecule, such as the cDNA having SEQ ID NO: 1, may be inserted into a plasmid vector adapted for expression in a bacterial cell, such as *Escherichia coli*, and yeast cells, such as *Saccharomyces cerevisiae*, or into a baculovirus vector for expression in insect cells. Such vectors comprise the regulatory elements necessary for expression of the DNA in the host cell (e.g. *E. coli* or insect cell), positioned in such a manner as to permit expression of the DNA in the host cell. Such regulatory elements required for expression include promoter sequences,

25

30

WO 02/16385

PCT/US01/26213

transcription initiation and termination sequences, and, optionally, enhancer sequences.

5 The PTX1 protein produced by nucleic acid expression in a recombinant prokaryotic or eukaryotic system may be purified according to methods known in the art. In a preferred embodiment, a commercially available expression/secretion system may be used, whereby the recombinant protein is expressed and thereafter secreted from the host cell, to be easily purified from the surrounding medium. If expression/secretion vectors are not used, an alternative approach involves purifying the recombinant protein by affinity separation, such as by immunological interaction with antibodies that bind specifically to the recombinant protein or nickel columns for isolation of recombinant proteins tagged with 6-8 histidine residues at their N-terminus or C-terminus. In yet another embodiment, GST fusion proteins may be employed to facilitate purification. Such methods are commonly used by those experienced in the field of recombinant protein purification.

10 15 20 25 The PTX1 proteins of the invention, prepared by the aforementioned methods, may be analyzed according to standard procedures. For example, such proteins may be subjected to amino acid sequence analysis, and/or gel electrophoresis.

As discussed above, the present invention also provides PTX1 polypeptides, or fragments or active portions thereof, for use in pharmaceuticals, in the development of drugs, diagnostic kits and for further study into its properties and role in vivo.

30 35 Polypeptides which are amino acid sequence variants, alleles, derivatives or mutants are also provided by the present invention. A polypeptide that is a variant, allele, derivative or mutant may have an amino acid sequence which differs from that given in SEQ ID NO: 2 by

WO 02/16385

PCT/US01/26213

addition, substitution, deletion and insertion of one or more amino acids. Preferred such polypeptides have PTX1 function, that is to say have one or more of the following properties: immunological cross-reactivity with an antibody reactive with the polypeptides for which the sequence is set out in SEQ ID NO: 2 and sharing an epitope with the polypeptides for which the amino acid sequence is set out in SEQ ID NO: 2 (as determined, for example, by immunological cross-reactivity between the two polypeptides).

A polypeptide which is an amino acid sequence variant, allele, derivative or mutant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 may comprise an amino acid sequence which shares greater than about 35% sequence identity with the sequence shown, greater than about 40%, greater than about 50%, greater than about 60%, greater than about 70%, greater than about 80%, greater than about 90% or greater than about 95%. Particular amino acid sequence variants may differ from that shown in SEQ ID NO. 2 by insertion, addition, substitution or deletion of 1 amino acid, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-150, or more than 150 amino acids. For amino acid "homology/identity", this may be understood to be similarity (according to the established principles of amino acid similarity, e.g., as determined using the algorithm GAP (Genetics Computer Group, Madison, WI) or identity. GAP uses the Needleman and Wunsch algorithm to align two complete sequences that maximizes the number of matches and minimizes the number of gaps. Generally, the default parameters are used, with a gap creation penalty = 12 and gap extension penalty = 4. Use of GAP may be preferred but other algorithms may be used including without limitation, BLAST (Altschul et al. (1990 J. Mol. Biol. 215:405-410); FASTA (Pearson and Lipman (1998) PNAS USA 85:2444-2448) or the Smith Waterman algorithm (Smith

WO 02/16385

PCT/US01/26213

and Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197) generally employing default parameters. Use of either of the terms "homology" and "homologous" herein does not imply any necessary evolutionary relationship between the compared sequences. The terms are used as they are in the phrase "homologous recombination", i.e., the terms merely require that the two nucleotide sequences are sufficiently similar to recombine under appropriate conditions.

A polypeptide according to the present invention may be used in screening for molecules which modulate its activity or function. Such molecules may be useful in a therapeutic (possibly including prophylactic) context.

The present invention also provides antibodies capable of immunospecifically binding to proteins of the invention. Polyclonal antibodies directed toward PTX1 may be prepared according to standard methods. In a preferred embodiment, monoclonal antibodies are prepared, which react immunospecifically with various epitopes of PTX1. Monoclonal antibodies may be prepared according to general methods of Köhler and Milstein, following standard protocols. Polyclonal or monoclonal antibodies that immunospecifically interact with PTX1 can be utilized for identifying and purifying such proteins. For example, antibodies may be utilized for affinity separation of proteins with which they immunospecifically interact. Antibodies may also be used to immunoprecipitate proteins from a sample containing a mixture of proteins and other biological molecules. Other uses of anti-PTX1 antibodies are described below.

Antibodies according to the present invention may be modified in a number of ways. Indeed the term "antibody" should be construed as covering any binding substance having a binding domain with the required specificity. Thus, the invention covers antibody fragments,

WO 02/16385

PCT/US01/26213

derivatives, functional equivalents and homologues of antibodies, including synthetic molecules and molecules whose shape mimics that of an antibody enabling it to bind an antigen or epitope.

5 Exemplary antibody fragments, capable of binding an antigen or other binding partner, are Fab fragment consisting of the VL, VH, Cl and CH1 domains; the Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; the Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single
10 arm of an antibody; the dAb fragment which consists of a VH domain; isolated CDR regions and F(ab')₂ fragments, a bivalent fragment including two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region. Single chain Fv fragments are also included.

15 Humanized antibodies in which CDRs from a non-human source are grafted onto human framework regions, typically with alteration of some of the framework amino acid residues, to provide antibodies which are less immunogenic than the parent non-human antibodies, are
20 also included within the present invention.

III. Uses of PTX1-Encoding Nucleic Acids, PTX1 Proteins and Antibodies Thereto:

25 The identification of the tumor suppressor gene, PTX1, provides utility for diagnosis, prognosis and gene therapy of prostate cancer. Isolation of PTX1-encoding nucleic acids, proteins and antibodies thereto will also provide wide utility as prognostic indicators of
30 neoplastic disease and as therapeutic agents for the treatment of many types of cancer.

Additionally, PTX1-related nucleic acids, proteins, and antibodies thereto, in accordance with this
35 invention, may be used as research tools to identify other tumor suppressor genes.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

A. PTX1-Encoding Nucleic Acids

PTX1-encoding nucleic acids may be used for a variety of purposes in accordance with the present invention. PTX1-encoding DNA, RNA, or fragments thereof may be used as probes to detect the presence of and/or expression of genes encoding the PTX1 protein. Methods in which PTX1-encoding nucleic acids may be utilized as probes for such assays include, but are not limited to: (1) *in situ* hybridization; (2) Southern hybridization (3) Northern hybridization; and (4) assorted amplification reactions such as polymerase chain reactions (PCR).

The PTX1-encoding nucleic acids of the invention may also be utilized as probes to identify related genes from other species as demonstrated herein. As is well known in the art, hybridization stringencies may be adjusted to allow hybridization of nucleic acid probes with complementary sequences of varying degrees of homology. Thus, PTX1-encoding nucleic acids may be used to advantage to identify and characterize other genes of varying degrees of relation to PTX1, thereby enabling further characterization of the observed altered gene expression involved in the aggressive progression of prostate cancer. Additionally, they may be used to identify genes encoding proteins that interact with PTX1 (e.g., by the "interaction trap" technique; see U.S. Patent No. 5,580,736), which should further accelerate elucidation of these cellular signaling mechanisms which are involved in cancer progression (Golemis et al. 1996).

