

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 523171

(P2003 - 523171A)

(43)公表日 平成15年8月5日(2003.8.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/711	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/711		39/395	E 4 B 0 2 4
39/395			T 4 B 0 6 3
		45/00	4 B 0 6 4
45/00		48/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全152数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 593138(P2000 - 593138)

(86)(22)出願日 平成12年1月19日(2000.1.19)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月17日(2001.7.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/01309

(87)国際公開番号 W000/041516

(87)国際公開日 平成12年7月20日(2000.7.20)

(31)優先権主張番号 09/233,693

(32)優先日 平成11年1月19日(1999.1.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P

(71)出願人 アボット・ラボラトリーズ
ABBOTT LABORATORIE
S

アメリカ合衆国、イリノイ・60064 - 6050、
アボット・パーク、アボット・パーク・ロ
ード・100、チャド・0377/エイ・ピー・6・
デー2

(72)発明者 ビリング - メデル , パトリシア・エイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60030、グレイ
ズレイク、ラベンダー・サークル・34088

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乳房の疾患を検出するために有用な試薬と方法

(57)【要約】

B U 1 0 1 と称し、乳房組織から転写される、一連の隣接し、部分的に重複する c D N A 配列およびそれにコードされるポリペプチドについて記載する。これらの配列は乳房の疾患および症状、例えば乳癌の検出、診断、病期決定、モニター観察、予知、インビボイメージング、予防もしくは処置、または個体の素因決定に有用である。また B U 1 0 1 にコードされるポリペプチドまたはタンパク質に特異的に結合する抗体、および組織特異的 B U 1 0 1 ポリペプチドの作用を防御するアゴニストまたは阻害因子をも提供し、これらの分子は乳房疾患、腫瘍または転移の治療的処置に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試験サンプル中の標的BU101ポリヌクレオチドの存在を検出する方法であって：

(a) 試験サンプルを少なくとも一つのBU101特異的ポリヌクレオチドまたはその相補体と接触させること、ここで該BU101特異的ポリヌクレオチドは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択されるポリヌクレオチドと少なくとも50%の同一性を有する；および

(b) 試験サンプルから該BU101特異的ポリヌクレオチドと結合する標的BU101ポリヌクレオチドの存在を検出すること；を含む方法。

【請求項2】 工程(a)を実施する前に該標的BU101ポリヌクレオチドが固相に結合される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 工程(a)を実施する前に該BU101特異的ポリヌクレオチドが固相に結合される請求項1に記載の方法。

【請求項4】 試験サンプル中のBU101 mRNAを検出する方法であって：

(a) 少なくとも一つのプライマーを用いて該サンプルで逆転写を実施し、cDNAを生成すること；

(b) BU101オリゴヌクレオチドをセンスおよびアンチセンスプライマーとして用いて工程(a)から得られたcDNAを増幅し、BU101アンプリコンを得ること；および

(c) 該BU101アンプリコンの存在を検出すること、ここで工程(a)および(b)で用いたBU101オリゴヌクレオチドは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を有する；を含む方法。

【請求項5】 工程(a)、(b)または(c)の一つを実施する前に該試験サンプルを固相と反応させる請求項4に記載の方法。

【請求項6】 該検出工程が測定可能なシグナルを発生することができる検出可能な標識を利用することからなる請求項4に記載の方法。

【請求項7】 標的BU101ポリヌクレオチドを含有することが疑われる試験サンプル中の該標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって：

(a) 試験サンプルをセンスプライマーとして少なくとも一つのBU101オリゴヌクレオチドとまたはアンチセンスプライマーとして少なくとも一つのBU101オリゴヌクレオチドと接触させ、増幅して第1段階の反応生成物を得ること；

(b) 該第1段階の反応生成物を少なくとも一つの別のBU101オリゴヌクレオチドと接触させて第2段階の反応生成物を得ること、但し、別のBU101オリゴヌクレオチドは工程(a)で用いたBU101オリゴヌクレオチドの3'に位置し、該第1段階反応生成物に相補的であることを条件とし；および

(c) 該第2段階反応生成物を標的BU101ポリヌクレオチドの存在の指標として検出すること、ここで工程(a)および(b)で用いたBU101オリゴヌクレオチドは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を有する；

を含む方法。

【請求項8】 工程(a)、(b)または(c)の一つを実施する前に該試験サンプルを固相と反応させる請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該検出工程が測定可能なシグナルを発生することができる検出可能な標識を利用することを含む請求項7に記載の方法。

【請求項10】 該検出可能な標識が固相と反応する請求項9に記載の方法。

【請求項11】 試験サンプル中のBU101ポリヌクレオチドを検出するのに有用な試験キットであって、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を有する少なくとも一つのBU101ポリヌクレオチドを含有する容器を含む該試験キット。

【請求項12】 BU101核酸分子から誘導される精製されたポリヌクレオチドであって、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチド。

【請求項13】 該ポリヌクレオチドがBU101核酸配列に特異的にハイブリダイズする請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項14】 該ポリヌクレオチドが約20ないし約50個のヌクレオチドの全長を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項15】 該ポリヌクレオチドが約10ないし約25個のヌクレオチドの全長を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項16】 該ポリヌクレオチドが組換え技術により生成された請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項17】 該ポリヌクレオチドが合成技術により生成された請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】 該ポリヌクレオチドが少なくとも一つのBU101エピトープをコードする配列を含んでなる請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項19】 該ポリヌクレオチドが固相に結合している請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項20】 該固相がそこに結合したポリヌクレオチド分子のアレイを含んでなる請求項19に記載のポリヌクレオチド。

【請求項21】 BU101ポリヌクレオチドに由来するオープン・リーディング・フレームを含む核酸配列を含んでなる組換え発現系であって、ここで該オープン・リーディング・フレームは望ましい宿主に適合する調節配列に機能的に連結されており、該核酸配列は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を有する組換え発現系。

【請求項22】 請求項21に記載の組換え発現系でトランスフェクトされた細胞。

【請求項23】 配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選

択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するBU101ポリペプチド。

【請求項24】 該ポリペプチドが組換え技術により製造される請求項23に記載のポリペプチド。

【請求項25】 該ポリペプチドが合成技術により製造される請求項23に記載のポリペプチド。

【請求項26】 配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列に由来するBU101エピトープの少なくとも一つに結合する特異的結合分子。

【請求項27】 特異的結合分子が抗体分子である請求項26に記載の特異的結合分子。

【請求項28】 試験サンプル中のBU101抗原または抗BU101抗体の存在を検出するための試験キットであって、配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するBU101ポリペプチドを含有する容器を含む該試験キット。

【請求項29】 該BU101ポリペプチドが固相に結合している請求項28に記載のキット。

【請求項30】 試験サンプル中のBU101抗原の存在を検出するためのキットであって、少なくとも一つのBU101エピトープを有するBU101抗原に結合する特異的結合分子を含有する容器を含むキット。

【請求項31】 該特異的結合分子が固相に結合している請求項30に記載のキット。

【請求項32】 少なくとも一つのBU101エピトープを含んでなるポリペプチドを製造する方法であって、配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞をインキュベートすることを含む該方法。

【請求項33】 該BU101抗原を含有することが疑われる試験サンプル

中のBU101抗原を検出する方法であって：

(a) 試験サンプルを配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選択されるBU101抗原の少なくとも一つのエピトープに結合する特異的結合分子と接触させること、該接触は結合分子/抗原複合体を形成するのに十分な時間および条件下で実施する；および

(b) 該BU101抗原の存在の指標である該複合体存在を検出すること；を含む方法。

【請求項34】 該特異的結合分子が抗体分子またはその断片である請求項33に記載の方法。

【請求項35】 該特異的結合分子が固相に結合している請求項33に記載の方法。

【請求項36】 かかる抗体を含有することが疑われる試験サンプル中のBU101抗原に特異的な抗体の存在を検出する方法であって：

(a) 試験サンプルを配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列に由来する少なくとも一つのBU101エピトープを含有するBU101ポリペプチドと接触させること、該接触は抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で実施する；および

(b) 該BU101抗原に特異的な抗体の存在の指標として該複合体の存在を検出すること；を含む方法。

【請求項37】 該BU101ポリペプチドが固相に結合している請求項36に記載の方法。

【請求項38】 少なくとも一つのBU101エピトープをコードする核酸配列であって、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される核酸配列でトランスフェクトされた細胞。

【請求項39】 免疫応答を引き起こすのに十分な量の単離された免疫原性ポリペプチドまたはその断片を個体に投与することを含むBU101抗原に特異

的に結合する抗体を製造する方法であって、ここで該免疫原性ポリペプチドは少なくとも一つのBU101エピトープを含んでなり、配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を有する方法。

【請求項40】 配列番号20ないし29およびその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに由来する少なくとも一つのBU101エピトープをコードする配列を含んでなるプラスミドを個体に投与することを含むBU101抗原に特異的に結合する抗体を製造する方法。

【請求項41】 ランセット、吸収ペーパー、布、綿棒およびカップからなる群から選択される、該サンプルを収集するのに有用な手段を有する容器をさらに含んでなる請求項11に記載の試験キット。

【請求項42】 ランセット、吸収ペーパー、布、綿棒およびカップからなる群から選択される、該サンプルを収集するのに有用な手段を有する容器をさらに含んでなる請求項28に記載の試験キット。

【請求項43】 ランセット、吸収ペーパー、布、綿棒およびカップからなる群から選択される、該サンプルを収集するのに有用な手段を有する容器をさらに含んでなる請求項30に記載の試験キット。

【請求項44】 該特異的結合分子が抗体またはその断片である請求項30に記載の試験キット。

【請求項45】 該ポリヌクレオチドが配列番号20に少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるBU101タンパク質をコードする請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項46】 該ポリヌクレオチドが配列番号4、配列番号5または配列番号6と少なくとも50%の同一性を有するDNAを含んでなる請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項47】 試験サンプル中該標的BU101ポリヌクレオチドの存在が乳房疾患の指標である請求項1に記載の方法。

【請求項48】 該アンプリコンが乳房疾患の指標である請求項4に記載の方法。

【請求項49】 該第2段階の反応生成物が乳房疾患の指標である請求項7に記載の方法。

【請求項50】 該複合体の検出が乳房疾患の指標である請求項33に記載の方法。

【請求項51】 該複合体の検出が乳房疾患の指標である請求項36に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願との前後参照)

本願は、35 U.S.C. 120に従って出願優先権を主張する、1996年8月19日出願の米国特許願通し番号第08/697,105号の一部継続出願である、1997年8月15日出願の米国特許願通し番号第08/912,276号の一部継続出願であり、前記出願はそれらの全体が参照してここに組み込まれる。

【0002】

(発明の背景)

本発明は一般に乳房の疾患の検出に関する。さらに、本発明はまた、乳房の疾患を検出するための試薬と方法に関する。より特定すると、本発明はポリヌクレオチド配列及びそれらによってコードされるポリペプチド配列のような試薬、ならびにこれらの配列を用いる方法に関する。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列は、乳癌のような乳房の疾患又は状態を検出する、診断する、病期分類する、監視する、予後判定する、生体内で画像化する、予防する又は治療する、あるいは乳房の疾患又は状態への素因を判定するのに有用である。

【0003】

乳癌は米国では女性において発生する最も一般的な形態の癌である。米国における乳癌の発生率は、1998年の間に乳癌と診断された症例が180,300例、乳癌に関連する死亡が43,900例と報告されている(米国癌協会(American Cancer Society)統計)。世界的に見ると、乳癌の発生数は1985年の700,000から1990年には約900,000に増加した。G.N.Hortobagyiら、CA Cancer J Clin 45:199-226(1995)。

【0004】

乳癌のような乳房の疾患又は状態を検出する、診断する、病期分類する、監視する、予後判定する、生体内で画像化する、予防する又は治療する、あるいは乳房の疾患又は状態への素因を判定するために使用される手順は、患者の結果にと

って決定的な重要性を持つ。例えば、早期乳癌と診断された患者は5年間の相対生存率が90%以上であるのに比べて、遠隔転移乳癌と診断された患者については約20%の生存率である。(米国癌協会統計)。現在、早期乳癌の最良の初期指標は乳房の理学的検査とマンモグラフィである。J. R. Harrisら、「Cancer: Principles and Practice of Oncology」、第4版より、p. 1264 - 1332, Philadelphia, PA: J/B. Lippincott Co. (1993)。マンモグラフィは理学的検査で検出できるよりも前に乳癌を検出しようが、限界がある。例えば、マンモグラフィの予測的価値は観察者の技術と乳房X線像(マンモグラム)の質に依存する。さらに、疑わしいマンモグラムの80から93%が偽陽性であり、乳癌を有する女性の10から15%がマンモグラムで偽陰性である。C. J. Wrightら、Lancet 346: 29 - 32 (1995)。明らかに、早期乳癌を検出するためのより感受性の高い特異的な新しい診断方法が求められている。

【0005】

乳癌患者は、初期治療後及び補助療法の間、治療に対する応答を調べ、存続又は再発疾患、あるいは遠隔転移を検出するために厳重に監視される。乳癌を監視するための現在の診断方法は、マンモグラフィ、骨スキャン、胸部X線写真、肝機能検査及び血清マーカーに関する検査を含む。患者を監視するために最も一般的に使用される血清腫瘍マーカーは、癌胎児抗原(CEA)及びCA 15-3である。CEAの限界として、転移性疾患を有する女性の約40%において血清レベルの上昇がないことが含まれる。さらに、補助療法中のCEA上昇は再発には相関せず、臨床的に重要でない他の因子に相関すると考えられる。CA 15-3も、かなりの数の進行性疾患の患者において陰性の場合があり、それ故転移を予測することができない。CEA及びCA 15-3のいずれも、悪性ではない良性状態でも上昇することがあり、偽陽性の結果をもたらす。それ故、癌の再発を検出する上でより感受性が高く、特異的な乳房関連マーカーを発見することは臨床的に有益であろう。J. R. Harrisら、前出。M. D. Schwartz: Cancer: Principles and Practice o

f Oncology, 第1巻、第4版、p. 531 - 542, Philadelphia, PA: J/B. Lippincott Co. 1993。

【0006】

乳癌を管理する際のもうひとつの重要なステップは患者の疾患の病期を判定することである。というのは病期判定は潜在的な予後的価値を持ち、至適治療をデザインするための判定基準を提供するからである。現在、乳癌の病理学的病期分類は、より正確な予後判定をもたらすことから、臨床的病期分類よりも好ましい。J. R. Harrisら、前出。他方で、臨床的病期分類は、病理学的評価のために組織を採取するという観血的手順に依存しないため、病理学的病期分類と少なくとも同程度に正確であれば好ましいであろう。浸潤の異なる段階を識別できる血清中又は尿中の新しいマーカーを検出することにより、乳癌の病期分類を改善できるであろう。そのようなマーカーは、乳房の原発腫瘍に由来するが、血中、骨髄又はリンパ節に存在する細胞によって発現されるmRNA又はタンパクマーカーであり、これらの遠位器官への転移に関する感受性の高い指標として用いることができる。例えば、乳房上皮細胞に関連する特異的タンパク抗原及びmRNAは、免疫組織化学的手法及びRT-PCRにより、それぞれ乳癌患者の骨髄、リンパ節及び血液において検出され、転移を示唆した。K. Pantelら、Onkologie 18:394 - 401 (1995)。

【0007】

そのような診断方法はまた、最小限に侵襲的な手順で得られる血液、血漿、血清又は尿などの試験サンプルにおける、免疫学的方法によって検出する様々な疾患マーカーの発現に基づいた免疫学的アッセイを含みうる。これらの診断方法は、医師が乳癌患者を管理する助けとなる情報を、患者にとっては低いコストで提供するであろう。前立腺特異抗原(PSA)やヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)のようなマーカーが存在し、それぞれ前立腺癌と精巣癌に関して患者をスクリーニングするために臨床的に使用される。例えば、PSAは通常前立腺によって高いレベルで精液中に分泌されるが、正常な前立腺を有する男性の血液にも非常に低いレベルで存在する。血清中の高レベルのPSAタンパクは、無症候男性における前立腺癌又は前立腺疾患の早期検出に用いられる。例えば、G. E

. Hanksら、「Cancer: Principles and Practice of Oncology」第1巻、第4版より、p. 1073 - 1113, Philadelphia, PA: J. P. Lippincott Co. 1993、M. K. Schwartzら、「Cancer: Principles and Practice of Oncology」第1巻、第4版より、p. 531 - 542, Philadelphia, PA: J. P. Lippincott Co. 1993参照。同様に、通常は乳房で発現されるが、乳房疾患の結果として不適切な体画分において高い量で認められる新しいマーカーを使用することにより、乳癌の管理を改善することができるであろう。

【0008】

さらに、早期乳癌の生物学的挙動を予測しうる新しいマーカーも重要な価値を持つであろう。患者の生活を脅かす又は将来脅かすことになる早期乳癌は、脅威ではない又はその恐れのないものよりも臨床的に重要である。G. E. Hanks, 前出。リンパ節が組織学的に陰性である患者が癌の再発を経験することになるかどうかを予測するため、また原位置での腺管癌の症例が侵襲性乳癌に進行するかどうかを予測するために、そのようなマーカーが必要とされる。より正確な予後マーカーは、臨床医が、乳房に限局されているが、攻撃的治療を行わなければ進行して転移するであろう早期癌を正確に同定することを可能にする。さらに、患者に攻撃的癌についてのマーカーが存在しなければ、その患者は費用がかかって恩恵のない治療を免れることができるであろう。J. R. Harrisら、前出。E. R. Frykbergら、Cancer 74: 350 - 361 (1994)。

【0009】

それ故、乳房の疾患又は状態を検出する、診断する、病期分類する、監視する、予後判定する、生体内で画像化する、予防する又は治療する、あるいは乳房の疾患又は状態への素因を判定するために有用な特異的方法と試薬を提供することは有益であろう。そのような方法は、癌を含めて、乳房に関連する疾患及び状態において過剰発現される遺伝子産物に関して試験サンプルを検定することを含む。そのような方法はまた、癌を含めて、乳房に関連する疾患及び状態によって変

化した遺伝子産物に関して試験サンプルを検定することを含みうる。そのような方法はさらに、癌を含めて、乳房に関連する疾患及び状態によって体内の様々な組織及び画分における分布が変化した遺伝子産物に関して試験サンプルを検定することを含みうる。そのような方法は、試験サンプル中のmRNAからcDNAを作製し、必要に応じて遺伝子又はその断片に対応するcDNAの部分を増幅して、癌を含めた疾患又は状態が存在する指標としてcDNA産物を検出する、あるいは疾患が存在する指標として遺伝子配列を含むmRNAの翻訳産物を検出することを含むであろう。有用な試薬は、生検組織、血液又は他の試験サンプルから抽出されたmRNAの逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、PCR、又はハイブリダイゼーションアッセイのような診断方法において使用するポリヌクレオチド又はその断片；あるいはそのようなmRNAの翻訳産物であるタンパク質；あるいはこれらのタンパク質に対する抗体を含む。そのようなアッセイは、遺伝子産物に関してサンプルを検定し、乳房疾患の指標としてかかる産物を検出するための方法を含むであろう。癌を含めた乳房の疾患及び状態のための薬物治療及び遺伝子治療は、これらの同定された遺伝子配列又はそれらが発現するタンパク質に基礎づけることができ、個々の治療の効果をモニターすることができる。さらに、癌のような初期段階の乳房疾患を検出することができる使用可能な代替的、非外科的診断法が得られることは有益であろう。

【0010】

(発明の概要)

本発明は、試験サンプルを少なくとも1個のBU101特異的ポリヌクレオチドに接触させ、試験サンプル中の標的BU101ポリヌクレオチドの存在を検出することを含む、試験サンプルにおいて標的BU101ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。BU101特異的ポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択されるポリヌクレオチドと少なくとも50%の同一性を持つ。また、BU101特異的ポリヌクレオチドは、当該方法を実施する前に固相に結合することもできる。

【0011】

本発明はまた、cDNAを作製するために少なくとも1個のプライマーで逆転写(RT)を実施し、BU101オリゴヌクレオチドをセンス及びアンチセンスプライマーとして用いて、そのようにして得たcDNAを増幅してBU101アンプリコン(増幅単位)を入手し、そして試験サンプル中のBU101mRNAの存在の指標としてBU101アンプリコンの存在を検出することを含み、前記BU101オリゴヌクレオチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を持つ、試験サンプルにおいてBU101mRNAを検出するための方法を提供する。増幅はポリメラーゼ連鎖反応によって実施することができる。また、当該方法を実施する前、増幅の前又は検出の前に試験サンプルを固相と反応させることもできる。この反応は直接又は間接反応のいずれでもよい。さらに、検出段階は、測定可能なシグナルを生じることができる検出可能標識を利用することを含みうる。検出可能標識は固相に結合することができる。

【0012】

本発明はさらに、次の事柄を含む、標的BU101ポリヌクレオチドを含むことが疑われる試験サンプルにおいて標的BU101ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する：(a)センスプライマーとして少なくとも1個のBU101オリゴヌクレオチドとアンチセンスプライマーとして少なくとも1個のBU101オリゴヌクレオチドに試験サンプルを接触させ、それを増幅して第一段階反応産物を得る；(b)他のBU101オリゴヌクレオチドが(a)段階で使用されるBU101オリゴヌクレオチドの3'側に位置し、第一段階反応産物に相補的であることを条件として、第一段階反応産物を少なくとも1個の他のBU101オリゴヌクレオチドに接触させて第二段階反応産物を得る；そして(c)試験サンプルにおける標的BU101ポリヌクレオチドの存在の指標として第二段階反応産物を検出する。当該方法において試薬として選択されるBU101オリゴヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を持つ。増幅はポリメラーゼ連鎖反応によって実施するこ

とができる。試験サンプルを、当該方法を実施する前、増幅の前又は検出の前に固相と直接又は間接的に反応させることができる。検出段階はまた、測定可能なシグナルを生じることができる検出可能標識を利用することを含む；さらに、検出可能標識を固相に結合することができる。

【0013】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択される少なくとも1個のBU101特異的ポリヌクレオチドが入った容器を含む、試験サンプルにおいて標的BU101ポリヌクレオチドを検出するために有用な試験キットも提供する。これらの試験キットはさらに、試験サンプル（例えば、血液、尿、唾液及び便など）を採集するために有用なツールが入った容器を含む。そのようなツールは、血液を採集し、安定させるためのランセット及び吸収紙又は布；唾液を採集し、安定させるための綿棒；及び尿又は便のサンプルを採集し、安定させるコップを含む。紙、布、綿棒、コップ等のような採集材料は、サンプルの変性又は不可逆的吸着を避けるため任意に処理してもよい。採集材料はまた、標本の完全性を維持するのに助けるために保存剤、安定剤又は抗菌剤で処理する又はそれらを含むことができる。

【0014】

本発明はまた、BU101遺伝子から誘導される精製ポリヌクレオチド又はその断片を提供する。精製ポリヌクレオチドはBU101遺伝子の核酸又はその相補体を選択的にハイブリダイズすることができる。当該ポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択されるポリヌクレオチドと少なくとも50%の同一性を持つ。さらに、精製ポリヌクレオチドは組換え及び/又は合成手法によって作製することができる。精製組換えポリヌクレオチドを組換えベクター内に組み込むことができる。本発明はさらに、組換えベクターでトランスフェクションした宿主細胞を含む。

【0015】

本発明はさらに、BU101から誘導されるオープンリーディングフレームを

含む核酸配列を包含する組換え発現系を提供する。核酸配列は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択される配列と少なくとも50%の同一性を持つ。核酸配列は所望する宿主と適合性である制御配列に機能的に連結される。この組換え発現系でトランスフェクションされた細胞も提供する。

【0016】

本発明はまた、BU101によってコードされるポリペプチドを提供する。ポリペプチドは、精製形態で提供される、組換えテクノロジーによって作製するか、又は合成手法によって作製することができる。当該ポリペプチドは、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29（配列番号20-29）、及びそれらの断片から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を持つアミノ酸配列を含む。

【0017】

また、少なくとも1個のBU101エピトープに特異的に結合する、抗体のような特異的結合分子を提供する。当該エピトープは、配列番号20-29及びそれらの断片から成る群から選択されるアミノ酸配列から誘導される。試験サンプルにおけるBU101抗原又は抗BU101抗体の存在を判定するためのアッセイキットも包含される。1つの実施形態では、アッセイキットは、配列番号20-29及びそれらの断片から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を持つ少なくとも1個のBU101ポリペプチドが入った容器を含む。さらに、試験キットは、試験サンプル（血液、尿、唾液及び便など）を採集するために有用なツールが入った容器を含みうる。そのようなツールは、血液を採集し、安定させるためのランセット及び吸収紙又は布；唾液を採集し、安定させるための綿棒；及び尿又は便のサンプルを採集し、安定させるコップを含む。紙、布、綿棒、コップ等のような採集材料は、サンプルの変性又は不可逆的吸着を避けるため任意に処理してもよい。これらの採集材料はまた、標本の完全性を維持するのに助けるために保存剤、安定剤又は抗菌剤で処理する又はそれらを含むことができる。また、ポリペプチドは固相に結合することができる。

【0018】

本発明のもう1つの実施形態では、BU101に対する抗体又はその断片のような特異的結合分子を使用して、疾患又は状態を検出する又は診断するために患者における抗原の局在を検出する又は画像化することができる。そのような抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであるか、若しくは分子生物学手法によって作製することができ、放射性同位元素及び常磁性金属を含むが、これらに限定されない、様々な検出可能標識で標識することができる。さらに、モノクローナル、ポリクローナル、又は分子生物学手法によって作製される抗体又はその断片は、BU101抗原の発現を特徴とする疾患の治療のための治療薬として使用することができる。治療適用の場合には、抗体は誘導体化せずに使用するか、若しくは放射性同位元素、酵素、毒素、薬剤、プロドラッグ等のような細胞傷害性物質で誘導体化することができる。

【0019】

試験サンプル中のBU101抗原又は抗BU101抗体の存在を調べるためのもう1つのアッセイキットは、BU101抗原に特異的に結合する抗体が入った容器を含み、かかるBU101抗原は少なくとも1個のBU101コードエピトープを含む。BU101抗原は、配列番号20-29及びそれらの断片から成る群から選択されるBU101コード抗原の配列と少なくとも約50%の配列類似性を持つ。これらの試験キットはさらに、試験サンプル(血液、尿、唾液及び便など)を採集するために有用なツールが入った容器を含みうる。そのようなツールは、血液を採集し、安定させるためのランセット及び吸収紙又は布；唾液を採集し、安定させるための綿棒；及び尿又は便のサンプルを採集し、安定させるコップを含む。紙、布、綿棒、コップ等のような採集材料は、サンプルの変性又は不可逆的吸着を避けるため任意に処理してもよい。これらの採集材料はまた、標本の完全性を維持するのを助けるために保存剤、安定剤又は抗菌剤で処理する又はそれらを含むことができる。当該抗体は固相に結合することができる。

【0020】

発現ベクターでトランスフェクションした宿主細胞をインキュベーションすることを含む、BU101の少なくとも1個のエピトープを含むポリペプチドを作

製するための方法を提供する。このベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、かかるポリペプチドは、配列番号20-29及びそれらの断片から成る群から選択されるBU101アミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性を持つアミノ酸配列を含む。

【0021】

BU101抗原を含むことが疑われる試験サンプルにおいてBU101抗原を検出するための方法も提供する。かかる方法は、BU101抗原の少なくとも1個のエピトープに特異的に結合する抗体又はその断片に、抗体/抗原複合体を形成するのに十分な時間と条件下で試験サンプルを接触させ、試験サンプル中にBU101抗原が存在することの指標としてそのような抗体を含む複合体の存在を検出することを含む。抗体は固相に結合することができ、モノクローナル又はポリクローナル抗体のいずれでもよい。さらに、当該抗体は、配列番号20-29及びそれらの断片から成る群から選択される少なくとも1個のBU101抗原に特異的に結合する。

【0022】

これらの抗体を含むことが疑われる試験サンプルにおいて、BU101抗原に特異的に結合する抗体を検出するもう1つの方法を提供する。かかる方法は、少なくとも1個のBU101エピトープを含むポリペプチドに試験サンプルを接触させることを含み、かかるBU101エピトープは、BU101ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列又はその断片と少なくとも50%の同一性を持つアミノ酸配列を含む。接触は、抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間と条件下で実施される。当該方法はさらに、ポリペプチドを含む複合体を検出することを必要とする。ポリペプチドは固相に結合することができる。さらに、ポリペプチドは、配列番号20-29及びそれらの断片から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を持つ組換えタンパク又は合成ペプチドでありうる。

【0023】

本発明は、BU101抗原の少なくとも1個のエピトープ又はその断片をコードするBU101核酸配列でトランスフェクションした細胞を提供する。核酸配

列は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択される。

【0024】

B U 1 0 1 抗原に対する抗体を産生するための方法も提供する。かかる方法は単離した免疫原性ポリペプチド又はその断片を個体に投与することを含み、前記の単離した免疫原性ポリペプチドは少なくとも1個のB U 1 0 1 エピトープを含む。免疫応答を生じるのに十分な量で免疫原性ポリペプチドを投与する。単離した免疫原性ポリペプチドは、配列番号20 - 29及びそれらの断片から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0025】

B U 1 0 1 抗原に特異的に結合する抗体を産生するためのもう1つの方法も開示する。かかる方法は、配列番号20 - 29及びそれらの断片から成る群から選択されるアミノ酸から誘導される、少なくとも1個のB U 1 0 1 エピトープをコードする核酸配列を含むプラスミドを個体に投与することを含む。プラスミドは、プラスミドが個体内で細胞によって取り込まれ、免疫応答を生じるのに十分なレベルで発現されるような量で投与する。

【0026】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及びそれらの断片又は相補体から成る群から選択されるポリヌクレオチドと少なくとも50%の同一性を持つ、少なくとも約10 - 12個のヌクレオチドから成るB U 1 0 1 ポリヌクレオチドを含む組成物も提供する。B U 1 0 1 ポリヌクレオチドは、少なくとも1個のB U 1 0 1 エピトープを持つアミノ酸配列をコードする。本発明によって提供されるもう1つの組成物は、約8 - 10個のアミノ酸から成る少なくとも1個のB U 1 0 1 エピトープを持つポリペプチドを含む。当該ポリペプチドは、配列番号20 - 29及びそれらの断片から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を持つアミノ酸配列を含む。また、配列番号20と少なくとも50%の同一性を持つB U 1 0 1 ポリペプチドをコードする遺伝子又はその断片、及び配列番号4、配列番号5、又は配列番号6と少なくとも50%の同一性を持つDNAを含む遺伝子又はその断片も提供する。

。

【0027】

(図面の簡単な説明)

図1は、クローン2083578H1(配列番号1)、603148H1(配列番号2)、604290H1(配列番号3)のヌクレオチド整列化、クローン2083578H1及び603148H1の完全長配列[それぞれ、2083578inh(配列番号4)及び603148inh(配列番号5)と称される]、及びそれらから誘導されるコンセンサス配列(配列番号6)を示す。

【0028】

図2は、オーバーラップクローン2083578H1(配列番号1)、603148HI(配列番号2)、604290H1(配列番号3)、2083578inh(配列番号4)、603148inh(配列番号5)のヌクレオチド整列化からのコンセンサスヌクレオチド配列(配列番号6)の形成を表わすコンティグ地図を示す。

【0029】

図3Aは、乳房組織と非乳房組織抽出物からのRNAのエチジウムブロマイド染色アガロースゲルのスキャンを示す。図3Bは、BU101放射性同位元素標識プローブとのハイブリダイゼーション後の対応するRNAのノーザンプロットである。

【0030】

図4は、正常乳房、乳癌、結腸及び肺組織のRNAをテンプレートとして使用した、BU101 RNA特異的RT-PCR増幅産物のSYBR(登録商標)Green染色アガロースゲルのスキャンである。

【0031】

図5は、BU101 RNA特異的RT-PCR増幅産物のSYBR(登録商標)Green染色アガロースゲルのスキャンである。この図は、胎盤DNAをRNA対照とし、水を試薬対照として使用した、MDA 361細胞系のRNAによる268塩基対のBU101特異的アンプリコンを示す。

【0032】

図6は、BU101アンプリコンが、LCx(登録商標)Analyzer系(Abbott Laboratories, Abbott Park, ILより入手可能)を用いて、MDA 361細胞系からの200フェムトグラム(fg)のRNAで容易に検出されたことを示す。

【0033】

図7は、LCx(登録商標)系を用いてBU101活性に関して検定した正常乳房、乳癌、正常結腸、結腸癌、正常肺及び肺癌組織からの10ピコグラム(pg)のRNAの結果を示す。

【0034】

図8は、BU101合成ペプチド(配列番号28)に対する抗血清でプローブした一連の組織タンパク抽出物に関して実施したウエスタンブロットの結果を示す。

【0035】

(発明の詳細な説明)

本発明は、配列番号20と少なくとも約50%の同一性を持つBU101ポリペプチドをコードする遺伝子又はその断片を提供する。本発明はさらに、配列番号4、配列番号5、又は配列番号6と少なくとも50%の同一性を持つDNAを含むBU101遺伝子又はその断片を包含する。

【0036】

本発明はまた、試験サンプル中のmRNAからcDNAを作製し、乳房組織遺伝子BU101の存在の指標としてcDNAを検出することを含む、BU101と称される乳房組織遺伝子の産物に関して試験サンプルを検定するための方法を提供する。かかる方法は、当該遺伝子又はその断片に対応する、BU101からのmRNAの1つ又はそれ以上の部分を増幅する増幅段階を含みうる。また、BU101の翻訳産物に関して検定するための方法も提供する。ここで提供する方法によって検定しうる試験サンプルは、組織、細胞、体液及び分泌物を含む。本発明はまた、これらの方法を実施する上で有用な、オリゴヌクレオチドプライマー及びポリペプチドのような試薬を提供する。

【0037】

ここで開示する核酸配列の部分は、RNAの逆転写又はcDNAの増幅のためのプライマーとして、あるいは試験サンプルにおける特定mRNA配列の存在を調べるためのプローブとして有用である。また、診断的免疫測定法における標準又は試薬として、製薬的スクリーニングアッセイのための標的として及び/又は様々な治療のための成分又は標的部位として有用な、コードポリペプチド配列を作製することを可能にする核酸配列も開示する。これらのポリペプチド配列内に含まれる少なくとも1個のエピトープに対して特異的なモノクローナル及びポリクローナル抗体は、BU101に関連する疾患又は状態、特に乳癌のための治療薬の送達物質として、ならびに診断試験のため及びスクリーニングのために有用である。当該遺伝子の他の部分の配列の単離は、これらの核酸配列から誘導されるプローブ又はPCRプライマーを利用して実施できる。このことは、目的とするmRNA又はcDNAの付加的なプローブを作製すること、ならびに対応するコードポリペプチド配列を確立することを可能にする。これらの付加的な分子は、ここで開示するような、BU101によって特徴づけられる乳癌のような乳房の疾患又は状態を検出する、診断する、病期分類する、監視する、予後判定する、生体内で画像化する、予防する又は治療する、あるいは乳房の疾患又は状態への素因を判定する上で有用である。

