

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500056

(P2004-500056A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 110 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2001-538959 (P2001-538959)	(71) 出願人 502174287	
(86) (22) 出願日 平成12年11月16日 (2000.11.16)	マトリテック, インコーポレイテッド	
(85) 翻訳文提出日 平成14年5月15日 (2002.5.15)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2	
(86) 国際出願番号 PCT/US2000/031483	4 6 O, ニュートン, ネバダ ストリ	
(87) 国際公開番号 W02001/036470	ート 3 3 O	
(87) 国際公開日 平成13年5月25日 (2001.5.25)	(74) 代理人 100078282	
(31) 優先権主張番号 60/165, 673	弁理士 山本 秀策	
(32) 優先日 平成11年11月16日 (1999.11.16)	(74) 代理人 100062409	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 安村 高明	
(31) 優先権主張番号 60/172, 170	(74) 代理人 100113413	
(32) 優先日 平成11年12月17日 (1999.12.17)	弁理士 森下 夏樹	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(72) 発明者 ワトキンス, ブラインモア	
(31) 優先権主張番号 60/178, 860	アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2	
(32) 優先日 平成12年1月27日 (2000.1.27)	4 5 2, ウォルサム, サマー ストリ	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	ート 9 9	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 乳癌関連ポリペプチドに基づく、乳癌の検出および処置のための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、個体における乳癌を検出および処置するための広範囲の方法および組成物を提供する。詳細には、本発明は、標的乳癌関連タンパク質を提供し、このタンパク質は、好ましくは転移が生じる前の、乳癌の迅速な検出を可能にする。この標的乳癌関連タンパク質は、例えば、標識された結合部分（例えば、そのタンパク質に特異的に結合できる標識された抗体）とサンプルとを反応させることによって検出され得る。本発明はまた、個体における乳癌の検出において有用なキットを提供する。さらに、本発明は、乳癌を処置するための標的またはこのような処置の効力をモニターするための指標のいずれかとして標的乳癌関連タンパク質を利用する、方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された乳癌関連ポリペプチドであって、該ポリペプチドは、乳癌を伴うヒトの血清において、乳癌のないヒトの血清においてよりも高い濃度で検出可能であること；ならびに
(i) 約 16 k D の分子量を有し、50 m M のリン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオンイオン交換樹脂に結合しないこと、

(i i) 約 17 k D、約 30 k D または約 35 k D の分子量を有し、50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中の 25 m M の塩化ナトリウムの存在下でアニオンイオン交換樹脂から溶出すること、

(i i i) 約 20 k D、約 24 k D または約 35 k D の分子量を有し、50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中の 50 m M の塩化ナトリウムの存在下で該イオン交換樹脂から溶出すること、

(i v) 約 35 k D の分子量を有し、50 m M リン酸ナトリウム p H 7 の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中の 50 m M の塩化ナトリウムの存在下で該イオン交換樹脂から溶出すること、

(v) 約 18 k D または約 71 k D の分子量を有し、50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中の 100 m M の塩化ナトリウムの存在下でイオン交換樹脂から溶出すること、

(v i) 約 12 k D の分子量を有し、50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中の 150 m M の塩化ナトリウムの存在下でイオン交換樹脂から溶出すること、

(v i i) 約 42 k D または約 56 k D の分子量を有し、50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中の 200 m M の塩化ナトリウムの存在下でイオン交換樹脂から溶出すること、あるいは

(v i i i) 約 35 k D の分子量を有し、50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中の 400 m M の塩化ナトリウムの存在下でイオン交換樹脂から溶出すること、
という特徴を包含する、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記節 (i)、(i i i) または (v i i) のポリペプチドは、ニッケル S E L D I チップに対する親和性を有するとさらに特徴づけられる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記節 (i i)、(i v) または (v) のポリペプチドは、W C X - 2 S E L D I チップに対する親和性を有するとさらに特徴づけられる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記節 (v i) のポリペプチドは、S A X - 2 S E L D I チップに対する親和性を有するとさらに特徴づけられる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記節 (v i i i) のポリペプチドは、銅 S E L D I チップに対する親和性を有するとさらに特徴づけられる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

非免疫グロブリンタンパク質であるというさらなる特徴を包含する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

非アルブミンタンパク質であるというさらなる特徴を包含する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

さらにエピトープを包含する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

個体における癌を診断する方法であって、該個体から単離されたサンプル中で、請求項 1 に記載のポリペプチドの存在を検出する工程であって、該ポリペプチドは、存在する場合、該個体における癌の指標である、工程、を包含する、方法。

【請求項 10】

前記癌は乳癌である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記サンプルは、乳房組織を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記サンプルは体液を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記体液は、血液、血清、血漿、汗、涙液、尿、腹腔液、リンパ液、腔分泌物、精子、髄液、腹水、唾液、痰、および乳房浸出物からなる群より選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記体液は血清である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

個体における癌を診断する方法であって、該方法は以下の工程：

(a) 該個体からのサンプルに、癌関連タンパク質と特異的に結合する結合部分と接触させて、結合部分 - 癌関連タンパク質複合体を生成する工程であって、該結合部分は、請求項 1 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、工程；および

(b) 該複合体の存在を検出する工程であって、該複合体は、存在する場合、該個体における癌の存在の指標である、工程、を包含する、方法。

【請求項 16】

前記結合部分は抗体である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記抗体は、ポリクローナル抗体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体は、検出可能な部分で標識される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記検出可能な部分は、放射能標識、ハプテン標識、蛍光標識および酵素標識からなる群より選択されるメンバーを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された結合部分。

【請求項 22】

前記部分は、抗体、該抗体の抗原結合フラグメントまたは生合成抗体結合部位である、請求項 21 に記載の結合部分。

【請求項 23】

前記結合部分は、モノクローナル抗体である、請求項 21 に記載の結合部分。

【請求項 24】

請求項 21 に記載の結合部分を薬学的に受容可能なキャリア中に含む、薬学的組成物。

【請求項 25】

個体における癌を処置する方法であって、該方法は、請求項 24 に記載の組成物の治療上有効な量を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 26】

前記癌は乳癌である、請求項 25 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

請求項 1 に記載のタンパク質をコードする、単離された核酸配列またはそれに相補的な配列。

【請求項 28】

少なくとも 15 ヌクレオチドを含み、かつ請求項 27 に記載の核酸に対して、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、単離された核酸配列。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 30】

請求項 28 に記載の核酸を、薬学的に受容可能なキャリアと混合して含む、組成物。

10

【請求項 31】

請求項 29 に記載の核酸を、薬学的に受容可能なキャリアと混合して含む、組成物。

【請求項 32】

個体における癌を処置する方法であって、該方法は、請求項 28 に記載の核酸を該個体の細胞中に導入する工程を包含する、方法。

【請求項 33】

前記癌は乳癌である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

ヒトにおける乳癌の存在を検出する方法であって、該方法は、
該ヒトの組織または体液のサンプル中の核酸分子の存在を検出して、それにより、該ヒト
における乳癌の存在を示す工程であって、該核酸分子は、請求項 1 に記載の乳癌関連タン
パク質の少なくとも一部をコードする核酸配列または該乳癌関連タンパク質を認識しそし
て該乳癌関連タンパク質に特異的に結合され得る核酸配列を含む、工程、
を包含する、方法。

20

【請求項 35】

前記方法は、前記核酸分子に特異的にハイブリダイズし得る標識されたハイブリダイゼーションプローブと前記サンプルとを反応させる工程を包含する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

個体における癌の存在を検出する方法であって、該方法は、
該個体からのサンプルを、請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする標的核酸に特異的
にハイブリダイズし得る核酸プローブに対して特異的ハイブリダイゼーション条件下で曝
露する工程、および
該核酸プローブを含む二重鎖の存在を検出する工程であって、該二重鎖の存在は、該個体
における癌の指標である、工程、
を包含する、方法。

30

【請求項 37】

前記核酸プローブに前記サンプルを曝露する工程の前に、該サンプルにおける前記標的核酸を増幅する工程をさらに包含する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記癌は乳癌である、請求項 36 に記載の方法。

40

【請求項 39】

前記核酸プローブは、検出可能な部分で標識される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

前記検出可能な部分は、放射能標識、ハプテン標識、蛍光標識および酵素標識からなる群より選択されるメンバーを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

乳癌の存在を検出するためまたは乳癌の治療処置の効力を評価するためのキットであって、該キットは、以下：

哺乳動物からの組織または体液のサンプルを受けるための容器；

50

請求項 1 に記載の乳癌関連タンパク質に特異的に結合する結合部分；
該乳癌関連タンパク質に結合した該結合部分を検出するための手段；および
参照サンプル、
を組み合わせる、キット。

【請求項 4 2】

前記参照サンプルは、正常な乳房サンプルの指標である、請求項 4 1 に記載のキット。

【請求項 4 3】

哺乳動物における癌を診断する方法であって、該方法は以下の工程：

(a) 該哺乳動物から単離されたサンプルを入手する工程；および

(b) 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 ；配列番号 7 ；配列番号 8 ；配列番号 9 ；配列番号 10 ；配列番号 11 ；配列番号 12 ；配列番号 13 ；配列番号 14 ；配列番号 15 ；配列番号 16 ；配列番号 17 ；配列番号 18 ；配列番号 19 ；配列番号 20 ；配列番号 21 ．配列番号 22 ；および配列番号 23 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とするタンパク質の存在を、該サンプル中において検出する工程であって、該タンパク質は、存在する場合、該哺乳動物における癌の指標である、工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 4】

前記癌は乳癌である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記サンプルは、乳房組織を含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記サンプルは、体液を含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記体液は、血液、血清、血漿、汗、涙液、尿、腹腔液、リンパ液、腔分泌物、精子、髄液、腹水、唾液、痰、および乳房浸出物からなる群より選択される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

哺乳動物における癌を診断する方法であって、該方法は以下の工程：

(a) 該哺乳動物に由来するサンプルを、癌関連タンパク質に特異的に結合する結合部分と接触させて、結合部分 - 癌関連タンパク質複合体を生成させる工程であって、該結合部分は、配列番号 5、配列番号 22 および配列番号 23 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的に結合する、工程；および

(b) 該複合体の存在を検出する工程であって、該複合体は、存在する場合、該哺乳動物における癌の存在の指標である、工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 9】

前記癌は乳癌である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記結合部分は、抗体、抗体フラグメントおよび生合成抗体結合部位からなる群より選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記結合部分は、抗体である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記結合部分は、検出可能な部分で標識される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記タンパク質の検出可能な量が存在しないことは、癌の非存在の指標である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 55】

以下のさらなる工程：

- (c) 前記サンプル中に前記タンパク質の量を測定する工程；および
 - (d) 該サンプル中の該タンパク質の量と、哺乳動物における癌の指標である閾値とを比較する工程であって、該閾値以上の該サンプル中の該タンパク質の量は、該哺乳動物における該癌の存在の指標である、工程、
- をさらに包含する、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 56】

哺乳動物における癌の存在を検出する方法であって、該方法は以下：

該哺乳動物の組織または体液のサンプルにおける核酸分子の存在を検出し、それにより該哺乳動物における癌の存在を示す工程であって、該核酸分子は、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；配列番号 7；配列番号 8；配列番号 9；配列番号 10；配列番号 11；配列番号 12；配列番号 13；配列番号 14；配列番号 15；配列番号 16；配列番号 17；配列番号 18；配列番号 19；配列番号 20；配列番号 21；配列番号 22；または配列番号 23 あるいはそれらのフラグメントに示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、工程、

を包含する、方法。

【請求項 57】

前記検出工程は、前記核酸分子に特異的にハイブリダイズし得る標識されたハイブリダイゼーションプローブと前記サンプルとを合わせることを包含する、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

哺乳動物における癌の存在を検出する方法であって、該方法は以下の工程：

- (a) 該哺乳動物からのサンプルと、特異的ハイブリダイゼーション条件下で、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；配列番号 7；配列番号 8；配列番号 9；配列番号 10；配列番号 11；配列番号 12；配列番号 13；配列番号 14；配列番号 15；配列番号 16；配列番号 17；配列番号 18；配列番号 19；配列番号 20；配列番号 21；配列番号 22；または配列番号 23 に示されるアミノ酸配列をコードする標的核酸に特異的にハイブリダイズし得る核酸プローブとを合わせる工程；および
 - (b) 該核酸プローブを含む二重鎖の存在を検出する工程であって、該二重鎖の存在は、該哺乳動物における癌の指標である、工程、
- を包含する、方法。

【請求項 59】

前記サンプルと前記核酸プローブとを合わせる工程の前に、該サンプルにおける前記標的核酸を増幅する工程をさらに包含する、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記癌は乳癌である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

前記核酸プローブは、検出可能な部分で標識される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 62】

前記検出可能な部分は、放射能標識、ハプテン標識、蛍光標識および酵素標識からなる群より選択されるメンバーを含む、請求項 61 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の参照)

本願は、代理人整理番号 MTP - 024 により識別される有用性特許出願（発明の名称「Materials and Methods for Detection and Treatment of Breast Cancer」、2000 年 11 月 10 日出願に対する優先権、および米国特許出願番号 60 / 165, 673 号（1999 年 11 月

10

20

30

40

50

16日出願) ; 米国特許出願番号60/201,721号(2000年5月3日出願)の利益を主張する。これらの開示は、本明細書において参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、概して、乳癌の検出および/処置のための方法および組成物に関する。より特定すると、本発明は、乳癌関連タンパク質およびそのようなタンパク質をコードする核酸に関する。これらは、乳癌検出のための細胞マーカー、および乳癌治療のための分子標的を表す。

【0003】

(発明の背景)

乳癌は女性における死因のトップである。乳癌の病因は明らかではないが、正常な乳房上皮の悪性表現型への形質転換は、特に30歳未満の女性において遺伝的要因の結果であり得る(Miki et al. (1994) Science 266:66-71)。しかし、他の非遺伝的要因がこの疾患の病因に対する有意な効果を有するようである。その起源に関わらず、乳癌の致死率は、それがその進行における早期に検出されない場合は、有意に増加する。従って、かなりの努力が、乳房組織における形質転換周囲の早期の細胞事象の解明に充てられてきた。そのような努力は、いくつかの可能な乳癌マーカーの同定をもたらした。例えば、BRCA1およびBRCA2の遺伝子の対立遺伝子は、遺伝および早期発症の乳癌に関連づけられた(Wooster et al. (1994) Science 265:2088-2090)。野生型BRCA1対立遺伝子は、腫瘍サプレッサー遺伝子をコードする。その対立遺伝子における欠失および/または他の改変は、乳房上皮の形質転換と関連づけられた。従って、変異したBRCA1対立遺伝子またはその遺伝子産物の検出は、乳癌および卵巣癌を検出するための手段として提唱された(Miki et al., 前出)。しかし、BRCA1は、癌マーカーとしては限界がある。なぜなら、BRCA1の変異は、乳癌の大部分について説明できないからである(Ford et al. (1995) British J. Cancer 72:805-812)。同様に、遺伝性乳癌の形態に関連付けされたBRCA2遺伝子は、乳癌症例の全体のうちほんの小部分を説明するだけである(Ford et al., 前出)。

【0004】

いくつかの他の遺伝子が乳癌に関連づけられ、そして直接またはその遺伝子産物を介するかのいずれかで、この疾患についてのマーカーとして働き得る。そのような可能なマーカーとしては、TP35およびその遺伝子産物、p53腫瘍サプレッサータンパク質が挙げられる(Malkin et al. (1990) Science 250:1233-1238)。失調、毛細管拡張症遺伝子のような遺伝子におけるヘテロ接合性の喪失もまた、発生中の乳癌の高危険性に関連づけられた(Swift et al. (1991) N. Engl. J. Med. 325:1831-1836)。これまでに提唱されたマーカーの多くに関連する問題は、そのオンコジーン表現型はしばしば、遺伝子欠失の結果であり、従って、形質転換の予想物としての野生型の非存在の検出を要求することである。

【0005】

従って、特異的で信頼性のあるマーカーであって、正常乳房組織および形質転換された乳房組織において示差的に発現され、そして乳癌の診断、乳癌のその発症の予想または乳癌の処置において有用であり得るものに対する当該分野における必要性が存在する。

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、哺乳動物(例えば、ヒト)における乳癌の存在を検出するため、およびその疾患であると診断された哺乳動物における乳癌を処置するための種々の方法および組成物を提供する。本発明は、部分的に、その各々のメンバーが、乳癌を伴う哺乳動物(例えば、ヒト)からの血清において、正常な哺乳動物、すなわち乳癌を伴わない哺乳動物からの血清に比較して、より高い濃度で検出可能である、タンパク質のファミリーを発見したことに基づく。従って、これらのタンパク質およびそのようなタンパク質をコードする核酸配

10

20

30

40

50

列またはそれに相補的な配列は、乳癌を診断するにおいて、乳癌治療の効力をモニターするにおいておよび/またはそのような治療の標的として有用な乳癌マーカーとして使用され得る。

【0007】

1つの局面において、本発明は、単離された乳癌関連タンパク質マーカーを提供する。このタンパク質マーカーは、乳癌を伴う哺乳動物（特に、ヒト）の血清において、乳癌を伴わない哺乳動物の血清におけるよりも高い濃度で検出可能であることで特徴づけられる。

【0008】

1つのマーカータンパク質は、それが、約16kDの分子量を有し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）の存在下でアニオン交換樹脂に検出可能な量で結合しないこととさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、ニッケルSELDIチップに対する結合親和性を有する。

10

【0009】

別のマーカータンパク質は、それが、約17kDの分子量を有し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）中25mM塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することとさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、WCX-2 SELDIチップに対する結合親和性を有する。

【0010】

別のマーカータンパク質は、それが、約30kDの分子量を有し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）中25mM塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することとさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、WCX-2 SELDIチップに対する結合親和性を有する。

20

【0011】

別のマーカータンパク質は、それが、約35kDの分子量を有し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）中25mM塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することとさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、WCX-2 SELDIチップに対する結合親和性を有する。

30

【0012】

別のマーカータンパク質は、それが、約20kDの分子量を有し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）中50mM塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することとさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、ニッケルSELDIチップに対する結合親和性を有する。