Nucleic acid molecules, or fragments thereof, encoding PTX1 may also be utilized to control the production of PTX1, thereby regulating the amount of protein available to participate in disease signaling pathways. Alterations in the physiological amount of PTX1 protein may act synergistically with other agents used to halt tumor progression. In disease models of

WO 02/16385

PCT/US01/26213

prostate cancer, the nucleic acid molecules of the invention may be used to decrease expression of PTX1. In this embodiment, antisense molecules are employed which are targeted to expression-controlling sequences of PTX1-
5 encoding genes. Antisense oligonucleotides may be designed to hybridize to the complementary sequence of nucleic acid, pre-mRNA or mature mRNA, interfering with the production of polypeptide encoded by a given DNA
10 sequence (e.g. either native PTX1 polypeptide or a mutant or variant form thereof), so that its expression is reduced or prevented altogether. In addition to the PTX1 coding sequence, antisense techniques can be used to target the control sequences of the PTX1 gene, e.g. the
15 5' flanking sequence of the PTX1 coding sequence such as the translation start site. Antisense oligomers should be of sufficient length to hybridize to the target nucleotide sequence and exert the desired effect, e.g. blocking translation of a mRNA molecule. However, it
20 should be noted that smaller oligomers are likely to be more efficiently taken up by cells in vivo such that a greater number of antisense oligomers may be delivered to the location of the target mRNA. Preferably, antisense oligomers should be at least 15 nucleotides long to achieve adequate specificity. Oligonucleotides for use in
25 antisense technology are preferably between 15 to 30 nucleotides in length. The use of antisense molecules to decrease expression levels of a pre-determined gene is known in the art. The construction of antisense sequences and their use is described in Peyman and Ulman, Chemical
30 Reviews, 90:543-584, (1990), Crooke, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:329-376, (1992), and Zamecnik and Stephenson, P.N.A.S., 75:280-284, (1974). Antisense constructs may be generated which contain the entire PTX1 cDNA in reverse orientation.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

In another embodiment, overexpression of the PTX1 gene will be introduced into prostate cancer cells in experiments to assess restoration of PTX1 activity in such cells as overexpression can lead to overproduction of the encoded protein, PTX1. Overproduction of PTX1 in cells may be assessed by immunofluorescence or any other standard technique known in the art. Alternatively, overexpression of PTX1 by this method may facilitate the isolation and characterization of other components involved in the protein-protein complex formation that occurs as a cell progressively becomes more malignant.

As described above, PTX1-encoding nucleic acids are also used to advantage to produce large quantities of substantially pure PTX1 protein, or selected portions thereof.

B. PTX1 Protein and Antibodies

Purified PTX1 protein, or fragments thereof, may be used to produce polyclonal or monoclonal antibodies which also may serve as sensitive detection reagents for the presence and accumulation of PTX1 (or complexes containing PTX1) in biopsy samples or cultured cells. Recombinant techniques enable expression of fusion proteins containing part or all of the PTX1 protein. The full length protein or fragments of the protein may be used to advantage to generate an array of monoclonal antibodies specific for various epitopes of the protein, thereby providing even greater sensitivity for detection of the protein in prostate cells.

Polyclonal or monoclonal antibodies immunologically specific for PTX1 may be used in a variety of assays designed to detect and quantitate the protein. Such assays include, but are not limited to: (1) flow cytometric analysis; (2) immunochemical localization of PTX1 in prostate cells; and (3) immunoblot analysis

WO 02/16385

PCT/US01/26213

(e.g., dot blot, Western blot) of extracts from prostate cells. Additionally, as described above, anti-PTX1 can be used for purification of PTX1 (e.g., affinity column purification, immunoprecipitation).

5 From the foregoing discussion, it can be seen that PTX1-encoding nucleic acids, PTX1 expressing vectors, PTX1 proteins and anti-PTX1 antibodies of the invention can be used to detect PTX1 gene expression and alter PTX1
10 protein accumulation for purposes of assessing those patients at risk for prostate progression. The invention also provides materials that facilitate the elucidation of the genetic and protein interactions involved in the regulation of the disease progression as a normal
15 prostate cell gives rise to a malignant tumor.

Exemplary approaches for detecting PTX1-encoding nucleic acid molecules or polypeptides/proteins include:

- a) determining the presence, in a sample from a patient, of nucleic acid molecules according to the present invention; or
- 20 b) determining the presence, in a sample from a patient, of the polypeptide encoded by the PTX1 gene and, if present, determining whether the polypeptide is full length, and/or is mutated, and/or is expressed at the normal level; or
- 25 c) using DNA restriction mapping to compare the restriction pattern produced when a restriction enzyme cuts a sample of nucleic acid molecules from the patient with the restriction pattern obtained from the PTX1-encoding nucleic acid sequence; or,
- 30 d) using a specific binding member capable of binding to a PTX1 nucleic acid sequence, the specific binding member comprising nucleic acid hybridizable with the PTX1 sequence, or substances comprising an antibody domain with specificity for a PTX1 nucleic acid sequence
35 or the polypeptide encoded by it, the specific binding

WO 02/16385

PCT/US01/26213

member being labeled so that binding of the specific binding member to its binding partner is detectable; or, e) using PCR involving one or more primers based on PTX1 nucleic acid sequences to screen for PTX1 sequences in a sample from a patient.

5 A "specific binding pair" comprises a specific binding member (sbm) and a binding partner (bp) which have a particular specificity for each other and which in normal conditions bind to each other in preference to other molecules. Examples of specific binding pairs are antigens and antibodies, ligands and receptors and complementary nucleotide sequences. The skilled person is aware of many other examples and they do not need to be listed here. Further, the term "specific binding pair" is also applicable where either or both of the specific binding member and the binding partner comprise a part of a large molecule. In embodiments in which the specific binding pair are nucleic acid sequences, they will be of a length to hybridize to each other under conditions of the assay, preferably greater than 10 nucleotides long, more preferably greater than 15 or 20 nucleotides long.

10 In most embodiments for screening for cancer susceptibility alleles, the PTX1-encoding nucleic acid molecules in the sample will initially be amplified, e.g. using PCR, to increase the amount of the analyte as compared to other sequences present in the sample. This allows the target sequences to be detected with a high degree of sensitivity if they are present in the sample. This initial step may be avoided by using highly sensitive array techniques that are becoming increasingly important in the art.

15 The identification of the PTX1-encoding nucleic acid sequence and its association with prostate cancer paves the way for aspects of the present invention to provide the use of materials and methods, such as are disclosed

20
25
30
35

WO 02/16385

PCT/US01/26213

and discussed above, for establishing the presence or absence in a test sample of a variant form of the PTX1-encoding nucleic acid molecule, in particular an allele or variant specifically associated with cancer, especially prostate cancer. This may be for diagnosing a predisposition of an individual to cancer. It may be for diagnosing cancer of a patient with the disease as being associated with PTX1.

This allows for planning of appropriate therapeutic and/or prophylactic measures, permitting stream-lining of treatment. The approach further stream-lines treatment by targeting those patients most likely to benefit.

According to another aspect of the invention, methods of screening drugs for cancer therapy to identify suitable drugs for restoring PTX1 product function are provided. Restoration of PTX1 function by gene transfer or by pharmacological means (e.g., small molecules which mimic PTX1 structure and/or function) would be expected to ameliorate the aberrant growth characteristics of prostate cancer cells.

The PTX1 polypeptide or fragment employed in drug screening assays may either be free in solution, affixed to a solid support or within a cell. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant polynucleotides expressing the polypeptide or fragment, preferably in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays. One may determine, for example, formation of complexes between a PTX1 polypeptide or fragment and the agent being tested, or examine the degree to which the formation of a complex between a PTX1 polypeptide or fragment and a known ligand is interfered with by the agent being tested.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to the PTX1 polypeptides and is described in detail in Geysen, PCT published application WO 84/03564, published on Sep. 13, 1984. Briefly stated, large numbers of different, small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with PTX1 polypeptide and washed. Bound PTX1 polypeptide is then detected by methods well known in the art.

Purified PTX1 can be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. However, non-neutralizing antibodies to the polypeptide can be used to capture antibodies to immobilize the PTX1 polypeptide on the solid phase.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of specifically binding the PTX1 polypeptide compete with a test compound for binding to the PTX1 polypeptide or fragments thereof. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants of the PTX1 polypeptide.

A further technique for drug screening involves the use of host eukaryotic cell lines or cells (such as described above) which have a nonfunctional PTX1 gene. These host cell lines or cells are defective at the PTX1 polypeptide level. The host cell lines or cells are grown in the presence of drug compound. The rate of growth of the host cells is measured to determine if the compound is capable of regulating the growth of PTX1 defective cells.

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides of

WO 02/16385

PCT/US01/26213

interest or of small molecules with which they interact (e.g., agonists, antagonists, inhibitors) in order to fashion drugs which are, for example, more active or stable forms of the polypeptide, or which, e.g., enhance or interfere with the function of a polypeptide in vivo. See, e.g., Hodgson, (1991) *Bio/Technology* 9:19-21. In one approach, one first determines the three-dimensional structure of a protein of interest (e.g., PTX1 polypeptide) or, for example, of the PTX1-DNA complex, by x-ray crystallography, by nuclear magnetic resonance, by computer modeling or most typically, by a combination of approaches. Less often, useful information regarding the structure of a polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous proteins. An example of rational drug design is the development of HIV protease inhibitors (Erickson et al., (1990) *Science* 249:527-533). In addition, peptides (e.g., PTX1 polypeptide) may be analyzed by an alanine scan (Wells, 1991) *Meth. Enzym.* 202:390-411. In this technique, an amino acid residue is replaced by Ala, and its effect on the peptide's activity is determined. Each of the amino acid residues of the peptide is analyzed in this manner to determine the important regions of the peptide.