【0038】

ここで述べる組成物及び方法は、乳房組織の疾患又は状態の指標としていくつかのマーカーの同定を可能にし、そこから得られる情報は、BU101に関連する疾患又は状態、特に乳癌を検出する、診断する、病期分類する、監視する、予後判定する、生体内で画像化する、予防する又は治療する、あるいは判定するのを助けるであろう。試験方法は、例えば、ここで提供される配列を使用し、同時にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)及びハイブリダイゼーションのような核酸増幅方法が使用できる、プローブアッセイを含む。

【0039】

さらに、ここで提供するヌクレオチド配列は、免疫原性エピトープが見出されるオープンリーディングフレームを含む。このエピトープは、BU101に関連する疾患又は状態にユニークであると考えられる。また、BU101遺伝子によ

ってコードされるポリヌクレオチド又はポリペプチド及びタンパクはマーカーとして有用であると思われる。このマーカーは、乳癌のような疾患では上昇又は変化するか、あるいは正常タンパクとして存在するが不適切な体画分に現われる。エピトープの独自性は、(i) BU101 遺伝子によってコードされるタンパク及びポリペプチドに対する抗体との免疫学的反応性及び特異性、及び(ii)他のいかなる組織マーカーとも反応性がないことによって判定されうる。免疫学的反応性を測定するための方法は周知であり、例えば、放射免疫測定法(RIA)、酵素結合免疫吸着剤検定法(ELISA)、血球凝集反応(HA)、蛍光偏光免疫測定法(FPIA)、化学発光免疫測定法(CLIA)及びその他を含むが、これらに限定されない。適当な方法のいくつかの例をここで述べる。

【0040】

特に異なる記載がないかぎり、下記の用語は下記の意味を持つものとする：

指定配列「から誘導される」又は「に特異的な」ポリヌクレオチドは、指定ヌクレオチド配列の領域に対応する、すなわち指定ヌクレオチド配列と同一又は相補的な、一般に少なくとも約6個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約10-12個のヌクレオチド、さらに一層好ましくは少なくとも約15-20個のヌクレオチドの隣接配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。かかる配列は、当分野において既知の手法によって決定されるような特定ポリヌクレオチド配列に独自の配列に相補的又は同一でありうる。指定配列の独自性を判定するための方法として、例えば、データバンク中の配列との比較が使用できる。配列を誘導しうる領域は、特異的エピトープをコードする領域、ならびに非翻訳及び/又は非転写領域を含むが、これらに限定されない。

【0041】

誘導ポリヌクレオチドは、必ずしも検討下にある目的のヌクレオチド配列から物理的に誘導されるわけではなく、ポリヌクレオチドが由来する領域の塩基配列によって提供される情報に基づいた、化学合成、複製、逆転写又は転写を含むがこれらに限定されない方法で生成されうる。それ自体で、もとのポリヌクレオチドのセンス又はアンチセンス方向を表わしうる。さらに、指定配列の領域に対応

する領域の組合せは、意図する用途に一致するように当分野において既知の方法で改変しうる。

【0042】

特定のポリヌクレオチドの「断片」は、特定ヌクレオチド配列の領域に対応する、すなわち特定ヌクレオチド配列と同一又は相補的な、一般に少なくとも約6個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約10 - 12個のヌクレオチド、さらに一層好ましくは少なくとも約15 - 20個のヌクレオチドの隣接配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。

【0043】

「プライマー」という用語は、標的ヌクレオチド配列に相補的であり、標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズするために使用される特異的オリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーは、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ又は逆転写酵素によって触媒されるヌクレオチド重合のための開始点として働く。

【0044】

「プローブ」という用語は、相補的配列を担う、サンプル中に存在する特異的ポリヌクレオチドを同定するために使用できる規定された核酸セグメント（又はヌクレオチドアナログセグメント、例えば下記に定義されるようなPNA）を意味する。

【0045】

「によってコードされる」は、ポリペプチド配列をコードする核酸配列を指し、かかるポリペプチド配列又はその部分は、当該核酸配列によってコードされるポリペプチドからの少なくとも3 - 5個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも8 - 10個のアミノ酸、さらに一層好ましくは少なくとも15 - 20個のアミノ酸を含む。また、当該配列によってコードされるポリペプチドで免疫学的に同定可能なポリペプチド配列も包含される。それ故、「ポリペプチド」、「タンパク」又は「アミノ酸」配列は、BU101アミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性、好ましくは約60%の同一性、より好ましくは約75 - 85%の同一性、最も好ましくは約90 - 95%又はそれ以上の同一性を持つ。さらに、BU101「ポリペプチド」、「タンパク」又は「アミノ酸」配列は、BU101のポリ

ペプチド又はアミノ酸配列と少なくとも約60%の類似性、好ましくは少なくとも約75%の類似性、より好ましくは約85%の類似性、最も好ましくは約95%又はそれ以上の類似性を持つと考えられる。このアミノ酸配列は、配列番号20-29及びそれらの断片から成る群から選択できる。

【0046】

ここでは交換可能に使用しうる語である「組換えポリペプチド」、「組換えタンパク」又は「組換え手法によって生成されるポリペプチド」は、その由来又は操作によって、天然において結合しているポリペプチドの全部又は一部に結合していない及び/又は天然において連結している以外のポリペプチドに連結しているポリペプチドを表わす。組換え又はコードポリペプチド又はタンパクは、必ずしも指定核酸配列から翻訳されるわけではない。化学合成又は組換え発現系の発現を含めた何らかの方法によっても生成されうる。

【0047】

ここで使用するとき、「合成ペプチド」という用語は、当業者に周知の方法によって化学合成されうる、あらゆる長さのポリマー形態のアミノ酸を意味する。これらの合成ペプチドは様々な適用において有用である。

【0048】

ここで使用するとき、「ポリヌクレオチド」という用語は、あらゆる長さのポリマー形態のヌクレオチド、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかを意味する。この用語は分子の一次構造だけを指す。従って、この用語は、二本鎖及び一本鎖DNA、ならびに二本鎖及び一本鎖RNAを含む。また、メチル化又はキャップ構造のような修飾形態及び非修飾形態のポリヌクレオチドも包含する。「ポリヌクレオチド」、「オリゴマー」、「オリゴヌクレオチド」及び「オリゴ」という用語はここでは交換可能に使用される。

【0049】

「cDNAに対応する配列」は、当該配列が、指定DNA中の配列と同一又は相補的であるポリヌクレオチド配列を含むことを意味する。cDNAとの同一性又は相補性の度合(又は「パーセント」)は、約50%又はそれ以上、好ましくは少なくとも約70%又はそれ以上、より好ましくは少なくとも約90%又はそ

れ以上である。同定されたcDNAに対応する配列は、少なくとも約50ヌクレオチドの長さ、好ましくは少なくとも60ヌクレオチドの長さ、より好ましくは約70ヌクレオチドの長さである。目的とする遺伝子又は遺伝子断片とcDNA間の対応性は当分野において既知の方法によって決定することができ、例えば配列決定された物質と上記cDNAの直接比較、又はハイブリダイゼーションと一本鎖ヌクレアーゼによる消化、それに続く消化断片のサイズ決定を含む。

【0050】

アミノ酸配列の「類似性」を決定するための手法は当分野において周知である。一般に「類似性」は、アミノ酸が同一であるか若しくは電荷又は疎水性のような類似した化学的及び/又は物理的特性を有する適当な部位での、2個又はそれ以上のポリペプチドの正確なアミノ酸対アミノ酸の比較を意味する。その後、比較したポリペプチド配列間でいわゆる「パーセント類似性」を決定することができる。核酸とアミノ酸配列の同一性を決定するための手法も当分野において周知であり、その遺伝子に関するmRNAのヌクレオチド配列を決定し(通常はcDNA中間体を通して)、それによってコードされるアミノ酸配列を決定して、これを第二のアミノ酸配列と比較することを含む。一般に「同一性」という用語は、それぞれ2個のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の正確なヌクレオチド対ヌクレオチド又はアミノ酸対アミノ酸の対応性を指す。2個又はそれ以上のポリヌクレオチド配列は、それらの「パーセント同一性」を決定することによって比較できる。2個又はそれ以上のアミノ酸配列は、同様にそれらの「パーセント同一性」を決定することによって比較できる。核酸又はペプチド配列のいずれでも、2つの配列のパーセント同一性は、2つの整列化した配列間の正確な一致数を短い方の配列の長さで割って、100を掛けたものである。核酸配列に関するおよその整列化は、SmithとWaterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489(1981)の局所相同性アルゴリズムによって提供される。Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff編集、補遺5、3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washin

gton, D. C., USAによって開発され、Gribuskov, Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763(1986)によって規格化されたスコアリングマトリックスを用いて、このアルゴリズムをペプチド配列に関して使用するよう拡大することができる。核酸及びペプチド配列に関するこのアルゴリズムの実施は、Genetics Computer Group(Madison, WI)により、そのBestFit utility適用において提供される。この方法についてのデフォルトパラメータがWisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8(1995)(Genetics Computer Group, Madison, WIより入手可能)の中に述べられている。配列間のパーセント同一性又は類似性を算定するための他の同等に適切なプログラムは、当分野において一般的に知られている。

【0051】

「精製ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドが自然の状態で結合しているタンパク質を基本的に含まない、例えば約50%未満、好ましくは約70%未満、より好ましくは約90%未満含む目的ポリヌクレオチド又はその断片を指す。目的とするポリヌクレオチドを精製するための手法は当分野において周知であり、例えば、カオトロピック剤によるポリヌクレオチド含有細胞の破壊、及びイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及び密度に従った沈降によるポリヌクレオチドとタンパクの分離を含む。

【0052】

「精製ポリペプチド」又は「精製タンパク」は、目的のポリペプチドが自然の状態で結合している細胞成分を基本的に含まない、例えば約50%未満、好ましくは約70%未満、より好ましくは約90%未満含む目的のポリペプチド又はその断片を意味する。目的とするポリペプチドを精製するための方法は当分野において既知である。

【0053】

「単離」という用語は、物質をそのもとの環境(例えば、物質が天然に生じる場合には天然環境)から取り出すことを意味する。例えば、生体動物中に存在す

る、天然に生じるポリヌクレオチド又はポリペプチドは単離されていないが、自然系において共存する物質の一部又は全部から切り離された同じポリヌクレオチド又はDNA又はポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドがベクターの一部である及び/又はそのようなポリヌクレオチド又はポリペプチドが組成物の一部である場合あり、かかるベクター又は組成物はその自然環境の一部ではないという意味で、さらに単離することができる。

【0054】

「ポリペプチド」及び「タンパク」はここでは交換可能に使用され、共有及び/又は非共有結合を通して連結されたアミノ酸の少なくとも1つの分子鎖を表わす。かかる用語は特定の長さの物質を意味しない。それ故、ペプチド、オリゴペプチド及びタンパクはポリペプチドの定義内に包含される。かかる用語は、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化等を含む。さらに、タンパク断片、アナログ、突然変異タンパク又は変異体タンパク、融合タンパク等もポリペプチドの意味の中に包含される。

【0055】

特定ポリペプチドの「断片」は、特定ポリペプチドから誘導される少なくとも約3 - 5個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約8 - 10個のアミノ酸、さらに一層好ましくは少なくとも約15 - 20個のアミノ酸を含むアミノ酸配列を指す。

【0056】

「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系」、「細胞培養」及び単細胞単位として培養される微生物又は高等真核細胞系を表わす他のそのような用語は、組換えベクター又は他のDNA導入のためのレシピエントとして使用されうる又は使用されてきた細胞を指す。

【0057】

ここで使用されるとき「レプリコン(複製単位)」は、細胞内でのポリヌクレオチド複製の自律単位として働くプラスミド、染色体又はウイルスのような何らかの遺伝的要素を意味する。

【0058】

「ベクター」は、結合されたセグメントの複製及び/又は発現をもたらすように、もう1つ別のポリヌクレオチドセグメントが結合されているレプリコンである。

【0059】

「制御配列」という用語は、それがライゲーションされているコード配列の発現を生じさせるために必要なポリヌクレオチド配列を指す。そのような制御配列の性質は宿主生物に依存して異なる。原核生物では、そのような制御配列は一般にプロモーター、リボソーム結合部位及びターミネーターを含む；真核生物では、そのような制御配列は一般にプロモーター、ターミネーター及び、一部の場合には、エンハンサーを含む。従って「制御配列」という用語は、最小限として、その存在が発現のために必要であるすべての成分を含むことが意図されており、同時にその存在が有益である付加的な成分、例えばリーダー配列も含みうる。

【0060】

「機能的に連結された」は、記述されている成分が意図されているように機能することができる関係にある状況を指す。それ故、例えば、コード配列に「機能的に連結された」制御配列は、制御配列と適合性である条件下でコード配列の発現が実現されるようにライゲーションされている。

【0061】

「オープンリーディングフレーム」又は「ORF」という用語は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の領域を指す。この領域は、コード配列の一部又はコード配列全体でありうる。

【0062】

「コード配列」は、適切な調節配列の制御下においたときmRNAに転写され、ポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドンと3'末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード配列は、mRNA、cDNA及び組換えポリヌクレオチド配列を含むが、これらに限定されない。

【0063】

「に関して/として免疫学的に同定可能」という用語は、指定ポリペプチド中

にも存在し、指定ポリペプチドに独自であるエピトープ及びポリペプチドの存在を指す。免疫学的同一性は、抗体結合及び/又は結合における競合によって決定されうる。これらの手法は当業者には既知であり、またここでも説明する。エピトープの独自性はまた、当該エピトープをコードするポリヌクレオチド配列に関してGenBankのような既知のデータベースをコンピュータ検索することによって、及び他の既知のタンパクとのアミノ酸配列比較によっても決定できる。

【0064】

ここで使用するとき、「エピトープ」は、ポリペプチド又はタンパクの抗原決定基を意味する。推定上、エピトープは、当該エピトープに独自の空間コンフォメーションに3個のアミノ酸を含むと考えられる。一般に、エピトープは少なくとも5個のそのようなアミノ酸から成り、より一般的には少なくとも8 - 10個のアミノ酸から成る。空間コンフォメーションを調べる方法は当分野において既知であり、例えば、x線結晶構造解析及び二次元核磁気共鳴を含む。

【0065】

「配座エピトープ」は、免疫学的に認識可能な構造のアミノ酸の特異的近位から成るエピトープであり、そのようなアミノ酸は隣接する又は隣接しない順序で同じポリペプチド上に又は異なるポリペプチド上に存在する。

【0066】

ポリペプチド内に含まれる特異的エピトープの抗体認識によって抗体に結合するとき、ポリペプチドは抗体と「免疫学的に反応性」である。免疫学的反応性は抗体結合によって、より明細には抗体結合の動態によって、及び/又は抗体が特異的であるエピトープを含む既知のポリペプチドを競合物質として使用した結合における競合によって、決定しうる。ポリペプチドが抗体と免疫学的に反応性であるかどうかを決定するための方法は当分野において既知である。

【0067】

ここで使用するとき、「目的のエピトープを含む免疫原性ポリペプチド」という用語は、天然に生じる目的のポリペプチド又はその断片、ならびに他の手段によって、例えば化学合成又は組換え生物におけるポリペプチドの発現によって調製されるポリペプチドを意味する。

【0068】

「トランスフェクション」という用語は、導入のために使用する方法に関わりなく、原核又は真核宿主細胞への外因性ポリヌクレオチドの導入を指す。「トランスフェクション」という用語はポリヌクレオチドの安定な導入と一過性導入の両方を指し、ポリヌクレオチドの直接取り込み、形質転換、形質導入、及びf交配を包含する。ひとたび宿主細胞に導入されると、外因性ポリヌクレオチドは、統合されないレプリコン、例えばプラスミドとして保持されるか、又はその代わりに宿主ゲノム内に組み込まれうる。

【0069】

「治療」は、予防及び/又は療法を指す。

【0070】

ここで使用するとき、「個体」という用語は、脊椎動物、特に哺乳動物種のメンバーを指し、家畜、競技用動物、霊長類及びヒトを含むがこれらに限定されない；より特定すると、かかる語はヒトを指す。

【0071】

ここで使用するとき、「センス鎖」又は「プラス鎖」（又は「+」）は、ポリペプチドをコードする配列を含む核酸を表わす。「アンチセンス鎖」又は「マイナス鎖」（又は「-」）は、「プラス」鎖の配列に相補的な配列を含む核酸を表わす。

【0072】

「試験サンプル」という用語は、分析物（目的とする抗体又は目的とする抗原など）の供給源である個体の身体の成分を指す。これらの成分は当分野において周知である。試験サンプルは、典型的には標的配列を含むことが疑われる何らかのものである。試験サンプルは、個体から標本を採取し、必要に応じてそれに含まれる細胞を破壊して標的核酸を放出させることのような、当分野において周知の方法を用いて調製できる。これらの試験サンプルは、ここで述べる本発明の方法によって試験することができる生物学的サンプルを含み、全血、血清、血漿、脳脊髄液、痰、気管支洗浄液、気管支吸引液、尿、リンパ液のようなヒト及び動物の体液、ならびに気道、腸管及び泌尿生殖管の様々な外分泌物、涙、唾液、乳

汁、白血球、骨髓腫等；細胞培養上清のような生物学的液体；固定されうる組織標本；及び固定されうる細胞標本を包含する。

【0073】

「精製産物」は、当該産物が正常に結合している細胞成分から、及び目的サンプル中に存在しうる他の細胞型から分離された産物の試料を指す。

【0074】

「PNA」は、標的の存在を調べるためにここで述べたアッセイのような手順において使用できる「ペプチド核酸アナログ」を意味する。「MA」は、標的の存在を調べるためのここで述べたアッセイのような手順において使用できる「モルホリンアナログ(morpholino analog)」を意味する。例えば、参照してここに組み込まれる米国特許第5,378,841号参照。PNAは、RNA標的又はDNAに対して特異的でありうる中性荷電成分である。例えば、本発明のDNAプローブの代わりにアッセイにおいて使用されるPNAプローブは、DNAプローブを使用するとき達成できない利益を提供する。これらの利益は、大量製造の可能性、大規模標識化、再現性、安定性、イオン強度の変化に対して感受性がないこと、ならびにDNA又はRNAを使用する方法において存在する酵素的分解への抵抗性を含む。これらのPNAは、フルオレセイン、放射性ヌクレオチド、化学発光化合物等のようなシグナルを生じる化合物で標識する(化合物「に結合する」)ことができる。PNA又はMAのような他の核酸アナログは、それ故、DNA又はRNAの代わりにアッセイ法において使用することができる。ここではDNAプローブを使用するアッセイが記述されているが、アッセイ試薬に必要な応じて適切な変更を加えて、DNA又はRNAをPNA又はMAに置き換えることは当業者の範囲内である。

【0075】

ここで使用するとき、「分析物」は、試験サンプル中に存在する可能性のある、検出すべき物質である。分析物は、それに対して天然に生じる特異的結合メンバー(抗体のような)が存在する、又はそれに対する特異的結合メンバーを調製することができる物質でありうる。従って、分析物は、アッセイにおいて1つ又はそれ以上の特異的結合メンバーに結合しうる物質である。「分析物」はまた、

抗原性物質、ハプテン、抗体及びそれらの組合せも含む。特異的結合対のメンバーとして、分析物は、ビタミンB12を測定するための特異的結合対のメンバーとしての内性因子タンパクの使用、葉酸を測定するための葉酸結合タンパクの使用、あるいは炭水化物を測定するための特異的結合対のメンバーとしてのレクチンの使用のような、天然に生じる結合パートナー（対）によって検出することができる。分析物はタンパク、ポリペプチド、アミノ酸、ヌクレオチド標的等を含みうる。分析物は、血液、血漿又は血清、尿等のような体液に可溶性でありうる。分析物は、細胞表面上又は細胞内のいずれかで組織中に存在しうる。分析物は、血液、尿、乳房吸引液のような体液中に分散しているか、又は生検サンプルとして得られる、細胞上又は細胞中に存在しうる。

【0076】

「乳房の疾患」、「乳房疾患」及び「乳房の状態」という用語は、非定型過形成、線維腺腫、嚢胞性乳房疾患及び癌を含むがこれらに限定されない、乳房の何らかの疾患又は状態を表わすためにここでは交換可能に使用される。

【0077】

ここで使用するとき、「乳癌」は、上皮内腺管癌、上皮内小葉癌、浸潤性腺管癌、管状腺癌、粘液性癌腫、浸潤性小葉癌及び炎症性乳癌を含むがこれらに限定されない、乳房の何らかの悪性疾患を指す。

【0078】

「発現配列標識（TAG）」又は「EST」は、組織から抽出されたmRNAの逆転写とそれに続くベクターへの挿入によって作製されたcDNA挿入物の部分配列を指す。

【0079】

「転写産物像」は、ライブラリーにおけるESTの量的分布を示す表又はリストを指し、ライブラリーが作製された組織において活性な遺伝子を表わす。

【0080】

本発明は、特異的結合メンバーを使用するアッセイを提供する。ここで使用するとき「特異的結合メンバー」とは特異的結合対のメンバーである。すなわち、分子の1つが化学的又は物理的手段を通して第二の分子に特異的に結合する、2

つの異なる分子である。それ故、一般的な免疫測定法における抗原と抗体の特異的結合対に加えて、他の特異的結合対としてビオチンとアビジン、炭水化物とレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクターとレセプター分子、補因子と酵素、酵素阻害因子と酵素、等を含みうる。さらに、特異的結合対は、もとの特異的結合メンバーのアナログであるメンバー、例えば分析物 - アナログを含みうる。免疫反応性特異的結合メンバーは、組換えDNA分子によって形成されるものを含めて、抗原、抗原断片、モノクローナルとポリクローナルの両方の抗体と抗体断片及びそれらの複合体を含む。

【0081】

特異的結合メンバーは「特異的結合分子」を含む。「特異的結合分子」はあらゆる特異的結合メンバー、特に免疫反応性特異的結合メンバーを意図する。それ自体で、「特異的結合分子」という用語は、抗体分子（ポリクローナルとモノクローナルの両方の標本から得られる）ならびに次のものを包含する：ハイブリッド（キメラ）抗体分子（例えば、Winterら、Nature 349:293-299（1991）、及び米国特許第4,816,567号参照）；F(ab')₂及びF(ab)断片；Fv分子（非共有結合ヘテロダイマー）（例えば、Inbarら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659-2662（1972）、及びEhrlichら、Biochem. 19:4091-4096（1980）参照）；一本鎖Fv分子（sFv）（例えば、Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883（1988）参照）；人体抗体分子（例えば、Riechmanら、Nature 332:323-327（1988）、Verhoeyanら、Science 239:1534-1536（1988）、及び1994年9月21日公開の英国特許公開第GB2,276,169号参照）；ならびに、そのような分子から得られる機能的断片、但し、かかる断片は親抗体分子の免疫結合特性を保持する。

【0082】

ここで使用するとき「ハプテン」という用語は、抗体に結合することができるが、キャリアタンパクに結合しなければ抗体産生を惹起することができない部分

抗原又は非タンパク結合メンバーを指す。

【0083】

ここで使用するとき「捕獲試薬」は、サンドイッチアッセイにおけるように分析物に対して、競合アッセイにおけるように指示試薬又は分析物に対して、若しくは間接アッセイにおけるようにそれ自体が分析物に特異的である補助的な特異的結合メンバーに対して特異的である、標識していない特異的結合メンバーを指す。捕獲試薬は、アッセイを実施する前又はアッセイの実施中に直接又は間接的に固相物質に結合することができ、それによって固定化された複合体を試験サンプルから分離することを可能にする。

【0084】

「指示試薬」は、特異的結合メンバーに複合した（「結合した」）、外的手段によって検出する測定可能なシグナルを生じることができ、且つそのようなシグナルを発する「シグナル発生化合物」（「標識」）を含む。特異的結合対の抗体メンバーであることに加えて、指示試薬は同時に、ビオチン又は抗ビオチン、アビジン又はビオチン、炭水化物又はレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクター又はレセプター分子、酵素補因子及び酵素、酵素阻害因子又は酵素、等のようなハプテン - 抗ハプテン系を含めて、何らかの特異的結合対のメンバーでもありうる。免疫反応性特異的結合メンバーは、サンドイッチアッセイにおけるように目的のポリペプチドに結合する、競合アッセイにおけるように捕獲試薬に結合する、若しくは間接アッセイにおけるように補助の特異的結合メンバーに結合することができる抗体、抗原、又は抗体 / 抗原複合体でありうる。プローブ及びプローブアッセイについて述べる時、「レポーター分子」という用語を使用することがある。レポーター分子は、カルバゾール又はアダマンタンのような、特異的結合対の特異的結合メンバーに複合した、上述したようなシグナル発生化合物を含む。

【0085】

想定される様々な「シグナル発生化合物」（標識）は、色原体、酵素のような触媒、フルオレセインやローダミンのような発光化合物、ジオキセタン、アクリジニウム、フェナントリジニウム及びルミノールのような化学発光化合物、放射

性元素及び直接眼に見える標識を含む。酵素の例は、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、等を含む。個々の標識の選択は決定的に重要ではないが、それ自体であるいは1つ又はそれ以上の付加物質と組み合わせて、シグナルを生じることができなければならない。

【0086】

「固相」(「支持体」)は当業者には既知であり、反応トレーのウエルの壁、試験管、ポリスチレンビーズ、磁性又は非磁性ビーズ、ニトロセルロースストリップ、膜、ラテックス粒子のような微粒子、ヒツジ(又は他の動物の)赤血球及びDuracyteR(ピルビン酸アルデヒドとホルムアルデヒドによって「固定された」赤血球、Abbott Laboratories, Abbott Park, ILより入手可能)その他を含む。「固相」は決定的に重要ではなく、当業者によって選択されうる。それ故、ラテックス粒子、微粒子、磁性又は非磁性ビーズ、膜、プラスチックチューブ、マイクロタイターウエルの壁、ガラス又はシリコンチップ、ヒツジ(又は他の適当な動物の)赤血球及びDuracyte(登録商標)は、すべて適当な例である。ペプチドを固相に固定するための適当な方法は、イオン性、疎水的、共有結合性相互作用等を含む。ここで使用するとき、「固相」は、不溶性であるか、若しくはその後の反応によって不溶性にすることができる物質を指す。固相は、捕獲試薬を誘引して固定するその内在能力によって選択することができる。その代わりに、固相は、捕獲試薬を誘引して固定する能力を持つ付加レセプターを保持しうる。付加レセプターは、捕獲試薬そのものに関して又は捕獲試薬に複合した荷電物質に関して反対の電荷を持つ荷電物質を含みうる。さらにもう1つの選択肢として、レセプター分子は、固相に固定されて(結合されて)おり、特異的結合反応を通して捕獲試薬を固定する能力を持つ、何らかの特異的結合メンバーでありうる。レセプター分子は、アッセイの実施前又はアッセイの実施中に捕獲試薬が固相材料に間接結合することを可能にする。従って固相は、プラスチック、誘導体化されたプラスチック、磁性又は非磁性金属、試験管のガラス又はシリコン表面、マイクロタイターウエル、シート、ビーズ、微粒子、チップ、ヒツジ(又は他の適当な動物の)赤血球、Duracyte(登録商標)及び当業者に既知の他の構造でありうる。

【0087】

固相はまた、検出抗体によるアクセスを可能にする十分な多孔度と抗原に結合するための適切な表面親和性を備えた適当な多孔性材料も含みうるものが想定され、それは本発明の範囲内である。一般に微小孔構造が好ましいが、水和状態でゲル構造を持つ物質も使用しうる。そのような有用な支持体は、ニトロセルロース及びナイロンを含むがこれらに限定されない。ここで述べるそのような多孔性支持体は、好ましくは、厚さ約0.01 - 0.5 mm、好ましくは約0.1 mmのシートの形態である。孔の大きさは広い範囲で変化しうるが、好ましくは約0.025 - 15 ミクロン、特に好ましくは約0.15 - 15 ミクロンである。そのような支持体の表面は、支持体への抗原又は抗体の共有結合を生じさせる化学的プロセスによって活性化されうる。しかしながら、一般に、十分には理解されていない疎水性の力による多孔性物質への吸着によって、抗原又は抗体の不可逆的結合が得られる。他の適当な支持体は当分野において既知である。

【0088】

試薬

本発明は、目的とする、BU101と称される乳房組織から誘導されるポリヌクレオチド配列、それによってコードされるポリペプチド、及びそれらのポリペプチドに特異的な抗体のような試薬を提供する。本発明はまた、開示されるポリヌクレオチド及びこれらのポリヌクレオチドに相補的な核酸配列から誘導されるオリゴヌクレオチド断片のような試薬を提供する。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド又は抗体は、乳癌のような乳房の疾患及び状態の検出、診断、病期分類、監視、予後判定、生体内での画像化、予防又は治療、あるいは乳房の疾患及び状態に対する素因の判定を導く情報を提供するために使用しうる。ここで開示する配列は、アッセイにおいて、又は遺伝子転写活性の特異的プロフィールを作製するために使用できるユニークポリヌクレオチドである。そのようなアッセイは、参照してここに組み込まれる、欧州特許第0373203B1号及び国際特許公開WO95/11995号に開示されている。

【0089】

選択したBU101由来のポリヌクレオチドは、正常な又は変化した遺伝子発

現を検出するためのここで述べる方法において使用できる。そのような方法は、BU101ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド、それらの断片又は誘導体、あるいはそれらに相補的な核酸配列を使用しうる。

【0090】

ここで開示するポリヌクレオチド、それらの相補的配列、又はそのいずれかの断片は、関連する乳房組織の疾患及び状態に関する遺伝子、核酸、cDNA又はmRNAを検出する、増幅する又は定量するためのアッセイにおいて使用できる。それらはまた、BU101ポリペプチドの全体又は部分的コード領域を同定するために使用できる。それらはさらに、個々の容器においてアッセイ用のキットの形態で、又は個々の組成物として提供されうる。アッセイ用のキットとして提供される場合には、緩衝剤、複合体 (conjugate) 等のような他の適当な試薬も含みうる。

【0091】

当該ポリヌクレオチドはRNA又はDNAの形態をとりうる。DNA、cDNA、ゲノムDNA、核酸アナログ及び合成DNAの形態のポリヌクレオチドは本発明の範囲内である。DNAは二本鎖又は一本鎖のいずれでもよく、また一本鎖の場合には、コード (センス) 鎖又は非コード (アンチセンス) 鎖のいずれでもよい。ポリペプチドをコードするコード配列は、ここで提供するコード配列と同一であってもよく、あるいは遺伝子コードの重複又は縮退の結果として、コード配列がここで提供するDNAと同じポリペプチドをコードする異なるコード配列であってもよい。

【0092】

このポリヌクレオチドは、当該ポリペプチドのコード配列だけ、あるいは当該ポリペプチドのコード配列とリーダー又は分泌配列又はプロタンパク配列のような付加コード配列、あるいは当該ポリペプチドのコード配列 (及び任意に付加コード配列) とポリペプチドのコード配列の5'側及び/又は3'側非コード配列のような非コード配列を含みうる。

【0093】

さらに、本発明は、ポリヌクレオチドの欠失、置換又は付加のような修飾を含

む変異体ポリヌクレオチド、及び変異体ポリヌクレオチド配列から生じるポリペプチド修飾を包含する。本発明のポリヌクレオチドはまた、ここで提供するコード配列の天然に生じる対立遺伝子変異体であるコード配列を持ちうる。

【0094】

さらに、ポリペプチドのコード配列を同じ読み枠内で、宿主細胞からのポリペプチドの発現と分泌を助けるポリヌクレオチド配列、例えば細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列に融合することができる。リーダー配列を持つポリペプチドはプロタンパクであり、宿主細胞によって開裂されてポリペプチドを産生するリーダー配列を持ちうる。ポリヌクレオチドはまた、タンパクプラス付加的な5'アミノ酸残基であるプロタンパクをコードしうる。プロ配列を持つタンパクはプロタンパクであり、一部の場合には、タンパクの不活性形態でありうる。ひとたびプロ配列が開裂されれば、活性タンパクが残存する。従って本発明のポリヌクレオチドは、タンパク、又はプロ配列を持つプロタンパク、又はプレ配列（リーダー配列）とプロ配列の両方を持つタンパクをコードしうる。

【0095】

本発明のポリヌクレオチドはまた、フレーム内で、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列に融合したコード配列を持ちうる。マーカー配列は、細菌宿主の場合にはマーカーに融合したポリペプチドの精製を提供するためのpQE-9によって供給されるヘキサヒスチジン標識でありうる、又は例えば、哺乳類宿主、例えばCOS-7細胞系を使用するときにはマーカー配列は血球凝集素(HA)でありうる。HA標識は、インフルエンザ血球凝集素タンパクから誘導されるエピトープに相当する。例えば、I. Wilsonら、Cell 37:767(1984)参照。

【0096】

ポリヌクレオチドと配列間に少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも90%の同一性が存在する場合、ポリヌクレオチドをここで提供する配列にハイブリダイズすると見なされるであろう。

【0097】

2つの核酸分子間の配列同一性の度合は、そのような分子間のハイブリダイゼーション事象の効率と強さに大きく影響する。部分的に同一な核酸配列は、完全に同一な配列が標的分子にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害する配列である。完全同一配列のハイブリダイゼーションの阻害は、当分野において周知のハイブリダイゼーションアッセイを用いて評価できる（例えば、サザンブロット、ノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーション、原位置（*in situ*）ハイブリダイゼーション、等、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、（1989）Cold Spring Harbor, N.Y.参照）。そのようなアッセイは、様々な度合の選択性、例えば低ストリンジェンシーから高ストリンジェンシーまでにわたる条件を用いて実施できる。低ストリンジェンシー条件を用いる場合には、非特異的結合事象が存在しなければ第二プローブが標的にハイブリダイズしないように、部分的な度合の配列同一性さえも持たない第二プローブ（例えば、標的分子と約30%未満の配列同一性を持つプローブ）を用いて、非特異的結合が存在しないことを評価できる。

【0098】

ハイブリダイゼーションに基づく検出系を用いるときには、標的核酸配列に相補的である核酸プローブを選択し、次に適当な条件を選択することによってプローブと標的配列を「選択的にハイブリダイズする」又は互いに結合させてハイブリッド分子を形成する。本発明の1つの実施形態では、核酸分子は、中等度に厳密なハイブリダイゼーション条件下で標的配列に選択的にハイブリダイズすることができる。本発明に関して、中等度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、選択した核酸プローブの配列と少なくとも約70%の配列同一性を持つ、少なくとも14ヌクレオチドの長さの標的核酸配列を検出することが可能である。もう1つの実施形態では、厳密なハイブリダイゼーション条件下でそのような選択的ハイブリダイゼーションを実施する。厳密なハイブリダイゼーション条件は、選択した核酸プローブの配列と90%以上の配列同一性を持つ、少なくとも14ヌクレオチドの長さの標的核酸配列を検出することができる。プローブと標的が特定の度合の配列同一性を持つ場合、プローブ/標的ハイブリダイゼ