【0013】

別のマーカータンパク質は、それが、約24kDの分子量を有し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）中50mM塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することとさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、ニッケルSELDIチップに対する結合親和性を有する。

40

【0014】

別のマーカータンパク質は、それが、約28kDの分子量を有し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして50mMリン酸ナトリウム（pH7.0）中50mM塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することとさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、ニッケルSELDIチップに対する結合親和性を有する。マイクロ配列分析は、このマーカータンパク質が、小核リボヌクレオタンパク質B"として当該分野において知られるタンパク質であると同定された（Habetset al. (1987) PROC NATL ACA

50

D S c i . U S A 8 4 , 2 4 2 1 - 2 4 2 5)。このアミノ酸配列は、配列番号 5 として以下に示す。

【 0 0 1 5 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 3 5 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 5 0 m M 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカートンパク質はまた、ニッケル S E L D I チップに対する結合親和性を有する。

【 0 0 1 6 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 3 5 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 5 0 m M 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカートンパク質はまた、ニッケル S E L D I チップに対する結合親和性を有する。

10

【 0 0 1 7 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 1 8 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 1 0 0 m M 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカートンパク質はまた、W C X - 2 S E L D I チップに対する結合親和性を有する。

20

【 0 0 1 8 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 7 1 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 1 0 0 m M 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカートンパク質はまた、W C X - 2 S E L D I チップに対する結合親和性を有する。マイクロ配列分析は、このマーカートンパク質が、切断刺激因子の 6 4 k D 三部ユニットとしてまたはそれに関連する、当該分野で公知のタンパク質であると同定した (T a k a g a k i e t a l . (1 9 8 7) P R O C N A T L A C A D S c i , U S A 8 9 , 1 4 0 3 - 1 4 0 7)。このアミノ酸配列を、以下に、配列番号 2 2 および配列番号 2 3 として示す。

30

【 0 0 1 9 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 1 2 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 1 5 0 m M 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカートンパク質はまた、S A X - 2 S E L D I チップに対する結合親和性を有する。

【 0 0 2 0 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 4 2 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 2 0 0 m M 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカートンパク質はまた、ニッケル S E L D I チップに対する結合親和性を有する。

40

【 0 0 2 1 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 5 6 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) 中 2 0 0 m M 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカートンパク質はまた、ニッケル S E L D I チップに対する結合親和性を有する。

【 0 0 2 2 】

別のマーカートンパク質は、それが、約 3 5 k D の分子量を有し、そして 5 0 m M リン酸

50

ナトリウム (pH 7.0) の存在下でアニオン交換樹脂に結合し、そして 50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) 中 400 mM 塩化ナトリウムの存在下でそのアニオン交換樹脂から溶出することでさらに特徴づけられる。このマーカータンパク質はまた、銅 S E L D I チップに対する結合親和性を有する。

【0023】

さらに、上記乳癌関連タンパク質は、非免疫グロブリンおよび/または非アルブミンタンパク質であるとしてさらに特徴づけられる。さらに、この乳癌関連タンパク質は、抗原性領域またはエピトープをさらに規定し得る。この抗原性領域またはエピトープは、結合部分 (例えば、抗体 (例えば、その抗原性領域またはエピトープに対して指向されるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、あるいはその抗体フラグメント、あるいは合成抗体結合部位)) に特異的に結合し得る。さらに、本発明により、当業者は、上記乳癌関連タンパク質をコードする核酸またはその乳癌関連タンパク質をコードする核酸に対して特異的なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る核酸を単離することを可能にする。さらに、当業者は、当該分野において現在利用可能な方法を用いて、単離されたマーカータンパク質全体またはそのフラグメントをコードする核酸配列を生成し得 (例えば、以下を参照のこと: Sambrook et al., eds. (1989) 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Press)。例えば、本発明の乳癌関連タンパク質は、単離されるとき、従来のペプチド配列決定プロトコルを用いて配列決定され得る。このペプチド配列に基づいて、cDNA ライブラリーをスクリーニングするにおいて有用なオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを生成することが可能である。次いで、この cDNA ライブラリーを、得られたオリゴヌクレオチドを用いてスクリーニングして、その単離されたタンパク質をコードする全長または部分長の cDNA 配列を単離することができる。

10

20

【0024】

別の局面において、本発明は、哺乳動物における乳癌の存在を検出するための種々の方法 (例えば、タンパク質または核酸をベースにした方法) を提供する。本発明の方法は、任意の関連する組織または体液のサンプルにおいて実施され得る。例えば、本発明の方法は、乳房組織において、より好ましくは乳房生検組織において行われ得る。あるいは、本発明の方法は、血液; 血清; 血漿; 糞便; 尿; 膺分泌物; 髄液; 唾液; 腹水; 腹腔液; 痰および乳房浸出物からなる群より選択される、ヒト体液サンプルにおいて行われ得る。しかし、本発明の方法はまた、他の組織または体液のサンプルにおける転移した乳癌細胞を検出するにおいて有用であり得る。乳癌の検出は、当該分野において周知でありそして使用される多数のアッセイ方法のいずれか 1 つを用いて達成され得る。

30

【0025】

1 つの局面において、個体における癌を診断する方法は、その個体からのサンプルに、乳癌関連タンパク質に特異的に結合する第一の結合部分を接触させて、第一の結合部分 - 癌関連タンパク質複合体を形成する工程を包含する。その第一の結合部分は、上記において示される乳癌関連マーカータンパク質の少なくとも 1 つに特異的に結合して、複合体を形成し得る。その後、次に複合体におけるマーカータンパク質の存在および/または量が、例えば、当該分野において周知の慣用方法論を用いて、検出可能な部分 (例えば、放射性標識または蛍光標識) で検出される場合第一の結合部分を介して、または第一の結合部分に対して特異的に結合する検出可能な部分で標識された第二の結合部分を介して検出され得る。従って、そのマーカータンパク質の存在または量は、個体における乳癌の存在の指標であり得る。例えば、そのサンプルにおけるマーカータンパク質の量は、乳癌の存在または非存在を示すようにその前に較正された閾値に対して比較され得る。そのような方法は、組織 (例えば、乳房組織) または体液 (例えば、血清) に対して行われ得るが、体液が現在好ましい試験サンプルである。

40

【0026】

上記の核酸分子の検出はまた、個体における乳癌および/または転移乳癌の存在の指標と

50

して作用し得る。従って、別の局面において、本発明は、ヒトにおける乳癌を検出するための別の方法を提供する。この方法は、組織または体液のサンプル中の核酸分子の存在を検出して、それにより、個体における乳癌の存在を示す工程を包含する。この核酸分子は、(i) 乳癌関連タンパク質によって特異的に認識および結合され得る配列を含む核酸分子、および(ii) 本明細書において示される乳癌関連タンパク質の1つ以上のうちの少なくとも一部をコードする配列を含む核酸分子からなる群より選択される。

【0027】

1つの実施形態において、この方法は、その個体からのサンプルを、核酸プローブ(例えば、10を超え、およびより好ましくは15を超えるヌクレオチド長であり、本明細書において示される乳癌関連タンパク質の1つをコードする標的核酸にハイブリダイズして二重鎖を形成し得る)に対して、特異的なハイブリダイゼーション条件下で暴露する工程を包含する。その後、この二重鎖の存在は、当該分野において公知および使用される、種々の検出方法を用いて検出され得る。その標的核酸は、その核酸プローブとのハイブリダイゼーションの前に、例えば、従来のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)の方法論を介して増幅され得る。

10

【0028】

1つの実施形態において、その標的核酸(例えば、メッセンジャーRNA(mRNA分子))は、15ヌクレオチドを超え、より好ましくは50ヌクレオチドを超え、そして最も好ましくは100ヌクレオチドを超える長さであり、そして本明細書において示される乳癌関連タンパク質の一つにおいて存在するアミノ酸配列をコードする。次いで、そのような標的mRNAは、そのサンプルに、そのマーカータンパク質をコードする核酸分子の少なくとも一部と特異的にハイブリダイズし得る、標識されたハイブリダイゼーションプローブ(例えば、³²Pされたオリゴヌクレオチドプローブ)を反応させることによって標識ノーザンブロット分析によって検出され得る。従って、乳癌関連タンパク質をコードするかまたは乳癌関連タンパク質によって特異的に結合され得る核酸分子の検出は、試験される個体において乳癌の存在の指標として働き得る。

20

【0029】

別の局面において、本発明は、乳癌の存在を検出するため、または乳癌の治療的な処置の効力を評価するためのキットを提供する。このようなキットは、組み合わせて、以下を備える：(i) 試験される個体からのヒト組織または体液のサンプルを受けるための容器、(ii) 乳癌関連マーカータンパク質におけるエピトープ、または乳癌関連タンパク質の少なくとも一部をコードする核酸配列または乳癌関連タンパク質の少なくとも一部をコードする核酸配列のいずれかに特異的に結合する、結合パートナー、および(iii) 参照サンプル。1つの実施形態において、参照サンプルは、陰性および/または陽性のコントロールを含み得る。その実施形態において、陰性のコントロールは、正常な乳房細胞型の指標であり、そしてその陽性コントロールは、乳癌の指標である。

30

【0030】

別の局面において、本発明は、乳癌を処置するための方法および組成物を提供する。1つの局面において、本発明は、乳癌の処置において有用な、タンパク質またはヌクレオ塩基を含有する配列を提供する。治療タンパク質は、例えば、結合部分(例えば、本明細書において示される乳癌関連タンパク質に対して特異的に結合し得る抗体(例えば、モノクローナル抗体、その抗原性結合フラグメント、または整合性抗体結合部位))であり得る。この方法は、乳癌を伴う患者に、治療有効量の化合物(好ましくは、抗体、そして最も好ましくはモノクローナル抗体であって、標的乳癌関連タンパク質に特異的に結合するもの)を投与して、それにより、そのタンパク質の生物学的活性を不活化または減少させる工程を包含する。同様に、その化合物は、低分子(例えば、有機低分子)であって、標的乳癌関連タンパク質の生物学的活性を阻害または減少するものを包含し得ることが企図される。

40

【0031】

別の局面において、本発明は、乳癌を処置するための別の方法を提供する。この方法は、

50

乳癌を有すると診断される患者に、治療有効量の化合物を投与する工程を包含する。この化合物は、標的乳癌関連タンパク質の発現をインビボで減少させて、それにより標的タンパク質の発現をインビボで減少させる。好ましい実施形態において、その化合物は、本明細書において示される乳癌関連タンパク質の少なくとも一つの少なくとも一部をコードする核酸に結合およびその発現（例えば、転写または翻訳）を減少し得る、ヌクレオ塩基含有配列（例えば、アンチセンス核酸配列またはペプチド核酸（PNA））である。投与後、アンチセンス核酸配列またはアンチセンスPNA分子は、標的タンパク質を少なくとも一部コードする核酸配列に結合し、それにより標的乳癌関連タンパク質のインビボ発現を減少させる。

【0032】

10

従って、本発明は、個体における乳癌を検出および処置するための、広汎な方法および組成物を提供する。具体的には、本発明は、個体において乳癌の特異的かつ初期（好ましくは転移が生じる前）の検出を可能にする、乳癌関連タンパク質を提供する。さらに、本発明は、個体における乳癌の検出において有用なキットを提供する。さらに、本発明は、乳癌の処置のためおよびそのような処置の効力をモニターするための、標的および指標として、乳癌関連タンパク質を利用する方法を提供する。本発明のこれらおよび他の多数のさらなる局面および利点は、以下の図面、詳細な説明、および以下の特許請求の範囲を考慮して明らかになる。

【0033】

20

（発明の詳細な説明）

本発明は、乳癌の検出および処置のための方法および組成物を提供する。本発明は、部分的に、乳癌関連タンパク質の発現に基づく。このタンパク質は、乳癌を伴うヒトの血清において、乳癌を伴わないヒトの血清に比較して、検出可能に高いレベルで存在する。

【0034】

乳癌関連タンパク質またはそのようなタンパク質をコードする核酸は、乳癌の検出においてまたは乳癌の治療のための標的として有用であるマーカーとして作用し得る。例えば、そのマーカータンパク質およびそのマーカータンパク質に結合する結合部分（例えば、抗体）またはそのマーカータンパク質をコードする核酸配列に対してハイブリダイズする核酸プローブを使用して、個体における乳癌の存在を検出し得ることが企図される。さらに、当業者乳癌を処置するための新規治療剤を生成し得ることが企図される。この治療剤としては、例えば、以下が挙げられる：インビボで標的タンパク質の生物学的活性に結合および減少または除去する個体に投与され得る抗体；その標的タンパク質をコードする遺伝子または遺伝子転写物とハイブリダイズしてそれによりインビボで標的タンパク質の発現を減少させる核酸またはペプチド核酸の配列；または標的タンパク質もしくはその標的タンパク質のための他の細胞部分（例えば、レセプター）と相互作用し、それにより標的タンパク質の生物学的活性を低減または除去する低分子（例えば、有機低分子）。

30

【0035】

以下に示されるのは、乳癌関連タンパク質を単離するための方法、乳癌関連タンパク質をマーカーとして使用して乳癌を検出するための方法、および癌治療のための標的として乳癌関連タンパク質を用いて乳癌に罹患した個体を処置するための方法である。

40

【0036】

（1．乳癌関連マーカータンパク質を検出するための方法）

本明細書中に開示されるような、本発明のマーカータンパク質が、乳癌を伴うと診断されたヒトの血清のタンパク質組成物を、乳癌を有さないヒトの血清のタンパク質組成物と比較することによって、同定される。本明細書中で使用される場合、用語「乳癌関連タンパク質」は、乳癌を伴うと診断された個体の組織または体液において、乳癌のない個体の対応する組織または体液と比較して高いレベルで検出可能である、任意のタンパク質を意味することが理解され、そしてそのタンパク質の種改変体および対立遺伝子改変体ならびにそれらのフラグメントを含む。本明細書中で使用される場合、用語「乳癌」は、乳房組織または乳房組織細胞に関連する任意の癌または癌性病変を意味することが理解され、そし

50

て乳癌に対する前駆体（例えば、異型（a t t y p i c a l）導管過形成または非異型過形成）を含み得る。マーカータンパク質または標的分子は、乳癌に罹患した個体の乳癌細胞または体液に独特であることは必要はなく、むしろそのマーカータンパク質または標的分子は、乳癌の組織または体液に由来するサンプルと、正常な乳房の組織または体液に由来するサンプルとの間を識別するために十分に高い信号雑音比を有すべきである。

【0037】

本明細書中で使用される場合、タンパク質またはアミノ酸配列の、「部分（一部）」または「フラグメント」は、そのタンパク質またはアミノ酸配列からの少なくとも10アミノ酸（例えば、そのタンパク質または配列のアミノ酸1～10、34～43、または127～136）を連続して含む、連続的ペプチドを意味する。好ましくは、そのペプチドは、そのタンパク質またはアミノ酸配列からの少なくとも20アミノ酸を、連続して含む。より詳細には、そのペプチドは、そのタンパク質またはアミノ酸配列からの少なくとも40アミノ酸を、連続して含む。

10

【0038】

本発明の乳癌関連マーカータンパク質は、乳癌を伴う個体の血清において存在するタンパク質を、乳癌のない個体の血清において存在するタンパク質に対して比較することによって、同定された。アルブミンタンパク質および免疫グロブリンタンパク質が、この血清から除去され、そしてそのタンパク質は、アニオン交換クロマトグラフィーによって12個の画分へと分離された。簡潔には、そのタンパク質が、50 mMリン酸ナトリウム（pH 7.0）の存在下で強アニオン交換カラムにロードされ、そして50 mMリン酸ナトリウム（pH 7.0）中の塩化ナトリウムの段階勾配を用いて溶出した。得られた12個の画分は、フロースルー画分、25 mM塩化ナトリウムにて溶出する画分、50 mM画分、75 mM画分、100 mM画分、125 mM画分、150 mM画分、200 mM画分、250 mM画分、300 mM画分、400 mM画分および2 M画分を含む。

20

【0039】

各画分は、SELDI（表面増強レーザー脱離およびイオン化（surface-enhanced laser desorption and ionization））質量分光法によって、分析された。この12個の画分の各々からのサンプルは、4つの異なるSELDIチップ表面のうちの1つに適用された。銅SELDI表面またはニッケルSELDI表面が、エチレンジアミン三酢酸を含むチップに、銅塩溶液またはニッケル塩溶液を添加することによって生成され得る。他のSELDIチップ表面としては、カルボキシレート部分を含むWCX-2、ならびに四級アンモニウム部分を含むSAX-2が、挙げられる。従って、本発明の乳癌関連タンパク質は、乳癌のない個体と比較して乳癌を有する個体の血清におけるその増加した存在、その分子量、アニオン交換樹脂上での結合および溶出の特徴、ならびに特定のSELDIチップに対するそれらの親和性によって、特徴づけられ得る。例えば、本明細書中で使用される場合、用語、特定のSELDIチップに対する「親和性」は、本発明の乳癌関連タンパク質が、1つの型のSELDIチップ（例えば、銅SELDIチップ）に対して、本明細書中に開示される他のSELDIチップ（例えば、ニッケルのSAX-2チップおよびWCX-2チップ）のうちの1つ以上に対してと比較して、優先的に結合することを意味するが理解される。実施例1に詳細に議論されるように、罹患個体由来の血清と健常個体由来の血清の比較は、罹患個体の血清において検出可能なレベルで頻繁に存在するが、健常個体の血清において匹敵するレベルではまれにしか存在しない、多数のタンパク質を明らかにした。

30

40

【0040】

一旦この乳癌関連タンパク質が質量分光法によって同定されると、同定されたタンパク質は、標準的タンパク質単離方法によって単離され得、そして当該分野で公知でありそして使用されるタンパク質配列決定技術を使用して配列決定され得る。例えば、実施例5および実施例6を参照のこと。一旦そのアミノ酸配列が同定されると、その後、マーカータンパク質またはその部分をコードする核酸が、従来の組換えDNA方法を使用して同定され得る。例えば、Sambrookら編（1989）「Molecular Cloning