It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by a functional assay, and then to solve its crystal structure. In principle, this approach yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original molecule. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks

WO 02/16385

PCT/US01/26213

of chemically or biologically produced banks of peptides. Selected peptides would then act as the pharmacore.

Thus, one may design drugs which have, e.g., improved PTX1 polypeptide activity or stability or which act as inhibitors, agonists, antagonists, etc. of PTX1 polypeptide activity. By virtue of the availability of cloned PTX1 sequences, sufficient amounts of the PTX1 polypeptide may be made available to perform such analytical studies as x-ray crystallography. In addition, the knowledge of the PTX1 protein sequence provided herein will guide those employing computer modeling techniques in place of, or in addition to x-ray crystallography.

The present invention further provides "compositions" in biological compatible solution, pharmaceutically acceptable excipient, carrier, buffer, stabilizer or other materials well known to those skilled in the art, comprising the nucleic acids, polypeptides, vectors or antibodies of the invention. A biologically compatible solution is a solution in which the polypeptide, nucleic acid, vector, or antibody of the invention is maintained in an active form, e.g. in a form able to effect a biological activity. Generally, such a biologically compatible solution will be an aqueous buffer, e.g. Tris, phosphate, or HEPES buffer, containing salt ions. Usually the concentration of salt ions will be similar to physiological levels. Biologically compatible solutions may include stabilizing agents and preservatives.

Such compositions may be formulated for administration by topical, oral, parenteral, intranasal, subcutaneous, and intraocular routes. Parenteral administration is meant to include intravenous injection, intramuscular injection, intraarterial injection or infusion techniques. The compositions may be administered

WO 02/16385

PCT/US01/26213

parenterally in dosage unit formulations containing standard well known non-toxic physiologically acceptable carriers, adjuvants and vehicles as desired.

5 The preferred sterile injectable preparations may be a solution or suspension in a nontoxic parenterally acceptable solvent or diluent. Examples of
10 pharmaceutically acceptable carriers are saline, buffered saline, isotonic saline (e.g. monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride, or a mixture or such salts), Ringers solution, dextrose, water, sterile water, glycol, ethanol, and combinations thereof. 1,3-butanediol and sterile fixed
15 oils are conveniently employed as solvents or suspending media. Any bland fixed oil may be employed including synthetic mono- or di-glycerides. Fatty acids such as oleic acid also find use in the preparation of injectables.

The composition medium may also be a hydrogel which is prepared from any biocompatible or non-cytotoxic (homo
20 or hetero) polymer, such as a hydrophilic polyacrylic acid polymer that can act as a drug adsorbing sponge. Such polymers have been described, for example in application W093/08845, the entire contents of which are hereby incorporated by reference. Certain of them, such
25 as, in particular, those obtained from ethylene and/or propylene oxide are commercially available. A hydrogel may be deposited directly onto the surface of the tissue treated, for example during surgical intervention.

The present invention provides "methods of
30 treatment" which comprise the administration to a human or other animal of an effective amount of a composition of the invention.

35 Effective amounts vary, depending on the age, type and severity of the condition to be treated, body weight, desired duration of treatment, method of administration,

WO 02/16385

PCT/US01/26213

and other parameters. Effective amounts are determined by a physician or other qualified medical professional.

5 The PTX1 polypeptides of the invention may also be administered via intra-tumor injection in a biologically compatible buffer, in doses of about 0.01 mg/kg to about 100mg/kg, preferably about 0.1 mg/kg to about 50mg/kg, and most preferably about 1mg/kg to about 10mg/kg of body weight per day. Alternatively, nucleic acids expressing the peptides of the invention may be delivered directly 10 to a tumor in vectors or liposomes which facilitate entry into a prostate tumor cancer cell.

The following examples provide illustrative methods 15 of practicing the instant invention, and are not intended to limit the scope of the invention in any way.

EXAMPLE 1
20 **IDENTIFICATION OF PTX1, A CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENE ON CHROMOSOME 12**

This example describes the use of subtractive hybridization to identify a novel gene, PTX1, which maps to Chromosome 12 and is present in normal prostate but 25 not in prostate carcinoma.

I. Materials and Methods:

The following protocols are provided to facilitate the practice of the present invention. 30

Subtractive hybridization: Total RNA was extracted from human normal prostate (kindly provided by the National Diabetes Research Interchange) and prostate carcinoma (remnant pathological specimen from our department) 35 according to Chomczynski and Sacchi (1987). Poly A⁺ mRNA was purified from total RNA using an Oligotex mRNA Mini

WO 02/16385

PCT/US01/26213

Kit (Qiagen). Subtractive hybridization was carried out using the PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories), and the procedure provided by the manufacturer was followed exactly. The normal prostate cDNA was used as 'tester' and the prostate tumor cDNA as 'driver'. After hybridization to remove common sequences, the differentially expressed cDNAs that are present in the tester cDNA, but absent from the driver cDNA, were amplified with Pfu DNA polymerase. The PCR products were phosphorylated with T4 polynucleotide kinase, blunt-end ligated to SmaI-cleaved, dephosphorylated pUC18 vector (Amersham Pharmacia Biotech), and transformed into XL1-Blue competent cells (Stratagene). Mini-preparations of plasmid DNA from randomly picked colonies were screened in a dot-blot format with subtracted probes as described in the manual accompanying the PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech Laboratories). Positive clones were further screened by nucleotide sequence analysis.

5'- and 3'- RACE: To isolate a full-length cDNA, the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories) was used. Poly A⁺ mRNA was isolated from 230 µg normal prostate total RNA using the Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen). Half of the poly A⁺ RNA was used for the synthesis of 5'-RACE ready cDNA and the other half for 3'-RACE ready cDNA. The 5'- and 3'- RACE were carried out according to the manual of the SMART RACE cDNA Amplification Kit. The PCR fragments were subcloned into pUC18 as described above.

Tissue expression of PTX1: Expression of PTX1 in human tissues was examined by RT-PCR using first strand cDNAs (Human Multiple Tissue cDNA Panels I and II) purchased from Clontech Laboratories, Inc. Aliquots of 5 µl of the

WO 02/16385

PCT/US01/26213

cDNA were amplified using PTX1-specific or β -actin-specific primers in a total volume of 75 μ l. PCR conditions were: 1 cycle of 96°C for 1 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 59°C for 1 min, and 72°C for 2 min; followed by 1 cycle of 72°C for 7 min. Aliquots of 20 μ l of the PCR products were analyzed on 2% agarose gel. The tissues tested were: brain, heart, kidney, liver, lung, pancreas, placenta, skeletal muscle, colon, ovary, peripheral blood leukocytes, prostate, small intestine, spleen, testis and thymus.

Human chromosome localization of the PTX1 Gene:

Monochromosomal Somatic Cell Hybrid PCRable DNAs (Quantum Biotechnologies) were used to localize PTX1 gene on human chromosomes. Aliquots of 250 ng DNA of a panel of 24 hybrids and 3 controls were amplified with PTX1-specific primers in a total volume of 75 μ l. PCR conditions were: 1 cycle of 96°C for 1 min; 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 2 min; followed by 1 cycle of 72°C for 7 min. Aliquots of 10 μ l of the PCR products were analyzed on 1% agarose gel.

Expression of recombinant PTX1 and production of antiserum:

The coding sequence corresponding to residues 121-208 of the PTX1 protein was amplified using synthetic primers with a built-in *Nco* I site at the 5'-end and a *Bam* HI site at the 3'-end. The amplified fragment was purified from agarose gel and subcloned into the *Nco* I/*Bam* HI sites of the bacterial expression plasmid vector, pCAL-c (Stratagene). To facilitate the purification of the recombinant protein, the sequence of pCAL-c vector between the *Bam* HI and *Kpn* I sites was replaced with one containing six consecutive His codons followed by a stop codon. The expression plasmid was

WO 02/16385

PCT/US01/26213

transformed into BL21-CodonPlus (DE3)-RIL competent cells (Stratagene).

To produce the recombinant PTX1 protein, bacteria harboring the expression plasmid were grown in 200 ml of LB medium containing 100 µg/ml of ampicillin to an OD₆₀₀ of 0.6-1.0, and induced for 2 hr with 2 mM IPTG. The cells were harvested, lysed with 20 ml of B-Per Reagent (Pierce) and the inclusion bodies were collected by centrifugation and washed three times with 1/10 dilution of B-Per Reagent. The recombinant protein was extracted from the inclusion bodies with 10 ml of extraction buffer (6M guanidine HCl, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 5 mM mercaptoethanol, pH 8.0) overnight at 4°C. The protein extract was mixed with 1 ml of pre-equilibrated Talon Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories, Inc) at room temperature for 20 min. The resin was washed twice with 10 ml of wash buffer (6M guanidine HCl, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5 mM mercaptoethanol, pH 7.0) and packed into a small column. The column was washed 3 times with 5 ml of wash buffer, and then eluted with 5 ml of elution buffer (6M guanidine HCl, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 7.0). The purified protein was dialyzed at 4°C against 3 x 4 liters of 10 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. The dried protein was sent to Alpha Diagnostic International for custom production of polyclonal antibodies in rabbits.