ーションに有用なハイブリダイゼーション条件は、当分野において知られているように決定できる（例えば、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach、B. D. HamesとS. J. Higgins編集、(1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press）。ハイブリッド分子は、例えば、支持体上、溶液中、及び組織切片中に形成されうる。ハイブリッドの形成は、レポーター分子、典型的にはプローブ内への取込みによってモニターできる。そのようなレポーター分子又は検出可能要素は、放射性元素、蛍光マーカー、及び酵素複合リガンドが結合しうる分子を含むが、これらに限定されない。

【0099】

ハイブリダイゼーションのためのストリンジェンシー条件に関して、数多くの等価条件を用いて、例えば次の因子を変化させることにより、特定のストリンジェンシーを確立できることは当分野において周知である：プローブの長さと性質、様々な配列の塩基組成物、塩及び他のハイブリダイゼーション溶液成分の濃度、ハイブリダイゼーション溶液中の遮断剤（例えば、ホルムアミド、硫酸デキストラン、及びポリエチレングリコール）の存在又は不在、ハイブリダイゼーション反応の温度及び時間パラメータ、ならびに様々な洗浄条件。ハイブリダイゼーション条件の特定セットの選択は十分に当業者の技術範囲内である（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(1989) Cold Spring Harbor, N. Y. 参照）。

【0100】

本発明はまた、ポリペプチドの少なくとも一部がここで提供されるポリヌクレオチドから選択されるBU101ポリヌクレオチドによってコードされる、精製BU101ポリペプチドを使用することによって産生される抗体を提供する。これらの抗体は、試験サンプル中のBU101抗原を検出するためのここで提供される方法において使用しうる。試験サンプル中にBU101抗原が存在することは、乳房の疾患又は状態が存在することの指標である。抗体はまた、治療のため、例えば発現の変化又は異常に関連する状態においてBU101ポリペプチドの

活性を中和する際に使用しうる。

【0101】

本発明はさらに、ここで提供するような推定アミノ酸配列を持つBU101ポリペプチド、ならびにそのようなポリペプチドの断片、アナログ及び誘導体に関する。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然精製ポリペプチド又は合成ポリペプチドでありうる。BU101ポリペプチドの断片、誘導体又はアナログは、1個又はそれ以上のアミノ酸残基が保存された又は保存されないアミノ酸残基（好ましくは保存されたアミノ酸残基）で置換されているものでありうるが、そのような置換されたアミノ酸残基は遺伝子コードによってコードされるもの又はそうでないもののどちらでもよい；あるいは、1個又はそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むものであってもよい；あるいは、ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を延長させる化合物（例えばポリエチレングリコール）のようなもう1つの化合物と融合しているものであってもよい；あるいは、リーダー又は分泌配列あるいはポリペプチド又はプロタンパク配列の精製のために用いられる配列のような、付加的なアミノ酸がポリペプチドに融合しているものであってもよい。そのような断片、誘導体及びアナログは本発明の範囲内である。本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドは、好ましくは分離形態で、且つ好ましくは精製されて提供される。

【0102】

それ故、本発明のポリペプチドは、天然に生じるポリペプチドと同一であるか、又は1個又はそれ以上のアミノ酸置換による小さな変化によって異なるアミノ酸配列を持ちうる。変化は、典型的には約1 - 5個のアミノ酸の範囲の「保存的置換」であって、置換アミノ酸は類似した構造又は化学特性を持ち、例えばイソロイシンによるロイシンの置換又はセリンによるトレオニンの置換でありうる。これに対し、変化は非保存的变化、例えばトリプトファンによるグリシンの置換を含みうる。同様の小さな変化はまた、アミノ酸の欠失又は挿入、又はその両方を含みうる。生物学的又は免疫学的活性を変化させずに、いずれのアミノ酸残基がどの程度の数まで置換、挿入又は欠失されうるかを決定する上での指針は、当分野において周知のコンピュータプログラム、例えばDNA STARソフトウェア

ア(DNASTAR Inc., Madison, WI)を用いて見出すことができる。

【0103】

本発明のポリヌクレオチド配列に従って構築されるプローブは、様々な種類の分析を提供する様々なアッセイ法において使用できる。例えば、そのようなプローブは、染色体分析を実施するための蛍光原位置ハイブリダイゼーション(FISH)テクノロジーにおいて、また染色体の拡大によって眼に見える、あるいはPCRで作製した及び/又は対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ、対立遺伝子特異的増幅を用いて又は直接配列決定によって検出する欠失又は転座のような、染色体における癌特異的構造変化を同定するために使用できる。プローブはまた、放射性標識、直接又は間接的に検出可能なハプテン、又は蛍光分子で標識することができ、組織標本又は細胞においてポリヌクレオチドを含む遺伝子のmRNA発現を評価するための原位置ハイブリダイゼーション試験のために利用できる。

【0104】

本発明はまた、ここで提供するポリヌクレオチドとポリペプチドの製造に関する教示も提供する。

【0105】

プローブアッセイ

ここで提供する配列は、試験サンプル中の核酸を検出するためのアッセイにおいて使用できるプローブを作製するために使用しうる。プローブは、目的とするポリヌクレオチドの保存ヌクレオチド領域から、又は目的とするポリヌクレオチドの非保存ヌクレオチド領域から設計することができる。アッセイに至適化するようにそのようなプローブを設計することは常套的技術の範囲内である。一般に、核酸プローブは、最大の特異性を所望するときには非保存又はユニーク領域から開発され、また例えば、多遺伝子ファミリーの異なるメンバーに緊密に関連するヌクレオチド領域に関して又はマウスとヒトのような関連種においてアッセイするときには保存領域から開発される。

【0106】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、核酸又はその混合物に含まれる所望核酸配列 (標的) を増幅するための手法である。PCRでは、1組のプライマーを過剰に使用して標的核酸の相補鎖にハイブリダイズする。プライマーは、標的核酸をテンプレートとして用いてポリメラーゼによって各々伸長される。伸長産物は、もとの標的鎖から分離したあと、それ自体が標的配列となる。その後新しいプライマーがハイブリダイズされてポリメラーゼによって伸長され、そのサイクルを繰り返して標的配列分子の数が幾何学的に増加する。PCRは、参照してここに組み込まれる米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号に開示されている。

【0107】

リガーゼ連鎖反応 (LCR) は核酸増幅のための代替法である。LCRでは、2個の一次 (第一及び第二) プローブと2個の二次 (第三及び第四) プローブを含むプローブ対を使用し、これらはすべて標的に対して過剰モルで用いられる。第一プローブは標的鎖の第一セグメントにハイブリダイズし、第二プローブは標的鎖の第二セグメントにハイブリダイズして、第一と第二セグメントは、一次プローブが5'リン酸-3'ヒドロキシル関係で互いに接するように、そしてリガーゼが共有結合によって2つのプローブを融合産物に融合する又はライゲートすることができるように、隣接している。さらに、同様に隣接するように、第三 (二次) プローブは第一プローブの一部にハイブリダイズすることができ、第四 (二次) プローブは第二プローブの一部にハイブリダイズすることができる。言うまでもなく、標的がもともと二本鎖であれば、第二プローブも最初の時点で同時に標的相補体にハイブリダイズする。ひとたび一次プローブのライゲートされた鎖が標的鎖から分離されれば、それを第三と第四プローブにハイブリダイズし、それらをライゲートして相補的な第二のライゲーション産物を形成することができる。ライゲーション産物は標的又はその相補体のいずれかと機能的に等しいことを認識することが重要である。ハイブリダイゼーションとライゲーションのサイクルの繰り返しによって標的配列の増幅が達成される。この手法は、1989年6月16日公開のK. BackmanへのEP-A-320 308号及び1991年7月31日公開のK. BackmanらへのEP-A-439 182

号の中でより詳細に記述されており、これらはいずれも参照してここに組み込まれる。

【0108】

mRNAの増幅に関しては、mRNAをcDNAに逆転写して、その後ポリメラーゼ連鎖反応を実施すること(RT-PCR)；あるいは、参照してここに組み込まれる米国特許第5,322,770号に述べられているように、両方の段階に単一の酵素を使用すること；あるいは、やはり参照してここに組み込まれるR.L.Marshallら、PCR Methods and Applications 4:80-84(1994)に述べられているように、mRNAをcDNAに逆転写したあと非対称ギャップリガーゼ連鎖反応(RT-AGLCR)を実施することは、本発明の範囲内である。

【0109】

ここで使用できる他の既知の増幅法は、J.C.Guatelliら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878(1990)が述べた、またJ.Compton,Nature 350(6313号):91-92(1991)によっても記述されている、いわゆる「NASBA」又は「3SR」手法；公開欧州特許願(EPA)第4544610号に述べられているようなQ-増幅；鎖置換増幅(G.T.Walkerら、Clin.Chem.42:9-13[1996]及び欧州特許願第684315号に述べられているような)；ならびに国際特許願公開第WO93/22461号に述べられているような標的仲介増幅を含むが、これらに限定されない。

【0110】

BU101の検出は、現在当分野において周知の検出方法ならびに将来考案されるかもしれない検出戦略を含めて、何らかの適当な検出方法を用いて実施できる。前記の現在既知の検出方法の例は、参照してここに組み込まれる。例えば、Caskyら、米国特許第5,582,989号、Gelfandら、米国特許第5,210,015号参照。そのような検出方法の例は、標的増幅法ならびにシグナル増幅テクノロジーを含む。現在既知の検出方法の例は、PCR、LCR、NASBA、SDA、RCR及びTMAと称される核酸増幅テクノロジーを

含むであろう。例えば、C a s k e y ら、米国特許第 5 , 5 8 2 , 9 8 9 号、G e l f a n d ら、米国特許第 5 , 2 1 0 , 0 1 5 号参照。前記はすべて参照してここに組み込まれる。検出はまた、S n i t m a n ら、米国特許第 5 , 2 7 3 , 8 8 2 号に開示されているようなシグナル増幅を用いて実施しうる。標的又はシグナルの増幅は現時点では好ましいが、増幅を必要としない超高感度検出法がここで使用できることが想定され、それは本発明の範囲内である。

【0111】

増幅を行う検出と増幅を行わない検出はいずれも、多様な異質及び均質検出様式を用いて実施できる。異質検出様式の例は、S n i t m a n ら、米国特許第 5 , 2 7 3 , 8 8 2 号、A l b a r e l l a ら、E P - 8 4 1 1 4 4 4 1 . 9 号より、U r d e a ら、米国特許第 5 , 1 2 4 , 2 4 6 号、U l l m a n ら、米国特許第 5 , 1 8 5 , 2 4 3 号及び K o u r i l s k y ら、米国特許第 4 , 5 8 1 , 3 3 3 号に開示されている。前記はすべて参照してここに組み込まれる。均質検出様式の例は、参照してここに組み込まれる、C a s k e y ら、米国特許第 5 , 5 8 2 , 9 8 9 号、G e l f a n d ら、米国特許第 5 , 2 1 0 , 0 1 5 号に開示されている。その使用によって B U 1 0 1 シグナルの感受性と増幅が改善される、ハイブリダイゼーションアッセイでの複数プローブの使用も想定され、本発明の範囲内である。例えば、参照してここに組み込まれる、C a s k e y ら、米国特許第 5 , 5 8 2 , 9 8 9 号、G e l f a n d ら、米国特許第 5 , 2 1 0 , 0 1 5 号参照。

【0112】

1つの実施形態では、本発明は一般に、標的ポリヌクレオチド配列を含むことが疑われる試験サンプルを、増幅プライマー及びアンプリコン配列の内部領域とハイブリダイズすることができる検出プローブを含む増幅反応試薬と接触させる段階を含む。ここで提供する方法に従って用いられるプローブとプライマーは捕獲及び検出標識で標識されるが、但し、プローブはある1つの種の標識で標識され、プライマーはもう1つ別の種類の標識で標識される。さらに、プライマーとプローブは、プローブ配列がプライマー配列よりも低い融解温度を持つように選択される。増幅試薬、検出試薬及び試験サンプルを増幅条件下に置くと、それに

よって、標的配列の存在下では標的配列のコピー（アンプリコン）が産生される。通常の場合、プライマーは標的配列とその相補鎖を増幅するように提供されるので、アンプリコンは二本鎖である。次に二本鎖アンプリコンを熱変性させて一本鎖アンプリコンメンバーを生成する。一本鎖アンプリコンメンバーが生成されれば、混合物を冷却してプローブと一本鎖アンプリコンメンバーとの間に複合体を形成させる。

【0113】

一本鎖アンプリコン配列とプローブ配列を冷却すると、プローブ配列は一本鎖アンプリコンメンバーに選択的に結合する。プローブ配列は一般にプライマー配列よりも短くなるように選択され、それ故プライマーよりも低い融解温度を持つと考えられるので、この所見は反直観的である。そこで、プライマーによって作製されるアンプリコンもプローブより高い融解温度を持つはずである。それ故、混合物を冷却すると、二本鎖アンプリコンの再形成が予想される。しかし先に述べたように、実際にはそうならない。プローブは一本鎖アンプリコンメンバーに選択的に結合することが認められる。さらに、このプローブ/一本鎖アンプリコン結合の選択性は、プライマー配列をプローブより過剰に加えたときでも存在する。

【0114】

プローブ/一本鎖アンプリコンメンバーのハイブリッドが形成されたあと、それらを検出する。プライマーとプローブ上に存在する検出標識と捕獲標識を使用する標準均質アッセイ様式がハイブリッドを検出するに適している。ハイブリッドは捕獲標識によって固相試薬に結合され、検出標識によって検出することができる。検出標識が直接検出可能である場合には、必要に応じて標識に検出可能なシグナルを生じさせ、そのシグナルを検出することによって固相上のハイブリッドの存在を検出することができる。標識が直接検出できない場合には、捕獲したハイブリッドを、一般に直接検出可能な標識に結合した結合メンバーを含むコンジュゲートに接触させることができる。コンジュゲートは複合体に結合し、複合体上のコンジュゲートの存在を直接検出可能標識で検出することができる。このようにして、固相試薬上のハイブリッドの存在を判定することができる。当業者

は、洗浄段階を用いてハイブリダイズしていないアンプリコン又はプローブならびに結合していないコンジュゲートを除去しうることを認識するであろう。

【0115】

1つの実施形態では、核酸分子の整列（アレー）を有する固相支持体を用いて均質アッセイを好都合に実施することができる。そのようなアレーは高収量及び/又は多重アッセイ様式のために有用である。あらかじめ生成した核酸分子からそのようなアレーを作製するための方法、又はインサイチュ合成手法を用いてアレーを生成する方法は、当分野において一般的に知られている[例えば、Dattaguptaら、EP特許公開第0234,726A3号; Southern、米国特許第5,700,637号; Pirrungら、米国特許第5,143,854号; PCT国際特許公開第WO92/10092号; 及びFodorら、Science 251:767-777(1991)参照]。

【0116】

標的配列は一本鎖と記述されているが、標的配列が実際には二本鎖であるが増幅プライマー配列とのハイブリダイゼーションの前に単にその相補体から分離されるケースも含むと想定される。この方法においてPCRを用いる場合、標的配列の末端は通常既知である。好ましい方法においてLCR又はその修正を用いる場合には、標的配列全体が通常既知である。典型的には、標的配列は、例えばRNA又はDNAのような核酸配列である。

【0117】

ここで提供する方法は、熱サイクル反応混合物を含む周知の増幅反応、特にPCR及びギャップLCR(GLCR)において使用することができる。増幅反応は、典型的にはプライマーを用いて標的核酸配列のコピーを繰り返し生成させるが、標的配列は通常、はるかに大きな核酸配列の小さな領域である。プライマーは、それ自体が標的配列の領域に相補的な核酸配列である。増幅条件下で、これらのプライマーは標的配列の相補的領域にハイブリダイズする又は結合する。標的配列のコピーは、典型的には、ポリメラーゼ又はリガーゼ活性を持つ酵素を別々に又は組み合わせて使用して、ハイブリダイズしたプライマーにヌクレオチドを付加する及び/又は隣接プローブ対をライゲートする、プライマー伸長及び/

又はライゲーションのプロセスによって生成される。モノマーとして又は前形成されたオリゴマーとしてプライマー又はプローブに付加されるヌクレオチドは、標的配列に対しても相補的である。ひとたびプライマー又はプローブが十分に伸長される及び/又はライゲーションされれば、例えば、相補的核酸鎖が解離する温度である「融解温度」まで反応混合物を加熱することによって、それらを標的配列から分離する。このようにして、標的配列に相補的な配列が形成される。

【0118】

その後新しいアンプリコンサイクルが起こり、二本鎖配列を分離することによって標的配列の数がさらに増幅され、プライマー又はプローブをそれぞれの標的にハイブリダイズさせて、ハイブリダイズしたプライマー又はプローブを伸長及び/又はライゲートし、再び分離することができる。増幅サイクルによって生成される相補的配列は、標的配列の数をさらに増幅するためのプライマー伸長又は2つのプローブのギャップ充填のテンプレートとして用いることができる。典型的には反応混合物を20 - 100回循環させ、より典型的には反応混合物を25 - 50回循環させる。サイクル数は当業者が決定できる。このようにして、標的配列とその相補的配列の多数のコピーが作製される。従って、プライマーは、増幅条件下で存在するときには標的配列の増幅を開始させる。

【0119】

一般に、PCRでは標的鎖とその相補体の一部に相補的である2個のプライマーが用いられる。LCRについては、一般に4個のプローブが使用され、その内の2個は標的配列に相補的であり、他の2個は標的の相補体に対して同様に相補的である。先に述べたプライマーセットと酵素に加えて、核酸増幅反応混合物はまた、周知であって、次のものを含むがそれらに限定されない、他の試薬を含むこともできる：マンガンのような酵素補因子；マグネシウム；塩；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)；及び、例えばデオキシアデニン三リン酸、デオキシグアニン三リン酸、デオキシシトシン三リン酸及びデオキシチミン三リン酸のようなデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)。

【0120】

増幅プライマーは標的配列の増幅を開始させるが、検出(又はハイブリダイゼ

ーション)プローブは増幅に関与しない。検出プローブは一般に核酸配列、又は、例えば国際特許公開第WO92/20702号に開示されているペプチド核酸；米国特許第5,185,444号、同第5,034,506号及び同第5,142,047号に述べられているモルホリンアナログ等のような荷電していない核酸アナログである。プローブが担う標識の種類に依存して、増幅反応によって生成されるアンプリコンを捕獲又は検出するためにプローブを利用する。プローブは標的配列の増幅には関与せず、それ故、余分なdNTPがプローブに付加することができないように、「伸長不能」にしておかねばならないと考えられる。それ自体で、アナログは通常伸長不能であり、核酸プローブは、ヒドロキシル基が伸長に関わることができないようにプローブの3'末端を修飾することによって伸長不能にすることができる。例えば、プローブの3'末端を捕獲又は検出標識で官能基化し、それによってヒドロキシル基を消費又は遮断することができる。その代わりに、3'ヒドロキシル基を単に開裂する、置換する又は修飾することもできる。参照してここに組み込まれる、1993年4月19日出願の米国特許出願番号第07/049,061号は、プローブを伸長不能にするために使用できる修飾を記述している。

【0121】

プライマーとプローブの比率は重要ではない。すなわち、プローブ又はプライマーを反応混合物に過剰に加えることができ、それによって一方の濃度が他方の濃度よりも高くなる。その代わりに、プライマーとプローブを等しい濃度で用いることもできる。好ましくは、しかしながら、プライマーをプローブよりも過剰に反応混合物に加える。従って、プライマー対プローブの比率は、例えば5:1及び20:1が好ましい。

【0122】

プライマー及びプローブの長さは変化しうるが、プローブの配列はプライマー配列よりも低い融解温度を持つように選択される。それ故、プライマー配列は一般にプローブ配列よりも長い。典型的には、プライマー配列は20-50ヌクレオチドの範囲の長さ、より典型的には20-30ヌクレオチドの範囲の長さである。典型的なプローブは10-25ヌクレオチドの範囲の長さである。

【0123】

プライマーとプローブを合成するための様々な方法が当分野において周知である。同様に、プライマー又はプローブに標識を結合するための方法も当分野で周知である。例えば、従来のヌクレオチドホスホルアミダイト化学と Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA)、Du Pont (Wilmington, DE) 又は Milligen (Bedford, MA) から入手しうる装置を用いて所望する核酸プライマー又はプローブを合成することは常套事象である。本発明のプライマー又はプローブのようなオリゴヌクレオチドに標識するための多くの方法が記述されている。Enzo Biochemical (New York, NY) 及び Clontech (Palo Alto, CA) はどちらも、プローブ標識手法を記述し、市販している。例えば、第一アミンは 3' - Amine - ON CPG™ (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて 3' オリゴ末端に結合することができる。同様に、第一アミンは Aminomodifier II (登録商標) (Clontech) を使用して 5' オリゴ末端に結合することができる。アミンは、従来の活性化と結合化学を用いて様々なハプテンと反応させることができる。さらに、それぞれ参照してここに組み込まれる、共同審理中の 1990年12月11日出願の米国特許願通し番号第 625,566号及び 1990年12月20日出願の同第 630,908号は、それぞれ 5' 末端と 3' 末端でプローブを標識する方法を教示している。1992年6月25日公開の国際特許公開第 WO92/10505号及び 1992年7月9日公開の同第 WO92/11388号は、それぞれ 5' 末端と 3' 末端でプローブを標識する方法を教示している。オリゴヌクレオチドを標識するための既知の方法に従って、標識ホスホルアミダイト試薬を調製し、使用して、オリゴヌクレオチドの合成の間に標識を付加する。例えば、N. T. Thuongら、Tet. Letters 29(46):5905-5908(1988); 又は J. S. Cohenら、公開米国特許願 07/246,688号 (NTIS ORDER番号 PAT-APPL-7-246,688)(1989) 参照。好ましくは、プローブをその 3' 末端と 5' 末端で標識する。

【0124】

捕獲標識はプライマー又はプローブに結合され、固相試薬の特異的結合メンバーと結合対を形成する特異的結合メンバーでありうる。プライマー又はプローブ自体が捕獲標識として働きうることは明白である。例えば、固相試薬の結合メンバーが核酸配列である場合には、プライマー又はプローブの相補的部分に結合して、プライマー又はプローブを固相に固定するように選択することができる。プローブ自体が結合メンバーとして働く場合には、当業者は、プローブが一本鎖アンプリコンメンバーに相補的でない配列又は「テール」を含むことを認識するであろう。プライマー自体が捕獲標識として働く場合には、プローブがプライマー配列に完全に相補的ではないように選択されるので、少なくともプライマーの一部は固相上の核酸に自由にハイブリダイズする。

【0125】

一般に、プローブ/一本鎖アンプリコンメンバー複合体は、均質免疫測定法を実施するのに一般的に用いられる手法を使用して検出できる。好ましくは、この実施形態では、市販されているAbbott LCx(登録商標)装置(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)によって使用されるプロトコールに従って検出が行われる。

【0126】

ここで開示するプライマーとプローブは、試験サンプルを1対のプライマーに接触させ、増幅を行って、ハイブリダイゼーションプローブを加えて検出を実施する、典型的PCRアッセイにおいて有用である。

【0127】

本発明によって提供されるもう1つの方法は、少なくとも1個のポリヌクレオチドがここで述べたようなBU101分子である、複数のポリヌクレオチドに試験サンプルを接触させ、試験サンプルを複数のポリヌクレオチドとハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション複合体を検出することを含む。ハイブリダイゼーション複合体を同定し、定量して、乳癌のような乳房組織疾患の指標であるプロファイルを収集する。発現されたRNA配列は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含めた当分野において周知の手法による逆転写とDNA産物の増幅によっ

てさらに検出する。

【0128】

薬剤スクリーニングと遺伝子治療

本発明はまた、乳房組織疾患又は状態、特に乳癌に関連したポリヌクレオチドの異常発現に結びつく状態を有する患者に、本発明のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドのようなアンチセンスBU101由来分子を導入するための遺伝子治療法の使用を包含する。アンチセンスRNA及びDNA断片及びリボザイムを含めたこれらの分子は、BU101 mRNAの翻訳を阻害するように設計され、BU101ポリヌクレオチド発現の変化又は異常に結びつく状態の処置において治療的に使用する。

【0129】

その代わりに、上述したオリゴヌクレオチドを、アンチセンスRNA又はDNAが上述したように生体内で発現されてBU101ポリヌクレオチドの産生を阻害するように、当分野において既知の手法によって細胞に送達することができる。BU101ポリヌクレオチドに対するアンチセンス構築物は、それ故、BU101転写産物の作用を逆転させ、乳癌のような乳房組織疾患状態を治療するために使用できる。これらのアンチセンス構築物はまた、腫瘍転移を治療するためにも使用する。

【0130】

本発明はまた、BU101ポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1つの化合物を同定するために、BU101ポリペプチド又はその断片への特異的結合に関して複数の化合物をスクリーニングする方法を提供する。そのような方法は、少なくとも1つの化合物を提供し；適当な条件下で、結合を生じさせるのに十分な時間、BU101ポリペプチドを各々の化合物と組み合わせ；そして各化合物へのBU101ポリペプチドの結合を検出する、という段階を含む。

【0131】

そのような試験で用いるポリペプチド又はペプチド断片は、溶液中に遊離しているか、支持体に固定されている、細胞表面に付着している、又は細胞内に位置する場合があります。スクリーニングの1つの方法は、ポリペプチド又はペプチ

ド断片を発現しうる組換え核酸で安定にトランスフェクションされた真核又は原核宿主細胞を使用する。薬剤、化合物、又は他の何らかの作用物質を、競合結合アッセイにおいてそのようなトランスフェクション細胞に対してスクリーニングすることができる。例えば、ポリペプチドと試験する作用物質間の複合体形成を生存細胞又は固定細胞のいずれかで測定することができる。

【0132】

本発明は、それ故、BU101に関連する疾患を治療するために使用できる薬剤、化合物、又は他の作用物質に関するスクリーニングの方法を提供する。これらの方法は、作用物質をポリペプチド又はその断片に接触させ、作用物質とポリペプチド間の複合体の存在に関して、又はポリペプチドと細胞間の複合体の存在に関して検定することを含む。適当なインキュベーション後、遊離（又は複合体化していない）ポリペプチド又はその断片を結合形態で存在するものから分離し、遊離又は複合体化していない標識の量を、個々の作用物質がポリペプチドに結合する又はポリペプチド/細胞複合体に干渉する能力の測定として使用する。

【0133】

本発明はまた、ポリペプチドに結合することができる中和抗体が、ポリペプチド又はその断片への結合に関して試験作用物質と特異的に競合する、競合的スクリーニングアッセイの使用を包含する。このようにすると、抗体を使用して、ここで提供するようなBU101ポリペプチドと1つ又はそれ以上の抗原決定基を共有する試験サンプル中のポリペプチドの存在を検出することができる。

【0134】

スクリーニングのためのもう1つの手法は、ここで開示するBU101の少なくとも1個のポリペプチドに対して適当な結合親和性を有する化合物についての高流量スクリーニングを提供する。簡単に述べると、多数の異なる小さなペプチド試験化合物を、プラスチックピン又は他の何らかの表面のような固相上で合成する。ペプチド試験化合物をポリペプチドと反応させ、洗浄する。その後固相に結合したポリペプチドを当分野において周知の方法によって検出する。精製ポリペプチドはまた、ここで述べるスクリーニング手法で使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体を使用してポリペプチドを捕

獲し、固相上に固定することができる。例えば、参照してここに組み込まれる、1984年9月13日公開のEP84/03564号参照。

【0135】

合理的な薬剤デザインの目標は、目的とする生物活性ポリペプチド又はそれらと相互作用する作用物質、拮抗物質又は阻害因子を含めた小分子の構造アナログを生成することである。そのような構造アナログを使用して、より活性な又は安定な形態のポリペプチドである、又は生体内でポリペプチドの機能を高める又は機能に干渉する薬剤をデザインすることができる。参照してここに組み込まれる、J. Hodgson, *Bio/Technology* 9:19-21 (1991)。

【0136】

例えば、1つのアプローチでは、ポリペプチド又はポリペプチド-阻害因子複合体の三次元構造を、x線結晶構造解析、コンピュータモデリング、又は最も典型的には2つのアプローチの組合せによって決定する。分子の構造を解明し、活性部位を決定するためには、ポリペプチドの形状と電荷の両方が確認されねばならない。それらより頻度は低い、相同タンパクの構造に基づくモデリングによってポリペプチドの構造に関する有用な情報が得られることもある。どちらの場合も、類似ポリペプチド様分子をデザインするため、又は効率的な阻害因子を同定するために適切な情報が使用される。

【0137】

合理的薬剤デザインの有用な例は、参照してここに組み込まれる、S. Braxtonら、*Biochemistry* 31:7796-7801 (1992) が示したような改善された活性又は安定性を持つ分子、あるいはS. B. P. Athaundara、*J Biochem. (Tokyo)* 113(6):742-746 (1993) が示したような天然ペプチドの阻害因子、作用物質又は拮抗物質として働く分子を含みうる。

【0138】

また、上述したような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、その後その結晶構造を決定することも可能である。原則として、このアプロー

チはその後の薬剤デザインの基礎となりうるファーマコフォア (p h a r m a c o p h o r e) を生じる。さらに、機能的な、薬理的活性抗体に対する抗イデオタイプ抗体 (「 抗 i d 」) を生成することによってタンパクの結晶構造解析を回避することも可能である。鏡像の鏡像のように、抗 i d の結合部位はもとのレセプターのアナログである。そこで抗 i d を使用して、化学的又は生物学的に産生されたペプチドのバンクからペプチドを同定し、単離することができる。単離されたペプチドはその後ファーマコフォア (すなわち基本型薬剤) として働くことができる。

【 0 1 3 9 】

X線結晶構造解析のような分析試験を実施するのに十分な量の本発明の組換えポリペプチドを使用可能にすることができる。さらに、ここで提供する核酸配列から誘導しうるポリペプチドアミノ酸についての知識は、x線結晶構造解析の代わりに又はそれに加えて、コンピュータモデリング手法を使用する分析試験への指針を提供する。

【 0 1 4 0 】

B U 1 0 1 ポリペプチドに特異的な抗体 (例えば、抗 B U 1 0 1 抗体) は、さらに、ポリペプチドに結合することによってポリペプチドの生物学的作用を阻害するために使用しうる。このように、抗体は治療において、例えば乳癌とその転移を含めた乳房組織疾患を治療するために使用できる。

【 0 1 4 1 】

さらに、そのような抗体は、試験サンプル中に B U 1 0 1 ポリペプチドの存在又は非存在を検出でき、それ故、乳房組織疾患又は状態、特に乳癌の診断のための診断マーカーとして有用である。そのような抗体はまた、乳癌のような乳房組織疾患状態のための診断マーカーとしても機能しうる。

【 0 1 4 2 】

本発明はまた、本発明のポリペプチドの拮抗物質及び阻害因子を対象とする。かかる拮抗物質及び阻害因子は、ポリペプチドの機能を阻害する又は排除するものである。それ故、例えば、拮抗物質は本発明のポリペプチドに結合して、その機能を阻害する又は排除することができる。拮抗物質は、例えば、B U 1 0 1 ポ

リペプチドに結合することによってBU101ポリペプチドの活性を排除する、ポリペプチドに対する抗体でありうる、又は一部の 경우에는拮抗物質はオリゴヌクレオチドでありうる。小分子阻害因子の例は、小ペプチド又はペプチド様分子を含むがこれらに限定されない。

【0143】

拮抗物質及び阻害因子は、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール及びそれらの組合せを含めて、製薬上許容される担体と共に組成物として使用されうる。BU101ポリペプチド阻害因子の投与は好ましくは全身性である。本発明はまた、そのようなポリペプチドの作用を阻害する抗体を提供する。

【0144】

アンチセンステクノロジーを使用して、三重らせんの形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を低減することができ、前記の方法はいずれもDNA又はRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード領域を使用して、10-40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドがデザインされる。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関わる遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それによってBU101ポリペプチドの転写と産生を妨げる。三重らせんについては、例えば、Leeら、Nuc. Acids Res. 6:3073(1979); Cooneyら、Science 241:456(1988); 及びDervanら、Science 251:1360(1991)参照。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは生体内でmRNAにハイブリダイズして、mRNA分子のBU101ポリペプチドへの翻訳を遮断する。アンチセンスについては、例えば、Okano, J. Neurochem. 56:560(1991); 及びOligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)参照。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、分子を核溶解性開裂に対して耐性にする、人工的ヌクレオチド間結合を含むように改変したとき、より高い効率で作用す

る。そのような人工的ヌクレオチド間結合は、メチルホスホネート、ホスホロチオレート及びホスホロアミデートヌクレオチド間結合を含むが、これらに限定されない。

【0145】

組換えテクノロジー

本発明は、本発明のBU101ポリヌクレオチドを含む宿主細胞と発現ベクター、及びそれらがコードするポリペプチドの産生のための方法を提供する。そのような方法は、BU101ポリヌクレオチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養からBU101ポリペプチドを回収することを含む。

【0146】

本発明はまた、本発明のBU10ポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝学的に構築された宿主細胞、及び組換え手法による本発明のポリペプチドの産生を提供する。

【0147】

宿主細胞は、クローニングベクター又は発現ベクターである本発明のベクターで遺伝学的に構築される(トランスフェクション、形質導入又は形質転換される)。ベクターはプラスミド、ウイルス粒子、ファージ等の形態でありうる。構築された宿主細胞は、プロモーターを活性化する、トランスフェクションされた細胞を選択する、又はBU101遺伝子を増幅するために適宜修正した従来の栄養培地で培養できる。温度、pH等のような培養条件は、発現のために選択した宿主細胞に関してこれまで使用されているものであり、当業者には明白である。

【0148】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え手法によってポリペプチドを産生するために使用できる。すなわち、ポリヌクレオチド配列はポリペプチドを発現するための様々な発現媒体のいずれか1つ、特にベクター又はプラスミドに組み込まれる。そのようなベクターは、染色体、非染色体及び合成DNA配列、例えばSV40の誘導體；細菌プラスミド；ファージDNA；酵母プラスミド；プラスミドとファージDNAの組合せから誘導されるベクター；ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス及び仮性狂犬病ウイルスのようなウイルスDNAを

含む。しかし、他のどのようなプラスミド又はベクターも、宿主細胞において複製可能であり且つ生存可能であるかぎり使用できる。

【0149】

適切なDNA配列は様々な手順によってベクターに挿入しうる。一般に、DNA配列は、当分野において既知の手順によって適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。そのような手順その他は当業者の範囲内であると考えられる。発現ベクター内のDNA配列は、mRNA合成を指令する適切な発現制御配列（プロモーター）に機能的に連結される。そのようなプロモーターの代表的な例は、LTR又はSV40プロモーター、大腸菌（*E. coli*）lac又はtrp、ファージ PサブLプロモーター、及び原核又は真核細胞又はそれらのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーターを含むが、これらに限定されない。発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位及び転写タミネーターを含む。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含みうる。さらに、発現ベクターは、好ましくはジヒドロ葉酸レダクターゼ又は真核細胞培養のためのネオマイシン耐性のような、又は大腸菌におけるテトラサイクリン又はアンピシリン耐性のような、トランスフェクションされた宿主細胞の選択のための表現型特性を提供する遺伝子を含む。