50

g: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。例えば、単離された乳癌関連タンパク質は、従来のペプチド配列決定プロトコル、およびcDNAライブラリーを配列決定するために設計されたオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを使用して、配列決定され得る。次いで、cDNAライブラリーが、得られたハイブリダイゼーションプローブを用いて、その単離されたマーカータンパク質をコードする全長cDNA配列または部分長cDNA配列を単離するためにスクリーニングされ得る。

【0041】

本発明において有用なマーカータンパク質は、本明細書中で同定される特定の配列のみならず、マーカータンパク質としても機能するその対立遺伝子改変体および関連タンパク質もまた包含する。従って、例えば、選択的スプライス形態、翻訳後修飾、または遺伝子重複から生じる配列が、各々本発明によって包含される。種改変体もまた、本発明によって包含され、患者が非ヒト哺乳動物である。マーカータンパク質として機能し得る他の相同性タンパク質もまた、想定される。

10

【0042】

好ましくは、改変体配列は、本明細書中に開示される配列のうちの1つの少なくとも一部に対して、少なくとも80%類似または70%同一、より好ましくは、少なくとも90%類似または80%同一、そして最も好ましくは、95%類似または90%同一である。

【0043】

候補ペプチド領域が、参照ポリペプチドまたはペプチドオリゴマーに対して、必要とされる%の類似性または同一性を有するか否かを決定するために、候補アミノ酸配列と参照アミノ酸配列とを、まず、HenikoffおよびHenikoff(1992)、「Amino acid substitution matrices from protein blocks」、PNAS(1992年11月)89:10915-10919の図2に記載のBLOSUM62置換マトリクスと組み合わせて、SmithおよびWaterman(1981)J. Mol. Biol. 147:195-197に記載の動的プログラミングアルゴリズム(dynamic programming algorithm)を使用して整列させる。本発明のために、ギャップ挿入ペナルティー(gap insertion penalty)について適切な値は-12であり、そしてギャップ伸長ペナルティー(gap extension penalty)について適切な値は-4である。Smith-WatermanのアルゴリズムおよびBLOSUM62マトリクスを使用して整列を実行するコンピュータプログラム(例えば、GCGプログラムパッケージソフト(Oxford Molecular Group, Oxford, England))が市販されており、そして、当業者によって広範に使用されている。

20

30

【0044】

一旦、候補配列と参照配列との間でアラインメントが作成されると、%類似性スコアが算出され得る。各配列の個々のアミノ酸を、互いに対するその類似性によって連続的に比較する。整列された2つのアミノ酸に対応する、BLOSUM62マトリクスでの値が0または負の数である場合、対様式(pairwise)の類似性スコアは0である；それ以外では、対様式の類似性スコアは1.0である。生類似性スコアは、整列されたアミノ酸の対様式の類似性スコアの合計である。次いで、この生スコアを、候補配列または参照配列のうちのより少数の方におけるアミノ酸数で除算することによって、この生スコアを正規化する。この正規化された生スコアが、%類似性である。あるいは、%同一性を算出するために、各配列の整列されたアミノ酸を、再度、連続的に比較する。アミノ酸が同一ではない場合、対様式の同一性スコアは0である；それ以外では、対様式の同一性スコアは1.0である。生同一性スコアは、整列された同一アミノ酸の合計である。次いで、この生スコアを、候補配列または参照配列のうちのより少数の方におけるアミノ酸数で除算することによって、この生スコアを正規化する。この正規化された生スコアが、%同一性である。%類似性および%同一性を算出する目的のためには、挿入および欠失は無視する。従って、ギャップペナルティーは、この計算においては使用されないが、最初のアライン

40

50

メントにおいて使用される。

【0045】

すべての場合において、上記のような天然に存在する配列の改変体は、マーカートンパク質としてのその機能について試験されなければならない。詳細には、特定の形態または特定の生物学的画分におけるその存在または非存在が、個体における癌の存在または非存在の指標でなければならない。この慣用的な実験は、本明細書中以降に記載される方法によってか、または当該分野において公知の他の方法によって実施され得る。

【0046】

組織または体液のサンプルにおけるマーカートンパク質は、結合アッセイ（ここで、マーカートンパク質に対する結合パートナーは、マーカートンパク質を含むことが疑われるサンプル中に導入される）を通して検出され得る。このようなアッセイでは、結合パートナーは、例えば、放射性同位体マーカ―または蛍光マーカ―で検出可能に標識され得る。標識された抗体が、選択されたマーカートンパク質を単離するために、類似の様式で使用され得る。マーカートンパク質をコードする核酸は、このマーカートンパク質をコードする配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有する核酸プローブを使用して検出され得る。PCRのような技術、そして特に、逆転写酵素PCRのような技術は、マーカートンパク質をコードする核酸を単離するために有用な手段である。以下に続く実施例は、乳癌関連タンパク質の単離および特徴付け、ならびに乳癌の検出および処置においてそれを使用する方法の詳細を提供する。

【0047】

（2．乳癌の検出）

一旦、乳癌関連タンパク質が同定されると、そのタンパク質またはそのタンパク質をコードする核酸をマーカ―として使用して、個体が乳癌を有するか否かを決定し得、そして有する場合には、適切な検出方法を使用して、疾患の状態をモニターし得る。

【0048】

マーカートンパク質またはそのタンパク質をコードする核酸を使用して、当業者は、ヒトにおいて乳癌を検出するための種々の検出方法を作成し得る。この方法は、代表的に、いくつかの手段によって、ヒトの組織または体液のサンプル中において、1つ以上の乳癌関連タンパク質またはこのようなタンパク質をコードする核酸の存在を検出する工程を包含する。ヒトにおいて乳癌を検出する方法の正確性および/または信頼度は、予め選択された組織または体液のサンプル中において、複数の乳癌関連タンパク質および/または核酸の存在を検出することによって、さらに増強され得る。検出アッセイは、本明細書中以降に記載の1以上のプロトコールを含み得る。

【0049】

（2．A．タンパク質ベースのアッセイ）

サンプル中のマーカートンパク質は、例えば、このマーカートンパク質と、このマーカートンパク質を特異的に結合し得る結合部分とを組み合わせることにより検出され得る。この結合部分は、例えば、リガンド-レセプター対（すなわち、特異的結合相互作用を有し得る分子の対）のメンバーを含み得る。この結合部分は、例えば、抗体-抗原、酵素-基質、核酸-核酸、タンパク質-核酸、タンパク質-タンパク質のような特異的結合対、または当該分野で公知の他の特異的結合対のメンバーを含み得る。結合タンパク質は、標的タンパク質に対する増強された親和性を有するように設計され得る。必要に応じて、この結合部分は、検出可能な標識（例えば、酵素標識、蛍光標識、放射活性標識、リン蛍光標識または呈色粒子（colored particle）標識）と連結され得る。この標識された複合体は、例えば、可視的に検出され得るか、または分光光度計もしくは他の検出器の補助により検出され得る。

【0050】

マーカートンパク質はまた、当該分野で利用可能なゲル電気泳動技術を用いて検出され得る。二次元ゲル電気泳動において、このタンパク質は、それらの等電点に従って、最初にpH勾配ゲルにおいて分離される。ついで、得られたゲルを、第2のポリアクリルアミド

10

20

30

40

50

ゲル上に配置し、そしてタンパク質を分子量に従って分離する（例えば、O'Farrell (1975) J. Biol. Chem. 250: 4007-4021を参照のこと）。

【0051】

1以上のマーカータンパク質は、乳癌を有すると疑われる個体から得られたサンプルからタンパク質を最初に分離し、次いで、このタンパク質を二次元ゲル電気泳動により分離して、特徴的な二次元ゲル電気泳動パターンを生成することにより検出され得る。次いで、このパターンは、正常細胞もしくは癌細胞から単離されたタンパク質を同じまたは類似の条件下で分離することにより生成された標準的ゲルパターンと比較され得る。この標準的なゲルパターンは、保存され、そして電気泳動パターンの電子データベースから検索され得る。二次元ゲル中の乳癌関連タンパク質の存在は、試験されたサンプルが乳癌を有する個体から採取したという指標を提供する。本明細書中で記載される他の検出アッセイを用いても同様に、例えば、二次元ゲル電気泳動パターンにおける2以上のタンパク質の検出により、このアッセイの精度がさらに増強される。複数の（例えば、2～5）乳癌関連タンパク質が二次元ゲル上に存在することは、個体における乳癌の存在のさらにより強い指標を提供する。従って、このアッセイは、乳癌の早期検出および処置を可能にする。

10

【0052】

乳癌関連マーカータンパク質はまた、当該分野で利用可能な広範なイムノアッセイのいずれかを用いて検出され得る。例えば、当業者は、体液サンプル中において乳癌を検出するためのサンドイッチイムノアッセイフォーマットを用い得る。あるいは、当業者は、1以上の標識された結合タンパク質を用いて、組織サンプル中の乳癌関連タンパク質の存在を検出するために、従来の免疫組織化学的手順を用い得る。

20

【0053】

サンドイッチイムノアッセイにおいて、マーカータンパク質を結合し得る2つの抗体が一般に用いられ、例えば、1つは、固体支持体上に固定化され、そして1つは、溶液中で遊離しており、そして検出可能な化合物で標識されている。第2の抗体のために用いられ得る化学標識の例としては、放射性同位体、蛍光化合物、および酵素、または反応性基質もしくは酵素基質に曝された場合に、呈色産物または電気化学的に活性な産物を生成する他の分子が挙げられる。マーカータンパク質を含むサンプルが、この系におかれる場合、このマーカータンパク質は、固定化抗体および標識抗体の両方に結合して、支持体表面で「サンドイッチ」免疫複合体を形成する。この複合体化したタンパク質は、非結合サンプル成分および過剰な標識抗体を洗い流し、そして支持体表面上のタンパク質に複合体化した標識抗体の量を測定することにより検出される。あるいは、溶液中で遊離した抗体（化学的部分（例えば、ハプテン）で標識され得る）は、遊離抗体を結合する検出可能な部分（すなわち、例えば、抗体に連結されたハプテン）で標識された第3の抗体により検出され得る。

30

【0054】

サンドイッチイムノアッセイおよび組織免疫化学的手順の両方は、良好な検出限界を有する標識を用いれば、非常に特異的かつ非常に高感度である。免疫学的アッセイの設計、理論およびプロトコルの詳細な総説は、当該分野における多くの教科書（「Practical Immunology」, Butts, W. R. 編（1984）Marcel Dekker, New Yorkおよび「Antibodies, A Laboratory Approach」, Harlowら編（1988）Cold Spring Harbor Laboratoryが挙げられる）において見出され得る。

40

【0055】

一般に、イムノアッセイ設計の考慮事項としては、標的タンパク質に対して十分に高い結合特異性を有して、非特異的相互作用の産物とは信頼性が高く区別され得る複合体を形成する抗体（例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体）の調製が挙げられる。本明細書中で用いられる場合、用語「抗体」は、結合タンパク質、例えば、標的タンパク質に対する適切な結合親和性および特異性を有する、抗体、または免疫グロブリン可変

50

領域様結合ドメインを含む他のタンパク質を意味することが理解される。抗体結合特異性が高くなるほど、検出され得る標的タンパク質濃度は低くなる。本明細書中で使用される場合、用語「特異的結合」または「特異的に結合する」は、結合部分、例えば、結合タンパク質が約 10^5 M^{-1} より高い、より好ましくは、約 10^7 M^{-1} より高い標的タンパク質に対する結合親和性を有することを意味することが理解される。

【0056】

個体における乳癌を検出するためのアッセイにおいて有用な、単離された標的乳癌関連タンパク質に対する抗体は、当該分野で周知であり、そして当該分野で示された標準的な免疫学的手順を用いて生成され得る。例えば、Practical Immunology, Buttt, N. R. 編、Marcel Dekker, NY, 1984を参照のこと。10
簡潔には、単離された標的タンパク質は、外因性の宿主（例えば、マウス、ヤギ、または他の適切な哺乳動物）において抗体を惹起するために用いられる。このマーカータンパク質は、宿主における抗体生成を増強し得る適切なアジュバントと組み合わせられ、そして例えば、腹腔内投与により宿主に注射される。宿主の免疫応答を刺激するために適切な任意のアジュバントが用いられ得る。一般に用いられるアジュバントは、フロイント完全アジュバント（殺傷および乾燥させた微生物細胞を含むエマルジョンであり、例えば、Calbiochem Corp., San DiegoまたはGibco, Grand Island, NYから入手可能）である。複数回の抗原注射が望まれる場合、引き続く注射は、不完全アジュバント（例えば、細胞非含有エマルジョン）と組み合わせて抗原を含み得る。ポリクローナル抗体は、目的のタンパク質に対する抗体を含む血清を引き出すこと20
により抗体生成宿主から単離され得る。モノクローナル抗体は、所望の抗体を生成する宿主細胞を単離し、これらの細胞を、免疫学分野で公知の標準的手順を用いてミエローマ細胞と融合し、そして標的タンパク質と特異的に反応し、かつ所望の結合親和性を有するハイブリッド細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることにより生成され得る。

【0057】

抗体結合ドメインはまた、生合成により生成され得、そして結合ドメインのアミノ酸配列は、標的タンパク質上の好ましいエピトープとの結合親和性を増強するために操作され得る。特定の抗体方法論は、十分に理解され、かつ文献において記載されている。それらの調製のより詳細な記載は、例えば、「Practical Immunology」（1984）（前出）に見出され得る。30

【0058】

さらに、遺伝子操作された生合成抗体結合部位（当該分野でBABSまたはsFv'としても公知）は、本発明の実施において用いられ得る。以下を含むBABSを作製および使用するための方法は、例えば、米国特許第5,091,513号；同第5,132,405号；同第4,704,692号；および同第4,946,778号に開示される：（i）非共有結合またはジスルフィド結合した合成 V_H および V_L ダイマー、（ii）共有結合した V_H および V_L 単鎖結合部位、（iii）個々の V_H および V_L ドメイン、または（iv）単鎖抗体結合部位。さらに、乳癌関連タンパク質に対する不可欠な特異性を有するBABSは、コンビナトリアル遺伝子ライブラリーからのファージ抗体クローニングにより得られ得る（例えば、Clacksonら（1991）Nature 352:624-628を参照のこと）。40
簡潔には、それらのコート表面上に、単離された乳癌関連タンパク質またはそれらのフラグメントで予め免疫されたマウスに由来する可変領域遺伝子配列によりコードされる免疫グロブリン可変領域を有するBABSを発現するファージの各々は、固定化された乳癌関連タンパク質に対する結合活性についてスクリーニングされる。固定化された乳癌関連タンパク質に結合するファージが採取され、そしてBABSをコードする遺伝子が配列決定される。次いで、目的のBABSをコードする得られた核酸配列は、従来の発現系で発現されて、BABSタンパク質を生成し得る。

【0059】

単離された乳癌関連タンパク質はまた、組織サンプルまたは体液サンプル中のタンパク質のレベルをモニターするための診断および他の組織評価キットおよびアッセイの開発のた50

めに用いられ得る。例えば、このキットは、抗体または他の特異的結合タンパク質を含み得、これらの抗体または他の特異的結合タンパク質は、組織サンプルもしくは体液サンプル中で乳癌関連タンパク質に特異的に結合し、そして乳癌関連タンパク質の存在および/または濃度の検出および/または定量を可能にする。

【0060】

乳癌関連タンパク質を検出するために適切なキットは、例えば、評価されるサンプルを捕捉するための容器または他の手段、および本明細書中に記載の1以上の乳癌関連タンパク質のサンプル中の存在および/または量を検出するための手段を含むことが意図される。本明細書中で記載される場合、「検出するための手段」は、1つの実施形態において、これらのタンパク質に特異的な1以上の抗体およびこれらのタンパク質に対する抗体の結合を検出するための手段（例えば、本明細書中で記載の標準的なサンドイッチイムノアッセイにより）を含む。例えば、組織サンプル由来のような、細胞内のタンパク質の存在が検出されるべき場合、このキットはまた、細胞内タンパク質を曝すように細胞構造を破壊するための手段を含み得る。

10

【0061】

(2. B. 核酸ベースのアッセイ)

個体における乳癌の存在は、組織サンプルまたは体液サンプル中で、乳癌関連タンパク質をコードする核酸分子を検出することにより測定され得る。当業者に周知の方法を用いて、本発明の乳癌関連タンパク質が配列決定され、次いで、この決定された配列に基づいて、cDNAスクリーニングのためのオリゴヌクレオチドプローブが設計される（例えば、Sambrookら(1989)前出を参照のこと）。

20

【0062】

マーカー乳癌関連タンパク質をコードする標的核酸分子は、この標的核酸を特異的に結合し得る標識した結合部分を用いて検出され得る。この結合部分は、例えば、タンパク質、核酸またはペプチド核酸を含み得る。さらに、標的核酸（例えば、乳癌関連タンパク質をコードするmRNA）は、例えば、標識したオリゴヌクレオチド（例えば、標的核酸の少なくとも一部分に相補的、かつこの部分と特異的にハイブリダイズし得る核酸フラグメント）を用いたノザンプロット分析を行うことにより検出され得る。

【0063】

より具体的には、乳癌関連ヌクレオチド配列もしくは乳癌関連タンパク質をコードするmRNAに相補的なRNA、または好ましくはDNAを含む遺伝子プローブを、確立された組換え技術またはオリゴヌクレオチド合成を用いて生成し得る。このプローブは、試験標本に存在する相補的核酸配列とハイブリダイズし、そして最高の特異性を提供し得る。短く十分に規定されたプローブ（単一の独特の配列をコードする）は、大部分は、正確かつ好ましい。より長いプローブは、一般には、あまり特異的でない。任意の長さのオリゴヌクレオチドがmRNA転写物にハイブリダイズし得るが、代表的には、8~100ヌクレオチドの範囲内、好ましくは、15~50ヌクレオチドの範囲内のオリゴヌクレオチドが、標準的なハイブリダイゼーションアッセイにおいて最も有用であると想定される。プローブの長さおよび配列の選択は、所望の特異性の程度の選択を可能にする。ハイブリダイゼーションは、必要とされる相補性の程度を設定するための高塩緩衝溶液、ホルムアミドまたは他の薬剤中で50~65℃で行われる。さらに、プローブが任意のDNAもしくはRNA配列を本質的に認識するように製造され得ることは、技術水準である。さらなる詳細については、例えば、Guide to Molecular Techniques, Bergerら、Methods of Enzymology, Vol. 152, 1987を参照のこと。