Immunohistochemical localization of PTX1: The procedure was carried out at room temperature except where indicated. Human prostate carcinoma sections were deparaffinized 3 times in xylene for 5 min each, rehydrated in graded ethanol, and boiled in antigen retrieval solution (10 mM sodium citrate/citric acid, pH 6.0) at a pressure of 15 psi for 10 min. The sections

WO 02/16385

PCT/US01/26213

were washed twice with Buffer 1 (100 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) for 5 min each. They were incubated with 200 μ l of blocking solution (1% Blocking Reagent [Roche Biochemical], 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5) for 1 hr, followed by 200 μ l of 2% goat serum in blocking solution for 30 min. They were then incubated with 100 μ l of primary antiserum (1:100 dilution in blocking solution) for 1 hr. After washing 3 times with Buffer 1 for 5 min the sections were incubated with 100 μ l of goat anti-rabbit IgG/alkaline phosphatase conjugate (1:100 dilution in blocking solution) for 1 hr. The sections were washed 3 times with Buffer 1 for 5 min, once with AP Buffer (100 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5), and then incubated with 200 μ l of freshly prepared Vega Red Chromogen (Biomedex Corp) for 30-60 min. Finally, the sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in graded ethanol, clarified in xylene and mounted in Permount (Fisher Scientific).

20 II. Results:

Molecular cloning and characterization of PTX1 cDNA: A large number of clones were obtained from the subtractive hybridization. Of the 396 randomly picked colonies, 57 were found positive by dot blot hybridization with a subtracted cDNA probe. They were further screened by nucleotide sequence analysis. Of these 57 clones, 56% were semenogelin cDNA. The other clones were mitochondrial DNA (11%), 28S ribosomal RNA (7%), prolactin-inducible protein (7%) and mucin (5%). The remaining clones (14%) were unique sequences. Four of these clones (#149, 341, 348 and 394) were novel sequences. RT-PCR using normal prostate and prostate tumor cDNAs showed that clones 149 and 348 were cDNAs differentially expressed in normal prostate (Figure 1).

WO 02/16385

PCT/US01/26213

Clone 348 was selected for further characterization and was re-named PTX1.

5 Since clone 348 is only 167 bp long, the full-length cDNA was isolated using 5'- and 3'-RACE. The 5'-RACE yielded a 180 bp fragment, while the 3'-RACE produced a 1.3 kb fragment. The composite nucleotide sequence of these two clones comprises a cDNA sequence of 1327 bp (SEQ ID NO: 1), including 26 bp of poly(A) tail at the 3' end (Figure 2). A continuous open reading frame is present, starting from the ATG codon at base 87 and ending at the TAA codon at base 1218. There are three other possible ATG codons upstream at bases 21, 51, and 59, but use of these codons gives rise to terminated proteins. Hence, the nucleotide sequence appears to encode a protein of 377 amino acid residues (SEQ ID NO: 2). The 5'-untranslated region is 86 base pairs (bp) long. On the other hand, the 3'-untranslated region is 107 bp long and contains one AATAAA sequence between bases 1278 and 1283. This sequence is only 18 bp upstream of the poly(A) tail and is apparently used for RNA processing and polyadenylation (Proudfoot and Brownlee, 1976).

Tissue expression and chromosomal localization of PTX1
25 **gene:** Expression study by RT-PCR using PTX1-specific primers and human multiple tissue cDNA panels showed that PTX1 was expressed in all of the 16 human tissues tested (data not shown). The chromosomal localization study by PCR using a monochromosomal somatic cell hybrid panel produced a band of the expected size only in samples containing human chromosome 12 or human genomic DNA control (Figure 3). These results indicate that the PTX1 gene is localized on human chromosome 12.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

Bacterial expression and immunolocalization of PTX1

protein: To generate specific antibodies against PTX1, a segment of the PTX1 sequence was initially expressed in a pCAL-c expression vector as a 12.4 kDa fusion protein with a calmodulin-binding peptide (CBP) tag. However, the fusion protein became insoluble after it was allowed to refold as described by Reddy et al. (1992) and was dialyzed to remove the guanidine HCl. This made it impossible to purify the fusion protein with the calmodulin resin. To obviate this problem, the thombin cleavage sequence of the pCAL-c vector was replaced with one containing six consecutive His codons, followed by a stop codon. This facilitates the purification of the recombinant protein with Talon metal affinity resin under denaturing conditions (Figure 4). Approximately 3 mg of recombinant protein may be routinely obtained from 200 ml culture using this method.

Immunohistochemical analysis of sections of human prostate and prostate tumor tissue using an antiserum against PTX1 showed that the cytoplasm and nuclei of the glandular epithelia of the normal prostate were stained, while those of prostate tumor were negative (Figure 5). Immunostaining using preimmune serum on sections of normal prostate also gave a negative result (data not shown). This indicates that the immunostaining of normal prostate by PTX1 antiserum was specific.

PC-3 prostate tumor cell line expression of PTX1 gene:

To elucidate the function of PTX1, the coding sequence of the PTX1-encoding nucleic acid molecule was inserted in both "sense" and "antisense" orientations in a tetracycline-repressible expression plasmid, pTRE2 (Tet-Off Gene Expression System; Clontech Laboratories). The resulting expression constructs were co-transfected with pTK-Hyg plasmid into a G418-resistant, Tet-Off-

WO 02/16385

PCT/US01/26213

transfected PC-3 prostate tumor cell line. Stable
transfectants were then selected with G418 and
hygromycin. Induction of the antisense or sense PTX1 RNA
was accomplished by removing tetracycline from the
5 culture medium. Upon induction, both the proliferation
rate and the number of viable cells of the cells
transfected with the sense PTX1 construct decreased,
where as the cells transfected with the antisense PTX1
construct grew faster than the control cells (PC-3 cells
10 transfected with a luciferase expression construct). The
growth curves of the PC-3 cells transfected with sense,
antisense and luciferase constructs are provided in
Figure 8. The induction of sense and antisense PTX1 RNA
was confirmed by RT-PCR using primers specific for PTX1
15 and the expression vector. The effect of induced RNA on
PTX1 translation was also confirmed by immuno-
histochemistry (data not shown).

In soft agar assays, cells transfected with the
antisense PTX1 construct readily formed colonies, while
20 cells transfected with luciferase or sense PTX1
constructs formed little or no colonies. These results
indicate that PTX1 may be a suppressor protein for
anchorage-independent cell proliferation.

25 III. Discussion:

The present invention is directed to the isolation
and sequence characterization of a full-length cDNA,
PTX1, encoding a novel human nuclear protein. This cDNA
was selected on the basis that it was expressed in normal
30 prostate, but not in prostate carcinoma. It is
ubiquitously expressed in normal human tissues. Its
expression in prostate carcinoma is down-regulated, which
has been confirmed by both RT-PCR and immunohistochemical
analysis. The deduced protein sequence contains a
35 RRLNRKK sequence (SEQ ID NO: 3) which is a putative

WO 02/16385

PCT/US01/26213

bipartite nuclear localization signal (Melchior and Gerace, 1995). The nuclear localization of PTX1 has been confirmed by immunohistochemical analysis. Furthermore, it is highly conserved as the human PTX1-specific primers can also detect the rodent counterparts (Figure 3).
5 Nuclear localization and down-regulation of PTX1 in prostate carcinoma suggests that PTX1 is a candidate tumor suppressor gene.

A search of the PTX1 sequence against the GenBank database revealed another cDNA known as CDA14 which encodes a protein with unknown function (Song et al., 2000). Nucleotide sequence homology analysis of PTX1 and CDA14 revealed that they are highly similar. However, there are several significant differences between these two cDNAs (Figure 6). CDA14 is 2 base pairs (bp) longer than PTX1 at the 5'-end. However, these two extra base pairs are not present in the genomic sequence (discussed in more details below). Its 3'-untranslated region is also 42 bp longer than that of PTX1. This may be due to the utilization of different polyadenylation sites. Multiple polyadenylation sites in mRNA are not unusual and have been reported to be present in other mRNAs such as porcine prohormone convertase PC1/3 (Dai et al., 1995). In the coding region of CDA14, there are three single base insertions at bases 696, 715 and 731, which altered 11 residues of the deduced protein sequence at positions 203-213 (Figure 7). This change in amino acid sequence may significantly alter the protein's structure and function. There are also two single base differences at bases 239 and 887, which affected single codons each.
25 One possible explanation for these sequence discrepancies is that CDA14 may be a natural mutant, since it was isolated from pheochromocytoma.