【0150】

上述したような適切なDNA配列ならびに適切なプロモーター又は制御配列を含むベクターは、適切な宿主をトランスフェクションして、宿主にタンパクを発現させるために使用しうる。適切な宿主の代表的な例として、次のものが挙げられるであろう：大腸菌、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）；ストレプトミセス属（*Streptomyces sp.*）；酵母のような真菌細胞；ショウジョウバエ（*Drosophila*）及びSf9のような昆虫細胞；CHO、COS又はバウズ（Bowes）黒色腫のような動物細胞；植物細胞、等々。適切な宿主の選択は、ここで提供する教示から当業者の範囲内であると考えられる。

【0151】

より特定すると、本発明はまた、ここで広く述べたような配列の1つ又はそれ

以上を含む組換え構築物を含む。構築物は、正方向又は逆方向に、本発明の配列が挿入された、プラスミド又はウイルスベクターのようなベクターを含む。この実施形態の好ましい態様では、構築物はさらに、当該配列に機能的に連結された、例えばプロモーターを含めた調節配列を含む。多数の適当なベクター及びプロモーターが当業者に既知であり、市販されている。例として、下記のベクターが提供される。細菌：pINCY (Incyte Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, CA)、pSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD)、pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBs、ファージスクリプト、psiX174、pBluescript SK、pBskS、pNH8a、pNH18a、pNH46a (Stratagene)；pTrc99A、pKK223-3 pKK233-3 pDR540 pRIT5 (Pharmacia)；Eukaryotic；pWLneo、pSV2cat、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia)。しかし、他のいかなるプラスミド又はベクターも、宿主において複製可能であり、生存可能であるかぎり使用しうる。

【0152】

プラスミドpINCYは、一般に、ポリリンカー（マルチクローニングサイト）に2つの修飾を持つことを除いて、プラスミドpSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, MDより入手可能)と同一である。これらの修飾は、(1) HindIII制限部位を欠く、そして(2) そのEcoRI制限部位が異なる位置にある、ことである。pINCYは、HindIIIとEcoRIの両方でpSPORT1を開裂し、ポリリンカーの切り出した断片を合成DNA断片（配列番号7及び配列番号8）で置換することによって、pSPORT1から創造される。この置換は当業者に既知のどのような方法で行ってもよい。例えば、2個のヌクレオチド配列、配列番号7と配列番号8を5'末端リン酸で合成的に作製し、一緒に混合して、ねじれ末端(staggered end)ライゲーションを実施するための標準条件下で、HindIIIとEcoRIで切断したpSPORT1プラスミドにライゲートすること

ができる。次に適当な宿主細胞（大腸菌DH5 μ 細胞など）をライゲートしたDNAでトランスフェクションし、組換えクローンをアンピリシン耐性に関して選択する。その後個々のクローンからプラスミドDNAを調製して、正しい方向に挿入配列が存在することを確認するため、制限酵素分析又はDNA塩基配列決定に供する。当業者に既知の他のクローニング戦略も使用しうる。

【0153】

CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクター又は選択可能マーカーを持つ他のベクターを用いて、所望する遺伝子からプロモーター領域を選択することができる。2つの適当なベクターはpKK232-8とpCM7である。個々に命名されている細菌プロモーターは、lacI、lacZ、T3、SP6、T7、gpt、PサブR、PサブL及びtrpを含む。真核プロモーターは、即時初期サイトメガロウイルス（CMV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ、初期及び後期SV40、レトロウイルスからのLTR及びマウスメタロチオネイン-Iを含む。適切なベクターとプロモーターの選択は、十分に当分野における通常技術のレベル内である。

【0154】

さらなる実施形態では、本発明は上述した構築物を含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、哺乳類細胞のような高等真核細胞又は酵母細胞のような下等真核細胞であるか、又は細菌細胞のような原核細胞でありうる。宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、又は電気穿孔法によって実施できる（L. Davisら、Basic Methods in Molecular Biology、第2版、AppletonとLang, Paramount Publishing, East Norwalk, CT (1994)]。

【0155】

宿主細胞中の構築物は、組換え配列によってコードされる遺伝子産物を生成するために従来のように使用することができる。その代わりに、本発明のポリペプチドを従来ペプチドシンセサイザーによって合成的に産生することもできる。

【0156】

組換えタンパクは、適切なプロモーターの制御下で哺乳類細胞、酵母、細菌、又は他の細胞において発現されうる。細胞不含翻訳系も、本発明のDNA構築物から誘導したRNAを用いてそのようなタンパクを産生するために使用できる。原核及び真核宿主に関して使用するための適切なクローニング及び発現ベクターは、参照してここに組み込まれる、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(Cold Spring Harbor, NY, 1989)に記述されている。

【0157】

ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって、高等真核細胞による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写が高められる。エンハンサーは通常約10 - 300 bpのDNAのシス作用性要素であり、プロモーターに作用してその転写を高める。例としては、複製起点の後期側(塩基100 - 270)のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。

【0158】

一般に、組換え発現ベクターは、宿主細胞のトランスフェクションを可能にする複製の起点と選択可能マーカー、例えば大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子やビール酵母菌(*S. cerevisiae*) TRP1遺伝子、及び下流構造配列の転写を指令する高度発現遺伝子から誘導されるプロモーターを含む。そのようなプロモーターは、中でも特に、3-ホスホグリセレートキナーゼ(PGK)、因子、酸性ホスファターゼ、又は熱ショックタンパクのような解糖酵素をコードするオペロンから誘導できる。非相同構造配列を、適当なフェーズで、翻訳開始及び終止配列、そして好ましくは翻訳されたタンパクのペリプラズム空隙又は細胞外媒質中への分泌を指令することができるリーダー配列と共に構築する。任意に、非相同配列は、所望する特性、例えば発現される組換え産物の安定化又は精製の単純化をもたらすN末端同定ペプチドを含む融合タンパクをコードしうる。

【0159】

細菌での使用のために有用な発現ベクターは、所望するタンパクをコードする

構造的DNA配列を適当な翻訳開始及び終止シグナルと共に、機能的プロモーターを持つ作動可能なリーディングフェーズに挿入することによって構築される。ベクターは、1つ又はそれ以上の表現型選択可能マーカー、及びベクターの維持を確保し、所望する場合には、宿主内での増幅を提供するための複製起点を含む。トランスフェクションのための適当な原核宿主は、大腸菌、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 及び *Pseudomonas*、*Streptomyces* 及び *Staphylococcus* 属の様々な種を含むが、他のものも常套的選択肢として使用しうる。

【0160】

細菌での使用のために有用な発現ベクターは、選択可能マーカーと、周知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝的要素を含むプラスミドから誘導される細菌複製起点を含む。他のベクターは、PKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 及び GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI) を含むが、これらに限定されない。これらの pBR322 の「バックボーン」部分を適切なプロモーター及び発現される構造配列と組み合わせる。

【0161】

適当な宿主をトランスフェクションし、宿主を適切な細胞密度まで増殖させたあと、選択したプロモーターを適当な手段 (例えば温度変化又は化学誘導) によって抑制解除し、さらなる期間、細胞を培養する。細胞を典型的には遠心分離によって収集し、物理的又は化学的手段によって破壊して、生じた粗抽出物をさらなる精製のために保持する。タンパクの発現において用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、音波破碎、機械的破壊、又は細胞溶解剤の使用を含めた何らかの高都合な方法によって破壊することができる。そのような方法は当業者には周知である。

【0162】

様々な哺乳類細胞培養系も、組換えタンパクを発現するために使用できる。哺乳類発現系の例は、Gluzman, Cell 23:175 (1981) が述

べたサル腎線維芽細胞のCOS-7系統、及びC127、HEK-293、3T3、CHO、HeLa及びBHK細胞系統のような、適合性ベクターを発現することができる他の細胞系統を含む。哺乳類発現ベクターは、複製起点、適当なプロモーターとエンハンサー、そして同時に何らかの必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位及び受容部位、転写終止配列及び5'隣接非転写配列を含む。SV40ウイルスゲノムから誘導されるDNA配列、例えばSV40起点、早期プロモーター、エンハンサー、スプライス、及びポリアデニル化部位を使用して、必要とされる転写されない遺伝的要素を提供することができる。代表的な有用ベクターはpRc/CMV及びpcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA)を含む。

【0163】

BU101ポリペプチドは、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸アンモニウム又はエタノール沈降、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー又はレクチンクロマトグラフィーを含めた既知の方法によって組換え細胞培養から回収され、精製される。精製中に存在するカルシウムイオンは低濃度(約0.1-5mM)であることが好ましい[Priceら、J. Biol. Chem. 244:917(1969)]。ポリペプチドの構造を完成させるために、必要に応じて、タンパクの再折りたたみ段階が使用できる。最後に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が最終精製段階に使用できる。

【0164】

本発明のポリペプチドは、高発現細胞系統から発現される天然精製産物、又は化学合成手順の産物、あるいは原核又は真核宿主から組換え手法によって(例えば培養中の細菌、酵母、高等植物、昆虫及び哺乳類細胞によって)産生される産物でありうる。組換え製造法で用いる宿主に依存して、本発明のポリペプチドは哺乳類又は他の真核細胞の炭水化物でグリコシル化してもよく、又はグリコシル化しなくてもよい。本発明のポリペプチドはまた、初期メチオニンアミノ酸残基を含みうる。

【0165】

出発プラスミドは、公開されている既知の手法に従って入手可能なプラスミドから構築できる。さらに、記述されているものと等価のプラスミドが当分野において既知であり、当業者には明白であろう。

【0166】

下記は、cDNAクローンの単離と分析のための一般的手順である。ここで開示する特定実施形態では、乳房組織からmRNAを単離して、cDNAライブラリーを構築するために使用する。乳房組織は外科的切除によって患者から入手し、病理学者が腫瘍又は非腫瘍組織として分類する。

【0167】

乳房組織ライブラリーのランダムな単離物からのcDNAインサートを部分的に配列決定し、実施例で述べるように詳細に分析して、配列番号1、配列番号2及び配列番号3として配列表に開示する。また、クローン2083578H1及び603148HIの完全長配列[それぞれ2083578inh(配列番号4)及び603148inh(配列番号5)と称される]も、実施例で述べるように詳細に分析して、配列表に開示する。これらのインサートのコンセンサス配列を配列番号6として示す。これらのポリヌクレオチドは、特定遺伝子についての関連調節配列を伴う又は伴わないオープンリーディングフレーム全体を含むことがあり、又は目的遺伝子の一部だけをコードすることもある。これは、多くの遺伝子が数百、時には数千塩基の長さであって、現在のテクノロジーでは、ベクターの制限、第一鎖の不完全な逆転写又は第二鎖の不完全な複製のためにその全体をクローニングすることができないという事実に基づかれる。付加的ヌクレオチド配列を含む隣接二次クローンは、当業者に既知の様々な方法を用いて入手する。

【0168】

DNA塩基配列決定のための方法は当分野において周知である。従来の酵素的方法は、目的とするDNAテンプレートにアニーリングしたオリゴヌクレオチドプライマーからDNA鎖を伸長するために、DNAポリメラーゼ、クロー断片、Sequenase(US Biochemical Corp, Cleve

land, OH) 又は Taq ポリメラーゼを使用する。一本鎖及び二本鎖テンプレートの使用のための方法が開発されている。鎖停止反応産物を尿素/ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、オートラジオグラフィー(放射性ヌクレオチド標識した前駆物質に関して)又は蛍光(蛍光標識した前駆物質に関して)によって検出することができる。機械化された反応調製法、蛍光検出法を用いた配列決定と分析にもたらされた最近の改善は、Applied Biosystems 377 DNA Sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA) のような機器を使用して1日当りに決定できる配列数を拡大することを可能にした。

【0169】

ヌクレオチド配列の読み枠はいくつかの種類の種類によって確認できる。まず最初に、コード配列内に含まれる読み枠は、開始コドン ATG 及び終止コドン TGA、TAA 又は TAG の存在に関して分析できる。典型的には、1つの読み枠が cDNA 配列の主要部分を通じて継続し、他の読み枠は多数の終止コドンを含む傾向にある。そのような場合、読み枠の決定は容易である。他のより難しい場合には、さらなる分析が必要である。

【0170】

各々の推定上のコドントリプレットでの個々のヌクレオチド塩基の発生を分析するためのアルゴリズムが作り出された。例えば、J. W. Fickett, Nuc. Acids Res. 10: 5303 (1982) 参照。特定生物(細菌、植物及び動物)についてのコードDNAは、第三コドン位置でのピリミジンの有意の選択性のよう、特定トリプレット周期内に特定ヌクレオチドを含む傾向がある。これらの選択性は、所与の長さのDNAのコード潜在能(及びフレーム)を決定するために使用できる、広く使用可能なソフトウェアに組み込まれている。開始/停止コドン情報と組み合わせたアルゴリズム由来の情報を使用して、正しいフレームを高い度合の確実性で決定することができる。このことによって、今度は、正しい読み枠内の配列を適切な発現ベクターに容易にクローニングすることが可能となる。

【0171】

ここで開示する核酸配列は、十分に確立された組換えDNA手法によって様々な他のポリヌクレオチド配列及び目的とするベクターに連結することができる。J. Sambrookら、前出参照。目的ベクターは、プラスミド、コスミド、ファージ誘導体、ファージミドのようなクローニングベクター、ならびに配列決定、複製及び発現ベクター、等を含む。一般に、そのようなベクターは、少なくとも1つの生物において機能性である複製起点、都合のよい制限エンドヌクレアーゼ消化部位及び個々の宿主細胞に適した選択可能マーカを含む。ベクターは当業者の既知の様々な手段によって適当な宿主細胞に移入され、その後かかる宿主細胞が所望するDNA、RNA又はポリペプチドを産生する。

【0172】

時として、配列決定又はランダム逆転写の誤りが適切なオープンリーディングフレーム又は調節要素の存在を隠してしまうことがある。そのような場合には、ポリペプチドを発現させることを試みて、標準的なペプチドマッピング及び配列決定手法によってアミノ酸配列を決定することにより、正しい読み枠を決定することが可能である。F. M. Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY (1989) 参照。さらに、所与のヌクレオチド配列の実際の読み枠を、3つの潜在的読み枠すべてを含むベクターで宿主細胞をトランスフェクションすることによって決定できる。正しい読み枠内のヌクレオチド配列を持つ細胞だけが予想された長さのペプチドを産生する。

【0173】

ここで提供するヌクレオチド配列は、現在の技術水準の自動化された方法で調製され、それ自体で、同定されていないヌクレオチドを含みうる。これらが、本発明を実施しようとする当業者に問題を呈することはない。J. Sambrook (前出) 又はその定期的最新化資料に述べられている標準的な組換え手法を用いたいくつかの方法が、欠如している配列情報を完全にするために使用できる。ここで述べるような完全長の配列を得るために使用される同じ手法が、ヌクレオチド配列を入手するために使用しうる。

【0174】

特定 cDNA の発現は、適切な発現ベクターに cDNA をサブクローニングし、このベクターを適切な発現宿主にトランスフェクションすることによって実現しうる。乳房組織 cDNA ライブラリーの作製のために使用されるクローニングベクターが特定 cDNA の mRNA を転写するために使用でき、かかるベクターは、 λ -ガラクトシダーゼのためのプロモーター、アミノ末端 met 及びその後の λ -ガラクトシダーゼの 7 個のアミノ酸残基を含む。これら 8 個の残基のすぐ後は、人工的プライミングと転写のために有用な構築バクテリオファージプロモーター、ならびに EcoRI を含めたクローニングのための多数のユニーク制限部位である。大腸菌の適切な宿主菌株にベクターをトランスフェクションすることができる。

【0175】

標準的な方法を用いて単離された細菌株をイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) で誘導すると、 λ -ガラクトシダーゼの最初の 7 個の残基、約 15 残基のリンカー及び cDNA 内にコードされるペプチドを含む融合タンパクが生成される。cDNA クローンインサートは基本的にランダムなプロセスによって生成されるので、組み込まれた cDNA が適切な翻訳のための正しいフレーム内に位置する可能性は 3 回に 1 回である。cDNA が正しい読み枠にない場合には、試験管内突然変異誘発、エキソヌクレアーゼ III 又は大豆ヌクレアーゼによる消化、又はオリゴヌクレオチドリナーの組み込みを含めた周知の方法によって適切な数の塩基を欠失又は挿入することにより、正しい読み枠を得ることができる。

【0176】

上記の cDNA を、特異的宿主でのタンパクの発現に有用であることが知られる他のベクターにシャトルさせることができる。クローニング部位及び標的 cDNA の両末端の伸長部にハイブリダイズするのに十分な DNA のセグメントを含むオリゴヌクレオチドプライマーは、標準的な方法によって化学合成できる。次にこれらのプライマーを使用して、PCR により所望する遺伝子セグメントを増幅することができる。生じた新しい遺伝子セグメントを標準条件下で適切な制限酵素を用いて消化し、ゲル電気泳動によって単離することができる。その代わり

に、cDNAを適切な制限酵素で消化し、欠落している遺伝子セグメントに化学合成したオリゴヌクレオチドを充填することによって類似した遺伝子セグメントを作製することができる。1個以上の遺伝子からのコード配列のセグメントを相互にライゲーションして、適切なベクターにクローニングし、組換え配列の発現を至適化することができる。

【0177】

そのようなキメラ分子のための適当な発現宿主は、チャイニーズハムスターの卵巣(CHO)及びヒト胚の腎(HEK)293細胞のような哺乳類細胞、Sf9細胞のような昆虫細胞、ビール酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)のような酵母細胞、及び大腸菌のような細菌を含むが、これらに限定されない。これらの細胞系の各々に関して、有用な発現ベクターはまた、細菌中での増殖を可能にする複製起点、及び細菌中での選択を可能にする、 β -ラクタマーゼ抗生物質耐性のような選択可能マーカーも含みうる。さらにベクターは、トランスフェクションした真核宿主細胞における選択を可能にするための、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子のような第二の選択可能マーカーを含みうる。真核宿主細胞において使用するためのベクターは、目的配列がポリAを欠く場合には3'ポリAテールの添加を必要とする。

【0178】

さらに、当該ベクターは遺伝子発現を高めるプロモーター又はエンハンサーを含みうる。そのようなプロモーターは宿主特異的であり、CHO細胞に関するMMTV、SV40又はメタロチオネインプロモーター；細菌宿主に関する

、ヤギ、ヒツジ等によって産生される乳から組換えタンパクを回収することを含む。タンパクの精製を容易にするように、ポリペプチド及び緊密に関連する分子を組換えによって発現することができる。1つのアプローチは、天然ではヒトポリペプチド上に存在しない1つ又はそれ以上の付加的なポリペプチドドメインを含むキメラタンパクの発現を包含する。そのような精製促進ドメインは、固定化された金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンドメインのような金属キレート化ペプチド、固定化された免疫グロブリンでの精製を可能にするプロテインAドメイン、及びFLAG伸長/アフィニティー精製系(ImmuneX Corp, Seattle, WA)において使用されるドメインを含むが、これらに限定されない。ポリペプチド配列と精製ドメイン間の、第XA因子又はInvitrogen(San Diego, CA)からのエンテロキナーゼのような開裂可能なリンカー配列は、ポリペプチドを回収するために有用であると考えられる。

【0179】

イムノアッセイ

その断片、誘導体、およびアナログを含むBU101ポリペプチド、またはかかるポリペプチドを発現する細胞は乳房組織に対する抗体を検出するための種々のアッセイにおいて利用でき、その多くを本明細書において記載する。またこれらを抗体を作るための免疫原としても用いることができる。これらの抗体は例えばポリクローナルまたはモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖およびヒト化抗体並びにFab断片またはFab発現ライブラリーの生成物でよい。当該分野で周知の種々方法を用いてかかる抗体および断片を作ることができる。

【0180】

例えば本発明の配列を含んでなるポリペプチドに対して生じた抗体を、ポリペプチドを動物、例えばマウス、ウサギ、ヤギまたはヒトに直接注射するか、またはポリペプチドを動物に投与することにより得ることができる。マウス、ウサギまたはヤギが好ましい。ポリペプチドおよびその断片は配列番号20ないし29からなる群から選択される。このようにして得られた抗体はペプチドそのものに結合する。このように、ポリペプチドの断片のみをコードする配列を用いて元来

のポリペプチドに結合する抗体を作ることさえできる。次いでかかる抗体を用いて試験サンプル例えばそのポリペプチドを含有することが疑われる組織からポリペプチドを単離できる。モノクローナル抗体を製造するために、連続細胞系統培養により製造される抗体を提供するいずれかの技術を用いることができる。事例を挙げると、KohlerおよびMilstein、Nature, 256: 495-497 (1975)により記載されたハイブリドーマ技術、Kozborら、Immun. Today, 4: 72 (1983)により記載されたヒトB細胞ハイブリドーマ技術、並びにColeら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (アラン・アール・リス・インコーポレーティッド、ニューヨーク、ニューヨーク州) 77-96頁(1985)に記載されたヒトモノクローナル抗体を製造するためのEBVハイブリドーマ技術などがある。一本鎖抗体の製造に関して記載された技術を適用して本発明の免疫原性ポリペプチド生成物に対する一本鎖抗体を製造できる。例えば米国特許第4946778号(参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。

【0181】

種々のアッセイ様式、例えば「サンドウィッチ」イムノアッセイおよびプローブアッセイを本発明の抗体に利用できる。例えば本発明の抗体またはその断片を種々のアッセイ系で用いて、試験サンプル中あるとすればBU101抗原の存在を決定できる。例えば、第1のアッセイ様式では、固相にコーティングしたポリクローナルもしくはモノクローナル抗体またはその断片、またはこれらの抗体の組合わせを試験サンプルと接触させ、第1の混合物を形成する。抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下、第1の混合物をインキュベートする。次いでシグナル発生化合物を結合したモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはその断片、またはその組合わせを含んでなる指示試薬を抗原/抗体複合体と接触させて第2の混合物を形成する。次いで抗体/抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下、第2の混合物をインキュベートする。あるとすれば、固相上に捕捉された試験サンプル中のBU101抗原の存在を、シグナル発生化合物により生じる測定可能なシグナルを検出することにより決定する。試験サンプル中に存在するBU101抗原の量は生じたシグナルに比例する。

【0182】

別のアッセイ様式では(1)BU101抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、もしくはその断片または固体支持体に結合するかかる抗体の組み合わせ；(2)試験サンプル；および(3)シグナル発生化合物が結合した異なるBU101抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、もしくはその断片(またはこれらの抗体の組み合わせ)を接触させることにより混合物を形成する。抗体/抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下、この混合物をインキュベートする。あるとすれば、試験サンプルに存在し、固相上に捕捉されたBU101抗原の存在を、シグナル発生化合物により生じた測定可能なシグナルを検出することにより決定する。試験サンプル中に存在するBU101抗原の量は生じたシグナルに比例する。

【0183】

別のアッセイ様式では少なくとも二つの本発明のモノクローナル抗体の一つまたは組み合わせをBU101抗原に対する抗体の検出用競合プローブとして用いることができる。例えばBU101ポリペプチド例えば本明細書に開示する組換え抗原を単独で、または組み合わせて固相をコーティングする。次いでBU101抗原に対する抗体を含有することが疑われる試験サンプルをシグナル発生化合物および少なくとも一つの本発明のモノクローナル抗体を含んでなる指示試薬と共に、固相に結合した試験サンプルおよび支持試薬か、または固相に結合した支持試薬の抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下でインキュベートする。モノクローナル抗体の固相への結合の低下を定量的に測定できる。

【0184】

さらに別の検出法では、本発明のモノクローナルまたはポリクローナル抗体を免疫組織化学的分析による組織切片および細胞中のBU101抗原の検出に用いることができる。凍結または化学的に固定した組織サンプルから組織切片を切り取ることができる。細胞中で抗原を検出する場合、細胞を血液、尿、乳房吸引液、またはその他の体液から単離できる。外科手術または針のいずれかによるバイオプシにより細胞を得ることができる。磁性粒子または鉄液で標識した後、遠心または磁気引力により細胞を単離し、本発明の抗体で染色した細胞の特定の分画

を濃縮できる。これらの抗体を直接標識する（例えば蛍光、金コロイド、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ等用いる）かまたは2次標識抗種抗体を用いて標識（本明細書に実例を示す種々標識を用いる）して疾患の組織病理学を追跡する細胞化学分析もまた本発明の範囲内である。

【0185】

加えて、これらのモノクローナル抗体をCNBr-活性化セファロースに類似するマトリックスに結合でき、細胞培養物または生物学的組織からの特異的BU101ポリペプチドのアフィニティー精製に用い、例えば組換えおよび元来のBU101タンパク質を精製できる。

【0186】

また本発明のモノクローナル抗体を用いて治療用またはその他の類似の適用のためのキメラ抗体を生成することもできる。

【0187】

モノクローナル抗体またはその断片をBU101抗原を検出するために別個に提供できる。本明細書において提供するモノクローナル抗体（およびその断片）の組み合わせを、少なくとも一つの本発明のBU101抗体をその他のBU101領域に特異的に結合する抗体と共に（各抗体は異なる結合特性を有している）混合物または「カクテル」の構成成分として一緒に用いることもできる。このように、このカクテルは本明細書で開示するBU101ポリペプチドを指向する本発明のモノクローナル抗体、およびBU101抗原またはその他の関連するタンパク質のその他の抗原決定基に特異的なその他のモノクローナル抗体を含んでよい。

【0188】

アッセイ様式で用いることができるポリクローナル抗体またはその断片はBU101ポリペプチドまたはさらにアッセイで用いられる別のBU101ポリペプチドに特異的に結合すべきである。好ましく用いられるポリクローナル抗体はBU101ポリペプチドに結合する哺乳動物起源、例えばヒト、ヤギ、ウサギまたはヒツジポリクローナル抗体である。最も好ましくはウサギ起源のポリクローナル抗体である。アッセイで用いられるポリクローナル抗体は単独で、またはポリ

クローナル抗体のカクテルとしてのいずれかで用いることができる。アッセイ様式で用いられるカクテルはBU101ポリペプチドに対して異なる結合特異性を有するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかから成るので、これらは乳房の疾患および症状例えば乳癌の診断、病期決定、モニター観察、予知、インビボイメージング、予防もしくは処置、または素因決定に有用である。

【0189】

組換え抗原の使用および、ペプチドがBU101のアミノ酸配列を含んでなる合成ペプチドまたは精製ペプチドの使用によりアッセイにおいてBU101抗原を検出できるのは本発明の範囲内であることを企図する。かかるポリペプチドおよびその断片のアミノ酸配列は配列番号20ないし29からなる群から選択される。また異なるBU101エピトープを同定する異なる合成、組換えまたは精製ペプチドを組み合わせて乳房の疾患および症状例えば乳癌の診断、病期決定、モニター観察、予知、インビボイメージング、予防もしくは処置、または素因決定のためのアッセイに用いることができることも本発明の範囲内である。この場合、これらのペプチド全てを一つの固相にコーティングでき；または各々別個のペプチドを別個の固相、例えば微粒子にコーティングでき、次いで組み合わせて後にアッセイで用いることができるペプチド混合物を形成できる。さらに異なる抗原のエピトープを規定する複数のペプチドを乳房の疾患および症状例えば乳癌の診断、病期決定、モニター観察、予知、予防もしくは処置、または素因の決定に用いることができることが企図される。次いで固相にコーティングされたまたは検出可能な標識で標識されたペプチドを限定量の抗体に関して、（あるとすれば）患者サンプル中に存在する抗原と競合させる。合成、組換えまたは精製ペプチドと抗体（または複数の抗体）との結合の低下は患者サンプル中のBU101抗原の存在を示している。BU101抗原の存在により患者における乳房組織疾患、とりわけ乳癌の存在が示される。種々のアッセイ様式が当業者に周知であり、多くを本明細書後記にて論じる。

【0190】

別のアッセイ様式では抗BU101抗体および/またはBU101抗原の存在を以下に示す同時アッセイにおいて検出できる。試験サンプルを第1の分析物質

の捕捉試薬と同時に接触させ、ここで該捕捉試薬は、固相に結合した第1の分析物質に特異的な第1の結合メンバーおよび第2の分析物質のための捕捉試薬を含んでなり、ここで該捕捉試薬は第2の固相に結合した第2の分析物質のための第1の結合メンバーを含んでなり、それにより混合物を形成する。この混合物を捕捉試薬/第1分析物質および捕捉試薬/第2の分析物質複合体を形成するのに十分な時間および条件下でインキュベートする。次いでこれらのこのように形成した複合体を、シグナル発生化合物で標識した第1の分析物質に特異的な結合ペアのメンバーを含んでなる指示試薬、およびシグナル発生化合物で標識した第2の分析物質に特異的な結合ペアのメンバーを含んでなる指示試薬と接触させて第2の混合物を形成する。この第2の混合物を捕捉試薬/第1分析物質/指示試薬複合体および捕捉試薬/第2の分析物質/指示試薬複合体を形成するのに十分な時間および条件下でインキュベートする。試験サンプル中の一つまたはそれ以上の分析物質の存在の指標としていずれかまたは両方の固相に形成された複合体に関連して発生するシグナルを検出することにより、一つまたはそれ以上の分析物質の存在を決定する。このアッセイ様式では本明細書に開示する発現系に由来する組換え抗原、および本明細書に開示する発現系に由来するタンパク質から製造されるモノクローナル抗体を利用する。例えばこのアッセイ系においてBU101抗原を第1の分析物質にできる。かかるアッセイ系についてはEP公開番号0473065においてより詳細に記載されている。

【0191】

さらに別のアッセイ様式では、本明細書に開示されるポリペプチドを利用して試験サンプル中のBU101抗原に対する抗体の存在を検出できる。例えば試験サンプルを少なくとも一つのポリペプチド例えば組換えタンパク質または合成ペプチドが結合している固相と共にインキュベートする。ポリペプチドおよびその断片は配列番号20ないし29からなる群から選択される。これらを抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で反応させる。インキュベーションの後、抗原/抗体複合体を検出する。選択したアッセイ系に応じ、指示試薬を用いて検出を容易にできる。別のアッセイ様式では、試験サンプルを本明細書に記載されるように生成された組換えタンパク質が結合している固相と接触させ、

また指示試薬で好ましく標識されているタンパク質に特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体とも接触させる。抗体/抗原複合体を形成するのに十分な時間および条件下でインキュベートした後、遊離相から固相を分離し、固相または遊離相のいずれかにおいてBU101抗原に対する抗体の存在の指標として標識を検出する。本明細書に開示される組換え抗原を用いる別のアッセイ様式も企図される。これらには試験サンプルを、第1の供給源に由来する少なくとも一つの抗原が結合している固相と接触させ、固相および試験サンプルを、抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下でインキュベートし、次いで固相を、第1の供給源とは異なる第2の供給源に由来する、標識した抗原と接触させる。例えば第1の供給源例えば大腸菌(E. coli)に由来する組換えタンパク質を捕捉用抗原として固相上で用い、試験サンプルをこのように調製した固相に加え、続いて判断されるかまたは必要とされる場合、標準的なインキュベーションおよび洗浄工程を実施し、異なる供給源(すなわち大腸菌以外)に由来する組換えタンパク質を続いて検出される指示試薬の一部として用いる。同様に固相上の組換え抗原および指示物質相の合成ペプチドの組み合わせもまた可能である。捕捉抗原として第1の供給源から生成されるかまたは由来するBU101に特異的な抗原および異なる第2の供給源からのBU101に特異的な抗原を利用するいずれかのアッセイ様式が企図される。このように、組換え抗原の種々組み合わせおよび合成ペプチド、精製タンパク質等の使用は本発明の範囲内である。このおよびその他のアッセイのごときアッセイが米国特許第5254458号に記載されており、これは所有権を共有し、参照により本明細書に組み込まれる。

【0192】

種々のその他の固相を利用するその他の態様もまた企図され、本発明の範囲内である。例えば負に荷電した重合体(EP公開番号0326100およびEP公開番号0406473)で固定化できる反応複合体を固定するためのイオン捕捉法を本発明に従って用い、高速液相免疫化学反応を行うことができる。負に荷電したポリアニオン/免疫複合体および予め処理した、正に荷電した多孔性マトリックス間のイオン相互作用により、残りの反応混合物から固定可能な免疫複合体を分離し、前記した種々シグナル発生系、例えばEPO公開番号0273115

に記載される化学ルミネサンスシグナル測定に記載されるものなどを用いて検出する。

【0193】

また、本発明の方法を、固相が微粒子（磁性または非磁性）を含んでなる自動および半自動システムなどの微粒子技術を利用する系に適用できる。かかる系には例えば各々公開EPO出願番号EPO425633およびEPO424634に記載されるものなどがある。

【0194】

イムノアッセイのための走査プローブ顕微鏡（SPM）の使用もまた本発明のモノクローナル抗体を容易に適用できる技術である。走査プローブ顕微鏡、とりわけ原子力顕微鏡では、捕捉相例えば少なくとも一つの本発明のモノクローナル抗体を固相に付着させ、走査プローブ顕微鏡を用いて固相表面に存在し得る抗原／抗体複合体を検出する。トンネル顕微鏡の使用により抗原／抗体複合体を検出するために通常多くのイムノアッセイ系において用いなければならない標識の必要性が排除される。特異的結合反応をモニター観察するためにSPMが多くの方法において使用できる。一つの態様では、特異的結合パートナーの一つのメンバー（本発明のモノクローナル抗体である分析物質特異的物質）を走査に適当な表面に結合する。プラスチック性または金属性表面の固相からなる試験片に吸着させることにより分析物質特異的物質を結合でき、続いて当業者に周知の方法を実施する。または、特異的結合パートナー（分析物質特異的物質）の、誘導プラスチック、金属、シリコンもしくはガラスの固相からなる試験片への共有結合を利用できる。共有結合法は当業者に周知であり、特異的結合パートナーを試験片に非可逆的に結合する種々の手段を含む。試験片がシリコンまたはガラスである場合、特異的結合パートナーに結合する前に表面を活性化しなければならない。また、高分子電解質相互作用を用いる技術および化学により特異的結合パートナーを試験片表面に固定できる。好ましい結合方法は共有結合的手段による。特異的結合メンバーの結合に続いて、表面をさらに血清、タンパク質または非特異的結合を最低にするその他の遮断物質のごとき物質と反応させることができる。またアッセイ目的でその適合性を変化させるために製品の部位または使用する点

のいずれかで表面をも走査できる。走査方法により試験片の特異的結合特性は変化しないと予測される。

【0195】

本発明は固相の使用が好ましいことを開示しているが、試薬例えば本発明の抗体、タンパク質およびペプチドを非固相アッセイ系において利用できることを企図している。これらのアッセイ系は当業者に周知であり、本発明の範囲内であると考えられる。