30

40

【0064】

これらのプローブもしくは抗体に連結される広範な種々の異なる標識は、アッセイにおいて用いられ得る。標識された試薬は、アッセイの設計に依存して、溶液中に提供され得るか、または不溶性支持体に結合され得る。種々の結合体は、直接的または間接的に、共有結合または非共有結合され得る。共有結合された場合、特定の連結基は、結合される2つ

50

の部分の性質に依存する。多数の連結基および連結のための方法は文献中に教示されている。広範には、これらの標識は、以下のカテゴリーに分けられ得る：クロモゲン；触媒反応；化学発光；放射活性標識；およびコロイドサイズの呈色粒子。このクロモゲンとしては、呈色が観察され得るように特有の範囲で光を吸収する化合物、または特定の波長または波長範囲の光で照射されると光を発する化合物（例えば、蛍光剤）が挙げられる。酵素的触媒および非酵素的触媒の両方が用いられ得る。酵素の選択において、アッセイが設計される型のサンプル中にこの酵素が通常存在するか否かにかかわらず、酵素の安定性、基質の性質、および存在するならば酵素の特性に対する結合体の効果を含む多くの考慮事項が存在する。潜在的に有用な酵素標識としては、オキシドレダクターゼ（o x i d o r e d u c t a s e）、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、またはシンセターゼが挙げられる。相互に関係のある酵素系もまた用いられ得る。化学発光標識は、化学反応により電子的に励起される化合物を伴い、次いで、検出可能なシグナルとして働くか、または蛍光アクセプターにエネルギーを供与する光を発し得る。放射活性標識としては、水素、ヨウ素、リンなどの不安定な形態のような一般的な使用において見出される種々の放射性同位体が挙げられる。コロイドサイズの呈色粒子は、概して、可視的に検出可能な特有の点（検出される物質の部位に対応する）を形成するコロイド金のような物質を含む。標識技術におけるさらなる情報は、例えば、米国特許第4,366,241号に開示される。

10

【0065】

ヌクレオチドプローブのインビトロ標識の一般的方法は、非標識DNAプローブが、二本鎖フラグメントのいずれかの鎖内に遊離の3'ヒドロキシル末端を生じるようにエンドヌクレアーゼでニックが入れられたニックトランスレーションを含む。同時に、エキソヌクレアーゼは、ニックの5'ホスホリル側からヌクレオチド残基を除去する。置換ヌクレオチドの配列は、二重鎖の反対の鎖の配列により決定される。従って、標識されたヌクレオチドが供給される場合、DNAポリメラーゼは、標識されたヌクレオチドでニックを埋める。この周知の技術を用いると、分子の50%までが標識され得る。より小さなプローブに関しては、3'末端標識を含む公知の方法が用いられ得る。さらに、蛍光分子、触媒、酵素または化学発光物質でDNAを標識する、現在市販される方法が存在する。ピオチン標識キットは、商標Bio-Probeのもとで市販される（Enzo Biochem Inc.）。この型の系は、プローブがアビジンに連結されることを可能とし、続いてこのアビジンは、例えば、蛍光分子、酵素、抗体などで標識され得る。プローブ構築および技術に関するさらなる開示については、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y. 1982)を参照のこと。

20

30

【0066】

標的核酸にハイブリダイズするために選択されたオリゴヌクレオチド（化学合成もしくは組換えDNA方法論のいずれによるかに拘わらず）は、標準的技術を用いて単離および精製され、次いで、好ましくは、標準的標識プロトコルを用いて、（例えば、³⁵Sまたは³²Pで）標識される。次いでSambrookら（1989）前出に記載されるように、この標的核酸を含むサンプルを、電気泳動ゲル上で泳動し、分散した核酸をニトロセルロースフィルターに転写し、そして標識したオリゴヌクレオチドを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、42℃で50%ホルムアミド、5×SSPE、2×デンハルト溶液、0.1%SDS）でフィルターに曝す。次いで、このフィルターを、68℃で2×SSPE、0.1%SDS、より好ましくは、68℃で0.1×SSPE、0.1%SDSを用いて洗浄し得る。当該分野で公知の他の有用な手順としては、溶液ハイブリダイゼーション、ならびにドットハイブリダイゼーションおよびスロットRNAハイブリダイゼーションが挙げられる。次いで、必要に応じて、サンプル中に存在する標的核酸の量を、ハイブリダイズしたフラグメントの放射活性を測定することにより、当該分野で公知の標準的手順を用いて定量する。

40

【0067】

50

さらに、オリゴヌクレオチドはまた、標的タンパク質ファミリーのメンバーをコードする他の配列を同定するために用いられ得る。この方法論はまた、本明細書中に記載のタンパク質をコードする核酸配列と関連し、これらの遺伝子の発現において機能的役割を果たし得る遺伝子配列を同定するために（例えば、タンパク質コード配列の上流または下流に存在する非コード配列を同定するために）用いられ得る。さらに、結合アッセイは、例えば、タンパク質の遺伝子調節または遺伝子発現に関与し得る、乳癌関連タンパク質をコードする核酸と特異的に結合相互作用し得るタンパク質を同定および検出するために行われ得る。さらなる実施形態において、本明細書中に記載のアッセイは、乳癌関連タンパク質により特異的に認識され得、そして結合され得る配列を含む核酸分子を同定および検出するために用いられ得る。

10

【0068】

さらに、適切なオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせ（すなわち、1を超えるプライマー）を用いることにより、当業者は、標準的なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）手順により（例えば、定量的PCRにより）、インピボでの標的遺伝子の発現レベルを決定し得ることが理解される。従来のPCRベースのアッセイは、例えば、Innesら（1990）「PCR Protocols; A Guide to methods and Applications」, Academic Press、およびInnesら（1995）「PCR Strategies」, Academic Press, San Diego, CAにおいて議論される。

【0069】

20

（3．インピボで乳癌関連タンパク質と相互作用するタンパク質の同定）

さらに、当業者は、本明細書中以下に記載されるような手順を用いて、本明細書中に記載の乳癌関連タンパク質とインピボで相互作用する他の分子を同定し得ることが意図される。このような分子はまた、化学療法についての可能な標的を提供し得る。

【0070】

例示目的のために、乳癌関連タンパク質と相互作用し得るタンパク質またはペプチドをコードするcDNAは、Duffeeら（1993）Gene & Develop. 7: 555 - 559に報告されているように、ツーハイブリッドアッセイを用いて決定され得る。このツーハイブリッド系の原理は、2つのタンパク質の非共有結合的相互作用が、通常これらのタンパク質が直接役割を果たさないプロセス（転写）において機能するドメインに対するそれらの共有結合のために、このプロセスを誘発することである。例えば、ツーハイブリッドアッセイにおいて、レポーター遺伝子の検出可能な発現は、2つの融合タンパク質（一方は、DNA結合ドメインを含み、もう一方は、転写開始ドメインを含む）が相互作用する場合に生じる。

30

【0071】

当業者は、Duffeeら（1993）前出に報告された、1以上のレポーター遺伝子を含む宿主細胞（例えば、酵母株Y153）を用い得る。この株は、2つの染色体に位置したレポーター遺伝子を保有し、この遺伝子の発現は、Gal4により調節される。第1のレポーター遺伝子は、Gal4プロモーターの制御下のE. coli lacZ遺伝子である。第2のレポーター遺伝子は、選択可能なHIS3遺伝子である。他の有用なレポーター遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、LEU2遺伝子、およびGFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子が挙げられ得る。

40

【0072】

2つのセットのプラスミドがツーハイブリッド系において用いられる。一方のセットのプラスミドは、乳癌関連タンパク質をコードするDNAにインフレームで融合されたGal4 DNA結合ドメインをコードするDNAを含む。他方のセットのプラスミドは、ヒトリンパ球から構築したヒトcDNAライブラリーの一部に融合されたGal4活性化ドメインをコードするDNAを含む。第1のセットのプラスミドからの発現は、Gal4 DNA結合ドメインおよび乳癌関連タンパク質を含む融合タンパク質を生じる。第2のセットのプラスミドからの発現は、リンパ球cDNAライブラリーからの発現産物に融合され

50

た転写活性化タンパク質を生じる。2つのプラスミドがGal4欠損宿主細胞（例えば、上記の酵母Y153細胞）へ形質転換された場合、Gal4 DNA結合ドメインと転写活性化ドメインとの相互作用は、このDNA結合ドメインに融合した乳癌関連タンパク質が、転写活性化ドメインに融合したリンパ球cDNAライブラリーから発現されたタンパク質に結合した場合にのみ生じる。乳癌関連タンパク質とそのインビボでの結合パートナーとの間のタンパク質間相互作用の結果として、検出可能なレベルのレポーター遺伝子発現が生じる。

【0073】

乳癌関連タンパク質とインビボで相互作用する分子を同定することに加えて、当業者はまた、分子、例えば、乳癌関連タンパク質とそのインビボでの結合パートナーとの間の特異的相互作用を改変または阻害する低分子をスクリーニングし得る。 10

【0074】

例えば、宿主細胞は、上記で議論されるように、適切なDNA結合ドメイン/乳癌関連タンパク質ハイブリッドおよび翻訳活性化ドメイン/推定乳癌関連タンパク質結合パートナーをコードするDNAでトランスフェクトされ得る。この宿主細胞はまた、転写因子DNA結合ドメインにより認識されるシス作用性転写活性化エレメントと作動可能に連結した適切なレポーター遺伝子を含み得る。この系において発現されるレポーター遺伝子のレベルがアッセイされる。次いで、この宿主細胞は、候補分子に曝され、そしてレポーター遺伝子発現のレベルが検出される。レポーター遺伝子発現の減少は、乳癌関連タンパク質とそのインビボ結合パートナーに関する複合体形成または安定性を妨害する候補の能力の指標である。コントロールとして、他の関連しないタンパク質-タンパク質複合体を妨害する候補分子の能力もまた試験される。乳癌関連タンパク質/結合パートナー相互作用を特異的に妨害し得るが、他のタンパク質-タンパク質相互作用は妨害し得ない分子は、生成およびさらなる分析のための候補として同定される。一旦潜在的な候補が同定されると、細胞周期および細胞複製を調節することにおけるその有効性は、標準的な細胞周期モデル系においてアッセイされ得る。 20

【0075】

候補分子は、本明細書中以下に記載されるように生成され得る。例えば、この候補分子をコードするDNAが、当該分野で十分に記載された従来技術（例えば、Sambrook（1989）前出を参照のこと）を用いて任意の種々の発現ベクターに挿入され得、そして全長および短縮化形態の両方を含む組換えタンパク質を生成するために適切な宿主細胞にトランスフェクトされ得る。有用な宿主細胞としては、E. coli、Saccharomyces cerevisiae、Pichia Pastoris、昆虫/バキュロウイルス細胞系、ミエローマ細胞および種々の他の哺乳動物細胞が挙げられる。このようなタンパク質の全長形態は、好ましくは、本明細書中で開示されるように、哺乳動物細胞において発現される。このヌクレオチド配列はまた、好ましくは、例えば、ラージT抗原（当該分野で十分に特徴づけされている）の8アミノ酸核標的化配列をコードする配列を用いて、翻訳された配列を核に標的化するための配列を含む。ベクターは、組換えタンパク質の正しい発現を促進するための種々の配列をさらに含み得る。これらの配列としては、転写プロモーターおよび転写終結配列、エンハンサー配列、好ましいリボソーム結合部位配列、好ましいmRNAリーダー配列、好ましいタンパク質プロセッシング配列、タンパク質分泌のための好ましいシグナル配列などが挙げられる。目的の遺伝子をコードするDNA配列はまた、潜在的阻害配列を除去するか、または望まれない二次構造形成を最小にするように操作され得る。当業者に理解されるように、この組換えタンパク質はまた、融合タンパク質として発現され得る。 30 40

【0076】

翻訳後、このタンパク質は、細胞自体から精製され得るか、または培養培地から回収され得る。このDNAはまた、組換えタンパク質の発現および/または精製を補助する配列を含み得る。このDNAは、直接発現され得るか、または容易に切断可能な融合の接合部を有する融合タンパク質の一部として発現され得る。 50

【0077】

このDNAはまた、適切な哺乳動物宿主において発現され得る。有用な宿主としては、線維芽細胞3T3細胞（例えば、CRL1658のNIH 3T3）、COS（サル腎臓細胞ATCC、CRL-1650）またはCHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞）（例えば、CHO-DXB11、Chasin(1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4222）、ミンク肺上皮細胞(MV1Lu)、ヒト包皮線維芽細胞、ヒト神経膠芽腫細胞、および奇形癌細胞が挙げられる。他の有用な真核生物細胞系としては、酵母細胞、昆虫ノバキュロウイルス系、またはミエローマ細胞が挙げられる。

【0078】

候補分子を発現するために、このDNAを、適切なプロモーター/エンハンサー配列および3'終結配列とともに、適切な市販のベクターの挿入部位にサブクローニングする。有用なプロモーター/エンハンサー配列の組み合わせとしては、例えば、pCDM8に存在するCMVプロモーター（ヒトサイトメガロウイルス(MIE)プロモーター）、およびラウス肉腫ウイルスLTRエンハンサー配列（例えば、Clontech, Inc., Palo Alto）によりブーストされる乳腺腫瘍ウイルスプロモーター(MMTV)が挙げられる。有用な誘導性プロモーターとしては、例えば、 Zn^{2+} メタロチオネインプロモーター(Wranaら(1992)Cell 71:1003-1014)のような Zn^{2+} 誘導性プロモーターが挙げられる。他の誘導性プロモーターは、当該分野で周知であり、そして同様に首尾よく使用され得る。トランス作用性エンハンサー配列を用いて、発現もまたさらに増強され得る。プラスミドもまた、好ましくは、増幅可能なマーカー（例えば、適切なプロモーター（例えば、SV40初期プロモーター(ATCC#37148)）の制御下でのDHFR）を含む。トランスフェクション、細胞培養、遺伝子増幅およびタンパク質発現の条件は、例えば、Ausubelら編(1989)「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley & Sons, NY.に記載されるような、当該分野で周知の標準的な条件である。簡潔には、トランスフェクトした細胞を5~10%の透析したウシ胎仔血清(dFCS)を含む培地で培養し、そして安定にトランスフェクトされた高発現細胞株を、増幅およびサブクローニングにより得て、そして標準的なウェスタンブロット分析およびノザンブロット分析により評価する。サザンブロットもまた、組み込まれた配列の状態およびそれらのコピー数の増幅の程度を評価するために用いられ得る。

【0079】

次いで、発現された候補タンパク質は、標準的な手段を使用して精製される。現在好ましい方法は、アフィニティーカラム（例えば、リガンドアフィニティーカラムまたは抗体アフィニティーカラム）を使用する。次いで、カラムを洗浄し、そして漸増イオン強度の勾配下、pHの変化下、または穏やかな界面活性剤の添加下で、候補分子を選択的に溶出する。乳癌関連タンパク質に結合する候補分子に加えて、乳癌関連タンパク質自体が、このような組換えDNA技術を使用して同様に産生され得ることが理解される。

【0080】

（4．乳癌治療および治療をモニターするための方法）

当業者は、乳癌関連タンパク質および乳癌関連タンパク質と相互作用するタンパク質を同定した後、乳癌を処置するための種々の治療を開発し得る。本明細書中に記載のマーカータンパク質は、正常な乳房細胞と比較して、乳癌細胞においてより高レベルで検出可能に存在するので、当業者は、例えば、これらのマーカータンパク質および/またはこれらのマーカータンパク質をコードする核酸を、癌化学療法のための標的分子として使用し得る。

【0081】

（4．A．アンチセンスベースの治療剤）

想定される特に有用な癌治療剤は、マーカータンパク質をコードする遺伝子の一部または全部あるいはマーカータンパク質をコードする転写物の一部または全部に相補的でありか

10

20

30

40

50

つ生理学的条件下でハイブリダイズし得る、オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列であり、このハイブリダイズによって、このマーカータンパク質遺伝子の転写および／または翻訳を減少または阻害する。あるいは、同じ技術が、乳癌関連タンパク質と相互作用するタンパク質の転写および／または翻訳を減少または阻害するために、適用され得る。

【0082】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、正常細胞および異常な細胞において遺伝子発現を阻害するために広範に使用されている。アンチセンス理論及び確立されたプロトコルの適切な概論については、例えば、Steinら(1988) Cancer Res. 48: 2659-2668を参照のこと。さらに、アンチセンスベースの治療剤としてのペプチド核酸の合成および使用は、PCT公開PCT/EP92/01291(1992年11月26日公開)、PCT/US92/10921(1993年6月24日公開)、およびPCT/US94/013523(1995年6月1日公開)に記載される。従って、アンチセンスベースの治療剤は、単独でかまたは他の治療と組み合わせて、化学療法の部分として使用され得る。

10

【0083】

アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸配列は、遺伝子および／またはmRNA転写物にハイブリダイズし得、従って、本明細書中に記載のタンパク質の転写および／または翻訳を阻害するために使用され得る。しかし、オリゴリボヌクレオチド配列は、一般に、デオキシリボヌクレオチド配列よりも、リボヌクレアーゼによる酵素的攻撃に対してより感受性であることが理解されている。それゆえ、オリゴデオキシリボヌクレオチドは、インビボでの治療的使用のためにはオリゴリボヌクレオチドよりも好ましい。ペプチド核酸は、通常の核酸配列とは異なり、ヌクレアーゼ分解に対して感受性でなく、そしてそれ故、インビボでより長い寿命を有するようであることが理解されている。さらに、ペプチド核酸配列は、対応するDNA配列よりも強く、相補的一本鎖DNAおよびRNA鎖を結合することが理解されている(例えば、PCT/EP92/20702(1992年11月26日公開)を参照のこと)。従って、ペプチド核酸配列は、インビボでの治療的使用に好ましい。