A search on the GenBank database also resulted in the identification of the PTX1 gene in a 203 kb fragment
35

WO 02/16385

PCT/US01/26213

of human chromosome 12p (Muzny et al., 2000). This also confirms the chromosomal localization of the PTX1 gene. By comparing this genomic sequence with the cDNA sequence, the location and size of the exons may be determined. The PTX1 gene spans a little over 40 kb, and it contains 14 exons of 41-143 bp and 13 introns of 0.5-9.4 kb (Figure 9; SEQ ID NOS: 6-31). The TATA or CAAT promoter elements are absent in the 5'-flanking sequence. The genomic sequence also refutes the three single base insertions in the coding region of CDA14 at bases 696, 715 and 731, but confirms the two single base changes in CDA14 at bases 239 and 887 (Figure 6).

Although loss of chromosome 17 may occur in the early stages of tumorigenesis of the prostate, loss of chromosome 12 (especially 12p) may be associated with more advanced stages (Brothman et al., 1994; Kibel et al., 1998). Using microcell-mediated chromosome transfer, a portion of human chromosome 12 corresponding to 12pter-q13 was shown to possess prostate tumor suppressor activity (Berube et al., 1994). On the other hand, using the same technique, a 70-cM portion of human chromosome 12 has been shown to suppress metastasis, but not tumorigenesis (Luu et al., 1998).

Additional experiments suggest that PTX1 also suppresses anchorage-independent cell proliferation in human prostate tissue. Expression of PTX1-encoding nucleic acid molecules in the PC-3 prostate tumor cell line resulted in decreased cell proliferation, while expression of antisense PTX1-encoding nucleic acids caused increased cell proliferation (Figure 8). Thus, when translation of PTX1 is blocked by antisense RNA, cells will grow without control. However, when PTX1 is overexpressed, cell proliferation is arrested. Taken together, these results strongly suggest that PTX1 plays

WO 02/16385

PCT/US01/26213

a critical role in suppressing cellular growth and tumor progression in human prostate carcinomas.

REFERENCES

- 5 Berube, N.G., Speevak, M.D., and Chevrette, M. (1994).
Suppression of tumorigenicity of human prostate cancer
cells by introduction of human chromosome del(12)(q13).
10 Cancer Res. 54, 3077-3081.
- 15 Brothman, A.R., Watson, M.J., Zhu, X.L., Williams, B.J., and
Rohr, L.R. (1994). Evaluation of 20 archival prostate
tumor specimens by fluorescence in situ hybridization
(FISH). Cancer Genet. Cytogenet. 75, 40-44.
- 20 Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step
method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-
phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162,156-159.
- 25 Dai, G., Smeekens, S.P., Steiner, D.F., McMurtry, J.P.,
and Kwok, S.C.M. (1995). Characterization of multiple
prohormone convertase PC1/3 transcripts in porcine ovary.
Biochim. Biophys. Acta 1264,1-6.
- 30 Golemis et al., (1996) Yeast Interaction Trap/Two Hybrid
Systems to Identify Interacting Proteins, Unit 20.1.1-
20.1.28 in *Current Protocols in Molecular Biology*, eds.
Ausubel, F.M. et al., John Wiley & Sons, NY.
- 35 Kibel, A.S., Schutte, M., Kern, S.E., Isaacs, W.B., and Bova,
G.S. (1998). Identification of 12p as a region of
frequent deletion in advanced prostate cancer. Cancer
Res. 58, 5652-5655.
- 40 Lara, P.N., Jr, Kung, H.-J., Gumerlock, P.H., and Meyers,
F.J. (1999). Molecular biology of prostate
carcinogenesis. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 32, 197-208.
- 45 Luu, H.H., Zagaja, G.P., Dubauskas, Z., Chen, S.L.,
Smith, R.C., Watabe, K., Ichikawa, Y., Ichikawa, T.,
Davis, E.M., Beau, M.M.L., and Rinker-Schaeffer, C.W.
(1998). Identification of a novel metastasis-suppressor
region on human chromosome 12. Cancer Res. 58, 3561-
3565.
- 50 Melchior, F., and Gerace, L. (1995). Mechanisms of
nuclear protein import. Curr. Opin. Cell Biol. 7, 310-
318.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

- Muzny, D.M., Adams, C., Bailey, M., Barbara, J., Blankenburg, K., Bodota, B., Bouck, J., Bowie, S. et al. (2000). Homo sapiens 12p BAC RP11-996F15 complete sequence. GenBank database, accession number: AC009318.
- 5 Proudfoot, N.J., and Brownlee, G.G. (1976). 3'-Noncoding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature 263, 211-214.
- 10 Reddy, G.K., Gunwar, S., Green, C.B., Fei, D.T.W., Chen, A.B., and Kwok, S.C.M. (1992). Purification and characterization of recombinant porcine prorelaxin expressed in Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys. 294, 579-585.
- 15 Sciavolino, P.J. and Abate-Shen C. (1998). Molecular biology of prostate development and prostate cancer. Ann. Med. 30, 357-368.
- 20 Song, H., Gao, G., Peng, Y., Ren, S., Chen, Z., and Han, Z. (2000). A novel gene expressed in human pheochromocytoma. GenBank database, accession numbers: NM_016570 and AF216751.
- 25 While certain of the preferred embodiments of the present invention have been described and specifically exemplified above, it is not intended that the invention be limited to such embodiments. Various modifications may be made thereto without departing from the scope and
- 30 spirit of the present invention, as set forth in the following claims.

WO 02/16385

PCT/US01/26213

What is claimed is:

1. A nucleic acid molecule encoding PTX1 which comprises the sequence of SEQ ID NO: 1.
5
2. The nucleic acid molecule of claim 1 which is cDNA.
3. The nucleic acid molecule of claim 1 which is RNA.
10
4. The nucleic acid molecule of claim 1 which encodes an exon present in genomic DNA.
5. The nucleic acid molecule of claim 1 which is double-stranded DNA.
15
6. An isolated PTX1-encoding nucleic acid molecule comprising a sequence selected from the group consisting of:
20
 - a) SEQ ID NO: 1;
 - b) a sequence which specifically hybridizes with SEQ ID NO: 1;
 - c) a sequence encoding a polypeptide of SEQ ID NO: 2;
 - d) a complement of SEQ ID NO: 1; and
 - d) a natural allelic variant of a sequence selected from the group consisting of a), b), c) and d).
7. A nucleic acid molecule which encodes an antisense molecule having between 10 and 50 nucleotides which binds specifically to a nucleic acid molecule of claim 6.
30

35

WO 02/16385

PCT/US01/26213

8. A recombinant expression vector comprising a nucleic acid molecule of claim 6.

9. An expression vector of claim 8 wherein said vector is selected from the group consisting of a plasmid, *E. coli*, *S. cerevisiae*, and a retrovirus.

10. A host cell transformed with an expression vector as claimed in claim 8.

11. A host cell as claimed in Claim 10, wherein said host cell is selected from the group consisting of bacteria, fungal, yeast, plant, insect, and animal cells.

12. An isolated polypeptide, which is a product of expression of the nucleic acid molecule of claim 1.

13. The isolated polypeptide of claim 12 which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

14. A method for producing and purifying a polypeptide, said method comprising the steps of
a) culturing the host cell of claim 10 under conditions wherein said polypeptide is produced;
b) recovering said polypeptide from said host cell culture.

15. An antibody immunologically specific for a polypeptide as claimed in claim 12.

16. A method for identifying a test compound which binds a polypeptide of claim 12, said method comprising:
a) providing a purified polypeptide produced via expression of the nucleic acid molecule of SEQ ID NO: 1;

WO 02/16385

PCT/US01/26213

b) contacting said peptide with a test compound suspected of having binding affinity for said peptide in a reaction mixture; and

5 c) assaying said mixture for complex formation between said test compound and said peptide.

17. A method as claimed in claim 16, wherein said peptide possesses biological activity and said test compound is assessed for agonistic activity.

10

18. A method as claimed in claim 16, wherein said peptide possesses biological activity and said test compound is assessed for antagonistic activity.

15

19. A method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample, said method comprising:

a) isolating a nucleic acid sample from said patient;

20

b) contacting said nucleic acid sample with a nucleic acid sequence of SEQ ID NO 1 under low stringency hybridization conditions, such that DNA duplexes form between sequences of sufficient complementarity;

c) isolating said DNA duplexes if any, and

25

d) assessing said duplexes for mismatched base pairing.

20. A method as claimed in claim 19, wherein said mismatched base pairing is due to the presence of a deletion in said nucleic acid from said patient sample.