【0196】

アッセイに用いられる試薬を一つまたはそれ以上の容器例えばバイアルまたはビンを含む試験キットの形態で提供でき、各々の容器はアッセイで用いられる別個の試薬例えばプローブ、プライマー、モノクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体のカクテル、またはポリペプチド（例えば組換えにより、合成的に製造されたまたは精製された）を含有する。ポリペプチドおよびその断片は配列番号20ないし29からなる群から選択される。その他の構成成分例えばバッファー、対照等は当業者に周知であり、かかる試験キットに含んでよい。入手可能な体液例えば血液、尿、唾液および便を含んでなる試験サンプルを収集する手段を有する試験キットを提供することを企図する。収集に有用なかかる手段（「収集用材料」）には血液を収集および安定化するためのランセットおよび吸収用紙または布；唾液を収集および安定化するための綿棒；尿または便を収集および安定化するためのカップなどがある。サンプルの変性または非可逆的な吸着を避けるために、収集用材料、紙、布、綿棒、カップ等を処理してもよい。また標本の完全性の維持を補助するために、収集用材料は保存剤、安定化剤または抗菌剤で処理されるか、またはこれらを含み得る。外科手術または針によるバイオプシで得られる試験標本を収集、安定化および保存するために設計されたキットもまた有用である。すべてのキットは別個に提供され得る二つの構成部分から構成されており；一つの構成部分は標本の収集および輸送のためのものであり、もう一つの構成部分は標本の分析のためのものである。例えば収集用の構成部分は一般市場の利用者に提供され、一方分析用構成部分は分析物質の存在、不在または量を決定する研究者などに提供される。さらに試験標本の収集、安定化および保存の

ためのキットは熟練者以外の人による使用のために構成され、家庭で使用し、続いて試験サンプルの分析のために研究室に輸送されるためのもので、一般市場で入手できる。

【0197】

インビボ抗体使用

本発明の抗体をインビボで用いることができる；すなわち、乳房の疾患を有することが疑われるまたは乳房の疾患を有する患者に診断または治療用途でこれらを注射できる。インビボ診断のための抗体の使用は当該分野で周知である。Sumerdonら、Nucl. Med. Biol., 17:247-254(1990)では標識としてインジウムIIIを用いる胎児性癌抗原(CEA)発現腫瘍の放射性免疫シンチグラフィによる画像化のために最適化された抗体キレート化剤について記載している。Griffinら、J. Clin. Onc., 9:631-640(1991)では再発性結腸直腸癌が疑われる患者の腫瘍の検出におけるこの薬物の使用について記載している。磁気共鳴による画像化のための標識として常磁性イオンを有する類似の物質の使用は当該分野で周知である(R. B. Lauffer、Magnetic Resonance in Medicine, 22:339-342(1991))。BU101抗原に対して指向する抗体を乳房の疾患例えば乳癌が疑われる患者に、患者の病態の診断または病期決定の目的で注射できる。用いる標識は選択した画像化様式に依存する。放射性標識例えばインジウムIII、テクネチウム99mまたはイオダイン131を平面走査または単光子放出コンピューター断層撮影(SPEC)に用いることができる。陽電子放出標識例えばフルオリン19を陽電子放出断層撮影(PET)に用いることもできる。MRIでは常磁性イオン例えばガドリニウム(III)またはマンガナーゼ(II)を用いることができる。乳房内または乳房外の標識の局在により疾患の拡散を決定できる。乳房内の標識の量により乳癌の存在または不在を決定できる。

【0198】

乳房の疾患を有することが解っている患者にBU101抗原に対して指向する抗体を注射するのは治療上有効である。抗体は組織または器官上または内に発現

するBU101抗原に結合することにより結合物質を用いることなく抗体は効果を奏することができる。また別に、治療効果を高めるために抗体を細胞毒例えば薬物、毒素または放射性核種に結合できる。GarnettおよびBaldwin、Cancer Research, 46:2407-2412(1986)では薬物-モノクローナル抗体結合体の調製について記載している。Pastanら、Cell, 47:641-648(1986)では種々癌の治療のためのモノクローナル抗体に結合した毒素の使用について説明している。GoodwinおよびMeares、Cancer Supplement, 80:2675-2680(1997)では、腫瘍に対する用量は最大であるが、正常組織毒性を制限する種々ストラテジーにおけるイトリウム90標識モノクローナル抗体の使用について記載している。その他の周知の細胞毒性放射性核種にはコパー67、イオダイン131およびレニウム186などがあり、これらは全て乳癌の治療のためのBU101抗原に対して指向するモノクローナル抗体の標識に用いることができる。

【0199】

大腸菌(E. coli)(クローン603148H1および2083578H1)を各々1996年10月7日および1998年3月9日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A.T.C.C.)、10801ユニバーシティー・プールバード、マナサス、バージニア州に寄託した。寄託はブダペスト条約のもとでなされ、寄託日から30年間または寄託の最後の要請の後5年間、または米国特許の強制期間の間、いずれかの長い期間維持される。本明細書に記載する寄託およびその他の寄託物質は便宜的にのみ提供されるものであって、本明細書に提供される教示の観点で本発明の実施に必要ではない。寄託物質全てにおけるcDNA配列を参照により本発明書に組み込まれる。クローン603148H1はA.T.C.C.寄託番号98185に一致する。クローン2083578H1はA.T.C.C.寄託番号98684に一致する。

【0200】

本発明をここで実施例により記載するが、これは説明を意味するものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0201】

実施例

実施例1：乳房組織ライブラリーBU101遺伝子特異的クローンの同定

A．発現配列タグ(EST)または転写イメージのライブラリー比較

cDNAクローンインサートの部分配列、いわゆる「発現配列タグ」(EST)を乳房腫瘍組織、乳房非腫瘍組織および腫瘍および非腫瘍の両方の多くのその他の組織から作ったcDNAライブラリーから誘導し、遺伝子転写イメージとしてデータベース(ライフセック(商標)データベース、インサイト・ファーマシューティカルズ、パロアルト、カリフォルニア州より入手可能)に入力した。国際公開番号WO95/20681を参照のこと。(転写イメージは所定の組織ライブラリーにおける代表的な遺伝子の各々のESTの番号の一覧である。成熟配列重複のEST共有領域をクラスタに分類する。クラスタに代表的な5'ESTからクローン番号を割り当てる。しばしば、そのコンセンサス配列を自動クラスタ化の基準に合致しなかったその他のESTの配列と比較することにより、目的のクラスタを拡大できる。全ての可能なクラスタおよび単一のESTのアラインメントはコンセンサス配列を誘導するコンティグを表す)。次いで転写イメージを評価して主に乳房組織ライブラリーを代表するEST配列を同定する。次いで標的ライブラリーにおける存在度(発生量)およびバックグラウンドライブラリーの不在度に従ってこれらの標的クローンをランク分けした。バックグラウンドの発生量が低い存在度の高いクローンを優先的に高次の研究に用いた。BU101のコンセンサス配列に対応するESTは乳房組織ライブラリーの25.6%(39のうち10)に見出された。コンセンサス配列、配列番号6(またはその断片)に対応するESTはデータベースのその他の非乳房ライブラリーの1.06%(754のうち8)にしか見出されなかった。従って、コンセンサス配列またはその断片が非乳房組織よりも乳房組織において24.1倍以上多く見出された。重複クローン2083578H1(配列番号1)、603148H1(配列番号2)、604290H1(配列番号3)の各々がさらなる研究のために同定された。これらは、コンティグを形成するのに必要な最低数のクローン(クローン2083578H1および603148H1の配列全長[各々2083578i

n h (配列番号4) および603148 i n h (配列番号5) と称する] に沿って) を示し、そこから本明細書において提供されるコンセンサス配列 (配列番号6) が誘導された。

【0202】

B. コンセンサス配列の生成

クローン2083578H1のヌクレオチド配列 (配列番号1)、603148H1のヌクレオチド配列 (配列番号2)、604290H1のヌクレオチド配列 (配列番号3) およびクローン2083578H1および603148H1のヌクレオチド配列の配列全長 [各々2083578 i n h (配列番号4) および603148 i n h (配列番号5) と称する] をシーケンチャー (商標) プログラム (ジーン・コース・コーポレーション、アンアポール、ミシガン州) に入力してヌクレオチドアラインメントシ (コンティグマップ) を作成し、次いでそのコンセンサス配列 (配列番号6) を作った。図1はこれらのクローンのヌクレオチド配列アラインメントおよび得られたヌクレオチドコンセンサス配列 (配列番号6) を示す。図2はクローン2083578H1 (配列番号1)、603148H1 (配列番号2)、604290H1 (配列番号3) およびクローン2083578H1および603148H1の配列全長 [各々2083578 i n h (配列番号4) および603148 i n h (配列番号5) と称する] を示すコンティグマップを表し、グラフィックディスプレイでBU101遺伝子の重複領域およびこれらのクローンの得られたコンセンサスヌクレオチド配列 (配列番号6) を形成する。これに従い、コンセンサス配列 (配列番号6) で3フレーム翻訳を実施した。第1の順行フレームは配列番号20として表される90残基のアミノ酸配列をコードするオープン・リーディング・フレームを有することが見出された。オープン・リーディング・フレームは配列番号6のヌクレオチド97ないし366に対応する。当業者に周知のソフトウェアおよび技術を用いて配列番号20の90残基アミノ酸配列を確立された配列と比較した。ラット前立腺ステロイド結合タンパク質 (p s c . 1 . p e p) のポリペプチド配列が配列番号20のBU101ポリペプチド配列に部分的に相同であることが見出された。このラット前立腺ステロイド結合タンパク質はP a r k e r ら、N a t u r e , 298 :

92-94(1982)に記載されている。

【0203】

ライフセック(商標)データベースの分析によりコンセンサヌクレオチド配列(配列番号6)の254位置におけるT/C多型の可能性が示された。データベースにおいてCヌクレオチド変種が33発生し、Tヌクレオチド変種が8発生した。ヌクレオチド254におけるこの多型性の結果、プロリン(CCG)およびロイシン(CTG)間でアミノ酸がシフトする。

【0204】

実施例2: BU101EST特異的クローンのシーケンシング

周知の方法[F. Sangerら、PNAS U.S.A. 74:5463(1977)]に従って、色素ターミネーターを用いるジデオキシ終止シーケンシングによりBU101遺伝子コンティグのクローン2083578H1、603148H1のDNA配列を決定した(各々配列番号4および配列番号5)。

【0205】

ベクター例えばpSPORT1(ライフ・テクノロジーズ・ガイザースブルグ、メリーランド州)およびpINCY(インサイト・ファーマシューティカルズ・インコーポレーティッド、パロアルト、カリフォルニア州から入手可能)がインサートの3'および5'ライゲーション接合部にちょうど隣接するユニバーサル・プライミング部位を含有するので、ユニバーサルプライマー、配列番号9および配列番号10(各々ニューイングランド・バイオラプス、ベバリー、メリーランド州およびアプライド・バイオシステムズ・インコーポレーティッド、フォスター・シティー、カリフォルニア州)を用いて両方向でインサートをシーケンシングした。ポリアクリルアミド変性ゲルにシーケンシング反応物を流し、アプライド・バイオシステムズ377シーケンサー(アプライド・バイオシステムズ、フォスター・シティー、カリフォルニア州より入手可能)により配列を決定した。コンセンサ配列、配列番号6の配列情報から別のシーケンシングプライマー、配列番号11および配列番号12を設計した。次いで、前記するように、これらのプライマーを用いて各DNA鎖からクローン化したインサートの残りのDNA配列を決定した。

【0206】

実施例3：核酸

A．組織からのRNA抽出

全RNAを乳房組織および乳房以外の組織から単離した。当該分野で周知のKatoら(J. Virol. 61: 2182-2191 (1987))に記載されている塩化リチウム/尿素技術およびトリゾール(商標)(ギブコ・ビー・アール・エル、グランドアイランド、ニューヨーク州)など(これに限定するものではない)の種々方法を用いることができる。

【0207】

簡単には、組織を滅菌コニカルチューブ中氷上に置き、3M LiCl、6M 尿素、5mM EDTA、0.1Mメルカプトエタノール、50mM トリスHCl (pH7.5)を加えた。ポリトロン(登録商標)ホモジナイザー(ブリクマン・インストラメンツ・インコーポレーティッド、ウェストベリー、ニューヨーク州)で氷上30ないし50秒間、組織をホモジナイズした。溶液を15mlプラスチック遠心チューブに移し、-20で一晩放置した。チューブを9000xg、0ないし4で90分間遠心し、上澄を即座にデカンテーションした。3M LiCl 10mlを加え、チューブを5秒間攪拌した。チューブを11000xg、0ないし4で45分間遠心した。デカンテーション、LiCl中への再懸濁および遠心を繰り返し、最終的に得られたペレットを空気乾燥し、1mM EDTA、0.5% SDS、10mM トリス(pH7.5) 2mlに懸濁した。プロテイナーゼK(20mg/ml) 20μlを加え、溶液を37で30分間時々混合しながらインキュベートした。3M NaClの10分の1容量(0.22ないし0.25ml)を加え、溶液を攪拌し、その後フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(PCI) 2mlを含有する別のチューブに移した。チューブを1ないし3秒間攪拌し、3000xg、10で20分間遠心した。PCI抽出を繰り返し、続いてクロロホルム/イソアミルアルコール(CI)で2回類似の抽出を行った。最終的に得られた水溶液を予め冷却した、無水エタノール6mlを含有する15mlコレックスガラスチューブに移し、チューブをパラフィンで覆い、-20で一晩放置した。チューブを10

000 × g、0ないし4 で30分間遠心し、エタノール上澄を即座にデカンテーションした。RNAペレットを75% 氷冷エタノール10mlで4回洗浄し、最終的に得られたペレットを室温で15分間空気乾燥した。RNAを10mM TE (pH7.6、1mM EDTA) 0.5mlに懸濁し、分光測光法によりその濃度を測定した。RNAサンプルを等分し、エタノール沈殿物として-70 で保存した。

【0208】

RNAの品質をアガロースゲル電気泳動(実施例5、ノーザン・ブロット分析を参照のこと)により決定し、0.5 μg/ml 臭化エチジウムで1時間染色した。完全なりボソームRNAを含有しないRNAサンプルはこの研究から排除した。

【0209】

別法として、RT-PCR分析では、ウルTRASPECK RNA試薬1mlを2.0ml ポリプロピレンマイクロヒュッジチューブ中の微粉碎した組織120mgに加え、ポリトロン(登録商標)ホモジナイザー(ブリンクマン・インストラメンツ・インコーポレーティッド、ウェストベリー、ニューヨーク州)で50秒間ホモジナイズし、氷上に5分間置いた。次いで各サンプルにクロロホルム0.2mlを加え、続いて15秒間攪拌した。氷上にさらに5分間サンプルを置き、続いて12000 × g、4 で15分間遠心した。上層を収集し、別のRNアーゼ不含2.0ml マイクロヒュッジチューブに移した。イソプロパノールの等容量を各サンプルに加え、溶液を氷上に10分間置いた。サンプルを12000 × g、4 で10分間遠心し、上澄を捨てた。残ったペレットを冷75% エタノールで2回洗浄し、攪拌して再懸濁し、次いで再懸濁した物質を7500 × g、4 で5分間遠心してペレット化した。最後に、RNAペレットをスピードバック(サバント、ファーミングデール、ニューヨーク州)中5分間乾燥し、RNアーゼ不含水中で再構築した。

【0210】

B. 血液単核細胞からのRNA抽出

以下のとおりフィコール・ハイパークを用いて遠心により患者の血液サンプル

から単核細胞を単離する。全血10ml容量を等容量のRPMIメジウム（ギブコ・ビー・アール・エル、グランドアイランド、ニューヨーク州）と混合する。次いでこの混合物の下にフィコール・ハイパーク（ファルマシア、ピスカッタウェイ、ニュージャージー州）10mlを層化し、200×gで30分間遠心する。単核細胞を含有するバッフィーコートを取り除き、ダルベッコPBS（ギブコ・ビー・アール・エル、グランドアイランド、ニューヨーク州）で50mlに希釈し、混合物を200×gで10分間遠心する。2回洗浄した後、得られたペレットをダルベッコPBSに再懸濁し最終容量を1mlにする。

【0211】

N. Katoら、J. Virology, 61: 2182 - 2191 (1987)に記載されるように、単離された単核細胞からRNAを調製する。簡単には、ペレット化した単核細胞を最終容量1mlにし、次いでPBS 250μlに再懸濁し、3M LiCl、6M 尿素、5mM EDTA、0.1M 2-メルカプトエタノール、50mM トリスHCl (pH 7.5) 2.5mlと混合する。得られた混合物をホモジナイズし、20 で一晩インキュベートする。ベックマンJ2-21Mローター中ホモジネートを8000rpm、0ないし4 で90分間遠心する。ペレットを3M LiCl 10ml中攪拌して再懸濁し、次いでベックマンJ2-21Mローター中10000rpm、0ないし4 で45分間遠心する。次いで再懸濁およびペレット化を繰り返す。ペレットを1mM EDTA、0.5% SDS、10mM トリス (pH 7.5) および400μg プロテイナーゼK 2mlに攪拌しながら再懸濁し、次いで振盪しながら37 で30分間インキュベートする。次いで3M NaClの10分の1容量を加え、混合物を攪拌する。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI) を用いて抽出サイクルを2回行い、続いてクロロホルム/イソアミルアルコール (CI) を用いて1回抽出してタンパク質を除去する。無水エタノール6mlを添加してRNAを沈殿させ、続いて-20 で一晩インキュベートする。遠心により沈殿したRNAを収集した後、ペレットを75%エタノールで4回洗浄する。次いでペレット化したRNAを1mM EDTA、10mM トリスHCl (pH 7.5) を含有する溶液に溶解する。

【0212】

陰性対照として乳房以外の組織を用いる。市販により入手可能なキット例えばポリアデニル化RNAを単離するためのオリゴdTセルローススピンカラム(ファルマシア、ウプサラ、スウェーデンのレディコール(商標))を用いることにより全RNAからmRNAをさらに精製できる。リボヌクレアーゼ保護アッセイで分析するために、溶解バッファー(5M グアニジンチオシアネート、0.1M EDTA、pH7.0)に全RNAまたはmRNAを溶解する。

【0213】

C. ポリソームからのRNA抽出

組織をセイライン中4 で切り刻み、6mM 2-メルカプトエタノール含有TK₁₅₀M(150mM KCl、5mM MgCl₂、50mM トリスHCl、pH7.4)溶液中0.8M スクロース2.5容量と混合する。B. Mechler、Methods in Enzymology, 152:241-248(1987)に記載されるように、組織をテフロン(登録商標)・ガラス・ポッター・ホモジナイザーで100ないし200rpmで5ストローク、続いてドゥンス・ホモジナイザーで6ストロークでホモジナイズする。次いでホモジネートを12000×g、4 で15分間遠心し、核を沈殿させる。TK₁₅₀M中2.5M スクロース6mlで上澄2mlを混合することによりポリソームを単離し、38ml ポリアロマーチューブ中TK₁₅₀M中2.5M スクロース4mlの上にこの混合物を層化する。抽出物分画の上にさらに連続して2回スクロースTK₁₅₀M溶液を層化する；第1の層、2.05Mスクロース13ml、続いて第2の層、1.3M スクロース6ml。90000×g、4 で5時間グラジエントを遠心してポリソームを単離する。次いでシリコン処理したパステュールピペットで1.3M スクロース/2.05M スクロース接触面から分画を取り、等容量のTE(10mM トリスHCl、pH7.4、1mM EDTA)で希釈する。等容量の90 SDSバッファー(1% SDS、200mM NaCl、20mM トリスHCl、pH7.4)を加え、沸騰水浴中2分間溶液をインキュベートする。次にプロテイナーゼK消化(50mg/ml)を用いて37 で15分間タンパク質を消化する。フェノール-クロ

口ホルム抽出物3等容量でmRNAを精製し、続いて2M 酢酸ナトリウム(pH 5.2) 0.1容量および100%エタノール2容量で-20℃で一晩沈殿させる。12000×g、4℃で10分間遠心して沈殿したRNAを回収する。RNAを乾燥し、TE(pH 7.4)または蒸留水に再懸濁する。次いで再懸濁したRNAをスロットプロットまたはドットプロットハイブリダイゼーションアッセイに用いてBU101 mRNAの存在を確認する(実施例6を参照のこと)。

【0214】

核酸及びタンパク質の品質は用いる調製法に依存する。標的分子の単離効率を最大にするために各サンプルに異なる調製技術が必要であろう。これらの調製技術は通常の技術範囲内である。

【0215】

実施例4：リボヌクレアーゼ保護アッセイ

A. 標識した相補的RNA(cRNA)ハイブリダイゼーションプローブおよび標識していないセンス鎖の合成

キアゲン・プラスミド・精製キット(キアゲン、チャッツウォース、カリフォルニア州)を用いて記載した、BU101遺伝子cDNA配列を含有し、対立するSP6およびT7ポリメラーゼプロモーターでフランキングされたpPORT1プラスミド、クローン603148H1を精製した。次いでDdeI制限酵素10単位を用いて37℃で1時間切断することによりプラスミド10μgを直線化した。QIAプレップキット(キアゲン、チャッツウォース、カリフォルニア州)を用いて直線化したプラスミドを精製し、これを用いて供給者の指示書に記載されるように、リボプローブ(登録商標)インビトロ転写システム(プロメガ・コーポレーション、マジソン、ウィスコンシン州)を用いてSP6プロモーターから6.3μM(アルファ³²P)UTP(アマーシャム・ライフ・サイエンス・インコーポレーティッド、アーリントン・ハイツ、イリノイ州)で標識したアンチセンス転写物を合成した。センス鎖を作るために、精製プラスミド10μgを制限酵素XbaI 10単位およびNotI 10単位で切断し、前記のようにT7プロモーターから転写した。センス鎖およびアンチセンス鎖の両

方をスピンカラムクロマトグラフィーにより単離した。260 nmにおけるUV吸収により未標識センス鎖を定量した。

【0216】

B. 標識プローブの標的へのハイブリダイゼーション

液体窒素下凍結組織を粉末に粉碎し、100ないし500 mgを、ダイレクトプロテクト(商標)ライゼートRNアーゼ保護キット(アンピオン・インコーポレーティッド、オースティン、テキサス州)の構成成分と同様に利用できる溶解バッファー1 mlに溶解した。さらに組織ホモジナイザーを用いて溶解を達成した。加えて、陽性対照として使用するためにマウス肝臓ライゼートのセンス鎖の既知の量からなる一連の希釈物を作った。最終的に、溶解した組織すなわち希釈したセンス鎖45 µlを溶解バッファー5 µl中放射性標識プローブ 1×10^5 cpmと直接混合した。37 °Cで一晩ハイブリダイゼーションを進行させた。

【0217】

C. RNアーゼ消化

ダイレクト・プロテクト(商標)プロトコルに従ってRNアーゼAおよびRNアーゼT1の溶液を用いて37 °Cで30分間でプローブにハイブリダイズしなかったRNAを反応物から除去し、続いてサルコシルナトリウムの存在下プロテイナーゼK消化によりRNアーゼを除去した。次いで消化から保護されたハイブリダイズされた断片を等容量のイソプロパノールを添加することにより沈殿させ、-70 °Cで3時間放置した。12000 × gで20分間の遠心により沈殿物を収集した。

【0218】

D. 断片分析

染料(80%ホルムアミド、10 mM EDTA (pH 8.0)、1 mg/mlキシレンシアノール、1 mg/mlプロモフェノールブルー)を加えた変性ゲルに沈殿物を溶解し、熱変性し、6%ポリアクリルアミドTBE、8 M尿素変性ゲルで電気泳動した。ゲルを画像化し、ストーム(商標)保存蛍光体オートラジオグラフィーシステム(モレキュラー・ダイナミクス、サニーベール、カリフォルニア州)を用いて分析した。試験サンプルから得られたピーク面積

を陽性対照センス鎖の周知の希釈物（前記のセクションBを参照のこと）から得られたピーク面積と比較することによりフェムトグラム（fg）に現れた保護断片のバンドを定量した。加えて、ライゼート中のDNA濃度を評価して試験サンプルライゼート中の細胞数を推測した。結果をBU101 RNA分子/細胞の画像評価スコアとして表した（表1）。

【0219】

【表1】

表1：RNアーゼ保護の結果

組 織	BU101 RNA/細胞	スコア*
正常乳房	10	+
正常乳房	7	+
正常乳房	8	+
正常乳房	2	+
正常乳房	0.2	+
乳癌	>46	3+
乳癌	0.3	+
乳癌	0	-
乳癌	>87	3+
乳癌	0	-
正常肺	0	-
肺癌	0	-
正常結腸	0	-

*保護断片が検出されなかったサンプルを「-」と評し；保護断片が検出され、そのfg値が標準曲線内にあったサンプルを「+」と評し；保護断片が検出され、そのfg値が標準曲線の2ないし10倍であったサンプルを「2+」と評し；保護断片が検出され、そのfg値が標準曲線の10倍またはそれ以上であったサンプルを「3+」と評した。

【0220】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列からなる生成物の検

出はBU101 mRNAの存在を示すものであり、乳房組織疾患または症状例
えば乳癌の診断を示唆するものである。

【0221】

実施例5：ノーザンブロットィング

ノーザンブロットィングは当該分野で周知の技術である。ノーザンブロット技術を用いて、ゲル電気泳動および核酸ハイブリダイゼーションを用いてRNAの複合集団から規定の大きさのRNA断片を同定した。簡単には、全RNA（実施例3を参照のこと）5ないし10 μ gを40mM モルフォリノプロパンスルホン酸（MOPS）（pH7.0）、10mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA、2.2Mホルムアルデヒド、50容量/容量%ホルムアミドを含有する溶液15 μ l中65 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。変性RNAをローディングバッファー（50%グリセロール、1mM EDTA、0.4%ブROMフェノールブルー、0.4%キシレンシアノール）2 μ lと混合し、40mM MOPS（pH7.0）、10mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTAおよび2.2Mホルムアルデヒドを含有する変性1.0%アガロースゲルに装填した。ゲルを60Vで1.5時間電気泳動し、RNAアーゼ不含水ですすいだ。下方アルカリ性キャピラリー移動法（Chomczynski、Anal. Biochem. 201:134-139（1992））を用いてRNAをゲルからナイロン膜（ブライトスター・プラス、アンビオン・インコーポレーティッド、オースティン、テキサス州）に1.5時間移した。フィルターを1X SSCですすぎ、自動架橋化様式のストラッタリンカー（ストラッタジーン・インコーポレーティッド、ラジヨーラ、カルフォルニア州）を用いてRNAをフィルターに架橋した。次いで予め加熱したプレハイブリダイゼーション溶液（5X SSC、50%ホルムアミド、5Xデンハーツ溶液、100 μ g/ml変性サケ精子DNA）20mlを含有するハイブリダイゼーションチューブ内に膜を置き、42 $^{\circ}$ Cのハイブリダイゼーションオープンで少なくとも3時間インキュベートした。プロットをプレハイブリダイズしたが、製造者の指示書に従って、ランダムプライマーDNAラベリングシステム（ライフ・テクノロジーズ・インコーポレーティッド、ガイザースブルグ、メリーランド州）を用いて、BU101インサー

ト断片 (X b a I および N o t I でクローン 6 0 3 1 4 8 H 1 を消化することにより得られる) を用いて 3 2 P 標識ランダムプライムプローブを作った。プローブの半分を 1 0 分間煮沸し、氷上で迅速に冷却し、ハイブリダイゼーションチューブに加えた。4 2 °C で少なくとも 1 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション溶液を捨て、フィルターを 3 X S S C、0 . 1 % S D S 3 0 m l 中 4 2 °C で 1 5 分間洗浄し、続いて 3 X S S C、0 . 1 % S D S 3 0 m l 中 4 2 °C で 1 5 分間洗浄した。フィルターをサララップで包み、コダック X A R - O マットフィルムに 8 ないし 9 6 時間暴露し、分析のためにフィルムを現像した。

【 0 2 2 2 】

臭化エチジウム染色アガロースゲルを用いる R N A 品質分析並びに乳房組織および非乳房組織からの R N A にハイブリダイズする B U 1 0 1 プローブを用いる対応するノーザンプロットの結果を各々図 3 A および 3 B に示す。R N A サイズ標準の位置 (キロ塩基対) をパネルの左に示す。B U 1 0 1 プローブはレーン 1 の乳房サンプルにおいてのみ 0 . 5 キロ塩基対で R N A バンドにハイブリダイズしたが、レーン 3 の乳房組織の R N A またはレーン 4 ないし 1 0 の 7 つの非乳房サンプル (各々結腸、結腸、肺、肺、卵巣、前立腺および脾臓) (図 3 B) ではハイブリダイズしなかった。レーン 2 はブランクである。

【 0 2 2 3 】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 およびその断片または相補体に対応する m R N A の高レベルの発現は B U 1 0 1 m R N A の存在を示すものであり、乳房組織疾患または症状、例えば乳癌の診断を示唆するものである。

【 0 2 2 4 】

実施例 6 : ドットプロット / スロットプロット

ドットおよびスロットアッセイは核酸の複合混合物中の特定の核酸配列の存在を評価するための迅速な方法である。かかるアッセイを実施するために、5 0 μ g までの R N A を 5 0 % ホルムアミド、7 % ホルムアルデヒド、1 X S S C 5 0 μ l と混合し、6 8 °C で 1 5 分間インキュベートし、次いで氷上で冷却す

る。次いでRNA混合物に20X SSC 100 μ lを加え、調製ニトロセルロースまたはナイロン膜を有する多機能装置に真空下装填する。膜を水、20X SSCに1時間浸し、20X SSCで予め湿らせた2枚のワットマン#3フィルターペーパー上に置き、スロットプロットまたはドットプロット真空多機能装置に装填する。前記の実施例4に記載のとおり調製および標識したプローブでスロットプロットを分析する。配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列に対応するmRNAの検出はBU101の存在の指標であり、乳房組織疾患または症状、例えば乳癌の診断を示唆するものである。

【0225】

実施例5および6に記載の方法において利用できるその他の方法およびバッファーは、本明細書に特記したもの以外は周知であり、J. Sambrookら(前記で引用)に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

【0226】

実施例7：イン・シトゥ・ハイブリダイゼーション

この方法は検出可能な核酸ハイブリダイゼーションプローブを用いて細胞における特異的標的核酸配列を直接検出するのに有用である。

【0227】

細胞性RNAの保持を最大にするために架橋固定剤例えばパラホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドで組織を調製する。L. Angererら、Methods in Cell Biol., 35:37-71(1991)を参照のこと。簡単には、50mM リン酸ナトリウム(pH7.5)中1% グルタルアルデヒド5容量以上の中に組織を4 で30分間置く。溶液を新鮮なグルタルアルデヒド溶液(50mM リン酸ナトリウム(pH7.5)中1% グルタルアルデヒド)と交換してさらに30分間固定する。固定溶液はおよそ0.375% NaClのモル浸透圧を有していなければならない。組織を等張NaClで1回洗浄し、リン酸塩を除去する。

【0228】

次いで以下のように固定した組織をパラフィンに包埋する。一連の漸増濃度の

エタノールで組織を各々15分間脱水する：50%（2回）、70%（2回）、85%、90%、次いで100%（2回）。次に、組織をキシレンに、2回交換して、室温で各20分間浸す。次いで組織をキシレンおよびパラフィンの1：1混合物に、2回交換して、60℃で各20分間浸し；次いでパラフィンに、最後に3回交換して、各15分間浸す。

【0229】

次に、標準的なマイクロトームを用いて組織を5µm切片に切断し、予め組織付着剤例えば3-アミノプロピルトリエトキシシランで処理したスライドに載せる。

【0230】

10分間2回のキシレン浸漬により組織からパラフィンを除去し、一連の漸減濃度のエタノールで再水和する：99%（2回）、95%、85%、70%、50%、30%、次いで蒸留水（2回）。切片を0.2M HClで10分間、前処理し、2µg/ml プロテイナーゼKで37℃で15分間、浸透化する。

【0231】

BU101遺伝子プラスミドから転写した標識リボプローブ（実施例4を参照のこと）を調製した組織切片にハイブリダイズさせ、3X標準セイライン抽出物および50%ホルムアミドルデヒド中56℃で一晩インキュベートする。2X標準セイラインクエン酸塩および50%ホルムアミドで洗浄することにより過剰なプローブを除去し、続いて100µg/ml RNアーゼAで37℃で30分間消化する。顕微鏡下紫外（UV）光の照明により蛍光プローブを可視化する。細胞質中の蛍光はBU101 mRNAを示している。別法としてオートラジオグラフィーにより切片を可視化できる。

【0232】

実施例8：逆転写PCR

A. 1工程RT-PCRアッセイ

当該分野で周知の方法を用いて逆転写PCRにより前記の標的配列を検出するための標的的特異的プライマーを設計する。1工程RT-PCRは単一の反応混合物においてRTおよびPCRの両方を実施する連続的な方法である。50mM（

N, N, -ビス[2-ヒドロキシエチル]グリシン)、pH 8.15、81.7 mM KOAc、33.33 mM KOH、0.01 mg/ml ウシ血清アルブミン、0.1 mM エチレンジアミンテトラ酢酸、0.02 mg/ml NaN₃、8重量/容量% グリセロール、150 μM 各dNTP、0.25 μM 各プライマー、rTthポリメラーゼ5単位、3.25 mM Mn(OAc)₂および標的RNA(実施例3を参照のこと)5 μlを含有する反応混合物200 μlでこの方法を実施する。RNAおよびrTthポリメラーゼ酵素がMn(OAc)₂の存在下不安定なので、Mn(OAc)₂は標的を添加する直前に加えるべきである。cDNA合成および熱循環に最適な条件は当業者に容易に決定できる。反応物をパーキン-エルマー・サーマル・サイクラー480中でインキュベートする。有用であることが解っている条件には、60ないし70、15ないし45分間のcDNA合成および94、1分間; 55ないし70、1分間; 72、2分間の30ないし45増幅サイクルなどがある。またTaqポリメラーゼおよび逆転写酵素例えばMMLV(モロニー・ネズミ白血病ウイルス)またはAMV(鳥類の骨髄芽球症ウイルス)RT(逆転写)酵素を用いる二重酵素法を用いて1工程RT-PCRを実施することもできる。

【0233】

B. 従来のRT-PCR

別法として、K. Q. Huら、Virology, 181:721-726(1991)に記載されるように従来の2工程RT-PCR反応を実施した。簡単には、1X PCR IIバッファー(パーキン-エルマー)、5 mM MgCl₂、1 mM dNTP、RNアシン 20単位、2.5 μM ランダムヘキサマー、およびMMLV 50単位(モロニー・ネズミ白血病ウイルス)逆転写酵素(RT)を含有する反応混合物20 μl中抽出したmRNA(実施例3を参照のこと)0.5 μgを逆転写した。MJリサーチ・サイクラー・モデルPTC-200で42、60分間逆転写を実施し、続いて95で5分間インキュベートしてRTを不活性化した。cDNA反応物2 μlを用いて、10 mM トリスHCl(pH 8.3)、50 mM KCl、2 mM MgCl₂、200 μM dNTP、0.5 μM 各センスおよびアンチセンスプライマー、各々配列番号1