20

【0084】

治療上有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列は、当該分野で周知かつ広く記載されている、公知のオリゴヌクレオチド合成方法およびペプチド核酸合成方法のいずれかによって合成され得る。あるいは、天然のmRNA配列の一部または全部に相補的な配列は、標準的な組換えDNA技術を使用して生成され得る。

30

【0085】

マーカータンパク質全体ならびにさらなる5'および3'非翻訳配列をコードする完全なヌクレオチド配列は、各マーカータンパク質配列について公知であり、そして／または当該分野で周知の技術を使用して容易に決定され得るので、このmRNA転写物または非コード配列の任意の部分とハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸は、従来のオリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸合成方法を使用して調製され得る。

【0086】

マーカータンパク質をコードするmRNA転写物の任意の部分に相補的でありかつハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドは、原理的には、本明細書中に記載の標的タンパク質の翻訳を阻害するために効果的である。例えば、米国特許第5,098,890号(1992年3月24日発行)に記載されるように、翻訳開始コドン部位のmRNAまたは翻訳開始コドン部位の近辺のmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドが、翻訳を阻害するために使用され得る。さらに、潜在的なリボソームの「読み飛ばし(リードスルー)」(これによって、リボソームが、このアンチセンス/センス二重鎖を解離してメッセージの翻訳を可能にすると想定される、現象)に起因して、翻訳開始部位から3'方向に離れすぎた配列は、このmRNA転写物のハイブリダイズにおいて、それほど効果的ではないかもしれないことが示唆されている。

40

50

【0087】

種々の配列の長さのオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸が、mRNA転写物にハイブリダイズさせるために使用され得る。しかし、非常に短い配列（例えば、8～15ヌクレオチド未満を含む配列）は、ほとんど特異性なく結合し得る。さらに、インビボでの使用のために、短いオリゴヌクレオチド配列は、酵素分解に特に感受性であり得る。上記のようなペプチド核酸は、おそらく、ヌクレアーゼ分解に耐性であり得る。オリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸配列が、細胞に直接提供される場合、非常に長い配列は、その標的細胞による取り込みの減少に起因して、阻害においてそれほど効果的でないかもしれない。従って、オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸が、標的細胞に直接提供される場合には、約8～50核酸塩基、およびより好ましくは15～30核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドおよび/またはペプチド核酸が、最も有利であると考えられる。

10

【0088】

標的細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を提供するための代替手段は、遺伝子治療であり、ここで、例えば、DNA配列（好ましくは、ベクターの部分としてそしてプロモーターに連結されている）は、その標的細胞内で構成的に発現される。Oellerら（Oellerら（1992）Science 254:437-539）は、ACCシンターゼ酵素のインビボ阻害を記載し、これは、全長ACCシンターゼ転写物に対するアンチセンス配列をコードする、構成的に発現可能なDNA配列を使用する。従って、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列が、標的細胞に間接的（例えば、その細胞内で発現される発現可能な遺伝子配列の部分として）に提供される場合、長いオリゴヌクレオチド配列（このタンパク質コード配列の実質的に全部に相補的な配列を含む）が、有利に使用され得る。

20

【0089】

最後に、想定される治療上有用なオリゴヌクレオチド配列はまた、天然に存在するヌクレオチドから構成されるネイティブオリゴマーのみならず、改変ヌクレオチドを含むオリゴマーを含み、例えば、安定性および脂質溶解性を改善し、それによって細胞の取り込みを増強する。例えば、脂質溶解性の増強および/またはヌクレアーゼ消化に対する耐性は、ヌクレオチド間ホスホジエステル結合中のリン酸基の酸素を、メチル基または硫黄原子に置換することによって生じることが公知である。ホスホロチオエート（「S-オリゴヌクレオチド」ここで、リン酸基酸素は、硫黄原子に置換されている）は、特に、ヌクレアーゼ切断に対して安定であり、脂質中で可溶性であり、そして特に、直接的なオリゴヌクレオチド投与に好ましい。S-オリゴヌクレオチドは、当該分野で周知かつ広く記載されている従来の合成方法を使用して化学合成され得る。

30

【0090】

好ましい合成ヌクレオシド間結合としては、ホスホロチオエート、アルカリホスホネート、ホスホロジチオエート、ホスフェートエステル、アルカリホスホノチオエート、ホスホラミダイト、カルバメート、カルボネート、ホスフェートトリエステル、アセトアミデート、およびカルボキシメチルエステルが挙げられる。さらに、1以上の5'-3'リン酸基は、低分子量（例えば、15～500Da）の有機基（たとえば、低級アルキル鎖基または低級脂肪族基（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチルを含む）、置換アルキル基および置換脂肪族基（例えば、アミノエチル、アミノプロピル、アミノヒドロキシエチル、アミノヒドロキシプロピル）、小サッカリド基またはグリコシル基を含む）に共有結合され得る。他の低分子量の有機改変は、アミノ基と末端リボースとの間の炭素残基の数の変化を伴う、ヌクレオシド間リン酸結合への付加（コレステロールまたはジアミン化合物）が挙げられる。これらの結合または他の改変を有するオリゴヌクレオチドは、当該分野で周知の方法を使用して調製され得る（例えば、米国特許第5,149,798号を参照のこと）。

40

【0091】

マーカータンパク質の転写および/または翻訳を阻害する適切なオリゴヌクレオチドおよび/またはペプチド核酸配列は、当該分野でよく特徴付けられている標準的なインビボア

50

ッセイを使用して同定され得る。好ましくは、ある範囲の用量を使用して、阻害ならびにハイブリダイゼーションの特異性について効果的な濃度を決定する。例えば、オリゴヌクレオチドの場合、 $0 \sim 100 \mu\text{g}$ オリゴヌクレオチド / ml の用量範囲をアッセイし得る。さらに、これらのオリゴヌクレオチドを、単回トランスフェクションで、または一連のトランスフェクションの部分として、細胞に提供し得る。アンチセンス効率を、トランスフェクション後に、標準的な細胞計数方法を使用してか、そして / またはマーカータンパク質の発現の減少についてアッセイする（例えば、免疫蛍光によって）ことによって、細胞増殖における変化を経時的にアッセイすることによって決定され得る。あるいは、細胞がチミジンを取り込みそして使用する能力は、細胞分裂についてアッセイする別の標準的手段であり、そして例えば、 ^3H -チミジンを使用して、本明細書中で使用され得る。効果的なアンチセンス阻害は、チミジンの取り込みを減少し、細胞増殖を阻害し、そして / またはマーカータンパク質の検出可能なレベルを減少するのに十分に、細胞分裂を阻害する。

10

【0092】

治療上有効なオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸の濃度は、新生物の性質および程度、使用する特定の核酸塩基配列、このオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列に対するその新生物の相対的な感受性、および他の因子に従って、変更し得る。所定の細胞型ならびにオリゴヌクレオチドおよび / またはペプチド核酸に有用な範囲は、標準的な用量範囲実験を行うことによって決定され得る。用量範囲実験はまた、正常細胞および悪性細胞に対する毒性レベルを評価するために行われ得る。有用な濃度は、 10^5 細胞あたり約 $1 \sim 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ の範囲にあり得る。

20

【0093】

インビボ使用のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列は、薬学的に受容可能なキャリア（例えば、適切な液体ビヒクルまたは賦形剤）および必要に応じて補助的な添加剤（単数または複数）と合わせられ得る。液体ビヒクルおよび賦形剤は、従来のものであり、そして市販されている。これらの例としては、滅菌水、生理学的食塩水、水性デキストロス溶液などが挙げられる。インビボ癌治療のために、アンチセンス配列は、好ましくは、悪性細胞に直接提供され得る（例えば、腫瘍への直接注入によって）。あるいは、オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸は、このアンチセンス配列が、標的悪性細胞にその配列を指向する手段と連結される場合に、全身的に投与され得る。

30

【0094】

従来のキャリアを用いる投与に加えて、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列は、種々の特別なオリゴヌクレオチド送達技術によって投与され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、Manninoら（1988）*BioTechnology* 6: 682、およびFelgnerら（1989）*Bethesda Res. Lab. Focus* 11: 21に記載されるように、リポソームにカプセル化され得る。リポソーム処方物の生成に有用な脂質としては、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが挙げられるが、これらに限定されない。このようなリポソーム処方物の調製は、当業者のレベル内にある（例えば、米国特許第4,235,871号；米国特許第4,501,728号；米国特許第4,837,028号；および米国特許第4,737,323号を参照のこと）。本発明の薬学的組成物は、細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を増強する化合物（例えば、シクロデキストリンなど）をさらに含み得る。組成物が、全身的に投与されず、むしろ標的細胞の部位で注射される場合、カチオン性界面活性剤（例えば、リポフェクチン）が、取り込みを増強するために添加され得る。さらに、再構成したウイルスエンベロープは、RNAおよびDNAを細胞に送達するために首尾よく使用されている（例えば、Aradら（1986）*Biochem. Biophys. Acta* 859: 88-94を参照のこと）。

40

【0095】

インビボでの治療的使用のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび / またはペプチド核酸配列は、治療的有效量、例えば、悪性細胞における標的タンパク質発現を減少ま

50

たは阻害するために十分な量で、個体に投与される。投与される実際の投薬量は、処置の性質が予防的であるかまたは治療的であるか、患者の年齢、体重、健康、投与経路、悪性疾患の大きさおよび性質、ならびに他の因子を考慮し得る。毎日の投薬量は、1日あたり約0.01~1,000mgの範囲にあり得る。必要な場合には、より多い量またはより少ない量のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列が、投与され得る。医学分野（特に、化学療法分野）の当業者に理解されるように、インビボ投与のための適切な用量範囲は、臨床医の慣用的実験である。予備的指針として、標的分子のインビトロ阻害のための有効量が、最初に決定され得る。

【0096】

（4．B．結合タンパク質ベースの治療剤）

上記のように、癌マーカータンパク質または癌マーカータンパク質と相互作用するタンパク質は、化学療法の標的として使用され得る。例えば、マーカータンパク質に本質的に可逆的に結合するように設計された結合タンパク質は、例えば、細胞に特異的でありかつその細胞に吸収されることが公知のリガンドとの結合によって、悪性細胞に提供され得る。特定の細胞および細胞型へ分子を標的化するための手段は、化学療法の分野において十分に記載されている。

【0097】

結合タンパク質は、当該分野で周知の技術を使用して獲得および試験され得る。例えば、抗体の結合部分は、有利に使用され得る。しかし、インタクトな抗体またはBABS（好ましくは、ヒト化されている）が、本発明の実施において使用されることが意図される。本明細書中で使用される場合、用語「ヒト化」とは、非ヒト免疫グロブリン可変領域のフレームワーク領域配列を、対応するヒトフレームワーク配列によって置換するプロセスを意味することが理解される。従って、このようなヒト化結合タンパク質が、それらの非ヒト化対応物よりも弱い免疫応答を誘発することが意図される。標的タンパク質に対する高い親和性（例えば、約 10^9 M^{-1} より大きい）を有することが同定される結合タンパク質が、特に有用である。あるいは、結合タンパク質をコードするDNAは、標的細胞内で発現される発現可能な遺伝子の部分として標的細胞に提供される。これは、当該分野で十分に記載される遺伝子治療プロトコルに使用される手順に従う。例えば、米国特許第4,497,796号および「Gene Transfer」、Vijay R. Baichwal編（1986）を参照のこと。一旦結合タンパク質に結合されると、標的タンパク質が不活性化されるか、またはその生物学的活性が減少され、それによって、細胞分裂を阻害または遅延させることが意図される。

【0098】

上記のように、インビボ使用のための適切な結合タンパク質は、適切な薬学的に受容可能なキャリア（例えば、生理学的食塩水または医学分野でよく特徴付けられている他の有用なキャリア）と合わせられ得る。これらの薬学的組成物は、例えば、直接注入によって、悪性細胞に直接提供され得るか、または結合タンパク質が標的細胞にそのタンパク質を標的化するための手段と結合されている場合に、全身的に提供される。最後に、適切な用量範囲および細胞毒性レベルは、標準的な用量範囲実験を使用して評価され得る。治療的有效濃度は、1日あたり約0.01~1,000mgの範囲にあり得る。上記のように、投与される実際の投薬量は、例えば、悪性疾患の性質、個体の年齢、体重および健康、ならびに他の因子に依存して、変更し得る。

【0099】

（4．C．低分子ベースの治療剤）

乳癌関連タンパク質を単離した後、当業者は、当該分野で周知の方法を使用して、低分子ライブラリー（ペプチドライブラリーまたは非ペプチドライブラリーのいずれか）をスクリーニングし、乳癌関連タンパク質の生物学的機能を減少または阻害する候補分子を同定し得る。これらの低分子は、好ましくは、標的分子のインビボ発現を減少することによって、または標的分子と相互作用して、これによって、標的分子の生物学的活性または標的分子とそのインビボ結合パートナーとの間の相互作用を阻害することによって、この機能

10

20

30

40

50

を達成する。

【0100】

一旦候補低分子が明らかにされると、当業者が、当該分野で周知の理論的な薬物設計方法を使用して、その低分子の効力を増強し得ることが意図される。あるいは、当業者は、さらなる候補分子の新規な設計をさらに補助する定量的構造活性関係 (Q S A R) を開発するために、当業者を補助する種々のコンピュータプログラムを使用し得る。一旦同定されると、これらの低分子は、商業的な量で生成され得、そして適切な安全性および効力の研究に供され得る。

【0101】

これらのスクリーニングアッセイが自動化され得、これによって、同じ時間で多くの低分子のスクリーニングを容易にすることが意図される。このような自動化手段は、薬物スクリーニングの当業者のレベル内にあり、従って、本明細書中では議論しない。

【0102】

候補ペプチドベースの低分子は、宿主細胞における適切な核酸配列の発現によってまたは合成有機化学を使用して生成され得る。同様に、非ペプチドベースの低分子は、当該分野で周知の従来の合成有機化学を使用して生成され得る。

【0103】

上記のように、インビボ使用のために、これらの同定された低分子は、適切な薬学的に受容可能なキャリア (例えば、生理学的食塩水または医学分野でよく特徴付けられている他の有用なキャリア) と合わせられ得る。これらの薬学的組成物は、例えば、直接注入によって、悪性細胞に直接提供され得るか、または結合タンパク質が標的細胞にそのタンパク質を標的化するための手段と結合されている場合に、全身的に提供される。最後に、適切な用量範囲および細胞毒性レベルは、標準的な用量範囲実験を使用して評価され得る。上記のように、投与される実際の投薬量は、例えば、悪性疾患の性質、個体の年齢、体重および健康、ならびに他の因子に依存して、変更し得る。

【0104】

(4. D. 個体における乳癌の状態をモニターするための方法)

乳癌の進行または化学療法の治療的効力は、当該分野で周知の手順を使用して測定され得る。例えば、特定の化学療法剤の効力は、細胞死を起こしている乳癌細胞から放出される乳癌関連タンパク質の量を測定することによって決定され得る。米国特許第5,840,503号および同第5,965,376号に報告されるように、可溶性核基質タンパク質およびそれらのフラグメントが、細胞死中の細胞によって放出される。このような可溶性核基質タンパク質は、体液において定量され得、そして組織中の細胞死の程度または速度をモニターするために使用され得る。同様に、1以上の乳癌関連タンパク質のレベルは、個体の乳癌の状態の指標として使用され得る。

【0105】

例えば、細胞から放出される乳癌関連タンパク質またはそのフラグメントの濃度は、健常な未処置の組織からの標準に対して比較される。液体サンプルを、処置の間の別々の間隔で収集し、そして標準と比較する。例えば、乳癌関連タンパク質のレベルにおける変化が、処置の効力 (すなわち、癌細胞死の速度) を示すことが意図される。可溶性乳癌関連タンパク質の放出は、血液、血漿、尿、精液、膣分泌物、ならびに乳房滲出液および他の体液において測定され得る。

【0106】

このアッセイを使用して、組織生存度または乳癌の進行をモニターする場合、目的のサンプル中のマーカータンパク質またはその転写物の存在および量を検出する工程を、間隔を開けて繰り返し、次いで、これらの値を比較して、検出された濃度における変化は、組織の状態における変化を反映する。例えば、1以上の乳癌関連タンパク質の増加は、乳癌の進行に相関し得る。このアッセイを使用して、治療の効力を評価する場合、これらのモニタリング工程は、治療剤または治療的手順の投与後 (例えば、化学療法剤の投与後または放射線処置後) に行う。同様に、乳癌関連タンパク質のレベルにおける減少は、乳癌の後

退に相関し得る。

【0107】

従って、乳癌は、本明細書中に教示されるように、乳癌関連タンパク質の存在によって同定され得る。一旦同定されると、乳癌は、これらの乳癌関連タンパク質の発現および/または生物学的活性をインビボで減少する化合物を使用して処理され得る。さらに、本明細書中に提供される方法は、疾患の進行および/または処置をモニターするために使用され得る。以下の非限定的な実施例は、乳癌関連タンパク質の単離および特徴付け、ならびに乳癌の検出におけるそれらの使用のための方法の詳細を提供する。

【0108】

(実施例1 - 乳癌マーカーの同定)

乳癌についてのマーカーを同定するために、表面増強レーザー脱離およびイオン化 (SELDI) 質量分析法によって、乳癌を有する個体の血清を、正常な個体の血清と比較した。手短には、個体から収集した 0.5 mL アリコートの血清を解凍した。次いで、1 μ L の 1 mg/mL ダイズトリブシンインヒビター (SBTI) 溶液および 1 μ L の 1 mg/mL ロイペプチン溶液を、各アリコートに添加した。脂質を除去するために、350 μ L の 1, 1, 2 - トリフルオロクロロエタンを、各サンプルに添加した。次いで、これらのサンプルを 5 分間ボルテックスし、そして 4 で 5 分間、微量遠心分離機で遠心分離した。得られた上清を、プロテイン G を結合したアガロースの 1 mL カラム (Hitrap Protein G カラム、Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) にアプライし、免疫グロブリンタンパク質を除去した。次いで、カラムを、SBTI およびロイペプチンを含有する、3 mL の 50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) (「結合緩衝液」) でリンスし、そして得られたフロースルーを、Cibacronブルーを結合した 6% Sepharose の 5 mL カラム (Hitrap blue column、Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) に直接アプライし、アルブミンタンパク質を除去した。この Hitrap ブルーカラムを、20 mL の結合緩衝液でリンスした。得られたフロースルーを、10 kD カットオフを有する遠心分離ベースの濃縮器 (Centricon 10、Millipore Corporation、Bedford, MA) を 4 回用いて、約 0.7 mL の最終濃度に濃縮した。