30

21. A method as claimed in claim 19, wherein said mismatched base pairing is due to the presence of an insertion in said nucleic acid from said patient sample.

35

WO 02/16385

PCT/US01/26213

22. A method as claimed in claim 19, wherein said mismatched base pairing is due to the presence of a point mutation.

5 23. A method of identifying a target nucleic acid molecule in a test sample using a nucleic acid probe derived from the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1 which is capable of specifically hybridizing to the complementary sequence of SEQ ID NO: 1, the method
10 comprising contacting the probe and the test sample under hybridizing conditions and observing whether hybridization takes place.

15 24. A method according to claim 23 wherein said probe is used to identify a PTX1-encoding nucleic acid or a mutant allele thereof.

20 25. A method of identifying agents that modulate PTX1 activity, comprising the steps of:
a) contacting cells expressing PTX1 with an agent suspected of being able to modulate PTX1 activity in culture medium capable of supporting cellular growth;
b) measuring proliferation of said cells expressing PTX1 in both the presence and absence of said
25 agent; and
c) comparing the proliferation of cells expressing PTX1 in the presence of said agent to the growth of cells expressing PTX1 in the absence of said agent, an increase or decrease in cell proliferation
30 being indicative of said agents being able to modulate PTX1 activity.

35 26. A kit for detecting expression of the PTX1 gene associated with a susceptibility to cancer, the kit comprising at least one nucleic acid probe capable of

WO 02/16385

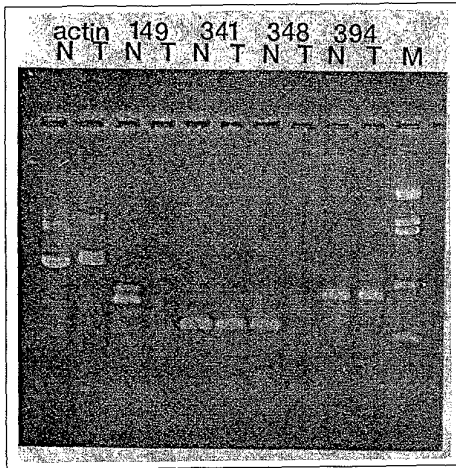
PCT/US01/26213

specifically binding an expressed PTX1 nucleic acid.

27. A kit for detecting expression of the PTX1 gene associated with susceptibility to cancer, the kit comprising at least one antibody capable of specifically binding a polypeptide encoded by an expressed PTX1 nucleic acid.