3 および配列番号14、並びにTaqポリメラーゼ 2.5単位を含有する最終PCR反応物50μl容量中でPCRを実施した。MJリサーチモデルPTC-200で以下のとおり反応物をインキュベートした：増幅40サイクル（94、20秒間；58、30秒間；72、30秒間）；最終伸長（72、10分間）；および4で浸漬。

【0234】

C. PCR断片分析

SYBR（登録商標）グリーンI蛍光インターカレーター（モレキュラー・プローブズ、ユージーン、オレゴン州）を含むゲル電気泳動を用いてサイズ決定することにより正確な生成物を確認し、ストーム・イメージングシステムを用いて画像化した（図4）。図4は正常な乳房組織（レーン1ないし5）および乳癌組織（レーン6ないし10）の両方でBU101特異的PCR生成物の指標であること201を塩基でのDNAバンドを示している。これはいずれの結腸組織（レーン12ないし16）でも存在しない。5個の肺組織（レーン17ないし21）のうち1個（レーン20）でBU101を示唆するバンドが観察された。

【0235】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択される配列を含んでなる生成物の検出はBU101 mRNAの存在を示すものであり、乳房組織疾患または症状、例えば乳癌の診断を示唆するものである。

【0236】

実施例9：OH-PCR

A. プローブ選別および標識

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションPCRにより前記した標的配列を検出するために、標的特異的プライマー（配列番号15および配列番号16）およびプローブ（配列番号17）を設計した。国際公開番号WO92/10505、1992年6月25日公開、およびWO92/11388、1992年7月9日公開では各々5'および3'末端でオリゴヌクレオチドを標識する方法を教示している。標識ホスホラミダイト試薬を調製し、これを用いてオリゴヌクレオチ

ドの合成中にそこに標識を加える。[N. T. Thuongら、Tet. Letters, 29(46):5905-5908(1988); J. S. Cohenら、公開米国特許出願07/246688 (NTIS受付番号PAT-APP L-7-246688)(1989)を参照のこと]。プローブを3'末端で標識し、PCR中の沈殿および望ましくない伸長生成物の形成を防御した。1工程OH-PCRではプローブは少なくとも15 でプライマーのTM以下のTMを有した。当業者に周知の標準的なホスホラミダイト化学および/または合成後標識法を用いて検出標識を有するまたは有さない特異的結合メンバーとしてプライマーおよびプローブを利用した。

【0237】

B. 1工程オリゴハイブリダイゼーションPCR

50mM KCl、10mM トリスHCl (pH8.3)、5mM MgCl₂、1mM dGTP、1mM dATP、1mM dCTP、1mM dTTP、RNアーゼ阻害因子 0.5単位、2.5μM オリゴd(T)16のバッファー中MuLV逆転写酵素2.5単位を用いて42 で30分間、続いて99 で5分間、および4 で5分間全RNA (実施例3を参照のこと) からcDNAを調製した。次いで50mM N,N'-ビス[2-ヒロキシエチル]グリシン (pH8.15)、81.7mM KOAc、33.33mM KOH、0.01mg/ml ウシ血清アルブミン、0.1mM エチレンジアミンテトラ酢酸、0.02mg/ml NaN₃、8重量/容量% グリセロール、150μM 各dNTP、0.25μM 順行プライマー (配列番号15)、0.5μM 逆行プライマー (配列番号16)、10.0nM プローブ (配列番号17)、rTthポリメラーゼ 5単位および1.63mM Mn(Cl)₂、190μlを含有するOH-PCR反応物に調製したcDNAを加えた。rTthポリメラーゼ酵素はMn(Cl)₂の存在下不安定であるので、Mn(Cl)₂は標的を添加する直前に加えた。別法としてcDNAの代わりに標的として全RNA (実施例3)を用いることができる。パーキン-エルマー・サーマル・サイクラー480中反応物をインキュベートした。cDNA合成および熱循環に最適な条件は当業者に容易に決定できる。有用であると解っている条件にはRNAで出発

した場合の、cDNA合成(60、30分間)、および45増幅サイクル(94、40秒間;62、100秒間)などがある。オリゴハイブリダイゼーションの前にSYBR(登録商標)グリーンで染色した2%アガロースゲル上でPCR生成物を可視化した(図5)。増幅(97、5分間;12、5分間;12浸漬)の後、オリゴハイブリダイゼーションを実施した。正確な反応生成物は少なくとも一つのPCR生成物の鎖および内的にハイブリダイズされたプローブを含有した。

【0238】

図5はBU101 RNA特異的PCR増幅生成物のSYBR(登録商標)グリーン染色アガロースゲルの走査である。この図はMDA361細胞系統RNA(レーン1)を有する268塩基対BU101特異的アンプリコンを示している。MDA361細胞系統(#HTB27)は転移性ヒト乳房腺癌に由来する(A.T.C.C.、ロックビル、メリーランド州)。胎盤のDNA(レーン2)をRNA対照として用い、一方水(レーン3)を試薬対照として用いた。ヒト胎盤DNA対照は268塩基対のアンプリコンを示さず、これはレーン1で観察された268塩基対がDNAではなくmRNAの増幅の結果であることを示唆している。試薬対照はアンプリコンを全く生じず、OH-PCR試薬自体が増幅されたのではないことを示した。

【0239】

C.OH-PCR生成物分析

LCx(登録商標)アナライザーシステム(アボット・ラボラトリーズ、アボットパーク、イリノイ州から入手可能)で増幅反応生成物を検出した。簡単には、ハイブリダイゼーションプローブの捕捉可能な部位で抗体標識微粒子により特異的反応生成物を捕捉し、PCR生成物に結合する検出可能な抗体の結合により複合体を検出した。内部プローブとハイブリダイズするPCR鎖を含有する複合体のみを検出できた。図6はBU101アンプリコンがMDA361細胞系統のRNAの200フェムトグラムで容易に検出されたことを示している。正常なPBLのRNA抽出物を陰性対照として用い、100ナノグラムでさえ検出されなかった。

【0240】

LCx (登録商標) システムを用いてBU101活性に関して種々組織からのRNA10ピコグラムを検定した。図7はBU101マーカの組織全体の分布を示している。11全ての正常な乳房および乳癌組織RNA (カラム1ないし11) はBU101 LCx (登録商標) アッセイにおいて反応性であり、一方正常な結腸および結腸癌組織並びに肺組織RNA (カラム12ないし15) は非反応性であった。この複合体の検出はBU101 mRNAの存在を示しており、これは乳房疾患または症状例えば乳癌の診断を示唆している。多くのその他の検出様式が存在し、当業者はこれを用いて、および/または修飾して増幅されたまたは増幅されていないBU101誘導核酸配列の存在を検出でき、例えばリガーゼ連鎖反応 (LCR、アボット・ラボラトリーズ、アボットパーク、イリノイ州) ; Q-ベータレプリカーゼ (ジーン・トラック (商標)、ナッパービル、イリノイ州)、分岐鎖反応 (キロン、エメリービル、カリフォルニア州) および鎖置換アッセイ (ベクトン・ディッキンソン、リサーチ・トライアングル・パーク、ノースキャロライナ州) などがあるが、これらに限定するものではない。

【0241】

実施例10：合成ペプチド生成

合成ペプチドをモデル化し、BU101ポリペプチドコンセンサス配列の予想されるアミノ酸配列に基づいて製造した (実施例1を参照のこと)。とりわけ、配列番号20から誘導される多くのBU101ペプチドが製造され、配列番号1ないし29のペプチドなどがある。全てのペプチドをシンフォニー・ペプチド・シンセサイザー (レイニン・インストラメント・カンパニー、エメリービル、カリフォルニア州)、またはFMOC化学、標準サイクルおよびイン・シトゥーHBTU活性化を用いる類似の装置で合成した。切断および脱保護条件は以下のとおりである：切断試薬 (77.5容量/容量% トリフルオロ酢酸、15容量/容量% エタンジチオール、2.5容量/容量% 水、5容量/容量% チオアニソール、1ないし2重量/容量% フェノール) 2.5ml容量を樹脂に加え、室温で2ないし4時間攪拌した。次いで濾液を除去し、冷ジエチルエーテルで切断試薬からペプチドを沈殿させた。各ペプチドを濾過し、水/アセトニトリ

ル/0.1% TFAグラジエントを用いて逆相調製用HPLCにより精製し、凍結乾燥した。質量分析法により生成物を確認した。

【0242】

精製したペプチドを用いて動物を免疫した(実施例14を参照のこと)。

【0243】

実施例11a. プラスミド577を用いる細胞系統におけるタンパク質発現
A. BU101発現プラスミドの構築

永久細胞系統で分泌される抗原を発現するために米国特許出願第08/478073号(1995年6月7日提出)(参照により本明細書に組み込まれる)に記載のプラスミド577を構築した。このプラスミドは以下のDNAセグメントを含有する:(a)細菌性 - ラクタマーゼおよびDNA複製起点を含有するpBR322の2.3キロ塩基対断片;(b)HSV-1チミジンキナーゼプロモーターおよびポリA付加シグナルの調節下にあるネオマイシン抵抗性遺伝子の発現を指向する1.8キロ塩基対のカセット;(c)シミアンウイルス40(SV40)プロモーターおよびポリA付加シグナルの調節下にあるジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子の発現を指示する1.9キロ塩基対のカセット;(d)シミアンウイルス40T-Agプロモーターおよび転写エンハンサー、ポリA付加シグナルを提供する単純疱疹ウイルス1型(HSV-1)ゲノムに続くB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)エンハンサーIの調節下にある修飾C型肝炎ウイルス(HCV)E2タンパク質に融合したウサギ免疫グロブリン重鎖シグナル配列の発現を指向する3.5キロ塩基対のカセット;および(e)このプラスミドでは機能を持たないSV40ゲノム後期領域の残りの0.7キロ塩基対の断片。ベクターの全てのセグメントは分生物学の当業者に周知の標準的な方法により組み立てられた。

【0244】

以下のようにプラスミド577のC型肝炎ウイルスE2タンパク質コーディング配列を、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6およびその断片または相補体からなる群から選択されるBU101ポリヌクレオチド配列と置換して分泌可能なBU101タンパク質を発現するための

プラスミドを構築する。プラスミド577をXbaIで消化することによりC型肝炎ウイルスE2遺伝子断片を放出する。得られたプラスミドバックボーンにより、発現したタンパク質を細胞の分泌経路に導くウサギ免疫グロブリン重鎖シグナル配列の下流でBU101 cDNAインサートを挿入できるようになる。標準的な方法を用いてPCRによりBU101 cDNA断片を生成する。センスPCRプライマー配列でコードされるのはXbaI部位であり、アミノ酸配列Ser-Asn-Glu-Leu(「SNEL」)をコードする12個のヌクレオチド配列にすぐ続き、シグナルプロテアーゼプロセッシング、効率的な分泌および培養液中の最終生成物の安定性を促進する。この12個のヌクレオチド配列にすぐ続いて、プライマーはBU101遺伝子のアミノ酸をコードする鑄型配列に相補的なヌクレオチドを含有する。アンチセンスプライマーは以下の8個のアミノ酸をコードする配列を停止コドンの直前に組み込んでいる: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(配列番号30)。この配列内でBU101タンパク質生成物の分析および生成を助ける認識部位が組み込まれている。すなわち抗フラッグM2(イーストマン・コダック・カンパニー、ニューヘブン、コネチカット州)と称する市販により入手可能なモノクローナル抗体により認識される認識部位(「フラッグ」と称する)をその他の匹敵する配列および対応する抗体と同様に利用できる。例えばパーキン・エルマー・セツスから入手したジーンアンプ(登録商標)を供給者の指示書に指示されるように使用してPCRを実施する。PCRプライマーは最終濃度0.5 μMで使用する。100 μl反応物中BU101プラスミド鑄型で35サイクル(94、30秒間; 55、30秒間; 72、90秒間)、続いて72で10分間伸長サイクルでPCRを実施する。

【0245】

B. ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞のトランスフェクション

前記したプラスミドをCHO/dhfr-細胞[DXB-111, Uriaciora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4451-4466(1980)]にトランスフェクトさせる。これらの細胞はA.T.C.

C.、10801ユニバーシティー・ブールバード、マナサス、バージニア州から受け入れ番号CRL9096で入手可能である。P. L. Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7414(1987)に記載されるカチオン性リポソーム媒介法を用いてトランスフェクションを実施する。とりわけ10%ウシ胎児血清、L-グルタミン(1mM)を補充したハムF-12培地でCHO/dhfr-細胞を培養し、フラスコあたり5ないし 8×10^5 セルの密度でフラスコに新たに播種する。細胞をトランスフェクションに関して全面成長の60から80%まで成長させる。プラスミドDNA 20 μ gをオプティ-MEM I培地1.5mlに加え、リポフェクチン試薬(ギブコ・ビー・アール・エル; グランドアイランド、ニューヨーク州)100 μ lをオプティ-MEM I培地の第2の1.5ml部分に加える。二つの溶液を混合し、室温で20分間インキュベートする。細胞から培養培地を除去した後、オプティ-MEM I培地5mlで3回細胞をすすぐ。次いでオプティ-MEM I-リポフェクチン-プラスミドDNA溶液を細胞上に積層する。細胞を37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートし、その後、選別前にさらに24時間オプティ-MEM I-リポフェクチン-DNA溶液を培養培地と置換する。

【0246】

C. 選別および増幅

トランスフェクションの1日後、細胞を1:3で継代培養し、dhfr/G418選別培地(以後「F-12マイナス培地G」と共にインキュベートする。選別培地はL-グルタミンを含有、ヒポキサンチン、チミジンおよびグリシン不含ハムF-12(ジェイ・アール・エッチ・バイオサイエンス、レネクサ、カンサス州)、および300 μ g/ml G418(ギブコ・ビー・アール・エル; グランドアイランド、ニューヨーク州)である。表面面積に対する培地容量の比率は25cm²あたり5mlを維持する。およそ2週間後、DHFR/G418細胞を広げて継代培養させ、F-12マイナス培地Gでさらに維持し続ける。

【0247】

トランスフェクトされたBU101 cDNA配列の各々を、メトトレキセー

トを用いてDHF^{R+}、G418⁺細胞を段階的に選別することにより増幅する(R, Schimke, Cell, 37:705-713(1984)に概説されている)。150nM メトトレキサート(MTX)(シグマ、セントルイス、ミズーリー州)含有F-12マイナス培地Gと共に細胞をおよそ2週間、抵抗性コロニーが出現するまでインキュベートする。150nM 適合細胞を5μM MTXにより選別することによりさらに遺伝子を増幅する。

【0248】

D. 抗原生成

5μM MYXを補充したF-12マイナス培地Gを5% CO₂中37℃で12ないし24時間、ちょうど全面成長した単層の上に積層する。成長培地を除去し、ダルベッコ・リン酸バッファーセリン(PBS)(カルシウムおよびマグネシウム含有)(ギブコ・ビー・アール・エル; グランドアイランド、ニューヨーク州)で3回すすぎ、存在し得る残留培地/血清を除去する。次いで細胞をVASカスタム培地(L-グルタミン含有、HEPES含有、フェノールレッド不含のVASカスタム処方、ジェイ・アール・エッチ・バイオサイエンス; レネкса、カンサス州より入手可能、製品番号52-08678P)と共に5% CO₂中、37℃で1時間インキュベートする。次いでTフラスコあたり5mlの生成物に関して細胞をVASで積層する。インキュベーションの7日後、培地を取り出し、保持し、次いで回収物2、3および4と共に精製するまで凍結する。単層をVASで、7日回収より3多く積層する。

【0249】

E. 乳房組織遺伝子BU101抗原発現の分析

当該分野で周知の標準的な方法および試薬を用いるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)(ラエムリ非連続性ゲル)によるか、または質量分析法により、BU101タンパク質構築物を発現する細胞のVAS上澄のアリコート进行分析する。

【0250】

F. 精製

ハイブリダイズされた結合によりアガロースに共有結合している抗フラッグM

2モノクローナル抗体を含んでなるアフィニティマトリックスを用いて、イムノアフィニティークロマトグラフィーによりフラッグ配列を含有するBU101タンパク質の精製を実施する(イーストマン・コダック・カンパニー、ニューヘブロン、コネティカット州)。アフィニティ精製の前に、ローラーボトルから回収した、プールしたVAS培地中タンパク質をセファデックスG-25(ファルマシア・バイオテック・インコーポレーティッド、ウプサラ、スウェーデン)カラムを用いて50mM トリスHCl(pH7.5)、150mM NaClバッファーに交換する。このバッファー中のタンパク質を抗フラッグM2抗体アフィニティカラムに適用する。50mM トリスHCl(pH7.5)、150mM NaClバッファーを用いてカラム洗浄することにより非結合性タンパク質を溶出する。50mM トリスHCl(pH7.5)、150mM NaCl中過剰のフラッグペプチドを用いて結合性タンパク質を溶出する。ゲル電気泳動またはHPLCにより精製されたBU101タンパク質から過剰のフラッグペプチドを除去できる。

【0251】

プラスミド577をこの実施例で利用するが、その他の適合する発現系例えばCMVを試薬および/または技術を適当に修飾して本発明において利用できることは当業者に周知であり、通常の技術範囲内である。

【0252】

BU101遺伝子のコーディング領域を含有する最大のクローン化インサートを次いで(i)例えばサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターおよび/またはタンパク質発現および検出を補助する可融性タンパク質配列を含有できる真核生物発現ベクター、または(ii)スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)およびCMP-KDOシンセターゼ(CKS)またはその他のタンパク質配列の発現のためのタンパク質融合遺伝子を含有する細菌性発現ベクターのいずれかにサブクローニングする。SODの融合配列を含有するポリペプチドの生成に有用な方法およびベクターはEPO 0196056(1986年10月1日公開)に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれ、CKSの融合配列を含有するものはEPO公開番号0331961(1989年9月13日公開)

に記載されており、これもまた参照により本明細書に組み込まれる。このように精製したタンパク質を動物免疫研究、固相イムノアッセイ等（これらに限定するものではない）の種々の技術に用いることができる。

【0253】

実施例11b：pcDNA3.1/Myc-Hisを用いる細胞系統におけるタンパク質発現

A. BU101発現プラスミドの構築

従来はたいていの哺乳動物の細胞系統により分泌抗原を発現するために、プラスミドpcDNA3.1/Myc-His (Cat. # V855-20、インビトロゲン、カールスバッド、カリフォルニア州)を構築していた。発現されたタンパク質インサートをmyc-hisペプチドタグに融合する。myc-hisタグ(配列番号31)は抗mycもしくは抗hisアフィニティーカラム、またはメタロプロテイン結合カラムのいずれかを用いて発現した融合タンパク質を精製するのに有用なc-mycオンコプロテインエピトープおよびポリヒスチジン配列を含んでなる。

【0254】

クローン603148H1(配列番号2)からpcDNA3.1/Myc-HisベクターへのBU101ポリヌクレオチド配列を挿入して分泌可能なBU101タンパク質を発現するためのプラスミドを構築した。(このプラスミドをpc-603148M/Hと称する)。pc-603148M/Hの構築の前に、以下のようにBU101 cDNA配列を最初にpCR(登録商標)-ブランチベクターにクローニングした：標準的な方法を用いるPCRによりBU101 cDNA断片を作った。PCRプライマーは最終濃度0.5 μMで用いた。pfuポリメラーゼ 5単位(ストラッタジーン、ラジョーラ、カリフォルニア州)を用いるPCRを、50 μl反応物中BU101プラスミド鋳型(実施例2を参照のこと)に関して30サイクル(94 °C、1分間；65 °C、1.5分間；72 °C、3分間)、続いて72 °Cで8分間の伸長サイクルで実施した。センスPCRプライマー配列、配列番号18はBU101遺伝子インサートのすぐ上流でpSPORTベクターに同一であるヌクレオチドを含んでなる。アンチセンスプラ

イマー、配列番号19はたいてい3'のインフレーム停止コドンのちょうど上流で5' Not I制限配列およびBU101 cDNAインサートの3'末端に相補的な配列を組み込んでいた。得られたプラント末端PCR生成物5 µlを直線化PCR(登録商標)プラントベクター(インビトロージェン、カールスバード、カリフォルニア州)25 ngにライゲートし、ベクターの致死ccdB遺伝子を妨害した。ワンショット(商標)形質転換キット(インビトロージェン、カールスバード、カリフォルニア州)を用いて、製造者の指示書に従い、得られたライゲートされたベクターをTOP10大腸菌(E. coli)(インビトロージェン、カールスバード、カリフォルニア州)に形質転換した。形質転換した細胞をLB-Kan(50 µg/mlカナマイシン)選別プレート上37°Cで成長させた。形質転換後妨害されたccdB遺伝子を有するプラスミドを含有する細胞のみを成長させる(Grant, S. G. N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 4645-4649(1990))。形質転換されたコロニーを採り、LB-Kanブロス3 ml中37°Cで成長させる。QIAプレップ(登録商標)(キアゲン・インコーポレーティッド、サンタクラリタ、カリフォルニア州)法を用いて、製造者の指示に従い、プラスミドDNAを単離した。EcoRIおよびNot I制限酵素でDNAを消化し、BU101インサート断片を遊離した。断片を1%シーケム(登録商標)LEアガロース/0.5 µg/ml臭化エチジウム/TEゲルの電気泳動に供し、UV照射により可視化し、切り取り、QIAクイック(商標)(キアゲン・インコーポレーティッド、サンタクラリタ、カリフォルニア州)法を用いて製造者に指示されるように精製した。

【0255】

p cDNA3.1/My c-HisプラスミドDNAをプラスミドDNAのポリリンカー領域においてEcoRIおよびNot Iで消化することにより直線化した。哺乳動物細胞のタンパク質の発現を指示するCMVプロモーターの下流で、前記のBU101精製cDNA断片を得られたプラスミドDNAバックボーンにライゲートした。ライゲートされたプラスミドを製造者に指示されるように、DH5アルファ(商標)細胞(ギブコ・ビー・アール・エル、グランドアイラン

ド、ニューヨーク州)に形質転換した。簡単には、BU101インサートを含有するpcDNA3.1/Myc-His 10ngをコンピテントDH5アルファ細胞50 μ lに加え、内容物を穏やかに混合した。混合物を氷上で30分間インキュベートし、37 $^{\circ}$ Cで20秒間熱ショックを与え、さらに2分間氷上に置いた。LB培地0.95mlを添加したときに、混合物を225rpmで振盪しながら37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。次いで形質転換した細胞を100mm LB/Amp (50 μ g/ml アンピシリン)プレートに載せ、37 $^{\circ}$ Cで成長させた。コロニーを取り、LB/Ampブロス3ml中で成長させた。QIAブレップキットを用いてプラスミドDNAを精製した。当該分野で周知の技術、例えば制限消化およびゲル分析など(これらに限定するものではない)を用いてインサートの存在を確認する。(J. Sambrookら、前記で引用)。

【0256】

B. ヒト胎児腎細胞293細胞のトランスフェクション

前記のセクションAで記載したBU101発現プラスミドをDH5アルファ細胞に形質転換し、LB/アンピシリン寒天に載せ、前記するようにLB/アンピシリンブロス10ml中で成長させた。QIAフィルター(商標)マキシキット(キアゲン、チャッツウォース、カリフォルニア州)を用いてプラスミドを精製し、HEK293細胞にトランスフェクトした(F. L. Grahamら、J. Gen. Vir. 36:59-72(1977))。これらの細胞はA. T. C. C.、10801 ユニバーシティー・ブールバード、マナサス、バージニア州から、受け入れ番号CRL1573で入手できる。P. Hawley-Nelsonら、Focus, 15:73(1993)に記載されているカチオン性リポフェクタミン媒介法を用いてトランスフェクションを実施した。10% ウシ胎児血清(FBS)、L-グルタミン(2mM)を補充したDMEM培地10ml中HEK293細胞を培養し、プレートあたり 9×10^6 セルの密度で100mm培養プレートに新たに播種した。37 $^{\circ}$ Cでトランスフェクションに関して全面成長の70%から80%まで細胞を成長させた。プラスミドDNA8 μ gをオプティMEM I(登録商標)培地(ギブコ・ビー・アール・エル、グランドアイランド、ニューヨーク州)800 μ lに加え、リポフェクタミン(商標)試薬

(ギブコ・ビー・アール・エル、グランドアイランド、ニューヨーク州) 48ないし96 μ lをDMEM血清不含培地の第2の800 μ l部分に加えた。二つの溶液を混合し、室温で15ないし30分間インキュベートした。細胞から培養培地を除去した後、細胞を血清不含DMEM 10mlで1回洗浄した。オプティMEM I - リポフェクトアミン - プラスミドDNA溶液を血清不含DMEM 6.4mlで希釈し、次いで細胞の上に積層した。細胞を37℃で5時間インキュベートし、その後さらに20% FBSを含むDMEM 8mlを加えた。18ないし24時間後、古い培地を吸引し、5% FBSを含む新鮮DMEM 5mlで細胞を積層した。トランスフェクションの72時間後、BU101遺伝子活性に関して上澄および細胞抽出物を分析した。

【0257】

C. 乳房組織遺伝子BU101抗原発現の分析

前記の培養上澄をサイトチューブに移し、氷上で保存した。冷ダルベッコPBS 10mlで2回洗浄してHEK293細胞を回収し、CAT溶解バッファー(ベーリンガー・マンハイム、インディアナポリス、インディアナ州) 1.5mlを添加して溶解し、続いて室温で30分間インキュベートした。ライゼートを1.7mlポリプロピレンマイクロヒュッジチューブに移し、1000 \times gで10分間遠心する。上澄を新しいサイトチューブに移し、氷上で保存する。BU101タンパク質構築物を発現する細胞の上澄および細胞のライゼートのアリコートBU101組換えタンパク質の存在に関して分析する。当該分野で周知の標準的な方法および試薬を用いてアリコートをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に流すことができる。(J. Sambrookら、前記で引用)。次いでこれらのゲルを固体培地例えばニトロセルロース、ニトラン等にプロットし、BU101タンパク質のバンドを抗mycエピトープまたは抗ヒスチジンモノクローナル抗体(インビトロゲン、カールスバッド、カリフォルニア州)または抗BU101ポリクローナル血清を用いるウェスタンブロッティング技術を用いて可視化できる(実施例14を参照のこと)。別法として、発現されたBU101組換えタンパク質を質量分析法により分析できる(実施例12を参照のこと)。

【0258】

D. 精製

myc-his配列を含有するBU101組換えタンパク質を、ポリヒスチジン残基に特異的に結合するニッケル荷電アガロース樹脂を含有するエクスプレス（登録商標）アフィニティークロマトグラフィーシステム（インビトロゲン、カールスバッド、カリフォルニア州）を用いて精製する。前記のように調製した10×100mmプレートの上澄をプールし、ニッケル荷電カラムを通す。50mM トリスHCl（pH7.5）/150mM NaClバッファーでカラムを洗浄することにより非結合性タンパク質を溶出し、myc-his融合タンパク質のみを残す。次いで過剰のイミダゾールもしくはヒスチジン、または低pHバッファーのいずれかを用いて結合性BU101組換えタンパク質をカラムから溶出する。別法として、myc-his配列でヒドラジドまたはその他の結合によりアガロース樹脂に結合した抗mycかまたは抗ヒスチジンモノクローナル抗体からなるアフィニティークラムに結合させ、各々過剰のmycペプチドまたはヒスチジンで溶出することにより組換えタンパク質を精製することもできる。

【0259】

次いで精製した組換えタンパク質を供給者の指示書に従って固相、例えばN-ヒドロキシサクシンイミド活性化セファロースカラム（ファルマシア・バイオテック、ピスカッタウェイ、ニュージャージー州）に共有結合的に架橋できる。次いで共有結合したBU101組換えタンパク質を含有するこれらのカラムを用いて、ウサギまたはマウス血清から抗BU101抗体を精製できる（実施例13および14を参照のこと）。

【0260】

E. BU101発現タンパク質でのマイクロタイタープレートのコーティング
前記するように、100mmプレートからの上澄をPBSで1:3に希釈した。次いで得られた混合物をリアクチ-バインド（商標）金属キレートマイクロタイタープレート（ピアース、ロックフォード、イリノイ州）の各ウェルに入れ、室温でインキュベートし、続いて脱イオン水で4回洗浄した。次いで調製したマイクロタイタープレートを用いてBU101抗体の存在に関してポリクローナル

抗血清をスクリーニングした（実施例17を参照のこと）。

【0261】

未精製細胞上澄に加え、精製BU101（前記のように調製）をも用いてポリクローナル抗血清をスクリーニングした（実施例17を参照のこと）。簡単には、精製BU101を50mM 炭酸塩バッファー、pH9.6で1:3に希釈し、この溶液100 μ lを用いてマイクロタイタープレートをコーティングした（実施例17）。これらの実験ではポリクローナル抗血清を試験用に1:500に希釈した。

【0262】

【表2】

表2：ポリクローナル抗BU101抗血清の発現されたBU101タンパク質への結合

ペプチド免疫原	ペプチドを結合したか？	BU101未精製細胞上澄	BU101精製
配列番号21	はい/KLH	0.083	ND
配列番号23	はい/KLH	1.149	0.917
配列番号27	いいえ	0.194	ND
配列番号28	いいえ	0.223	0.227

（結果を抗血清の1:500希釈のA405として表す。全ての免疫前血清は1:500希釈で陰性であった。）

【0263】

実施例12：乳房組織タンパク質の化学的分析

A. MSを用いるトリプシンペプチド断片の分析

乳房疾患、例えば乳癌の患者の血清、乳房疾患のない患者の血清、乳房疾患、例えば乳癌の患者の乳房組織または細胞の抽出物、乳房疾患のない患者の乳房組織または細胞の抽出物、およびその他の疾患のないまたは疾患のある患者の器官の組織または細胞の抽出物を標準的な方法を用いてポリアクリルアミドゲルに流し、クーマシーブルーで染色する。未知のポリペプチドを含有している疑いのあるゲルの部分を切除し、インゲル還元、アセトアミド化およびトリプシン消化に供した。P. Jenorら、Anal. Bio. 224:451-455 (1995) および J. Rosenfeldら、Anal. Bio. 203:173-1

79 (1992)。ゲル切片を100mM NH_4HCO_3 およびアセトニトリルで洗浄する。縮んだゲル片を消化バッファー(50mM NH_4HCO_3 、5mM CaCl_2 および12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシン)中4で45分間膨張させる。上澄を吸引し、トリプシン不含の消化バッファー5ないし10 μl と置換し、37で一晩インキュベートした。5%葉酸およびアセトニトリルで3回変換してペプチドを抽出し、蒸発乾固する。ペプチドをポロスR2ソルベント(ペルセプティブ・バイオシステムズ、フラミングハム、マサチューセッツ州)およそ0.1 μl に吸収させ、5%葉酸10 μl に溶解することにより吸引ガスクロマトグラフィーキャピラリーチューブのチップに捕捉し、それをキャピラリーに通す。吸収したペプチドを水で洗浄し、60%メタノール中5%葉酸で溶出する。ナノエレクトロスプレー質量分析法により分析するために、溶出液をAPI III質量分析器(パーキン・エルマー・サイエックス、ソーンヒル、オンタリオ、カナダ)のスプレーキャピラリーに直接通す。M. Wilmsら、*Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 136:167-180(1994)およびM. Wilmsら、*Anal. Chem.*, 66:1-8(1994)。第1の4極子から得られた質量スペクトルからトリプシンペプチドの質量を決定する。予測したペプチドに対応する質量をさらにMS/MSモードで分析し、ペプチドのアミノ酸配列を得る。

【0264】

B. LC/MSを用いるペプチド断片分析

過形成疾患組織で見出されるmRNA配列から予測されるポリペプチドの存在もまた液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いて確認できる。D. Hessら、*METHODS. A Companion to Methods in Enzymology* 6:227-238(1994)。患者の血清標本または腫瘍抽出物をSDSで変性し、ジチオスレイトール(1.5 mg/ml)で90、30分間還元し、続いてヨードアセタミド(4 mg/ml)で25、15分間アルキル化する。アクリルアミド電気泳動の後、ポリペプチドをカチオン性膜にエレクトロブロットイングし、クーマシーブルーで染色する。染色後、膜を洗浄し、未知ポリペプチドを含有すると考えら

れる部分を切除し、細片に切断する。膜を500 μ lマイクロ遠心管中に置き、タンパク質溶解消化バッファー(0.1M NaCl、10% アセトニトリル、2mM CaCl₂および5 μ g/ml トリプシンを含有する100mM トリスHCl、pH8.2)(シグマ、セントルイス、ミズーリー州)10ないし20 μ lに浸す。37 $^{\circ}$ Cで15時間の後、飽和尿素3 μ lおよび100 μ g/mlトリプシン1 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cでさらに5時間インキュベートする。消化混合物を10% トリフルオロ酢酸3 μ lで酸性にし、遠心して膜から上澄を分離する。上澄をマイクロボア逆相HPLCカラムに直接注入し、0.05% トリフルオロ酢酸中アセトニトリルの直線グラジエントで溶出する。溶出液をエレクトロスプレー質量分析器に直接供給し、分流器に通した後必要であれば物質の容量を調整する。実施例12、セクションAに示した方法に従ってデータを分析する。

【0265】

実施例13：遺伝子免疫プロトコル

A. インビボ抗原発現

遺伝子免疫では適当な発現ベクターを接種した後、インビボ抗原を直接発現することによりタンパク質精製工程を回避する。また、この方法による抗原生成では、タンパク質を哺乳動物組織において生成するので、正確なタンパク質のフォールディングおよびグリコシル化が可能である。この方法では遺伝子配列のCMVプロモーターを含有するプラスミドへの挿入、プラスミドの伸長および精製、並びにプラスミドDNAの動物筋肉組織への注射を行う。好ましい動物にはマウスおよびウサギなどがある。例えばH. Davisら、Human Molecular Genetics, 2:1847-1851(1993)を参照のこと。1回または2回ブースター免疫の後、次いで動物を出血させ、腹水を収集することができるか、またはハイブリドーマ生成のために動物の脾臓を回収できる。

【0266】

B. プラスミド調製および精製

実施例11に記載される方法に従って、適切な5'制限部位を含有する適当な

PCRプライマーを用いて、BU101 cDNA含有ベクターからBU101 cDNA配列を作る。適当な制限酵素でPCR生成物を切断し、CMVプロモーターを含有するベクター（例えば、インビトロゲン、サンディエゴ、カリフォルニア州のpRc/CMVまたはpcDNA3ベクター）に挿入する。次いでこのプラスミドを適当な細菌性株で伸長し、CsClグラジエントまたはキアゲンプラスミドDNA精製カラムを用いて細胞ライゼートから精製する。これらの技術は全て分子生物学の分野の通常の技術者に周知である。

【0267】

C. 免疫プロトコル

麻酔した動物をPBSで希釈した精製プラスミドまたはその他のDNA取り込みエンハンサー（カルディオトキシン、25% スクロース）0.1ないし100 µgで免疫する。例えばH. Davisら、Human Gene Therapy, 4: 733 - 740 (1993); およびP. W. Wolffら、Biotechniques, 11: 474 - 485 (1991)を参照のこと。ブースター注射を月間隔で1ないし2回行う。