【0109】

得られた血清 (免疫グロブリンおよびアルブミンを実質的に含まない) を、イオン交換クロマトグラフィーによって、ほぼ等価量のタンパク質を含有する 12 個の画分に再分割した。詳細には、血清を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中の Mono Q (Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) イオン交換カラム (四級アンモニウム基を有する強力なアニオン交換体) にアプライし、そしてタンパク質を、段階様式で塩化ナトリウム濃度を増加することによって、カラムから溶出した。従って、血清は、溶出で使った塩化ナトリウムの濃度に基づく 12 個の画分に分けられた。従って、これらの画分を、フロースルー、25 mM、50 mM、75 mM、100 mM、125 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、400 mM および 2 M 塩化ナトリウムと表示した。溶出後、各画分を、約 100 μ g/mL に濃縮し、そして緩衝液を、結合緩衝液に交換した。

【0110】

次いで、各 12 個の画分から 4 ~ 10 μ l を、4 個の SELDI チップ表面の各々にアプライしてそして結合させた (各表面は、8 個のサンプルを維持する)。チップ上の各サンプルの意図される位置を、パパニコラウスミアにおいて使用したマーカーと同様の疎水性マーカーを使用して引いた円で区分した。本明細書中で使用した SELDI チップは、CIPHERGEN Biosystems, Inc., Palo Alto, California から購入し、そして以下に記載のように使用した。

【0111】

銅またはニッケル表面について、エチレンジアミン三酢酸部分を含むチップ (IMAC,

10

20

30

40

50

Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA) を、5 μ L の銅塩溶液またはニッケル塩溶液の 2 回の 5 分間の適用で前処理し、そして脱イオン水で洗浄した。5 μ L の結合緩衝液での 5 分の処理後、次いで、2 ~ 3 μ L のサンプルを、30 ~ 60 分間、その表面に適用した。次いで、別の 2 ~ 3 μ L のサンプルを、さらに 30 ~ 60 分間、その表面に適用した。次いで、チップを、結合緩衝液で 2 回洗浄し、結合されなかったタンパク質を除去した。0.5 μ L のシナピン酸 (sinapinic acid) (12.5 mg/mL) を、2 回添加し、そして各回で乾燥させた。シナピン酸の存在は、質量分析法の際のその結合したタンパク質の蒸発およびイオン化を増強する。

【0112】

カルボキシル部分を含有するチップ表面 (WCX-2, Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA) について、疎水性ペンの使用の前に、表面を、30 分間、10 mM HCl で洗浄し、そして脱イオン水で 5 回リンスした。ペンの使用後、表面を、5 μ L の結合緩衝液で 5 回洗浄し、そして脱イオン水で 1 回洗浄した。2 ~ 3 μ L のサンプルを、各 30 ~ 60 分間で 2 回適用した。表面を、5 μ L の結合緩衝液で 2 回洗浄し、そして 0.5 μ L のシナピン酸を、2 回適用した。

【0113】

四級アンモニウム部分を含有するチップ表面 (SAX-2, Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA) について、ペンの使用後に、表面を 5 μ L の結合緩衝液で 5 回洗浄し、そして脱イオン水で 1 回洗浄した。サンプルの適用、洗浄、およびシナピン酸の適用は、上記と同じように行った。

【0114】

次いで、このチップを、ソフトウェアプログラム「SELDI v. 2.0」を走らせて Ciphergen SELDI PBS One (Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA) を利用する質量分析法に供した。全てのチップについて、「高質量」を 200,000 ダルトンに設定し、「出発検出器感度」を 9 (10 が最も高い感度である 1 ~ 10 の範囲から) に設定し、NDF (中性密度フィルター (neutral density filter)) を「OUT」に設定し、データ収集方法を「Seldi Quantitation」に設定し、SELDI 収集パラメータを 5 の増加で 20 に設定し、そして強さ 50 (100 の中から) で 2 ショットでの加温を含んだ。IMAC チップについて、質量を、3000 ダルトン ~ 3001 ダルトンに最適化し、出発レーザー強さを 80 (100 の中から) に設定し、そして遷移を 5 (すなわち、1 部位あたり 5 レーザーショット) に設定した。ピークをコンピューターによって自動的に同定した。WCX-2 チップについて、質量を、3,000 ダルトン ~ 50,000 ダルトンに最適化し、出発レーザー強さを 80 に設定し、そして遷移を 8 に設定した。ピークをコンピューターによって自動的に同定した。SAX-2 チップについて、質量を、3,000 ダルトン ~ 50,000 ダルトンに最適化し、出発レーザー強さを 85 に設定し、そして遷移を 8 に設定した。ピークをコンピューターによって自動的に同定した。

【0115】

10 個の血清サンプル (正常な個体から 5 個および乳癌を有する個体から 5 個) を質量分析法によって分析し、上記の 60 画分に存在するタンパク質を同定した。質量分析法痕跡において生じたピークを比較して、乳癌を有する個体由来の血清サンプルに存在するが、正常なサンプルには存在しないこれらのピークを同定した。異なるサンプルにおけるピークが、わずかに 1 % の質量差を有する場合、このピークを同じものとして仮定した。ちょうど 11,000 Da 以上 ~ 約 103,000 Da のサイズの範囲で 11 個の質量分析法ピークを、同定した。これは、乳癌を有する個体由来の全ての 5 個の血清サンプルに存在し、そして正常な個体由来のサンプルには存在しなかった。次いで、これらのピークの存在または非存在を、追加の 30 血清サンプル (正常な個体由来の 15 個および乳癌を有する個体由来の 15 サンプル) について決定した。最初の 5 つの乳癌血清サンプルの 4 つに

10

20

30

40

50

存在するが、正常のサンプルのいずれにも存在しなかった 7 個のピークをまた、分析した。これは、これらが、すでに評価の元の 11 個のピークの 1 つ以上として同じ画分および同じ SELDI 表面に存在するからである。研究した 18 個のピークの 15 個は、20 個の乳癌血清サンプルの 15 個以上に存在したが、正常血清サンプルの 15 個以上に存在しなかった。

【0116】

前述の分析の結果を、表 1 に要約する。表に列挙される質量を正確に 1 % 以内と予測する。

【0117】

【表 1】

10

表 1

質量 (Da)	モイQ 画分(mM 塩化 ナトリウム)	使用した SELDIチップ 表面	乳癌を有する 個体由来 サンプルの 陽性数	乳癌を有さない 個体由来 サンプルの 陽性数
16210	0 (70-スレー)	Nickel	17	1
17188	25 mM	WCX-2	17	2
30183	25 mM	WCX-2	15	3
34664	25 mM	WCX-2	16	4
20050	50 mM	Nickel	19	0
28258	50 mM	Nickel	20	0
24170	50 mM	Nickel	17	0
35393	50 mM	Nickel	17	3
34908	50 mM	WCX-2	16	2
70908	100 mM	WCX-2	20	0
17840	100 mM	WCX-2	18	2
11709	150 mM	SAX-2	20	0
42354	200 mM	Nickel	17	0
56280	200 mM	Nickel	16	0
34517	400 mM	Copper	18	1

20

30

40

(実施例 2 乳癌マーカータンパク質の配列決定)

上で提供した生物学的および質量分析法データに基づく乳癌関連タンパク質は、周知の技術を使用してよりよく特徴付けし得る。例えば、血清のサンプルは、例えばカラムクロマトグラフィーおよび/または電気泳動を使用して画分され得、表 1 において同定される各タンパク質に対応する精製タンパク質サンプルを生成し得る。次いで、単離されたタンパク質の配列を、通常のペプチド配列決定方法論(実施例 5 および 6 を参照のこと)を使用して決定し得る。上記の開示を考慮して当業者は、本明細書中に記載される方法によって

50

同定される任意の乳癌関連タンパク質に対する抗体を生成し得ることを正しく認識する。さらに、上記の開示を考慮して当業者は、上記のフラグメントをコードする核酸配列およびそれらの核酸配列相補体を生成し得る。さらに、当業者は通常の組み換えDNA方法論（例えば、このような核酸配列を用いてcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって）を使用して、標的乳癌関連タンパク質をコードする全長核酸配列を単離し得る。このような全長核酸配列、またはそれらのフラグメントを使用して、核酸ベースの検出システムまたは治療を作製し得る。

【0118】

（実施例3 乳癌関連タンパク質に特異的に結合する抗体の生成）

一旦同定された場合、乳癌関連タンパク質を、当業者に対して周知の多数の結合アッセイを使用して組織または体液サンプルにおいて検出し得る。例えば、上記のように、乳癌関連タンパク質を、抗体（例えば、乳癌関連タンパク質に配列するエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体）を使用して組織サンプルまたは体液サンプルのいずれかにおいて検出し得る。このような検出システムにおいて、抗体を好ましくは検出可能な部分で標識化する。

【0119】

下に提供するものは、抗乳癌関連モノクローナル抗体の生成のための例示的なプロトコールである。他のプロトコールをまた構築する。従って、タンパク質を標的とする抗体を生成する特定の方法を、本発明の局面であることを想定しない。

【0120】

免疫化されたマウスが適切な血清力価を得るまでJマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）のBalb/cを、腹腔内に標的タンパク質と共に2週間毎に注射する。それ以後、マウスを3連続静脈ブーストで注射する。フロイント完全アジュバント（Gibco, Grand Island）をはじめの注射に使用し、不完全フロイントアジュバントを次の注射に使用し；そして生理食塩水を、連続静脈注射のために使用する。次いで、動物を屠殺して、そしてその脾臓を取り出す。次いで脾臓細胞（またはリンパ節細胞）をマウス骨髓腫株と融合する（例えば、Kohlerら（1975）Nature 256: 495の方法を使用して）。次いで、標的タンパク質と反応する抗体を生成するハイブリドーマをクローニングして、腹水として増殖する。ハイブリドーマを、任意の所望のアッセイにおいて免疫原に対する反応性によってスクリーニングする。スクリーニングプロトコール、腹水生成および免疫アッセイの詳細な記載もまた、1993年5月13日公開PCT/US92/09220号に開示される。

【0121】

（実施例4 個体において乳癌を検出するための抗体ベースアッセイ）

以下のアッセイを、組織サンプルのために開発している：しかし、試験液サンプルに対する同様のアッセイをはなはだしい実験なしに開発し得ることを考慮する。代表的なアッセイは、市販される免疫検出キット（例えば、Vector Laboratories, Inc. から市販されるABC Elite kit）を使用し得る。

【0122】

生検サンプルを、適切な医学的ガイドラインの従う研究下で患者から取り出す。次いで、このサンプルをガラス顕微鏡スライドに塗布してそしてこのサンプルを10分間冷却アセトン中で固定する。次いで、このスライドを蒸留水でリンスして過酸化水素含有溶液（2 mL 30% H₂O₂ および20 mL 冷却メタノール）で前処理する。次いで、このスライドを緩衝液A（0.1% Tweenおよび0.1% Brijと共にTris緩衝生理食塩水（TBS）を含有する）中でリンスする。緩衝液A中のマウス抗乳癌関連タンパク質モノクローナル抗体を、スライドに添加して、次いでこのスライドを室温で1時間インキュベートする。次いで、このスライドを緩衝液Aで洗浄し、そして緩衝液A中の二次抗体（ABC Elite kit, Vector Labs, Inc.）をこのスライドへ添加する。次いで、このスライドを37℃で15分間湿度チャンバ内でインキュベートする。このスライドを再び緩衝液Aで洗浄して、次いでシグナルの増幅のためにABC試薬

10

20

30

40

50

(ABC Elite kit, Vector Labs, Inc.) をこのスライドに添加する。次いで、このスライドをさらに 37 で 15 分間湿度チャンバ内でインキュベートする。

【0123】

次いで、このスライドを蒸留水で洗浄し、そしてジアミノベンゼジン (diaminobenzidine) (DAB) 基質をスライドに 4 ~ 5 分間添加する。次いで、このスライドを蒸留水でリンスし、ヘマトキシリンで後染色し、95%エタノールでリンスし、100%エタノールでリンスし、次いでキシレンでリンスする。次いで、カバーガラスをスライドにつけ、そして光学顕微鏡で結果を観察する。

【0124】

10

(実施例 5 28.3 kD 乳癌タンパク質の精製および特徴付け)

実施例 1 で同定した 28.3 kD 乳癌タンパク質を、単離してそしてさらに以下のように特徴付けした。

【0125】

約 30 mL の血清 (複数の乳癌患者由来を組み合わせた) からプロテイン G クロマトグラフィーおよび Cibacron Blue アガロースゲルクロマトグラフィーを使用して (それぞれ、標準的な方法論 (実施例 1 に記載される方法論) で) 免疫グロブリン G および血清アルブミンを除去した。次いで血清から除去したアルブミンおよび免疫グロブリンを、モノ Q イオン交換親和性クロマトグラフィーによって分画した。簡単には、この血清タンパク質を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 中の 5 mL のモノ Q カラム (Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) に適用し、フロースルー (flow through) 画分を収集した。その後、この血清タンパク質を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 を使用するカラムから塩化ナトリウムの濃度を増加して段階的に溶出した。この様式において、各異なる量の塩化ナトリウムを含有する 12 個の血清画分を得た。この画分は、フロースルー、ならびに 25 mM、50 mM、75 mM、100 mM、125 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、400 mM、および 2 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液の溶出緩衝液を含む。

20

【0126】

目的のタンパク質を含む 50 mM 塩化ナトリウム画分は、続いて 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 で交換される緩衝液であり、そしてメーカーの指示に従って Centricon 10 (Millipore) の手段によって濃縮した。次いで、生じたサンプルを、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.4 を含有するアイソクラチック緩衝液を使用する Sephacryl S-200 カラム (Pharmacia) 上のサイズ排除クロマトグラフィーによって分画した。カラムから溶出した画分を、実施例 1 に記載するように Ciphergen SELDI 質量分析法を使用して 28.3 kD タンパク質の存在について評価した。28.8 kD タンパク質を含む画分をプールして、50 mM NiCl_2 を使用して事前インキュベートすることで Ni^{+2} で前もってロードした IMAC カラム (Sigma) に適用した。次いで、IMAC カラムを 100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.4 を含有する溶液の 6 倍の容量で洗浄し、そして結合タンパク質画分を 100 mM イミダゾールを含む同じ溶液で溶出した。次いで、溶出した画分を、Minicon 10 (Millipore) の手段によって濃縮し、次いでドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって 12% Tris グリシン SDS-PAGE ゲル上で分画した。タンパク質画分のサンプルを、ゲルの 2 つの平行レーンに適用した。電気泳動後、次いで得られたゲルを Coomassie Brilliant Blue 色素で染色し、そして汚れを除き、タンパク質の存在を示した。約 28.3 kD の 3 つのバンド (最も重い分子量タンパク質、中間分子量タンパク質、および最も軽い分子量タンパク質として特徴付ける) を、2 つのレーンの 1 つから切除し、そしてアクリルアミド薄片から溶出した。

30

40

【0127】

50

このタンパク質を以下のようにゲルから溶出した。簡単には、ゲル薄片を、HPLC階級の水を用いて勢いよく渦状に5回洗浄した。次いで、洗浄した薄片を、120 μ Lの100 mM酢酸ナトリウムpH 8.5、0.1% SDS中に小片に切断し、37 で一晩インキュベートした。上清を新鮮なチューブに静かに注ぎ、そして急速真空 (speed vac) で乾燥した。次いで生じたペレットを37 μ LのHPLC階級の水において再構成した。次いで、約1480 μ Lの冷却エタノールを添加し、そして生じた混合物を-20で一晩インキュベートした。サンプルを4、15分間、11,000 rpmで遠心分離した。上清を除去し、そして生じたペレットを5 μ Lの水において再構築した。生じたタンパク質溶液をSELDI上に走らせ、28.3 kDタンパク質を3つの調製物の1つにおいて同定した (最も重い28 kDタンパク質に対応する図1Aを参照のこと)。次いで、この対応するバンドを、ゲル上の第2の2レーンから切除した。トリプシンでタンパク質分解後、トリプシンのフラグメントをゲルから溶出し、そして質量分析法を介するマイクロ配列 (microsequence) 分析として提起した。

【0128】

4つの個々の質量を、質量分析法で検出した。4つの質量を使用してSwiss Protein Databaseを探索する場合、全ての4つの質量を見出し、当該分野でU2核内低分子リボヌクレオチドB'' (U2 snRNP B'') (Habetsら (1987) 上記、Swiss Protein Database受託番号4507123) として呼ばれるタンパク質において存在するアミノ酸配列に一致した。この結果を、表2にまとめる。

【0129】

【表2】

表 2

ペプチド	配列	配列番号	タンパク質
1	QLQGFPHYGKPMR	1	U2 snRNP B''
2	HDIAFVEFENDGQAGAAR	2	U2 snRNP B''
3	LVPGRHDIAFVEFENDGQAGAAR	3	U2 snRNP B''
4	TVEQTATTNK	4	U2 snRNP B''

U2 snRNP B'' タンパク質のN末端方向～C末端方法におけるアミノ酸配列は、一次アミノ酸コードにおいて以下である：

【0130】

【化1】

MDIRPNHTTY INNMNDKIKK EELKRSLYAL FSQFGHVVDI VALKTMKMRG QAFVIFKELG
 SSTNALRQLQ GFPFYGKPMR IQYAKTDSI ISKMRGTFAD KEKKKEKKKA KTVEQTATT
 NKKPGQGTPN SANTQGNSTP NPQVPDYPPN YILFLNNLPE ETNEMMLTML FNQFPGFKEV
 RLVPGRHDIA FVEFENDGQA GAARDALQGF KITPSHAMKI TYAKK (配列番号:5)