5

Figure 1



WO 02/16385

PCT/US01/26213

2/9

Figure 2

GACCCGGGCTTCATG 15
 GAAACATGGCGTAGGCTGGGACCAACACAAAGCATGACTATATGAAGGAAGGAGTTTCTCTGAAG 86

ATG AGG CGA CTG AAT CGG AAA AAA ACT TTA AGT TTG GTA AAA GAG TTG GAT GCC 140
 M R R L N R K K T L S L V K E L D A 18

TTT CCG AAG GTT CCT GAG AGC TAT GTA GAG ACT TCA GCC AGT GGA GGT ACR GTT 194
 F F K V F E S Y V E T S A S G G T V 36

TCT CTA ATA GCA TTT ACA ACT ATG GCT TTA TTA ACC ATA ATG AAA TTC TCA GTA 248
 S L I A F T T M A L L T I M K F S V 54

TAT CAA GAT ACA TGG ATG AAG TAT GAA TAC GAA GTA GAC AAG GAT TTT TCT AGC 302
 Y Q D T W M K Y E Y E V D K D F S S 72

AAA TTA AGA ATT AAT ATA GAT ATT ACT GTT GCC ATG AAG TGT CAA TAT GTT GGA 356
 K L R I N I D I T V A M K C Q Y V G 90

CGG GAT GTA TTG GAT TTA GCA GAA ACA ATG GTT GCA TCT GCA GAT GGT TTA CT 410
 A D V L D L A E T M V A S A D G L V 108

TAT GAA CCA ACA GTA TTT GAT CTT TCA CCA CAG CAG AAA GAG TGG CAG AGG ATG 464
 Y E P T V F D L S P Q K E W Q R M 126

CTG CAG CTG ATT CAG AGT AGG CTA CAA GAA GAG CAT TCA CTT CAA GAT GTG ATA 518
 L Q L I Q S R L Q E E H S L Q D V I 144

TTT AAA AGT GCT TTT AAA AGT ACA TCA ACA GCT CTT CCA CCA AGA GAA GAT GAT 572
 F K S A F K S T S T A L F P R E D D 162

TCA TCA CAG TCT CCA AAT GCA TGC AGA ATT CAT GGC CAT CTA TAT GTC AAT AAA 626
 S S Q S P N A C R I H G H L Y V N K 180

GTA GCA GGG AAT TTT CAC ATA ACA CTG GGC AAG GCA ATT CCA CAT CCT CGT GGT 680
 V A G N F H I T V G K A I P H P R G 198

CAT GCA CAT TTG GCA GCA CTT GTC AAC CAT GAA TCT TAC AAT TTT TCT CAT AGA 734
 H A H L A A L V N H E S Y N F S H R 216

ATA GAT CAT TTG TCT TTT GGA GAG CTT GTT CCA GCA ATT ATT AAT CCT TTA GAT 788
 I D H L S F G E L V P A I I N P L D 234

GGA ACT GAA AAA ATT GCT ATA GAT CAC AAC CAG ATG TTC CAA TAT TTT ATT ACA 842
 G T E K I A I D H N Q M F Q Y F I T 252

GTT GAG CCA ACA AAA CTA CAT ACA TAT AAA ATA TCA GCA TAC ACC CAT CAG TTT 896
 V V P T K L H T Y K I S A Y T H Q F 270

TCT GTG ACA GAA AGG GAA CGT ATC ATT AAC CAT GCT GCA GGC AGC CAT GGA GTC 950
 S V T E R E R I I N H A A G S H G V 288

TCT GGG ATA TTT ATG AAA TAT GAT CTC AGT TCT CTT ATG GTG ACA GTT ACT GAG 1004
 S G I F M K Y D L S S L M V T V T E 306

GAG CAC ATG CCA TTC TGG CAG TTT TTT GTA AGA CTC TGT GGT ATT GTT GGA GGA 1058
 E H M P F F W Q F F V R L C G I V G G 324

ATC TTT TCA ACA ACA GGC ATG TTA CAT GGA ATT GGA AAA TTT ATA GTT GAA ATA 1112
 I F S T T G M L H G I G K F I V E I 342

ATT TGC TGT CGT TTC AGA CTT GGA TCC TAT AAA CCT GTC AAT TCT GTT CCT TTT 1166
 I C C R F R L G S Y K P V N S V P F 360

GAG GAT GGC CAC ACA GAC AAC CAC TTA CCT CTT TTA GAA AAT AAT ACA CAT TAA 1220
 E D G H T D N H L P L L E N N T H * 377

CACCTCCCGATTGAAGGAGAAAACTTTTTCCTGAGACATAAAACCTTTTTTAAATAATAAATATTGTG 1291
 CAATATATCCAAAAAATAAAAAAATAAAAAA 1327

Figure 3

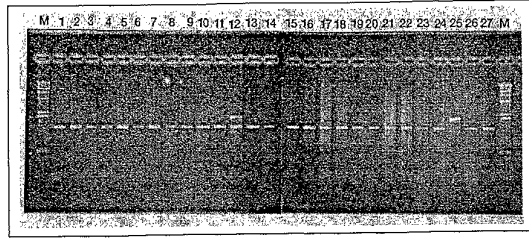


Figure 4

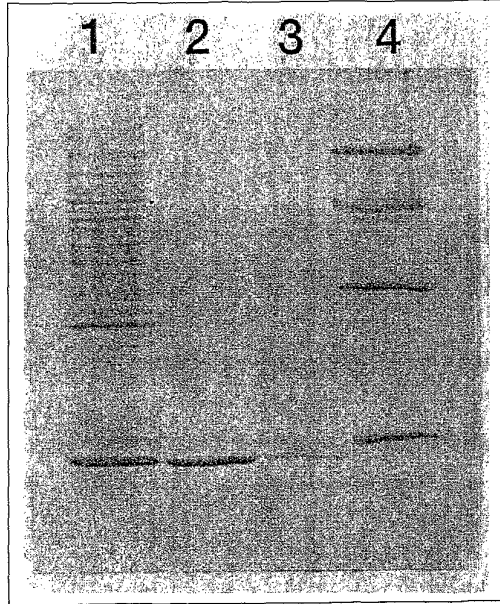


Figure 5

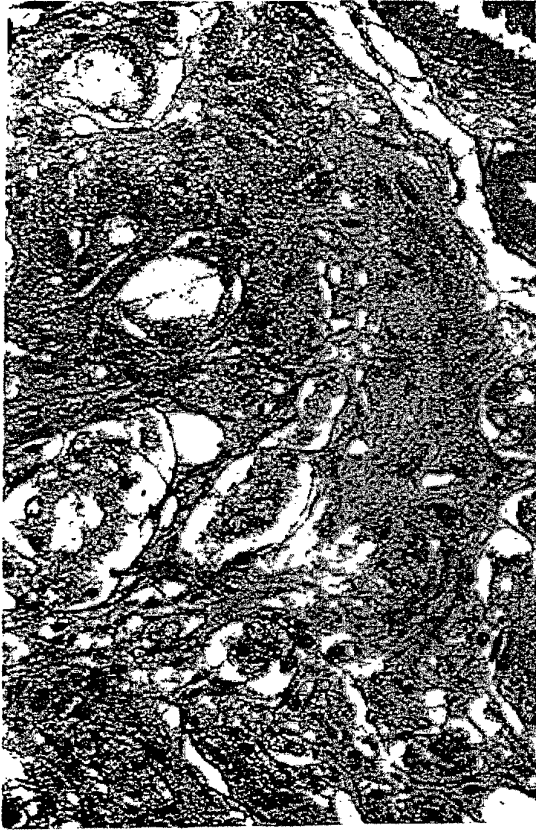
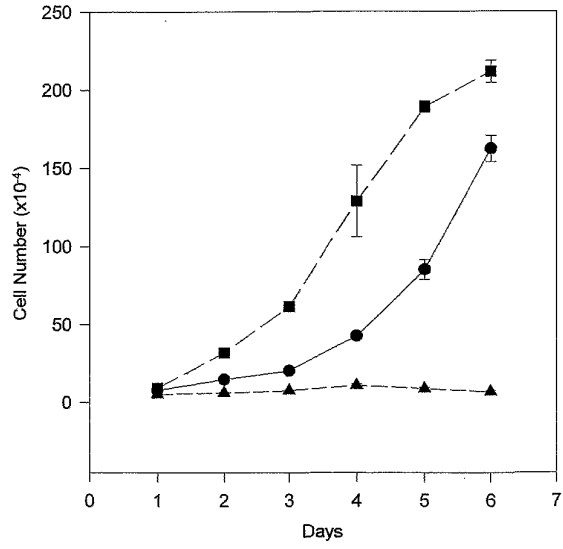


Figure 8



WO 02/16385

PCT/US01/26213

9/9

Figure 9

Exon #	Size (bp)	Intron #	Size (kb)	5' Splice Junctions	3' Splice Junction	Codon(s) Interpreted
1	49	1	9.4	158697 CATTACACACAG gtaaaatactga	149252 tttattctcttag CATGACATRRT	
2	143	2	1.3	149110 GGT ACA G gtgagatcaggt	147804 tggatttcccag TT TCT CTA	V ^W
3	109	3	1.8	147586 TTT TCT AG gtaactattttt	145856 tttgctttccag C AAA TTA	S ^T
4	47	4	1.3	145823 TGT CAA T gtaagtaacct	144529 ttttctatgacg AT GTT GGA	Y ^W
5	71	5	5.2	144450 TAT GAA CCA gtaagtttgatt	139267 ctttcattccag ACA GGA TTT	P ^W /P ^W
6	41	6	3.9	139227 TGG CAG AG gtaataagagaa	135306 ctttcttatttag G AFG CTG	R ^W
7	102	7	1.1	135205 CCA CCA AG gtgagctctgta	134058 ttattttaacag A GAA GAT	R ^W
8	96	8	6.3	133964 GTG GGC AA gtaagtcttttt	127650 ttctctttccag G GCA ATT	K ^W
9	56	9	0.8	127595 CAT GAA T gtaagcagcttc	126759 tttgcttttttag CT TAC AAT	S ^W
10	99	10	3.5	126661 ATA GAT C gtaagttattaa	123122 tttgattcttag AC AAC CAG	H ^W
11	98	11	2.2	123025 ACA GAA AGG gtaagttgaatc	120864 ccttcccttttag GAA CGT ATC	R ^W /E ^W
12	163	12	1.3	120702 ACA ACA G gftaacaccat	119398 tgtttattacag GC AFG TTA	G ^W
13	83	13	0.5	119316 GTC ATT TCT gtaagtgctgta	118600 ttttctctcttag GTT CCT TTT	S ^W /V ^W
14	140					

WO 02/16385

PCT/US01/26213

SEQUENCE LISTING

<110> Kwok, Simon
 Daskal, Terachimiel
 Albert Einstein Healthcare Network

<120> Novel Tumor Suppressor Encoding Nucleic
 Acid, PTX1, And Methods Of Use Thereof

<130> ABEH-012

<140> Not Assigned Yet

<141> 2001-08-22

<150> 60/226,993

<151> 2000-08-22

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
 <211> 1327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1

gacccgggct	tctgtgaac	atggcggtag	gctgggacca	taacacaagc	atgactatat	60
gaagggaag	gaaggtttc	ctgaagatga	ggcgactgaa	tcggaaaaaa	actttaagtt	120
tggtaaaaga	gttggatgcc	tttcggaagg	ttctcgagag	ctatgtagag	acttcagcca	180
gtggaggtac	agttctctca	atagcattta	caactatggc	tttattaacc	ataatgaaat	240
tctcagtata	tcagatata	tggatgaagt	atgaatacga	agtagacaag	gatttttcta	300
gcaaaatgaag	aattaatata	gatattactg	ttgccatgaa	gtgtcaatat	gttggagcgg	360
atgtatttga	tttagcagaa	acaatggttg	catctgcaga	tggtttagtt	tatgaaccac	420
cagtatttga	tcttccacca	cagcagaaag	agtggcagag	gatgctgcag	ctgattcaga	480
gtaggctaca	agaagagcat	tcacttcaag	atgtgatatt	taaaatgctc	tttaaaagta	540
catcaacagc	tcttccacca	agagaagatg	atcctacaca	gtctccaaat	gcctgcaaaa	600
ttcatggcca	tctatattgc	aataaagtag	cagggaaatt	tcacataaca	gtgggcaagg	660
caattccaca	tctcgtggt	catgcaact	tggcagcact	tgtcaaccat	gaatcttaca	720
atttttctca	tagaatagat	catttgcctt	ttggagagct	tgttccagca	attattaatc	780
ctttagatgg	aactgaaaaa	attgctatag	atcacaacca	gatgttccaa	tatttcaata	840
cagttgtgcc	aacaaaaacta	catacatata	aaatatcagc	atacaccocat	cagttttctg	900
tgcacgaag	ggacgctatc	ataaccatg	ctgcaggcac	ccatggagtc	tctgggatat	960
ttatgaata	tgatctcagt	tctcttatgg	tgacagttac	tgaggagcac	atgccattct	1020
ggcagttttt	tgtaaagctc	tgtggtatgt	ttggaggaat	cttttcaaca	acagggcatgt	1080
tacatggaaat	tggaaaattt	atagttgaaa	taatttgcct	tcgtttcaga	cttggatcct	1140
ataaacctgt	caattctggt	ccttttgagg	atggccacac	agacacccac	ttacctcttt	1200
tagaaaaata	tacacattaa	cacctccga	ttgaaggaga	aaaacttttt	gcctgagaca	1260
taaaaccttt	ttttaataat	aaaatattgt	gcaatatata	caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1320
aaaaaaaa						1327

<210> 2
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Arg	Arg	Leu	Asn	Arg	Lys	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	Val	Lys	Glu	Leu
1				5				10						15	
Asp	Ala	Phe	Pro	Lys	Val	Pro	Glu	Ser	Tyr	Val	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser
			20				25							30	