【0268】

D. 抗血清の試験および使用

動物を出血させ、既知遺伝子配列（実施例16を参照のこと）から合成したペプチドを用いて当該分野で周知の技術例えばウェスタンブロッティングまたはEIA技術により、抗体に関して得られた血清を試験する。次いでこの方法により生成した抗血清を用いて、実施例15ないし18に記載の技術のごときELISAまたはウェスタンブロッティング技術により患者組織もしくは細胞抽出物中または患者血清中の抗原の存在を検出できる。

【0269】

実施例14: BU101に対する抗体の生成

A. ポリクローナル抗血清の生成

BU101 コンセンサスヌクレオチド配列（配列番号6）の予測アミノ酸配列から誘導されたペプチドでウサギに注射することによりBU101に対する抗血清を調製した。ペプチド配列番号21ないし29の合成については実施例10に

記載されている。免疫原として用いたペプチドは本明細書において後記するように調製した担体タンパク質例えばキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に結合していたか、または結合していなかった（すなわちKLHのごとき担体に結合していない）。

【0270】

1. ペプチド結合

ペプチドをマレイミド活性化キーホールリンペットヘモシアニン（KLH、イムジェクト（登録商標）として市販により入手可能、ピヤース・ケミカル・カンパニー、ロックフォード、イリノイ州から入手可能）に結合させた。イムジェクト（登録商標）はヘモシアニンのモルあたり約250モルの反応性マレイミド基を含有する。活性化KLHを約7.7mg/mlの濃度でリン酸塩緩衝セイライン（PBS、pH8.4）に溶解した。ペプチドはペプチド配列に生じたシステインを介してか、または点結合を提供するために合成されたペプチドに予め加えられたシステインに結合した。ペプチドをジメチルスルホキシド（DMSO、シグマ・ケミカル・カンパニー、セントルイス、ミズーリー州）に溶解し、KLHに結合した反応性マレイミドのモルあたりペプチド約1.5モルのモル比で活性化KLHと反応させた。ペプチド配列番号21ないし27および配列番号29の結合方法は本明細書において後記する。かかる方法の量、時間および条件を変化させてペプチド結合を最適化できることは当業者に周知である。

【0271】

本明細書において後記する結合反応は、約0.77マイクロモルの反応性マレイミド基を含有するKLHペプチド結合体（「結合ペプチド」）3mgを得ることに基づいている。このペプチド結合体の品質は通常、ウサギにおいてポリクローナル抗血清を生成するための1回の初回注射および4回のブースター注射に十分であった。簡単にはペプチド（配列番号21ないし27および配列番号29）をDMSO100μlあたり1.16マイクロモルの濃度でDMSOに溶解した。DMSO溶液100μlを前記のように調製した活性化KLH溶液380μlに加え、PBS（pH8.4）20μlを加えて500μlの容量にした。反応物を攪拌しながら室温で一晩インキュベートした。反応混合物中の未反応チオー

ルの量を測定することにより反応の程度を決定した。チオールの出発濃度と最終濃度の差を活性化K L Hに結合したペプチド濃度と仮定した。エルマン試薬(5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)、ピヤース・ケミカル・カンパニー、ロックフォード、イリノイ州)を用いて残存するチオールの量を測定する。システインHCl(ピヤース・ケミカル・カンパニー、ロックフォード、イリノイ州)35mgをPBS(pH7.2)10mlに溶解し、保存溶液を望ましい濃度に希釈することにより、0、0.1、0.5、2、5および20mMの濃度のシステイン標準を作った。イムロン2(登録商標)マイクロウェルプレート(ダイネックス・テクノロジーズ、チャンティリー、バージニア州)の各ウェルにPBS(pH8.4)200μlを入れることにより、光度測定法でチオール濃度を決定した。次に標準または反応混合物10μlを各ウェルに加えた。最後にPBS(pH8.4)中1mg/mlの濃度のエルマン試薬20μlを各ウェルに加えた。ウェルを室温で10分間インキュベートし、マイクロプレート・リーダー(例えばバイオラッド・モデル3550、バイオラッド、リッチモンド、カリフォルニア州)を用いて赤色415nmで全ウェルの吸光度を測定した。標準の吸光度を用いて標準曲線を構築し、標準曲線から反応混合物のチオール濃度を決定した。遊離チオールの濃度の減少により連続的な結合反応が示された。室温で6時間PBS(pH7.2)に対して透析することにより未反応ペプチドを除去した。すぐに使用する場合は結合体を2ないし8で保存し、そうでない場合は-20以下で保存した。

【0272】

2. 動物免疫

体重2kgまたはそれ以上の雌白色ニュージーランドウサギを用いてポリクローナル抗血清を上昇させた。1匹の動物を結合(配列番号21ないし27および配列番号29)ペプチドまたは結合していない(配列番号26ないし29)ペプチドにより免疫した。第1回の免疫の1週間前に動物から血液5ないし10mlを採り、非免疫出血前サンプルとして供した。

【0273】

結合ペプチド(配列番号21ないし27および配列番号29)および非結合ペ

プチド（配列番号26ないし29）を用いて、完全フロイントアジュバント（CFA）（ディフコ、デトロイト、ミシガン州）0.5mlを含有するPBS（pH7.2）中2mg/mlの濃度でペプチド0.5mlを乳化することにより1次免疫原を調製した。皮下、腹腔内および筋肉内の投与経路により動物のいくつかの部位に免疫原を注射した。1次免疫の4週間後、ブースター免疫を行った。ブースター免疫用量に用いる免疫原を、今度はペプチドを不完全フロイントアジュバント（IFA）（ディフコ、デトロイト、ミシガン州）0.5mlで1mg/mlに希釈した以外は1次免疫原に用いたのと同じの結合または結合していないペプチド0.5mlを乳化することにより調製した。再度、ブースター用量を皮下、腹腔内および筋肉内型の注射によりいくつかの部位に投与した。ブースター免疫の2週間後、動物を出血させ（5ml）、各血清を以下に記載するようにペプチドに対する免疫反応性に関して試験した。ブースターおよび出血スケジュールを4週間隔で十分な力価が得られるまで繰り返した。以下の実施例17に記載するように、マイクロタイターEIAにおいて非結合ペプチドを用いることにより抗血清の力価または濃度を決定した。1:500またはそれ以上の抗体力価はさらに使用および研究するのに十分な力価であると考えられた。加えて、いくつかのペプチド抗血清に関して見かけの親和性 $[K_d(\text{app})]$ （以下の実施例17に記載）をも決定した（表3）。

【0274】

【表3】

表3：BU101に対して生成されたポリクローナル抗体の力価および
Kd (aap)

ペプチド 免疫原	ペプチドを 結合したか?	13週力価		Kd(aap)
		配列番号に対する抗原		
		28	29	
配列番号 21	はい/KLH	12,000	ND	$10^{-7.3}$
配列番号 22	はい/KLH	10,000	ND	$10^{-7.7}$
配列番号 23	はい/KLH	54,000	ND	$10^{-7.8}$
配列番号 24	はい/KLH	8900	ND	$10^{-7.0}$
配列番号 25	はい/KLH	<500	ND	$10^{-7.3}$
配列番号 26	いいえ	12,500	ND	$10^{-7.5}$
配列番号 26	はい/KLH	4700	ND	$10^{-7.5}$
配列番号 27	いいえ	51,000	ND	$10^{-7.8}$
配列番号 27	はい/KLH	43,000	ND	$10^{-7.8}$
配列番号 28	いいえ	47,000	ND	$10^{-7.7}$
配列番号 29	はい/KLH	ND	52,000	ND
配列番号 29	いいえ	ND	>62,500	ND

【0275】

B. モノクローナル抗体の生成

1. 免疫プロトコル

マウス(6ないし8週齢の雌Balb/c)を担体例えばKLHに結合している(前記のように調製)かまたは結合していない(すなわちKLHのごとき担体に結合していない)のいずれかのペプチドを用いて免疫したが、マウスにおいてモノクローナル抗体生成するための非結合、または結合ペプチドの量はウサギにおいてポリクローナル抗血清を生成するために用いた量のおよそ10分の1であった。このように、1次免疫原はCFA乳剤0.1ml中非結合または結合ペプチド100μgからなり、一方ブースター免疫で用いる免疫原はIFA0.1ml中非結合または結合ペプチド25μgからなる。標準的な技術を用いてモノクローナル抗体を作るためのハイブリドーマを調製およびスクリーニングした。モノクローナル抗体を発達させるために用いられる方法はKohlerおよびMilstein、Nature, 256:494(1975)に詳記される方法の

ごとき当該分野で周知の方法に従い、J. G. R. Hurrell 編、Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications、シー・アール・シー・プレス・インコーポレーティッド、ボッカラートン、フロリダ州(1982)に概説されている。KohlerおよびMilstein法に基づくモノクローナル抗体を産生させるための別の方法はL. T. Mimmsら、Virology, 176: 604-619 (1990)の方法であり、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0276】

免疫レジユメ(マウスによる)は1次免疫にさらにブースター免疫を加えたものからなる。1次免疫に用いられる1次免疫原は予めCFA 50 μ lで乳化したPBS (pH 7.2) 50 μ l中非結合または結合ペプチド100 μ gからなる。ブースター免疫は1次免疫後およそ4週に実施され、IFA 50 μ lで乳化したPBS (pH 7.2) 50 μ l中非結合または結合ペプチド25 μ gからなる。この免疫原全100 μ lを各マウスに腹腔内接種した。3回めの免疫のおよそ4週後に実施例17に記載されるようにマイクロタイタープレート酵素免疫アッセイ(EIA)により免疫応答に関して個々のマウスをスクリーニングした(表4)。

【0277】

【表4】

表4：BU101に対して生成されたマウス抗血清の力価

マウス番号	ペプチド免疫原	ペプチドを結合したか？	配列番号による力価		
			29	23	28
			29	23	28
1-1	配列番号 29	はい/KLH	54,000	ND	ND
1-2	配列番号 29	はい/KLH	10,300	ND	ND
1-3	配列番号 29	はい/KLH	61,000	ND	ND
1-4	配列番号 29	はい/KLH	28,000	ND	ND
1-5	配列番号 29	はい/KLH	25,000	ND	ND
2-1	配列番号 23	はい/KLH	ND	54,000	ND
2-2	配列番号 23	はい/KLH	ND	40,000	ND
2-3	配列番号 23	はい/KLH	ND	17,000	ND
2-4	配列番号 23	はい/KLH	ND	35,000	ND
2-5	配列番号 23	はい/KLH	ND	12,500	ND
8-1	配列番号 28	いいえ	ND	ND	10,800
8-2	配列番号 28	いいえ	ND	ND	18,500
8-3	配列番号 28	いいえ	ND	ND	7,900
8-4	配列番号 28	いいえ	ND	ND	9,000
8-5	配列番号 28	いいえ	ND	ND	11,800

NDは実施しなかったことを示す。

【0278】

3回目の免疫のおよそ15週後、PBS (pH 7.2) 中非結合または結合ペプチド25 µgでマウスを静脈内接種した。この静脈内ブースター投与の3日後、ポリエチレングリコール(PEG)法を用いて脾細胞を、Sp2/0-Ag14ミエローマ細胞(ミルステイン・ラボラトリーズ英国)と融合した。10%ウシ胎児血清(FCS) Sp2/0-Ag14ミエローマ細胞(ミルステイン・ラボラトリーズ+1% ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT))を含有するダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)中融合体を培養した。実施例17のプロトコルに従ってマイクロタイタープレートEIAによりバルク

培養物をスクリーニングした。免疫原として用いたペプチドと反応するクローンおよびその他のペプチド（すなわち免疫原として用いなかったBU101ペプチド）と反応しないクローンを最終的な伸長のために選別した。このように選別したクローンを伸長し、等分し、10% FCSおよび10% ジメチルスルフォキシドを含有するDMEM中凍結した。

【0279】

2. モノクローナル抗体を含有する腹水の生成

前記のように調製した凍結ハイブリドーマを解凍し、伸長培地に置いた。生存ハイブリドーマ細胞をプリスタン処理したマウスの腹腔内に接種した。マウスから腹水を除去し、プールし、0.2 μフィルターを通して濾過し、免疫グロブリンGクラス(IgG)分析に供し、精製に必要なプロテインAカラムの容量を決定した。

【0280】

3. 腹水からのモノクローナル抗体の精製

簡単には、濾過し、解凍した腹水をプロテインAセファロース結合バッファー(1.5M グリシン、3.0M NaCl、pH8.9)の等容量と混合し、0.2 μフィルターを通して再度濾過した。腹水に存在するIgGの量によりプロテインAカラムの容量を決定する。次いで溶出液をPBS(pH7.2)に対して2ないし8 で一晩透析する。透析したモノクローナル抗体を除菌し、アリコートに分配する。このように調製した精製された抗BU101モノクローナルを2ないし8 で短期保存かまたは-80 で長期保存する。モノクローナル抗体のさらなる特性化。前記のように生成したモノクローナル抗体のアイソタイプおよびサブタイプを実施例17に記載のEIAマイクロタイタープレートアッセイを用いて決定した。簡単には、マイクロタイタープレートにペプチドでコーティングし、ハイブリドーマ細胞培養上澄と反応させる。アルカリ性ホスファターゼヤギ抗マウスアイソタイプ試薬(抗IgG1、抗IgG2a、抗IgG2b、および抗IgG3)(サザン・バイオテック、バーミンガム、アラバマ州)を用いて結合抗体を特異的に検出した。アイソタイプの決定に加えて、モノクローナル抗体をペプチドマッピングしてさらに特性化した。再度、実施例17に記載さ

れるE I Aマイクロタイタープレートアッセイを用いてマイクロタイタープレートを各々の合成ペプチド（配列番号21ないし29）でコーティングし、モノクローナル抗体の結合を決定した。アイソタイプ化およびペプチド特異性の結果を表5にまとめる。

【0281】

【表5】

表5：抗BU101モノクローナル抗体のアイソタイプおよびペプチド特異性

モノクローナル抗体	アイソタイプ	ペプチド特異性
H85C21	IgG1	配列番号25 配列番号28
H95C43	IgG2a	配列番号23 配列番号28
H155C16	IgG1	配列番号24 配列番号28
H171C113sc16	IgG1	配列番号28

【0282】

モノクローナル抗体のアリコート量を2ないし8で連続保存し、所定の期間中の光学密度（OD）の値評価することにより、モノクローナル抗体において安定性試験を実施することもできる。

【0283】

C. 免疫原としての組換えタンパク質の使用

本明細書に記載するように作った組換えタンパク質を免疫原として用いて、当業者に周知の試薬および技術に相応の変化を加えてポリクローナルおよびモノクローナル抗体を生成するのは本発明の範囲内である。

【0284】

実施例15：BU101ペプチドに特異的に結合する血清抗体の精製

実施例13および/または14で前記するように得られた免疫血清を実施例10に記載されるように調製された固定合成ペプチド、または実施例11に記載されるように調製された組換えタンパク質を用いてアフィニティー精製する。抗血清のIgG分画は希釈した粗製抗血清をプロテインAカラム（アフィニティー・ゲル・ブ

ロテインA、バイオラッド、ヘルクレス、カリフォルニア州)に通すことにより得られる。バッファー(結合バッファー、製造者により供給)で溶出することにより、免疫グロブリンでない全てのタンパク質が実質的に除去される。0.1M 緩衝グリシン(pH3)で溶出することにより、実質的にアルブミンおよびその他の血清タンパク質を含まない免疫グロブリン調製物が得られる。

【0285】

免疫アフィニティークロマトグラフィーを実施して特異的抗原結合抗体のより高度な分画を有する調製物が得られる。抗血清を上昇させるために用いられるペプチドをクロマトグラフィー樹脂に固定し、そのエピトープを指向する特異的抗体を樹脂に吸着する。非結合性構成成分を洗い流した後、0.1M グリシンバッファー、pH2.3で特異的抗体を溶出する。抗体分画を即座に1.0M トリスバッファー(pH8.0)で中和し、免疫反応性を維持する。クロマトグラフィー樹脂の選択はペプチドに存在する反応基に依存する。ペプチドがアミノ基を有する場合、アフィ-ゲル10またはアフィ-ゲル15(バイオ-ラッド、ヘルクレス、カリフォルニア州)のごとき樹脂を用いる。カルボキシ基を介してペプチドに結合するのが望ましい場合、アフィ-ゲル102を用いることができる(バイオ-ラッド、ヘルクレス、カリフォルニア州)。ペプチドが遊離のスルフヒドリル基を有する場合、有機水銀樹脂例えばアフィ-ゲル501を用いることができる(バイオ-ラッド、ヘルクレス、カリフォルニア州)。

【0286】

別法として、脾臓を回収し、ハイブリドーマ生成に用いて本明細書に前記するように当該分野で周知の常法に従ってモノクローナル抗体を生成できる。

【0287】

実施例16：組織サンプルのウェスタンブロッティング

0.1M トリスHCl(pH7.5)、15重量/容量% グリセロール、0.2mM EDTA、1.0mM 1,4-ジチオスレイトール、10µg/ml ロイペプチンおよび1.0mM フッ化フェニルメチルスルフォニル中組織サンプルをホモジナイズすることによりタンパク質抽出物を調製した(Kainら、Biotechniques, 17:982(1994))。ホモジナイ

ズした後、ホモジネートを4 で5分間遠心し、破片から上澄を分離した。タンパク質を定量するために上澄3ないし10 μ lをビスニコニン酸試薬(シグマ、セントルイス、ミズーリー州)1.5mlに加え、562nmで得られる吸光度を測定した。

【0288】

SDS-PAGEのために、トリシンバッファー(ノベックス、サンディエゴ、カリフォルニア州)でサンプルを望ましいタンパク質濃度に調整し、等容量の2Xトリシンサンプルバッファー(ノベックス、サンディエゴ、カリフォルニア州)と混合し、サーマル・サイクラーで100、5分間加熱した。次いでサンプルを電気泳動用のノベックス10-20%プレキャスト/トリシン・ゲルに供した。電気泳動の後、ノベックス・トリス・グリシン・トランスファーバッファー中サンプルをゲルからニトロセルロース膜に移した。次いでウェスタン・ライツ・プラスまたはウェスタン・ライツ(トロピックス、ベッドフォード、マサチューセッツ州)化学発光検出キットで提供される試薬および方法を用いて特異的抗ペプチド抗体で膜をプロービングした。展開した膜をハイパーフィルムECL(アマーシャム、アーリントンハイツ、イリノイ州)に暴露することにより化学発光バンドを可視化した。

【0289】

フィルム上でバンドを可視化した後、発色性基質5-ブロモ-4-クロロ-3-インドールホスフェート(BCIP)を添加し、展開することによりバンドを膜上で直接可視化することもできた。この発色性溶液は100mM NaCl、5mM MgCl₂および100mM トリスHCl、pH9.5を含有する溶液中0.016% BCIPを含有する。バンドが望ましい強度に展開されるまで(1ないし2日間)、フィルターを溶液中室温でインキュベートした。ライトボックスで徹照し、アルファ・イメージャー2000(アルファ・イノテック・コーポレーション、サンレアンドロ、カリフォルニア州)で画像を記録することにより画像を捕捉した。予め染色した分子量標準(ノベックス、サンディエゴ、カリフォルニア州)およびビオチン化分子量標準(トロピックス、ベッドフォード、マサチューセッツ州)の可動性に基づいて分子量を決定した。

【0290】

図8はBU101合成ペプチド、配列番号28（実施例14を参照のこと）に対する抗血清を用いて組織タンパク質抽出物のパネルで実施したウェスタンブロットティングの結果を示している。図8の各レーンは異なる組織タンパク質抽出物を示している：1、胃；2、ブランク；3、心臓；4、胎盤；5、脾臓；6、脳；7、腎臓；8、乳癌；9、肺；10、肝臓；11、卵巣；12、マーカー分子量（キロダルトン）。6.5キロダルトン近くのバンド（矢印）は、タンパク質サイズマーカー（レーン12）により決定されるように、乳房組織抽出物（レーン8）においてのみ検出され、その他のいずれの組織抽出物においても検出されなかった。その他のウェスタンブロットティングでは（データは示していない）、また9個の乳癌組織タンパク質抽出物のうち5個で、および6個の正常乳房組織タンパク質抽出物のうち1個で6.5キロダルトンのバンドが観察された。

【0291】

1次抗体（抗ペプチドポリクローナル抗血清）はニトロセルロースフィルターに暴露する前にペプチド免疫原の濃度を変化させて、室温で30分間ブレインキュベートする以外は前記と類似の方法で競合実験を実施した。前記のようにウェスタンの展開を続ける。乳房サンプルでは6.5キロダルトンのバンドに結合する抗体はBU101ペプチド配列番号23100 nMの濃度で阻害された。

【0292】

実施例17：EIAマイクロタイタープレートアッセイ

実施例14に記載されるように好ましくはウサギおよびマウスから得た抗血清の免疫反応性を以下のようにマイクロタイターEIAにより決定した。簡単には実施例10に記載されるように調製した合成ペプチド、配列番号21ないし29を炭酸塩バッファー（50 mM、pH 9.6）に溶解し、最終濃度2 µg/mlにした。次にペプチドまたはタンパク質溶液100 µlをイムロン2（登録商標）マイクロタイタープレート（ダイネックス・テクノロジーズ、チャンティリー、バージニア州）の各ウェルに入れた。プレートを室温で一晩インキュベートし、次いで脱イオン水で4回洗浄した。適当なタンパク質遮断剤、例えばスーパーブロック（登録商標）（ピヤース・ケミカル・カンパニー、ロックフォード、イ

リノイ州) 125 μ l を各ウェルに添加することによりウェルを遮断し、次いで溶液を即座に捨てた。この遮断方法を3回実施した。前記のように調製した免疫したウサギおよびマウスから得られた抗血清を0.05% トゥイーン-20 (登録商標) (モノラウレート・ポリオキシエチレンエーテル) (シグマ・ケミカル・カンパニー、セントルイス、ミズーリー州) および0.05% アジドナトリウムを含有するPBS中タンパク質遮断剤 (例えば3% スーパーブロック (登録商標) 溶液) に1:100、1:500、1:2500、1:12500および1:62500の希釈で希釈し、コーティングしたマイクロタイタープレートの各ウェルに入れた。次いでウェルを室温で3時間インキュベートした。各ウェルを脱イオン水で4回洗浄した。アルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgGまたはヤギ抗マウスIgG抗血清 (サザン・バイオテック、バーミンガム、アラバマ州) 100 μ l を0.05% トゥイーン20 (登録商標) および0.05% アジドナトリウムを含有するリン酸塩緩衝セイライン中3% スーパーブロック (登録商標) 溶液で1:2000に希釈し、各ウェルに加えた。ウェルを室温で2時間インキュベートした。次に各ウェルを脱イオン水で4回洗浄した。次いでパラニトロフェニルホスフェート基質 (キルケガード・アンド・ペリー・ラボラトリーズ、ガイザースブルグ、メリーランド州) 100 μ l を各ウェルに加えた。ウェルを室温で30分間インキュベートした。各ウェルで405 nmの吸光度は赤色であった。試験ウェルでは405 nmにおける吸光度が非免疫血清 (陰性対照) により得られる吸光度以上に上昇することにより陽性反応を同定した。陽性反応は検出可能な抗BU101抗体が存在していることを示した。抗ペプチド抗血清の力価は前記した抗血清の希釈から算出し、 $A_{405\text{nm}} = 0.5\text{OD}$ である算出希釈として定義した。

【0293】

力価に加え、見かけの親和性 [$K_d(\text{app})$] をもいくつかの抗ペプチド抗血清に関して決定した。EIAマイクロタイタープレートアッセイの結果を用いてミカエリス・メンテンの等式に類似の等式に基づいて見かけの解離定数 (K_d) を誘導した (V. Van Heyningen, *Methods in Enzymology*, 121:472 (1986) およびさらにX. Qiuら、J

ournal of Immunology, 156:3350 (1996) に記載) :

【0294】

【数1】

$$[Ag-Ab] = [Ag-Ab]_{max} \times \frac{[Ab]}{[Ab] + Kd}$$

式中、 $[Ag-Ab]$ は抗原 - 抗体複合体濃度、 $[Ag-Ab]_{max}$ は最大複合体濃度、 $[Ab]$ は抗体濃度、および K_d は解離定数である。曲線が適合する間は $[Ag-Ab]$ は所定の Ab 濃度における OD_{405nm} の値からバックグラウンドを減じたもので置き換えた。 K_d および $[Ag-Ab]_{max}$ に対応する $[OD_{405nm}]_{max}$ を適合パラメーターとして処理した。ソフトウェアプログラムオリジン (商標) (マイクロカル・ソフトウェア・インコーポレーティッド、ノーザンプトン、メリーランド州) を曲線適合に用いた。

【0295】

実施例18：固相粒子のコーティング

A. BU101 抗原に特異的に結合する抗体での微粒子のコーティング

BU101 タンパク質 (実施例15を参照のこと) に特異的に結合するアフィニティ精製した抗体で、半径が 0.1 ないし $20 \mu m$ の範囲であるポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレン、ポリメチルアクリレートの微粒子または類似の粒子をコーティングする。微粒子を受動的または能動的のいずれかでコーティングできる。あるコーティング法は、以下に示すように、EDAC (塩酸1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド) (アルドリッチ・ケミカル・カンパニー、ミルウォーキー、ウィスコンシン州) 活性化カルボキシル化ラテックス微粒子をBU101タンパク質に特異的に結合する抗体でコーティングすることからなる。簡単には、適当な容器中で樹脂洗浄カルボキシル化ラテックス微粒子 (バングズ・ラボラトリーズ、カーメル、インディアナ州またはセロディン、インディアナポリス、インディアナ州) の最終 0.375% 固体懸濁液を $50 mM$ MESバッファー、 $pH 4.0$ および $150 mg/l$ のアフィ

ニティー精製した抗BU101抗体（実施例14を参照のこと）を含有する溶液中15分間混合する。EDACカップリング剤を最終濃度5.5 µg/mlで混合物に加え、室温で2.5時間混合する。

【0296】

次いで0.2 µm マイクロゴン濾過モジュールを用いる接線流濾過（tangential flow filtration）により8容量のトウイン20（登録商標）/リン酸ナトリウム洗浄バッファー（pH7.2）で微粒子を洗浄した。洗浄した微粒子を通常希釈した表面活性剤および遮断剤として無関係のタンパク質を含有する適当なバッファー中必要時まで保存する。

【0297】

B. 1/4インチビーズのコーティング

またBU101抗原に特異的に結合する抗体を当該分野で周知の常法に従って1/4インチポリスチレンビーズの表面にコーティングし（Snitmanら、米国特許第5273882号、参照により本明細書に組み込まれる）、競合結合またはEIAサドウィッチアッセイにおいて使用することもできる。

【0298】

最初にポリスチレンビーズを10 mM NaHCO₃バッファー（pH8.0）中約15秒間超音波処理することにより清浄する。次いで全ての微細物質が除去されるまでビーズを脱イオン水で洗浄する。次いで10 mM 炭酸塩バッファー（pH8ないし9.5）の抗体溶液中にビーズを浸す。抗体溶液は高親和性モノクローナル抗体の場合の1 µg/mlほどの希釈に、またはアフィニティー精製しなかったポリクローナル抗体では約500 µg/mlほどの濃度に行う。ビーズを室温で少なくとも12時間コーティングし、次いで脱イオン水で洗浄する。ビーズを空気乾燥するか、またはぬれた状態（PBS中、pH7.4）で保存してもよい。またこれらをタンパク質安定剤（例えばスクロース）または非特異的結合遮断剤として用いられるタンパク質遮断剤（例えば無関係のタンパク質、カルナチオン・スキムミルク、スーパーブロック（登録商標）等）で保護コーティングしてもよい。

【0299】

実施例19：微粒子酵素イムノアッセイ(MEIA)

標準抗原競合EIAまたは抗体サンドウィッチEIAを実施し、固相例えば微粒子を利用することにより(MEIA)、患者の試験サンプル中のBU101抗原を検出する。アッセイは自動分析器例えばIMx(登録商標)アナライザー(アボット・ラボラトリーズ、アボットパーク、イリノイ州)で実施できる。

【0300】

A. 抗体サンドウィッチEIA

簡単には、BU101抗原を含有することが疑われるサンプルを抗BU101抗体コーティング微粒子(実施例17に記載のように調製)の存在下インキュベートして抗原/抗体複合体を形成させる。次いで微粒子を洗浄し、シグナル発生化合物(すなわちアルカリ性ホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼのごとき酵素)に結合した抗体を含んでなる指示試薬を抗原/抗体複合体または微粒子に加え、インキュベートする。微粒子を洗浄し、シグナル発生化合物と反応して測定可能なシグナルを生じる基質(例えば各々、4-メチルアンベリフェリルホスフェート(MDP)、またはOPD/パーオキサイド)を添加することにより結合抗体/抗原/抗体複合体を検出する。陰性対照で生じたシグナルと比較して、試験サンプル中のシグナル上昇によりBU101抗原の存在が検出される。試験サンプル中のBU101抗原の存在は乳房疾患または症状例えば乳癌の診断の指標である。

【0301】

B. 競合結合アッセイ

競合結合アッセイでは、標識ペプチドが抗ペプチド抗体コーティング微粒子と接触した場合に、測定可能なシグナルを発生するペプチドまたはタンパク質を使用する。このアッセイをIMx(登録商標)アナライザー(アボット・ラボラトリーズ、アボットパーク、イリノイ州より入手可能)で実施できる。BU101抗原を含有することが疑われる試験サンプルの存在下、標識ペプチドをBU101抗体コーティング微粒子(実施例17に記載されるように調製)に加え、標識BU101ペプチド(または標識タンパク質)/結合抗体複合体および/または患者のBU101抗原/結合抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下

でインキュベートする。試験サンプル中のBU101抗原は標識BU101ペプチド（またはBU101タンパク質）と、微粒子上の結合部位に関して競合する。アッセイにおいて、試験サンプル中の抗原およびBU101ペプチドまたはBU101タンパク質は抗体結合部位に関して競合するので、試験サンプル中のBU101抗原は標識ペプチドおよび抗体コーティング微粒子の結合を低下させる。低下したシグナル（対照と比較して）試験サンプル中のBU101抗原の存在を示している。BU101抗原の存在は乳房疾患または症状、例えば乳癌の診断を示唆している。

【0302】

前記で提供され、論じられたBU101ポリヌクレオチドおよびそれによりコードされるタンパク質は乳房組織疾患、とりわけ乳癌のマーカーとして有用である。試験は試験サンプル例えば血液、血漿または血清におけるこのマーカーの出現に基づき、低コスト、非侵害的に医師が癌の診断をし、治療プロトコルを選択するか、または選択した治療の有効性をモニター観察する助けとなる診断情報を提供できる。このマーカーは容易に入手できる体液例えば血液、尿または便中に疾患組織に由来する抗原として出現し、免疫学的方法により検出できる。このマーカーは疾病状態で上昇し、疾病状態で変化するか、または不適切な身体部分において出現する乳房の正常タンパク質である。

【0303】

実施例20：BU101タンパク質の免疫組織化学的検出

前記の実施例14で記載された配列番号23に対する抗血清を用いて、標準的な方法により種々の正常および疾患組織を免疫組織化学的に染色した。簡単には、組織の凍結塊を6ミクロンの切片に切断し、顕微鏡スライドに載せた。冷アセトンで固定した後、切片を室温で乾燥し、次いでリン酸塩緩衝セイラインで洗浄し、遮断した。スライドを1：100希釈した配列番号23に対する抗体と共にインキュベートし、洗浄し、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体と共にインキュベートし、再度洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したアビジンと共にインキュベートした。最後の洗浄の後、スライドを赤色の色素を提供する3-アミノ-9-エチルカルバゾール基質と共にインキュベートした。スライドをヘマトキシ

リンで対比染色し、マウントして、病理学者が顕微鏡により試験した。

【0304】

良性および悪性の上皮細胞を含む全ての乳房標本の上皮細胞においてドット様から広汎性のパターンで中程度から強度の免疫反応性が観察された。実際には全ての細胞が染色された。間質細胞では免疫反応性はほとんどまたは全く認められなかった。散在する好中球および組織球もまた陽性であった。陰性対照では適当な結果が得られた。結腸の上皮細胞では中程度から強度の免疫反応性であった。間質細胞では低から中程度の免疫反応性をも示した。単球は、結腸の固有筋層および脈管中膜などのたいていの器官で中程度の免疫反応性を示した。マクロファージは通常中程度の免疫反応性であった。

【0305】

試験した全ての組織の結果を表6にまとめる。縦軸の「#陽性/全数」表示は標本の全数のうちの陽性標本の数を意味する。縦軸の「%」表示は試験した全組織に対して平均化した陽性細胞のパーセントを意味する。

【0306】

【表6】

表6：抗BU101（配列番号：23）による組織染色

組織	#陽性/全数	%	注釈
乳房、良性組織	13/13	100	上皮細胞はドット様の免疫反応性を示す。
乳房、葉状腫瘍	1/1	100	上皮細胞はドット様の免疫反応性を示す。
乳房、腺管癌	9/9	100	実質的に全細胞が強度に染色される。
結腸、正常	10/10	100	
結腸、腺癌	4/4	100	癌細胞では強度に免疫反応する。
回腸、正常	1/1	100	
肺、正常	0/3	0	肺泡マクロファージはバックグラウンド染色を示す。
肺、気管支上皮	3/3	100	
肝臓、正常肝細胞	0/2	0	
肝臓、胆管上皮細胞	2/2	100	中程度の免疫反応性
膀胱、正常	0/3	0	
前立腺、良性	0/1	0	
前立腺、腺癌	0/4	0	少数の癌細胞において弱い免疫反応性

【図面の簡単な説明】

【図1】

クローン2083578H1（配列番号1）、603148H1（配列番号2）、604290H1（配列番号3）のヌクレオチド整列化、クローン2083578H1及び603148H1の完全長配列〔それぞれ、2083578inh（配列番号4）及び603148inh（配列番号5）と称される〕、及びそれらから誘導されるコンセンサス配列（配列番号6）を示す。

【図2】

オーバーラップクローン2083578H1（配列番号1）、603148HI（配列番号2）、604290H1（配列番号3）、2083578inh（配列番号4）、603148inh（配列番号5）のヌクレオチド整列化からのコンセンサスヌクレオチド配列（配列番号6）の形成を表わすコンティグ地図を示す。

【図3A】

図3Aは、乳房組織と非乳房組織抽出物からのRNAのエチジウムブロマイド

染色アガロースゲルのスキャンを示す。

【図3B】

図3Bは、BU101放射性同位元素標識プローブとのハイブリダイゼーション後の対応するRNAのノーザンブロットである。

【図4】

正常乳房、乳癌、結腸及び肺組織のRNAをテンプレートとして使用した、BU101 RNA特異的RT-PCR増幅産物のSYBR（登録商標）Green染色アガロースゲルのスキャンである。

【図5】

BU101 RNA特異的RT-PCR増幅産物のSYBR（登録商標）Green染色アガロースゲルのスキャンである。この図は、胎盤DNAをRNA対照とし、水を試薬対照として使用した、MDA 361細胞系のRNAによる268塩基対のBU101特異的アンプリコンを示す。