(実施例6 71 kD乳癌タンパク質の精製および特徴付け)

実施例1において同定された71 kD乳癌タンパク質を、単離し、そしてさらに、以下のように特徴付けした。

【0131】

4人の個体のそれぞれ由来の50 mL血清をプールして、200 mLの単一のアリコートを与えた。この200 mLアリコートを各33 mLの6個のアリコートにさらに分けた。各アリコートを、実施例1に記載のように10 mLのトリフルオロトリクロロエタンで処理した。フロースルー(flow through)(約500 mL/アリコート)においてタンパク質を含む画分をプールして、Centricon濃縮機を使用して約10 mL/アリコートまで濃縮した(計60 mL)。

【0132】

3 mLアリコートを、5 mLモノQセファロースカラム上へロードした(60 mL/3 mL = 20アリコート)。分別を、全ての容積を5倍することを除き実施例1に記載のように実施した。100 mM塩化ナトリウムで各画分から溶出した画分を単一の200 mL画分にプールし、そして緩衝液を実施例1に記載のように結合緩衝液へ交換した。

10

【0133】

200 mL画分を、一連の抗体カラムへ適用して、50~70 kDの過剰なタンパク質を除去した。これらのタンパク質(α -1抗トリプシン、セルロプラスミン、カリクレイン、およびGCグロブリン)のそれぞれを同定し、そして予備試みの間配列決定して71 kDタンパク質を単離した。このタンパク質に対する市販される抗体を購入して、通常のNHSEステル化学的作用(Pierce Aminolink Plus kit - 部分番号44894)を使用して固体支持(アガロース)に結合した。当のタンパク質がWesternブロット分析によってフロースルーにおいてもはや見え得なくなるまで200 mL画分を順番に各カラムに適用した。

20

【0134】

フロースルーを、S200カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィーに供した。71 kDピークを含む画分を、実施例1に示すようにSELDIによって同定した。これらの画分はまた、Cibacronブルーカラムに結合しないヒト血清アルブミン(HSA)のフラグメントを含むことが明らかなため、画分を、HSAに対する2つのマウス抗体を有するHSA親和性カラムに適用して、残存HSAをサンプルから除去した。サンプルのSDS-PAGE分析は、銀染色によって71 kDの範囲に単一のバンドを示した。残存サンプルを、2つのアリコートに分割し、そして10%tris-グリシンゲルの2つのレーン上に走らせた。このゲルをCoomassie Brilliant Blue色素で染色した。2つのレーンの1つ由来の71 kDバンドを切除して、そして実施例5に記載のようにゲルから溶出した。その同一性を70.972 kDマーカートンパク質としてSELDIによって確認した。他のレーン由来の71 kDバンドを切除して、そしてトリプシンで処理した。生じたペプチドをゲルから溶出して、そして質量分析法によってマイクロ配列分析に供した。16個の切断刺激因子の64 kDサブユニットの予測されるトリプシンフラグメントは、71 kDタンパク質の質量スペクトルにおいて同定したものに对应する質量を有する。この16個の配列を表3に示す。切断刺激因子に対する2つの報告した配列を、並列表中に配列番号22および配列番号23として示す。

30

【0135】

【表3】

表 3

パート	配列	配列番号	タンパク質
1	GQVPMQDPR	6	切断刺激因子
2	GSLPANVPTPR	7	切断刺激因子
3	GLLGDAFNDPR	8	切断刺激因子
4	AGLTVRDPVDR	9	切断刺激因子
5	ALRVDNAASEKNK	10	切断刺激因子
6	GGTLLSVTGEVEPR	11	切断刺激因子
7	DIFSEVGPVVSFR	12	切断刺激因子
8	GIDARGMEARAMEAR	13	切断刺激因子
9	GMEARAMEARGLDAR	14	切断刺激因子
10	AVASLPPEQMFELMK	15	切断刺激因子
11	AMEARAMEVRGMEAR	16	切断刺激因子
12	GYLGPPHQGPPMHVPGHESR	17	切断刺激因子
13	GPIPSGMQGPSPINMGAVVPQGSR	18	切断刺激因子
14	NMLLQNPQLAYALLQAQVVMR	19	切断刺激因子
15	GGPLPEPRPLMAEPRGPMLDQR	20	切断刺激因子
16	SLGTGAPVIESPYGETISPEDAPESISK	21	切断刺激因子

10

20

30

40

(等価物)

本発明は、他の特定の形態においてその趣旨または本質の特徴からそれずに具体的に表現され得る。従って上記実施形態は、本明細書中に記載の本発明の限定よりもむしろ実例となる全ての点において考慮されるべきである。従って、本発明の範囲は、上の記載よりもむしろ添付の請求の範囲によって示され、請求の範囲の等価な意味および範囲における全ての变化は、その中に参考として包含されることが意図される。

【0136】

(参考による援用)

前述の特許および上に引用される科学的文献のそれぞれの全体的開示は、本明細書中に参考としてはっきりと援用される。

【0137】

本発明は、以下の図面を参照してより完全に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A - 1Cは、トリプシン消化に供され、そしてポリアクリルアミドゲルから溶出された、28 kDタンパク質の質量スペクトルを介した特徴付けから得られたスペクトルである。図1Aは、ゲルから単離された最も重い28 kDタンパク質のスペクトルであり、図1Bは、ゲルから単離された中程度の28 kDタンパク質のスペクトルであり、そして図1Cは、ゲルから単離された最も軽い28 kDタンパク質のスペクトルである。

【図 1】

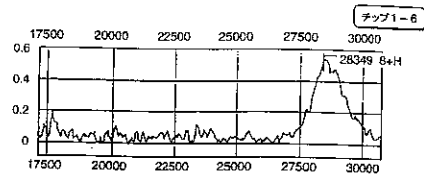


FIG. 1A

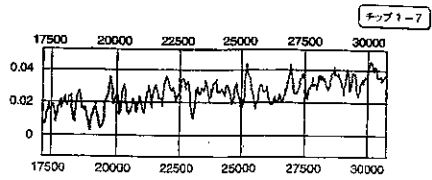


FIG. 1B

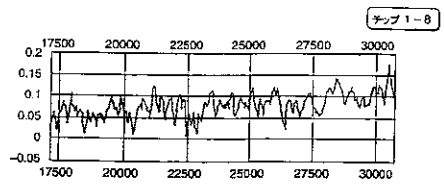


FIG. 1C

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 May 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/36470 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00 (72) Inventor: WATKINS, Brynmor; 99 Summer Street, Waltham, MA 02452 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US99/31483 (74) Agent: BRODOWSKI, Michael, H.; Testa, Hurwitz & Thibault, LLP, High Street Tower, 125 High Street, Boston, MA 02110 (US).
- (22) International Filing Date: 16 November 2000 (16.11.2000)
- (35) Filing Language: English (81) Designated States (national): AU, CA, JP.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Priority Data:
- | | | |
|---------------|-------------------------------|----|
| 60/165,573 | 16 November 1999 (16.11.1999) | US |
| 60/172,170 | 17 December 1999 (17.12.1999) | US |
| 60/178,860 | 27 January 2000 (27.01.2000) | US |
| 60/201,721 | 3 May 2000 (03.05.2000) | US |
| Not furnished | 10 November 2000 (10.11.2000) | US |
- Published:
Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

(71) Applicant: MATRITECH, INC. [US/US]; 300 Nevada Street, Newton, MA 02460 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/36470 A2

(54) Title: MATERIALS AND METHODS FOR DETECTION AND TREATMENT OF BREAST CANCER

(57) Abstract: The invention provides a wide range of methods and compositions for detecting and treating breast cancer in an individual. Specifically, the invention provides target breast cancer-associated proteins, which permit a rapid detection, preferably before metastases occur, of breast cancer. The target breast cancer-associated protein may be detected, for example, by reacting the sample with a labeled binding moiety, for example, a labeled antibody capable of binding specifically to the protein. The invention also provides kits useful in the detection of breast cancer in an individual. In addition, the invention provides methods utilizing the breast cancer-associated proteins either as targets for treating breast cancer or as indicators for monitoring the efficacy of such a treatment.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

**MATERIALS AND METHODS FOR DETECTION
AND TREATMENT OF BREAST CANCER**

Reference to Related Applications

This application claims priority to utility patent application identified by Attorney Docket No. MTP-024, entitled "Materials and Methods for Detection and Treatment of Breast Cancer," filed on November 10, 2000, and the benefit of U.S. Serial No. 60/165,673, filed November 16, 1999; U.S. Serial No. 60/172,170, filed December 17, 1999; U.S. Serial No. 60/178,860, filed January 27, 2000; and U.S. Serial No. 60/201,721, filed May 3, 2000, the disclosures of which are incorporated by reference herein.

Field of the Invention

The present invention relates generally to methods and compositions for the detection and/or treatment of breast cancer. More specifically, the present invention relates to breast cancer-associated proteins and nucleic acids encoding such proteins which represent cellular markers for breast cancer detection, and molecular targets for breast cancer therapy.

Background of the Invention

Breast cancer is a leading cause of death in women. While the pathogenesis of breast cancer is unclear, transformation of normal breast epithelium to a malignant phenotype may be the result of genetic factors, especially in women under 30 (Miki *et al.* (1994) *Science* 266: 66-71). However, it is likely that other, non-genetic factors also have a significant effect on the etiology of the disease. Regardless of its origin, breast cancer morbidity increases significantly if it is not detected early in its progression. Thus, considerable effort has focused on the elucidation of early cellular events surrounding transformation in breast tissue. Such effort has led to the identification of several potential breast cancer markers. For example, alleles of the BRCA1 and BRCA2 genes have been linked to hereditary and early-onset breast cancer (Wooster *et al.* (1994) *Science* 265: 2088-2090). The wild-type BRCA1 allele encodes a tumor suppressor protein. Deletions and/or other alterations in that allele have been linked to transformation of breast epithelium. Accordingly, detection of mutated BRCA1 alleles or their gene products has been proposed as a means for detecting breast, as well as ovarian, cancers (Miki *et al.*, *supra*). However, BRCA1 is limited as a cancer marker because BRCA1 mutations fail to account for the majority of breast cancers (Ford *et al.* (1995) *British J. Cancer* 72: 805-812). Similarly, the

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 2 -

BRCA2 gene, which has been linked to forms of hereditary breast cancer, accounts for only a small portion of total breast cancer cases (Ford *et al.*, *supra*).

Several other genes have been linked to breast cancer and may serve as markers for the disease, either directly or via their gene products. Such potential markers include the TP53 gene and its gene product, the p53 tumor suppressor protein (Malkin *et al.* (1990) *Science* 250: 1233-1238). The loss of heterozygosity in genes such as the ataxia telangiectasia gene has also been linked to a high risk of developing breast cancer (Swift *et al.* (1991) *N. Engl. J. Med.* 323: 1831-1836). A problem associated with many of the markers proposed to date is that the oncogenic phenotype is often the result of a gene deletion, thus requiring detection of the absence of the wild-type form as a predictor of transformation.

There is, therefore, a need in the art for specific, reliable markers that are differentially expressed in normal and transformed breast tissue and that may be useful in the diagnosis of breast cancer, in the prediction of its onset or the treatment of breast cancer. Such markers and methods for their use are provided herein.

15 Summary of the Invention

The invention provides a variety of methods and compositions for detecting the presence of breast cancer in a mammal, for example, a human, and for treating breast cancer in a mammal diagnosed with the disease. The invention is based, in part, upon the discovery of a family of proteins each member of which is detectable at a higher concentration in serum from a mammal, for example, a human, with breast cancer relative to serum from a normal mammal, that is, a mammal without breast cancer. Accordingly, these proteins, as well as nucleic acid sequences encoding such proteins, or sequences complementary thereto, can be used as breast cancer markers useful in diagnosing breast cancer, monitoring the efficacy of a breast cancer therapy and/or as targets of such a therapy.

25 In one aspect, the invention provides isolated breast cancer-associated protein markers. The protein markers are characterized as being detectable at a higher concentration in the serum of a mammal, specifically, a human, with breast cancer than in serum of a mammal without breast cancer.

30 One marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 16 kD, and fails to bind in a detectable amount to an anion exchange resin in the presence of 50 mM

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 3 -

sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 17 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 25 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a WCX-2 SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 30 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 25 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a WCX-2 SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 25 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a WCX-2 SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 20 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 24 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 28 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium chloride in 50 mM

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 4 -

sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip. Microsequence analysis has identified the marker protein to be a protein known in the art as small nuclear ribonucleoprotein B'' (Habets *et al.* (1987) PROC NATL ACADE SCI, USA 84, 2421-2425), the amino acid sequence of which is identified hereinbelow as SEQ ID NO: 5.

5 Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip.

10 Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip.

15 Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 18 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 100 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a WCX-2 SELDI chip.

20 Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 71 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 100 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a WCX-2 SELDI chip. Microsequence analysis has identified the marker protein to be a protein known in the art
25 as, or related to, the 64 kD subunit of cleavage stimulating factor (Takagaki *et al.* (1987) PROC NATL ACADE SCI, USA 89, 1403-1407), the amino acid sequence of which is identified hereinbelow as SEQ ID NO: 22 and SEQ ID NO: 23..

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 12 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0,
30 and elutes from the anion exchange resin in the presence of 150 mM sodium chloride in 50 mM

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 5 -

sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a SAX-2 SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 42 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 200 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 56 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 200 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a nickel SELDI chip.

Another marker protein is further characterized in that it has a molecular weight of about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion exchange resin in the presence of 400 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. This marker protein also has a binding affinity to a copper SELDI chip.

Furthermore, the aforementioned breast cancer-associated proteins are further characterized as being non-immunoglobulin and/or non-albumin proteins. Furthermore, the breast cancer-associated proteins may further define an antigenic region or epitope that may bind specifically to a binding moiety, for example, an antibody, for example, a monoclonal or a polyclonal antibody, an antibody fragment thereof, or a biosynthetic antibody binding site directed against the antigenic region or epitope. In addition, the invention enables one skilled in the art to isolate nucleic acids encoding the aforementioned breast cancer-associated proteins or nucleic acids capable of hybridizing under specific hybridization conditions to a nucleic acid encoding the breast cancer-associated proteins. Furthermore, the skilled artisan may produce nucleic acid sequences encoding the entire isolated marker protein, or fragments thereof, using methods currently available in the art (see, for example, Sambrook *et al.*, eds. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press). For example, the breast cancer-associated protein of the invention, when isolated, can be sequenced using conventional peptide sequencing protocols. Based on the peptide sequence, it is possible to produce oligonucleotide

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 6 -

hybridization probes useful in screening a cDNA library. The cDNA library may then be screened with the resultant oligonucleotide to isolate full or partial length cDNA sequences encoding the isolated protein.

In another aspect, the invention provides a variety of methods, for example, protein or
5 nucleic acid-based methods, for detecting the presence of breast cancer in a mammal. The methods of the invention may be performed on any relevant tissue or body fluid sample. For example, methods of the invention may be performed on breast tissue, more preferably breast biopsy tissue. Alternatively, the methods of the invention may be performed on a human body fluid sample selected from the group consisting of: blood; serum; plasma; fecal matter; urine;
10 vaginal secretion; spinal fluid; saliva; ascitic fluid; peritoneal fluid; sputum; and breast exudate. It is contemplated, however, that the methods of the invention also may be useful in detecting metastasized breast cancer cells in other tissue or body fluid samples. Detection of breast cancer can be accomplished using any one of a number of assay methods well known and used in the art.

15 In one aspect, the method of diagnosing cancer in an individual comprises contacting a sample from the individual with a first binding moiety that binds specifically to a breast-cancer associated protein to produce a first binding moiety-cancer-associated protein complex. The first binding moiety is capable of binding specifically to at least one of the breast cancer associated marker proteins identified hereinabove to produce a complex. Thereafter the presence and/or
20 amount of marker protein in the complex can then be detected, for example, via the first binding moiety if labeled with a detectable moiety, for example, a radioactive or fluorescent label, or a second binding moiety labeled with a detectable moiety that binds specifically to the first binding moiety using conventional methodologies well known in the art. The presence or amount of the marker protein can thus be indicative of the presence of breast cancer in the individual. For
25 example, the amount of marker protein in the sample may be compared against a threshold value previously calibrated to indicate the presence or absence of breast cancer, wherein the amount of the complex in the sample relative to the threshold value can be indicative of the presence or absence of cancer in the individual. Although such a method can be performed on tissue, for example, breast tissue, or a body fluid, for example, serum, a body fluid currently is the preferred
30 test sample.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 7 -

Detection of the aforementioned nucleic acid molecules can also serve as an indicator of the presence of breast cancer and/or metastasized breast cancer in an individual. Accordingly, in another aspect, the invention provides another method for detecting breast cancer in a human.

The method comprises the step of detecting the presence of a nucleic acid molecule in a tissue or body fluid sample thereby to indicate the presence of breast cancer in an individual. The nucleic acid molecule is selected from the group consisting of (i) a nucleic acid molecule comprising a sequence capable of recognizing and being specifically bound by a breast cancer-associated protein, and (ii) a nucleic acid molecule comprising a sequence encoding at least a portion of one or more of the breast cancer-associated proteins identified herein.

In one embodiment, the method comprises exposing a sample from the individual under specific hybridization conditions to a nucleic acid probe, for example, greater than about 10 and more preferably greater than 15 nucleotides in length, capable of hybridizing to a target nucleic acid encoding one of the breast cancer-associated proteins identified herein to produce a duplex. Thereafter, the presence of the duplex can be detected using a variety of detection methods known and used in the art. It is contemplated that the target nucleic acid may be amplified, for example, via conventional polymerase chain reaction (PCR) or reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) methodologies, prior to hybridization with the nucleic acid probe.

In one embodiment, the target nucleic acid (for example, a messenger RNA (mRNA) molecule), is greater than 15 nucleotides, more preferably greater than 50 nucleotides, and most preferably greater than 100 nucleotides in length and encodes an amino acid sequence present in one of the breast cancer-associated proteins identified herein. Such a target mRNA may then be detected, for example, by Northern blot analysis by reacting the sample with a labeled hybridization probe, for example, a ³²P labeled oligonucleotide probe, capable of hybridizing specifically with at least a portion of the nucleic acid molecule encoding the marker protein.