WO 02/16385

PCT/US01/26213

Gly Gly Thr Val Ser Leu Ile Ala Phe Thr Thr Met Ala Leu Leu Thr
 35 40 45
 Ile Met Lys Phe Ser Val Tyr Gln Asp Thr Trp Met Lys Tyr Glu Tyr
 50 55 60
 Glu Val Asp Lys Asp Phe Ser Ser Lys Leu Arg Ile Asn Ile Asp Ile
 65 70 75 80
 Thr Val Ala Met Lys Cys Gln Tyr Val Gly Ala Asp Val Leu Asp Leu
 85 90 95
 Ala Glu Thr Met Val Ala Ser Ala Asp Gly Leu Val Tyr Glu Pro Thr
 100 105 110
 Val Phe Asp Leu Ser Pro Gln Gln Lys Glu Trp Gln Arg Met Leu Gln
 115 120 125
 Leu Ile Gln Ser Arg Leu Gln Glu Glu His Ser Leu Gln Asp Val Ile
 130 135 140
 Phe Lys Ser Ala Phe Lys Ser Thr Ser Thr Ala Leu Pro Pro Arg Glu
 145 150 155 160
 Asp Asp Ser Ser Gln Ser Pro Asn Ala Cys Arg Ile His Gly His Leu
 165 170 175
 Tyr Val Asn Lys Val Ala Gly Asn Phe His Ile Thr Val Gly Lys Ala
 180 185 190
 Ile Pro His Pro Arg Gly His Ala His Leu Ala Ala Leu Val Asn His
 195 200 205
 Glu Ser Tyr Asn Phe Ser His Arg Ile Asp His Leu Ser Phe Gly Glu
 210 215 220
 Leu Val Pro Ala Ile Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Glu Lys Ile Ala
 225 230 235 240
 Ile Asp His Asn Gln Met Phe Gln Tyr Phe Ile Thr Val Val Pro Thr
 245 250 255
 Lys Leu His Thr Tyr Lys Ile Ser Ala Tyr Thr His Gln Phe Ser Val
 260 265 270
 Thr Glu Arg Glu Arg Ile Ile Asn His Ala Ala Gly Ser His Gly Val
 275 280 285
 Ser Gly Ile Phe Met Lys Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Met Val Thr Val
 290 295 300
 Thr Glu Glu His Met Pro Phe Trp Gln Phe Phe Val Arg Leu Cys Gly
 305 310 315 320
 Ile Val Gly Gly Ile Phe Ser Thr Thr Gly Met Leu His Gly Ile Gly
 325 330 335
 Lys Phe Ile Val Glu Ile Ile Cys Cys Arg Phe Arg Leu Gly Ser Tyr
 340 345 350
 Lys Pro Val Asn Ser Val Pro Phe Glu Asp Gly His Thr Asp Asn His
 355 360 365
 Leu Pro Leu Leu Glu Asn Asn Thr His
 370 375

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/26213
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(?) :C07H 21/02, 21/04; C12N 1/20, 15/00; C07K 1/00 US CL :556/22.1, 24.8; 435/252.8, 320.1; 530/350 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) U.S. : 556/22.1, 24.8, 24.25, 25.3; 435/6, 69.1, 91.1, 183, 252.3, 320.1; 530/350 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 practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/25959 A2 (CHIRON CORPORATION) 18 JUNE 1998(18.06.98), see entire document, especially SEQ ID NOS: 19 and 31, and pages 8-11, 18-20, 22, 23, 74, and 75.	6-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention. "B" earlier document published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "Z" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 04 JANUARY 2002		Date of mailing of the international search report 25 JAN 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 806-9230		Authorized officer FRANK LU <i>Felicia D. Roberts</i> Telephone No. (703) 806-1285

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/22213
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos. because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
Please See Extra Sheet.		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14		
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/28215

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

STN, WEST and STIC Sequence database

Search Terms: SEQ ID Nos. 1 and 2, PTX1, hybridization, oligonucleotide, expression vector, host cell, transformation, and recombinant protein

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-14, drawn to a nucleic acid molecule encoding PTX1 (claims 1-5), an isolated PTX1-encoding nucleic acid molecule (claim 6), a nucleic acid molecule which encodes an antisense molecule (claim 7), an expression vector (claims 8 and 9), a host cell (claims 10 and 11), an isolated polypeptide (claims 12 and 13), and a method for producing and purifying a polypeptide (claim 14).

Group II, claim 16, drawn to an antibody.

Group III, claims 16-18, drawn to a method for identifying a test compound.

Group IV, claims 19-24, drawn to a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence (claims 19-22) and a method of identifying a target nucleic acid molecule in a test sample (claims 23 and 24).

Group V, claim 25, drawn to a method for identifying agents that modulate PTX1 activity.

Group VI, claim 26, drawn to a kit for detecting expression expression of the PTX1 gene associated with a susceptibility to cancer.

Group VII, claim 27, drawn to a kit for detecting expression expression of the PTX1 gene associated with a susceptibility to cancer.

The inventions listed as Groups I to VII do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I and II do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for producing and purifying a polypeptide of Group I is not required for Group II while an antibody of Group II is not required for Group I.

Groups I and III do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for producing and purifying a polypeptide of Group I is not required for Group III while a method for identifying a test compound which binds a polypeptide of Group III is not required for Group I.

Groups I and IV do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for producing and purifying a polypeptide of Group I is not required for Group IV while a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample of Group IV is not required for Group I.

Groups I and V do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for producing and purifying a polypeptide of Group I is not required for Group V while a method for identifying agents that modulate PTX1 activity of Group V is not required for Group I.

Groups I and VI do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for producing and purifying a polypeptide of Group I is not required for Group VI while a kit of Group VI is not required for Group I.

Groups I and VII do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for producing and purifying a polypeptide of Group I is not required for Group VII while a kit of Group VII is not required for Group I.

Groups II and III do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, an antibody of Group II is not required for Group III while a method for identifying a test compound which binds a polypeptide of Group III is not required for Group II.

Groups II and IV do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, an antibody of Group II is not required for Group IV while a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample of Group IV is not required for Group II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/26218

Groups II and V do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, an antibody of Group II is not required for Group V while a method for identifying agents that modulate PTX1 activity of Group V is not required for Group II.

Groups II and VI do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, an antibody of Group II is not required for Group VI while a kit of Group VI is not required for Group II.

Groups II and VII do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, an antibody of Group II is not required for Group VII while a kit of Group VII is not required for Group II.

Groups III and IV do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying a test compound which binds a polypeptide of Group III is not required for Group IV while a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample of Group IV is not required for Group III.

Groups III and V do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying a test compound which binds a polypeptide of Group III is not required for Group V while a method for identifying agents that modulate PTX1 activity of Group V is not required for Group III.

Groups III and VI do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying a test compound which binds a polypeptide of Group III is not required for Group VI while a kit of Group VI is not required for Group III.

Groups III and VII do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying a test compound which binds a polypeptide of Group III is not required for Group VII while a kit of Group VII is not required for Group III.

Groups IV and V do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample of Group IV is not required for Group V while a method for identifying agents that modulate PTX1 activity of Group V is not required for Group IV.

Groups IV and VI do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample of Group IV is not required for Group VI while a kit of Group VI is not required for Group IV.

Groups IV and VII do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying a mutation in a nucleic acid sequence in a patient sample of Group IV is not required for Group VII while a kit of Group VII is not required for Group IV.

Groups V and VI do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying agents that modulate PTX1 activity of Group V is not required for Group VI while a kit of Group VI is not required for Group V.

Groups V and VII do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, a method for identifying agents that modulate PTX1 activity of Group V is not required for Group VII while a kit of Group VII is not required for Group V.

Groups VI and VII do not relate to a single inventive concept because they lack the same or corresponding special technical features. For example, at least one nucleic acid probe of Group VI is not required for Group VII while at least one antibody of Group VII is not required for Group VI.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	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	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

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

(72) 発明者 サイモン・クウォク

アメリカ合衆国 1 9 3 3 3 ペンシルベニア州デボン、ノース・フェアフィールド・ロード 3 2 2 番

(72) 発明者 イエラチミール・ダスカル

アメリカ合衆国 1 9 0 2 7 ペンシルベニア州エリキンス・パーク、アシュボーン・ロード 7 0 7 番

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36
 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA09 EA02 EA04 GA11 HA12
 4B063 QA17 QA19 QQ02 QQ42 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QS33 QS34
 QX01
 4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01 DA14
 4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74

專利名称(译)	编码新型肿瘤抑制因子的核酸，PTX1及其使用方法		
公开(公告)号	JP2004518409A	公开(公告)日	2004-06-24
申请号	JP2002521482	申请日	2001-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	爱因斯坦医疗网络		
申请(专利权)人(译)	爱因斯坦医疗保健网络		
[标]发明人	サイモンクウォク イエラチミールダスカル		
发明人	サイモン・クウォク イエラチミール・ダスカル		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/4703		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫		
优先权	60/226993 2000-08-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了编码PTX1的新型核酸分子，其位于人染色体12上。编码PTX1的核酸分子，由其编码的蛋白质及其抗体可用于促进癌症的诊断，预后和治疗。

アミノ酸	3文字省略	1文字省略
L-アラニン	Ala	A
L-アルギニン	Arg	R
L-アスパラギン	Asn	N
L-アスパラギン酸	Asp	D
L-システイン	Cys	C
L-グルタミン	Gln	Q
L-グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
L-ヒスチジン	His	H
L-イソロイシン	Ile	I
L-ロイシン	Leu	L
L-メチオニン	Met	M
L-フェニルアラニン	Phe	F
L-プロリン	Pro	P
L-セリン	Ser	S
L-スレオニン	Thr	T
L-トリプトファン	Trp	W
L-チロシン	Tyr	Y
L-バリン	Val	V
L-リジン	Lys	K