【図6】

図6は、BU101アンプリコンが、LCx（登録商標）Analyzer系（Abbott Laboratories, Abbott Park, ILより入手可能）を用いて、MDA 361細胞系からの200フェムトグラム（fg）のRNAで容易に検出されたことを示す。

【図7】

LCx（登録商標）系を用いてBU101活性に関して検定した正常乳房、乳癌、正常結腸、結腸癌、正常肺及び肺癌組織からの10ピコグラム（pg）のRNAの結果を示す。

【図8】

BU101合成ペプチド（配列番号28）に対する抗血清でプローブした一連の組織タンパク抽出物に関して実施したウエスタンブロットの結果を示す。

【配列表】

Sequence Listing

<110> Patricia Billing-Medel
Maurice Cohen
Tracey L. Colpitts
Paula N. Friedman
Julian Gordon
Edward N. Granados
Steven C. Hodges
Michael R. Klass
Jon D. Kratochvil
Lisa Roberts-Rapp
Christi Scheffel
John C. Russell
Stephen D. Stroupe

<120> Reagents and Methods Useful for Detecting Diseases of
the Breast

<130> 5972.US.P2

<150> US 08/912,276

<151> 1997-08-15

<160> 31

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 274
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
aaatagccct ggcctctgca gctccacagg ctccctgggt ggagtccaaa tcactcattg 60
tttgtgaaag ctgagctcac agcaaaacaa gccaccatga agctgtcggt gtgtctcctg 120
ctggtcacgc tggccctctg ctgtaccag gccaatgccg agttctgccc agctcttggt 180
tctgagctgt tagacttctt ctccattagt gaacctctgt tcaagttaag tcttgccaaa 240
tttgatgccc ctctggaagc tgttcagacc aagt 274

<210> 2
<211> 237
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
tccaaatcac tcattgtttg taaaagctga gctcacagca aaacaagcca ccatgaagct 60
gtcgggtgtgt ctctgctgg tcacgctggc cctctgctgc taccaggcca atgccgagtt 120
ctgcccagct cttgtttctg agctgttaga cttcttcttc attagtgaac ctctgttcaa 180
gttaagctctt gccaaatttg atgccctcc ggaagctggt gcagccaagt taggagt 237

<210> 3
<211> 230
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ccggaagctg ttgcagccaa gttaggagtg aagagatgca cggatcagat gtcccttcag 60
aaacgaagcc tcattgcgga agtctctggtg aaaatattga agaatgtag tgtgtgacat 120
gtaaaaactt tcatectggt ttccactgtc tttcaatgac accctgatct tcaactgcaga 180
atgtaaaggt ttcaactctt tgctttaata aatcacttgc tctccacgtc 230

<210> 4
<211> 478
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
 aaatagccct gggctctgca gctccacagg ctctctgggt ggagtcctaaa tcaactcattg 60
 tttgtgaaag ctgagctcac agcaaaaaca gccaccatga agctgtcgggt gtgtctcctg 120
 ctggtcacgc tggccctctg ctgctaccag gccaatgccg agttctgccc agctcttggt 180
 tctgagctgt tagacttctt ctccattagt gaacctctgt tcaagttaag tcttgccaaa 240
 tttgatgccc ctctggaagc tgttgacagc aagttaggag tgaagagatg cacggatcag 300
 atgtcccttc agaaacgaag cctcattgag gaagtcctgg tgaaaatatt gaagaaatgt 360
 agtgtgtgac atgtaaaaac tttcatcctg gtttccactg tctttcaatg acaccctgat 420
 ctccactgca gaatgtaaag gtttcaacgt cttgctttaa taaatcactt gctctcca 478

<210> 5
 <211> 488
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gtccaaatca ctcatgtgtt gtgaaagctg agctcacagc aaaacaagcc accatgaagc 60
 tgtcgggtgtg tctcctgctg gtcacgctgg cctctgctg ctaccaggcc aatgccgagt 120
 tctgcccagc tcttgtttct gagctgttag acttcttctt cattagtga cctctgttca 180
 agttaagtct tgccaaattt gatgcccctt cattagtga cctctgttca agttaagtct 240
 tgccaaattt gatgcccctc cggaagctgt tgcagccaag ttaggagtga agagatgcac 300
 ggatcagatg tcccttcaga aacgaagcct cattgcccga gtctctgggtga aaatattgaa 360
 gaaatgtagt gtgtgacatg taaaaacttt catcctgggt tccactgtct ttcaatgaca 420
 cctgatctt cactgcagaa tgtaaagggt tcaacgtctt gctttaataa atcacttgct 480
 ctccacgt 488

<210> 6
 <211> 481
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 aaatagccct gggctctgca gctccacagg ctctctgggt ggagtcctaaa tcaactcattg 60
 tttgtgaaag ctgagctcac agcaaaaaca gccaccatga agctgtcgggt gtgtctcctg 120
 ctgggtcacgc tggccctctg ctgctaccag gccaatgccg agttctgccc agctcttggt 180
 tctgagctgt tagacttctt ctccattagt gaacctctgt tcaagttaag tcttgccaaa 240
 tttgatgccc ctccggaagc tgttgacagc aagttaggag tgaagagatg cacggatcag 300
 atgtcccttc agaaacgaag cctcattgag gaagtcctgg tgaaaatatt gaagaaatgt 360
 agtgtgtgac atgtaaaaac tttcatcctg gtttccactg tctttcaatg acaccctgat 420
 ctccactgca gaatgtaaag gtttcaacgt cttgctttaa taaatcactt gctctccagc 480
 t 481

<210> 7
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Restriction site

<400> 7
 agctcgggaat tccgagcttg gatcctctag agcggcggcc gactagttag ctctctgacc 60
 cgggaatt 68

<210> 8
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Restriction site

<400> 8
 aattaattcc cgggtcgacg agctcactag tcggcggccc ctctagagga tccaagctcg 60
 gaattccg 68

<210> 9

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

 <220>
 <223> Universal primer

 <400> 9
 agcggataac aatttcacac agga 24

 <210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Universal primer

 <400> 10
 tgtaaaacga cggccagt 18

 <210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 acttgaacag aggttcact 19

 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 cagccaagtt aggagttgaa 20

 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 gagatgcacg gatcagatg 19

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 ttttacgtgg agagcaagtg 20

 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 15
 ttctgccag ctcttgtttc tgag 24

 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 16

tgcagtggaag atcagggtg 19
 <210> 17
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 gcctcattgc gga 13
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 taatacgact cactataggg 20
 <210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 gcggccgccc aactacatt tcttcaatat 30
 <210> 20
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Met Lys Leu Ser Val Cys Leu Leu Leu Val Thr Leu Ala Leu Cys Cys
 1 5 10
 Tyr Gln Ala Asn Ala Glu Phe Cys Pro Ala Leu Val Ser Glu Leu Leu
 20 25 30
 Asp Phe Phe Phe Ile Ser Glu Pro Leu Phe Lys Leu Ser Leu Ala Lys
 35 40 45
 Phe Asp Ala Pro Pro Glu Ala Val Ala Ala Lys Leu Gly Val Lys Arg
 50 55 60
 Cys Thr Asp Gln Met Ser Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ile Ala Glu Val
 65 70 75 80
 Leu Val Lys Ile Leu Lys Lys Cys Ser Val
 85 90
 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Glu Phe Cys Pro Ala Leu Val Ser Glu Leu Leu Asp Phe Phe Phe
 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Ile Ser Glu Pro Leu Phe Lys Leu Ser Leu Ala Lys Phe Asp Ala
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Ser Leu Ala Lys Phe Asp Ala Pro Pro Glu Ala Val Ala Ala Lys
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Glu Ala Val Ala Lys Leu Gly Val Lys Arg Cys Thr Asp Gln
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Met Ser Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ile Ala Glu Val Leu Val Lys
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Ser Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ile Ala Glu Val Leu Val Lys Ile
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Cys Ser Val
 20
 <210> 27
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Leu Ala Lys Phe Asp Ala Pro Pro Glu Ala Val Ala Ala Lys Leu Gly
 1 5 10 15
 Val Lys Arg Cys Thr Asp Gln Met Ser Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ile
 20 25 30
 Ala Glu Val Leu Val Lys Ile Leu Lys Lys Cys Ser Val
 35 40 45
 <210> 28
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Glu Phe Cys Pro Ala Leu Val Ser Glu Leu Leu Asp Phe Phe Phe Ile
 1 5 10 15
 Ser Glu Pro Leu Phe Lys Leu Ser Leu Ala Lys Phe Asp Ala Pro Pro
 20 25 30
 Glu Ala Val Ala Ala Lys Leu Gly Val Lys Arg Cys Thr Asp Gln Met
 35 40 45
 Ser Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ile Ala Glu Val Leu Val Lys Ile Leu
 50 55 60
 Lys Lys Cys Ser Val
 65
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT

```

      <213> Homo sapiens
      <400> 29
Ser Leu Ala Lys Phe Asp Ala Pro Leu Glu Ala Val Ala Ala Lys
 1          5          10          15
      <210> 30
      <211> 8
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <220>
      <223> Affinity purification system recognition site

      <400> 30
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1          5
      <210> 31
      <211> 21
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <220>
      <223> Affinity purification system recognition site

      <400> 31
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Glu His
 1          5          10          15
His His His His His
 20

```

【図1】

Figure 1

```

>2083578H1      AAATAGCCCT GGGCTCTGCA GCTCCACAGG CTCCTGGGGT GGAGTCCAAA
>2083578inh     AAATAGCCCT GGGCTCTGCA GCTCCACAGG CTCCTGGGGT GGAGTCCAAA
<603148inh      GTCCAAA
>603148H1       TCCAAA
コンセンサス   AAATAGCCCT GGGCTCTGCA GCTCCACAGG CTCCTGGGGT GGAGTCCAAA

>2083578H1      TCACTCATTG TTTGTGAAAG CTGAGCTCAC AGCAAACAA GCCACCATGA
>2083578inh     TCACTCATTG TTTGTGAAAG CTGAGCTCAC AGCAAACAA GCCACCATGA
<603148inh      TCACTCATTG TTTGTGAAAG CTGAGCTCAC AGCAAACAA GCCACCATGA
>603148H1       TCACTCATTG TTTGTGAAAG CTGAGCTCAC AGCAAACAA GCCACCATGA
コンセンサス   TCACTCATTG TTTGTGAAAG CTGAGCTCAC AGCAAACAA GCCACCATGA

>2083578H1      AGCTGTCGGT GTGTCTCCTG CTGGTCACGC TGGCCCTCTG CTGCTACCAG
>2083578inh     AGCTGTCGGT GTGTCTCCTG CTGGTCACGC TGGCCCTCTG CTGCTACCAG
<603148inh      AGCTGTCGGT GTGTCTCCTG CTGGTCACGC TGGCCCTCTG CTGCTACCAG
>603148H1       AGCTGTCGGT GTGTCTCCTG CTGGTCACGC TGGCCCTCTG CTGCTACCAG
コンセンサス   AGCTGTCGGT GTGTCTCCTG CTGGTCACGC TGGCCCTCTG CTGCTACCAG

>2083578H1      GCCAATGCCG AGTTCGCCC AGCTCTTGTT TCTGAGCTGT TAGACTTCTT
>2083578inh     GCCAATGCCG AGTTCGCCC AGCTCTTGTT TCTGAGCTGT TAGACTTCTT
<603148inh      GCCAATGCCG AGTTCGCCC AGCTCTTGTT TCTGAGCTGT TAGACTTCTT
>603148H1       GCCAATGCCG AGTTCGCCC AGCTCTTGTT TCTGAGCTGT TAGACTTCTT
コンセンサス   GCCAATGCCG AGTTCGCCC AGCTCTTGTT TCTGAGCTGT TAGACTTCTT

>2083578H1      CTTTCATTAGT GAACCTCTGT TCAAGTTAAG TCTTGCCAAA TTTGATGCCC
>2083578inh     CTTTCATTAGT GAACCTCTGT TCAAGTTAAG TCTTGCCAAA TTTGATGCCC
<603148inh      CTTTCATTAGT GAACCTCTGT TCAAGTTAAG TCTTGCCAAA TTTGATGCCC
>603148H1       CTTTCATTAGT GAACCTCTGT TCAAGTTAAG TCTTGCCAAA TTTGATGCCC
コンセンサス   CTTTCATTAGT GAACCTCTGT TCAAGTTAAG TCTTGCCAAA TTTGATGCCC

>2083578H1      CTCTGGAAGC TGTGTCAGCC AAGT
>2083578inh     CTCTGGAAGC TGTGTCAGCC AAGTTAGGAG TGAAGAGATG CACGGATCAG
<603148inh      CTCCGGAAGC TGTGTCAGCC AAGTTAGGAG TGAAGAGATG CACGGATCAG
>603148H1       CTCCGGAAGC TGTGTCAGCC AAGTTAGGAG T
>604290H1       CCGGAAGC TGTGTCAGCC AAGTTAGGAG TGAAGAGATG CACGGATCAG
コンセンサス   CTCCGGAAGC TGTGTCAGCC AAGTTAGGAG TGAAGAGATG CACGGATCAG

>2083578inh     ATGTCCCTTC AGAAACGAAG CCTCATTGCG GAAGTCCTGG TGAAAATATT
<603148inh     ATGTCCCTTC AGAAACGAAG CCTCATTGCG GAAGTCCTGG TGAAAATATT
>604290H1       ATGTCCCTTC AGAAACGAAG CCTCATTGCG GAAGTCCTGG TGAAAATATT
コンセンサス   ATGTCCCTTC AGAAACGAAG CCTCATTGCG GAAGTCCTGG TGAAAATATT

>2083578inh     GAAGAAATGT AGTGTGTGAC ATGTAAAAAC TTTCATCCTG GTTTCCACTG
<603148inh     GAAGAAATGT AGTGTGTGAC ATGTAAAAAC TTTCATCCTG GTTTCCACTG
>604290H1       GAAGAAATGT AGTGTGTGAC ATGTAAAAAC TTTCATCCTG GTTTCCACTG
コンセンサス   GAAGAAATGT AGTGTGTGAC ATGTAAAAAC TTTCATCCTG GTTTCCACTG

>2083578inh     TCTTTCAATG ACACCCTGAT CTTCACTGCA GAATGTAAAG GTTTCAACGT
<603148inh     TCTTTCAATG ACACCCTGAT CTTCACTGCA GAATGTAAAG GTTTCAACGT
>604290H1       TCTTTCAATG ACACCCTGAT CTTCACTGCA GAATGTAAAG GTTTCAACGT
コンセンサス   TCTTTCAATG ACACCCTGAT CTTCACTGCA GAATGTAAAG GTTTCAACGT

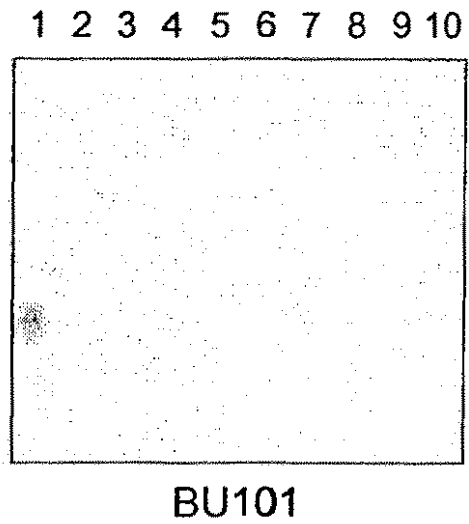
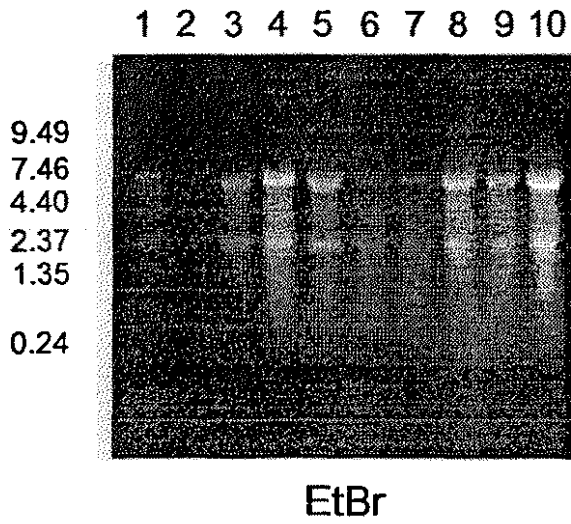
>2083578inh     CTTGCTTTAA TAAATCACTT GCTCTCCA
<603148inh     CTTGCTTTAA TAAATCACTT GCTCTCCACG T
>604290H1       CTTGCTTTAA TAAATCACTT GCTCTCCACG T
コンセンサス   CTTGCTTTAA TAAATCACTT GCTCTCCACG T

```


【図3A】

Figure 3A

Figure 3B



EtBr

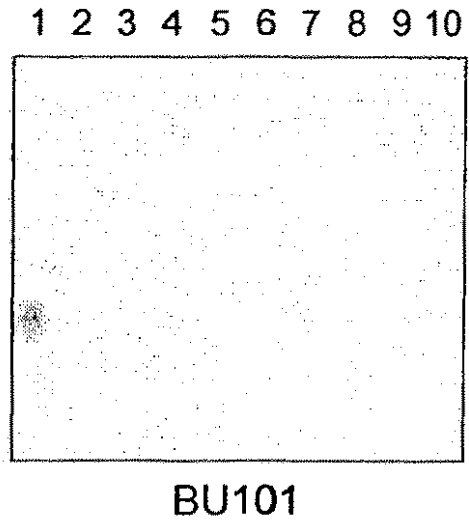
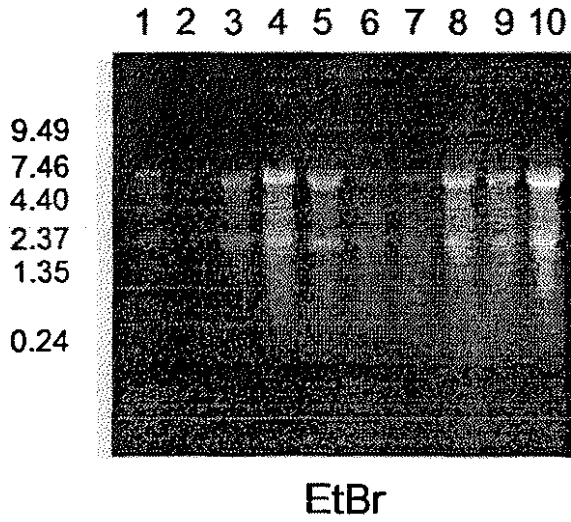
BU101

レーン	組織	レーン	組織
1	乳房	6	肺
2	ブランク	7	肺
3	乳房	8	卵巢
4	結腸	9	前立腺
5	結腸	10	脾臓

【図3B】

Figure 3A

Figure 3B



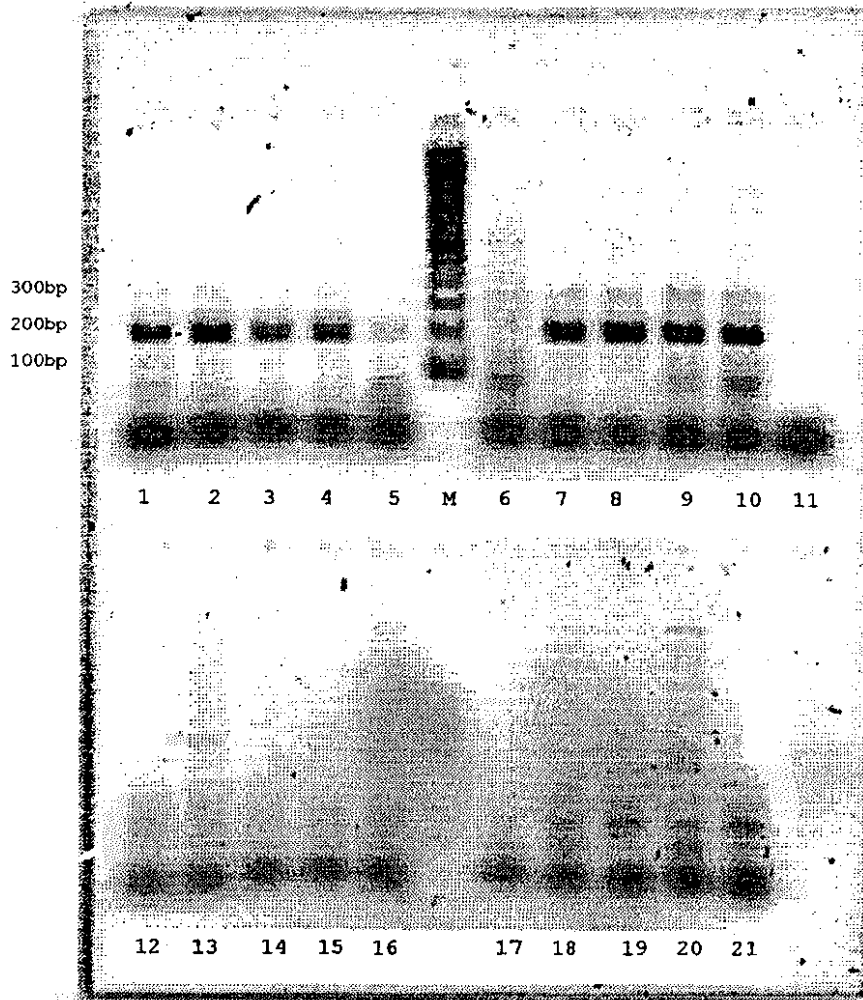
EtBr

BU101

レーン	組織	レーン	組織
1	乳房	6	肺
2	ブランク	7	肺
3	乳房	8	卵巢
4	結腸	9	前立腺
5	結腸	10	脾臓

【図4】

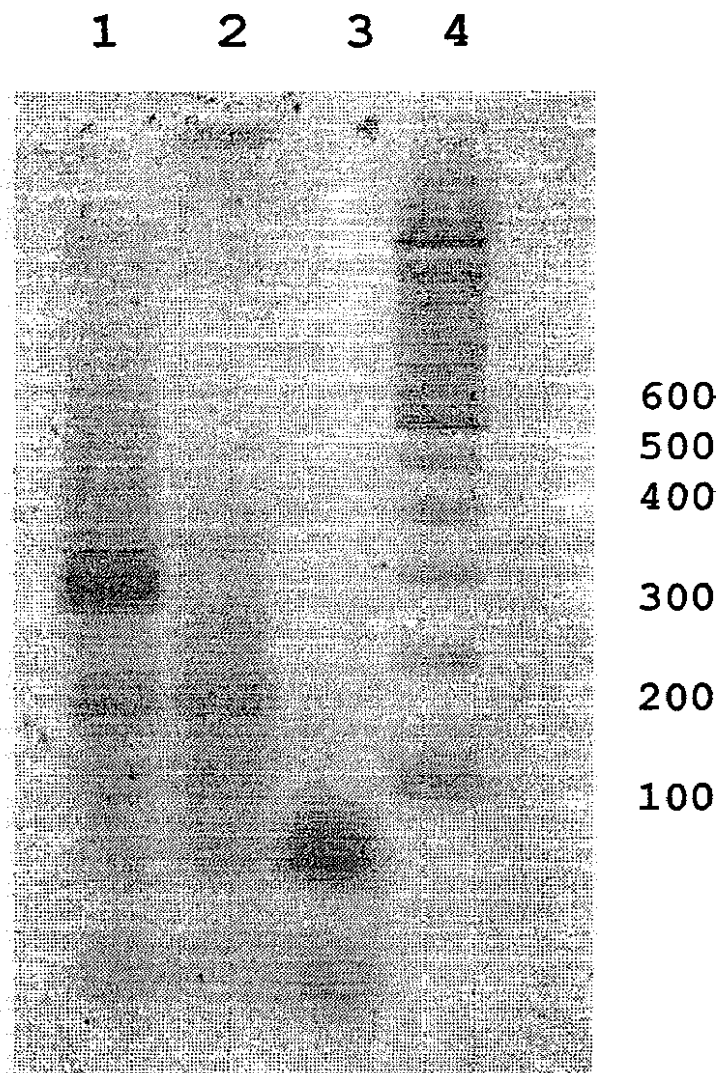
Figure 4



レーン	組織	レーン	組織
1	正常乳房	12	結腸
2	正常乳房	13	結腸
3	正常乳房	14	結腸
4	正常乳房	15	結腸
5	正常乳房	16	結腸
6	乳癌	17	肺
7	乳癌	18	肺
8	乳癌	19	肺
9	乳癌	20	肺
10	乳癌	21	肺
11	胎盤DNA	M	分子量マーカー (100bp)

【図5】

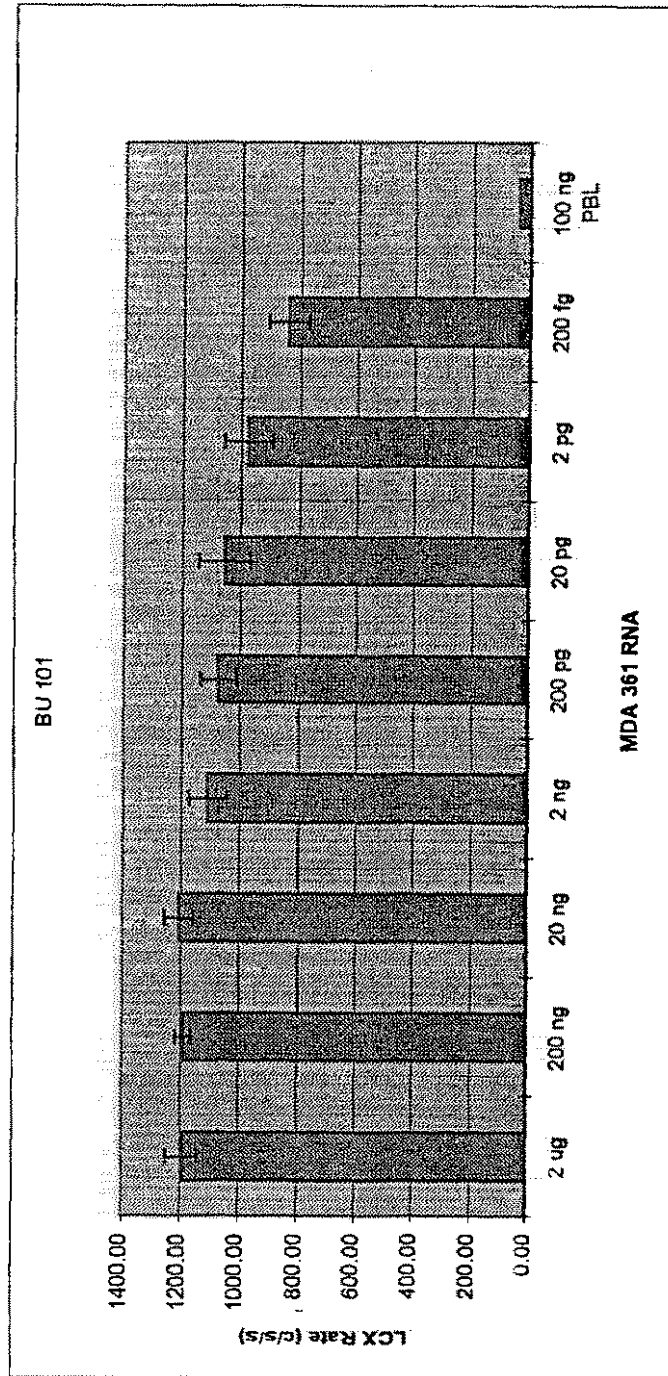
Figure 5



レーン	サンプル
1	MDA 361細胞系RNA
2	胎盤DNA
3	水
4	100塩基対標準

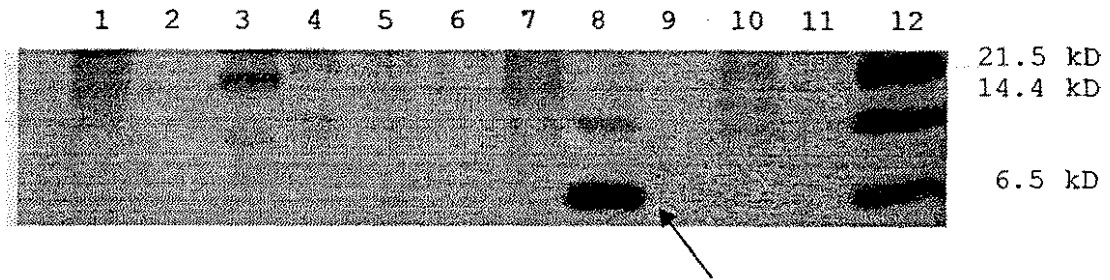
【図 6】

Figure 6



【図8】

Figure 8



レーン	組織	レーン	組織
1	胃	7	腎臓
2	ブランク	8	乳癌
3	心臓	9	肺
4	胎盤	10	肝臓
5	脾臓	11	卵巣
6	脳	12	分子量マーカー (kD)

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/01309		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C07K14/47 C12N5/10 C07K16/18				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C07K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS				
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 07857 A (ABBOTT LAB) 26 February 1998 (1998-02-26) the whole document	1-51		
X	FRIEDMAN, P. ET AL: "BU101: A new breast specific uteroglobin." ANTICANCER RESEARCH, (SEPT.-OCT., 1998) VOL. 18, NO. 5C, PP. 3840-3841. MEETING INFO.: 22ND INTERNATIONAL BREAST CANCER RESEARCH CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR BREAST CANCER RESEARCH ATHENS, GREECE SEPTEMBER 24-27, 1998 , XP000929344 the whole document	1-51		
-/-				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents :				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search 21 July 2000		Date of mailing of the international search report 07/08/2000		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2250 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Reuter, U		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/01309

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WATSON M A ET AL: "MAMMAGLOBIN, A MAMMARY-SPECIFIC MEMBER OF THE UTEROGLOBIN GENE FAMILY, IS OVEREXPRESSED IN HUMAN BREAST CANCER" CANCER RESEARCH, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 56, 15 February 1996 (1996-02-15), pages 860-865, XP002048615 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-51
E	WO 00 35950 A (ABBOTT LAB) 22 June 2000 (2000-06-22) the whole document	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/01309

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9807857 A	26-02-1998	CA 2232237 A EP 0870025 A JP 2000500664 T	26-02-1998 14-10-1998 25-01-2000
WO 0035950 A	22-06-2000	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/47	16/18	4 C 0 8 6
	16/18	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15	1/19	
	1/19	1/21	
	1/21	C 1 2 P 21/02	C
	5/10	21/08	
C 1 2 P	21/02	C 1 2 Q 1/68	A
	21/08	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 Q	1/68		N
G 0 1 N	33/53	33/574	Z
		33/58	A
	33/574	37/00	1 0 2
	33/58	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	37/00	5/00	A
(72)発明者	コーエン, モーリス アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイ ランド・パーク、ディアフィールド・ロー ド・2026		
(72)発明者	コルピッツ, トレイシー・エル アメリカ合衆国、イリノイ・60073、ラウ ンド・レイク、ノース・サークル・ドライ ブ・34365		
(72)発明者	フリードマン, ポーラ・エヌ アメリカ合衆国、イリノイ・60015、デイ アフィールド、カムノー・コート・462		
(72)発明者	ゴードン, ジュリアン アメリカ合衆国、イリノイ・60044、レイ ク・ブラフ、イースト・シエリダン・ロー ド・307		
(72)発明者	グラナドス, エドワード・エヌ アメリカ合衆国、イリノイ・60061、バー ノン・ヒルズ、モンゴメリー・レイク・19		
(72)発明者	ホツジス, ステイブン・シー アメリカ合衆国、イリノイ・60089、バツ ファロー・グローブ、ストーンゲイト・ロ ード・169		
(72)発明者	クラス, マイケル・アール アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバ テイビル、マルベリイ・ドライブ・1606		
(72)発明者	クラトクビル, ジョン・デー アメリカ合衆国、ミズーリ・63088、ワイ ルドウッド、カントリートツブ・コート・ 1706		

- (72)発明者 ロバーツ - ラツプ, ライザ
アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガ
ニー、ウエストフィールド・ドライブ・
2090
- (72)発明者 ラツセル, ジョン・シー
アメリカ合衆国、ウイスコンシン・53158、
プレザント・プレイリイ、シツクスティフ
オース・コート・8275
- (72)発明者 シエツフエル, クリステイ・ピー
アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マン
デライン、パンパリー・ロード・925
- (72)発明者 ストロープ, ステイーブン・デー
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバ
テイビル、ウイルシャー・ドライブ・945
- F ターム(参考) 2G045 AA25 BA14 CA25 CA26 CB03
CB04 CB07 DA12 DA13 DA14
DA36 FA16 FB02 FB03 FB07
JA04
4B024 AA12 BA80 CA03 DA02 DA03
EA04 GA11 HA12 HA15
4B063 QA19 QQ43 QR08 QR36 QR42
QR56 QS25 QS34 QX01
4B064 AG01 AG26 AG27 CA10 CA19
CA20 CC24 DA13 DA14
4B065 AA91X AA93X AB01 BA02
CA46
4C084 AA13 AA17 MA01 NA14 ZB262
4C085 AA13 AA14 CC32 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
MA01 MA04 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40
DA75 DA76 EA50 EA51 FA72
FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003523171A5	公开(公告)日	2007-02-22
申请号	JP2000593138	申请日	2000-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ビリングメデルパトリシアエイ コーエンモーリス コルピツツトレイシーエル フリードマンポーラエヌ ゴードンジユリアン グラナドスエドワードエヌ ホツジスステイブンシー クラスマイケルアール クラトクビルジヨンディー ロパーツラツプライザ ラツセルジヨンシー シエツフエルクリステイピー ストロープステイブンディー		
发明人	ビリング-メデル,パトリシア-エイ コーエン,モーリス コルピツツ,トレイシー-エル フリードマン,ポーラ-エヌ ゴードン,ジユリアン グラナドス,エドワード-エヌ ホツジス,ステイブン-シー クラス,マイケル-アール クラトクビル,ジヨン-ディー ロパーツ-ラツプ,ライザ ラツセル,ジヨン-シー シエツフエル,クリステイ-ピー ストロープ,ステイブン-ディー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/711 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/ /58 G01N37/00 C12N5/10		
CPC分类号	C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/711 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33 /53.M G01N33/53.N G01N33/574.Z G01N33/58.A G01N37/00.102 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BA14 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045 /DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/JA04 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064 /CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA93X		

4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74

优先权 09/233693 1999-01-19 US

其他公开文献 JP2003523171A

摘要(译)

描述为BU101，描述了从乳腺组织转录的一系列连续的，部分重叠的cDNA序列以及由此编码的多肽。这些序列可用于检测，诊断，分期，监测，预测，体内成像，预防或治疗乳腺疾病和病症，例如乳腺癌，或使个体易感。还提供了与BU101编码的多肽或蛋白质特异性结合的抗体，以及防止分子与乳腺疾病，肿瘤或转移相关的组织特异性BU101多肽的作用的激动剂或抑制剂。对治疗有用。