Detection of a nucleic acid molecule either encoding a breast cancer-associated protein or capable of being specifically bound by a breast cancer-associated protein, can thus serve as an indicator of the presence of a breast cancer in the individual being tested.

In another aspect, the invention provides a kit for detecting the presence of breast cancer or for evaluating the efficacy of a therapeutic treatment of a breast cancer. Such kits may comprise, in combination, (i) a receptacle for receiving a human tissue or body fluid sample from the individual to be tested, (ii) a binding partner which binds specifically either to an epitope on a

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 8 -

breast cancer-associated marker protein or a nucleic acid sequence encoding at least a portion of the breast cancer-associated protein or the nucleic acid sequence encoding at least a portion of the breast cancer-associated protein, and (iii) a reference sample. In one embodiment, the reference sample may comprise a negative and/or positive control. In that embodiment, the negative control would be indicative of a normal breast cell type and the positive control would be indicative of breast cancer.

In another aspect, the invention provides methods and compositions for treating breast cancer. In one aspect the invention provides proteins or nucleobase-containing sequences useful in the treatment of breast cancer. The therapeutic protein could be, for example, a binding moiety, for example, an antibody, for example, a monoclonal antibody, an antigenic binding fragment thereof, or a biosynthetic antibody binding site capable of binding specifically to a breast cancer-associated protein identified herein. The method comprises the step of administering to a patient with breast cancer, a therapeutically-effective amount of a compound, preferably an antibody, and most preferably a monoclonal antibody, which binds specifically to a target breast cancer-associated protein thereby to inactivate or reduce the biological activity of the protein. The target protein may be any of the breast cancer-associated proteins identified herein. Similarly, it is contemplated that the compound may comprise a small molecule, for example, a small organic molecule, which inhibits or reduces the biological activity of the target breast cancer-associated protein.

In another aspect, the invention provides another method for treating breast cancer. The method comprises the step of administering to a patient diagnosed as having breast cancer, a therapeutically-effective amount of a compound which reduces *in vivo* the expression of a target breast cancer-associated protein thereby to reduce *in vivo* the expression of the target protein. In a preferred embodiment, the compound is a nucleobase containing sequence, for example, an anti-sense nucleic acid sequence or a peptidyl nucleic acid (PNA) capable of binding to and reducing the expression (for example, transcription or translation) of a nucleic acid encoding at least a portion of at least one of the breast cancer-associated proteins identified herein. After administration, the anti-sense nucleic acid sequence or the anti-sense PNA molecule binds to the nucleic acid sequences encoding, at least in part, the target protein thereby to reduce *in vivo* expression of the target breast cancer-associated protein.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 9 -

Thus, the invention provides a wide range of methods and compositions for detecting and treating breast cancer in an individual. Specifically, the invention provides breast cancer-associated proteins, which permit specific and early, preferably before metastases occur, detection of breast cancer in an individual. In addition, the invention provides kits useful in the
5 detection of breast cancer in an individual. In addition, the invention provides methods utilizing the breast cancer-associated proteins as targets and indicators, for treating breast cancers and for monitoring of the efficacy of such a treatment. These and other numerous additional aspects and advantages of the invention will become apparent upon consideration of the following figures, detailed description, and claims which follow.

10 **Description of the Drawings**

The invention can be more completely understood with reference to the following drawings, in which:

Figures 1A-1C are spectra resulting from the characterization via mass spectrometry of 28 kD proteins subjected to trypsin digestion and eluted from a polyacrylamide gel. Figure 1A is a
15 spectrum of the heaviest 28 kD protein isolated from the gel, Figure 1B is a spectrum of the median 28 kD protein isolated from the gel, and Figure 1C is a spectrum of the lightest 28 kD protein isolated from the gel.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 10 -

Detailed Description of the Invention.

The present invention provides methods and compositions for the detection and treatment of breast cancer. The invention is based, in part, upon the discovery of breast cancer-associated proteins which generally are present at detectably higher levels in serum of humans with breast cancer relative to serum of humans without breast cancer.

The breast cancer-associated proteins or nucleic acids encoding such proteins may act as markers useful in the detection of breast cancer or as targets for therapy of breast cancer. For example, it is contemplated that the marker proteins and binding moieties, for example, antibodies that bind to the marker proteins or nucleic acid probes which hybridize to nucleic acid sequences encoding the marker proteins, may be used to detect the presence of breast cancer in an individual. Furthermore, it is contemplated that the skilled artisan may produce novel therapeutics for treating breast cancer which include, for example: antibodies which can be administered to an individual that bind to and reduce or eliminate the biological activity of the target protein *in vivo*; nucleic acid or peptidyl nucleic acid sequences which hybridize with genes or gene transcripts encoding the target proteins, thereby to reduce expression of the target proteins *in vivo*; or small molecules, for example, organic molecules which interact with the target proteins or other cellular moieties, for example, receptors for the target proteins, thereby to reduce or eliminate biological activity of the target proteins.

Set forth below are methods for isolating breast cancer-associated proteins, methods for detecting breast cancer using breast cancer-associated proteins as markers, and methods for treating individuals afflicted with breast cancer using breast cancer-associated proteins as targets for cancer therapy.

1. Methods for Detecting Breast Cancer-Associated Marker Proteins.

Marker proteins of the invention, as disclosed herein, are identified by comparing the protein composition of serum of a human diagnosed with breast cancer with the protein composition of serum of a human free of breast cancer. As used herein, the term "breast cancer-associated protein" is understood to mean any protein which is detectable at a higher level in a tissue or body fluid of an individual diagnosed with breast cancer relative to a corresponding tissue or body fluid of an individual free of breast cancer and includes species and allelic variants thereof and fragments thereof. As used herein, the term "breast cancer" is understood to mean any cancer or cancerous lesion associated with breast tissue or breast tissue cells and can include

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 11 -

precursors to breast cancer, for example, atypical ductal hyperplasia or non-atypical hyperplasia. It is not necessary that the marker protein or target molecule be unique to a breast cancer cell or body fluid of an individual afflicted with breast cancer: rather the marker protein or target molecule should have a signal to noise ratio high enough to discriminate between samples
5 originating from a breast cancer tissue or body fluid and samples originating from normal breast tissue or body fluid.

As used herein, a "portion" or a "fragment" of a protein or of an amino acid sequence denotes a contiguous peptide comprising, in sequence, at least ten amino acids from the protein or amino acid sequence (e.g. amino acids 1-10, 34-43, or 127-136 of the protein or sequence).

10 Preferably, the peptide comprises, in sequence, at least twenty amino acids from the protein or amino acid sequence. More preferably, the peptide comprises, in sequence, at least forty amino acids from the protein or amino acid sequence.

The breast cancer-associated marker proteins of the invention were identified by comparing the proteins present in the serum of individuals with breast cancer to the proteins
15 present in the serum of individuals without breast cancer. Albumin and immunoglobulin proteins were removed from the serum, and the proteins were separated into twelve fractions by anion exchange chromatography. Briefly, the proteins were loaded on a strong anion exchange column in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and eluted with a stepwise gradient of sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. The resulting twelve fractions include
20 a flow-through fraction, a fraction eluting in 25 mM sodium chloride, a 50 mM fraction, a 75 mM fraction, a 100 mM fraction, a 125 mM fraction, a 150 mM fraction, a 200 mM fraction, a 250 mM fraction, a 300 mM fraction, a 400 mM fraction, and a 2 M fraction.

Each fraction was analyzed by SELDI (surface-enhanced laser desorption and ionization) mass spectrometry. Samples from each of the twelve fractions were applied to one of four
25 different SELDI chip surfaces. A copper or nickel SELDI surface can be generated by adding a copper or nickel salt solution to a chip comprising ethylenediaminetriacetic acid. Other SELDI chip surfaces include: WCX-2 which comprises carboxylate moieties, and SAX-2 which comprises quaternary ammonium moieties. The breast cancer-associated proteins of the invention can therefore be characterized by their increased presence in serum of individuals
30 having breast cancer relative to individuals without breast cancer, their molecular weight, binding and elution characteristics on an anion exchange resin, and their affinity to a particular

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 12 -

SELDI chip. For example, as used herein, the term "affinity" to a particular SELDI chip is understood to mean that the breast cancer-associated proteins of the invention bind preferentially to one type of SELDI chip (e.g., copper SELDI chip) relative to one or more of the other SELDI chips (e.g., the nickel, SAX-2 and WCX-2 chips) disclosed herein. As discussed in detail in

5 Example 1, comparison of the sera from diseased and healthy individuals revealed a number of proteins frequently present at detectable levels in the sera of diseased individuals, but infrequently present at comparable levels in the sera of healthy individuals.

Once the breast cancer-associated proteins have been identified by mass spectroscopy, the identified proteins can be isolated by standard protein isolation methodologies and sequenced using protein sequencing technologies known and used in the art. See, for example, Examples 5
10 and 6. Once the amino acid sequences are identified then nucleic acids encoding the marker proteins or portions thereof can be identified using conventional recombinant DNA methodologies. See, for example, Sambrook *et al.* eds. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press. For example, an isolated breast cancer-associated protein can be sequenced using conventional peptide sequencing protocols, and the
15 oligonucleotide hybridization probes designed for sequencing a cDNA library. The cDNA library may then be screened with the resultant hybridization probes to isolate full length or partial length cDNA sequences encoding the isolated marker proteins.

Marker proteins useful in the present invention encompass not only the particular
20 sequences identified herein but also allelic variants thereof and related proteins that also function as marker proteins. Thus, for example, sequences that result from alternative splice forms, post-translational modification, or gene duplication are each encompassed by the present invention. Species variants are also encompassed by this invention where the patient is a non-human mammal. Other homologous proteins that may function as marker proteins are also envisioned.
25 Preferably, variant sequences are at least 80% similar or 70% identical, more preferably at least 90% similar or 80% identical, and most preferably 95% similar or 90% identical to at least a portion of one of the sequences disclosed herein.

To determine whether a candidate peptide region has the requisite percentage similarity or identity to a reference polypeptide or peptide oligomer, the candidate amino acid sequence and
30 the reference amino acid sequence are first aligned using the dynamic programming algorithm described in Smith and Waterman (1981), *J. Mol. Biol.* 147:195-197, in combination with the

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 13 -

BLOSUM62 substitution matrix described in Figure 2 of Henikoff and Henikoff (1992), "Amino acid substitution matrices from protein blocks", *PNAS* (1992 Nov), 89:10915-10919. For the present invention, an appropriate value for the gap insertion penalty is -12, and an appropriate value for the gap extension penalty is -4. Computer programs performing alignments using the algorithm of Smith-Waterman and the BLOSUM62 matrix, such as the GCG program suite (Oxford Molecular Group, Oxford, England), are commercially available and widely used by those skilled in the art.

Once the alignment between the candidate and reference sequence is made, a percent similarity score may be calculated. The individual amino acids of each sequence are compared sequentially according to their similarity to each other. If the value in the BLOSUM62 matrix corresponding to the two aligned amino acids is zero or a negative number, the pairwise similarity score is zero; otherwise the pairwise similarity score is 1.0. The raw similarity score is the sum of the pairwise similarity scores of the aligned amino acids. The raw score is then normalized by dividing it by the number of amino acids in the smaller of the candidate or reference sequences. The normalized raw score is the percent similarity. Alternatively, to calculate a percent identity, the aligned amino acids of each sequence are again compared sequentially. If the amino acids are non-identical, the pairwise identity score is zero; otherwise the pairwise identity score is 1.0. The raw identity score is the sum of the identical aligned amino acids. The raw score is then normalized by dividing it by the number of amino acids in the smaller of the candidate or reference sequences. The normalized raw score is the percent identity. Insertions and deletions are ignored for the purposes of calculating percent similarity and identity. Accordingly, gap penalties are not used in this calculation, although they are used in the initial alignment.

In all instances, variants of the naturally-occurring sequences, as described above, must be tested for their function as marker proteins. Specifically, their presence or absence in a particular form or in a particular biological compartment must be indicative of the presence or absence of cancer in an individual. This routine experimentation can be carried out by the methods described hereinbelow or by other methods known in the art.

Marker proteins in a sample of tissue or body fluid may be detected via binding assays, wherein a binding partner for the marker protein is introduced into a sample suspected of containing the marker protein. In such an assay, the binding partner may be detectably labeled as, for example, with a radioisotopic or fluorescent marker. Labeled antibodies may be used in a

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 14 -

similar manner in order to isolate selected marker proteins. Nucleic acids encoding marker proteins may be detected using nucleic acid probes having a sequence complementary to at least a portion of the sequence encoding the marker protein. Techniques such as PCR and, in particular, reverse transcriptase PCR, are useful means for isolating nucleic acids encoding a marker protein. The examples which follow provide details of the isolation and characterization of breast cancer-associated proteins and methods for their use in the detection and treatment of breast cancer.

2. Detection of Breast Cancer

Once breast cancer-associated proteins have been identified, the proteins or nucleic acids encoding the proteins may be used as markers to determine whether an individual has breast cancer and, if so, suitable detection methods can be used to monitor the status of the disease.

Using the marker proteins or nucleic acids encoding the proteins, the skilled artisan can produce a variety of detection methods for detecting breast cancer in a human. The methods typically comprise the steps of detecting, by some means, the presence of one or more breast cancer-associated proteins or nucleic acids encoding such proteins in a tissue or body fluid sample of the human. The accuracy and/or reliability of the method for detecting breast cancer in a human may be further enhanced by detecting the presence of a plurality of breast cancer-associated proteins and/or nucleic acids in a preselected tissue or body fluid sample. The detection assays may comprise one or more of the protocols described hereinbelow.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 15 -

2.A. Protein-Based Assays

The marker protein in a sample may be detected, for example, by combining the marker protein with a binding moiety capable of specifically binding the marker protein. The binding moiety may comprise, for example, a member of a ligand-receptor pair, i.e., a pair of molecules capable of having a specific binding interaction. The binding moiety may comprise, for example, a member of a specific binding pair, such as antibody-antigen, enzyme-substrate, nucleic acid-nucleic acid, protein-nucleic acid, protein-protein, or other specific binding pair known in the art. Binding proteins may be designed which have enhanced affinity for a target protein. Optionally, the binding moiety may be linked with a detectable label, such as an enzymatic, fluorescent, radioactive, phosphorescent or colored particle label. The labeled complex may be detected, e.g., visually or with the aid of a spectrophotometer or other detector.

Marker proteins may also be detected using gel electrophoresis techniques available in the art. In two-dimensional gel electrophoresis, the proteins are separated first in a pH gradient gel according to their isoelectric point. The resulting gel then is placed on a second polyacrylamide gel, and the proteins separated according to molecular weight (see, for example, O'Farrell (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021).

One or more marker proteins may be detected by first isolating proteins from a sample obtained from an individual suspected of having breast cancer, and then separating the proteins by two-dimensional gel electrophoresis to produce a characteristic two-dimensional gel electrophoresis pattern. The pattern may then be compared with a standard gel pattern produced by separating, under the same or similar conditions, proteins isolated from normal or cancer cells. The standard gel pattern may be stored in, and retrieved from an electronic database of electrophoresis patterns. The presence of a breast cancer-associated protein in the two-dimensional gel provides an indication that the sample being tested was taken from a person with breast cancer. As with the other detection assays described herein, the detection of two or more proteins, for example, in the two-dimensional gel electrophoresis pattern further enhances the accuracy of the assay. The presence of a plurality, e.g., two to five, breast cancer-associated proteins on the two-dimensional gel provides an even stronger indication of the presence of a breast cancer in the individual. The assay thus permits the early detection and treatment of breast cancer.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 16 -

A breast cancer-associated marker protein may also be detected using any of a wide range of immunoassay techniques available in the art. For example, the skilled artisan may employ the sandwich immunoassay format to detect breast cancer in a body fluid sample. Alternatively, the skilled artisan may use conventional immuno-histochemical procedures for detecting the
5 presence of the breast cancer-associated protein in a tissue sample using one or more labeled binding proteins.

In a sandwich immunoassay, two antibodies capable of binding the marker protein generally are used, e.g., one immobilized onto a solid support, and one free in solution and labeled with a detectable chemical compound. Examples of chemical labels that may be used for the second
10 antibody include radioisotopes, fluorescent compounds, and enzymes or other molecules that generate colored or electrochemically active products when exposed to a reactant or enzyme substrate. When a sample containing the marker protein is placed in this system, the marker protein binds to both the immobilized antibody and the labeled antibody, to form a "sandwich" immune complex on the support's surface. The complexed protein is detected by washing away
15 non-bound sample components and excess labeled antibody, and measuring the amount of labeled antibody complexed to protein on the support's surface. Alternatively, the antibody free in solution, which can be labeled with a chemical moiety, for example, a hapten, may be detected by a third antibody labeled with a detectable moiety which binds the free antibody or, for example, the hapten coupled thereto.

Both the sandwich immunoassay and tissue immunohistochemical procedures are highly
20 specific and very sensitive, provided that labels with good limits of detection are used. A detailed review of immunological assay design, theory and protocols can be found in numerous texts in the art, including "*Practical Immunology*", Butt, W.R., ed., (1984) Marcel Dekker, New York and "*Antibodies, A Laboratory Approach*", Harlow *et al.* eds. (1988) Cold Spring Harbor
25 Laboratory.

In general, immunoassay design considerations include preparation of antibodies (e.g., monoclonal or polyclonal antibodies) having sufficiently high binding specificity for the target protein to form a complex that can be distinguished reliably from products of nonspecific interactions. As used herein, the term "antibody" is understood to mean binding proteins, for
30 example, antibodies or other proteins comprising an immunoglobulin variable region-like binding domain, having the appropriate binding affinities and specificities for the target protein.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 17 -

The higher the antibody binding specificity, the lower the target protein concentration that can be detected. As used herein, the terms "specific binding" or "binding specifically" are understood to mean that the binding moiety, for example, a binding protein has a binding affinity for the target protein of greater than about 10^5 M^{-1} , more preferably greater than about 10^7 M^{-1} .

5 Antibodies to an isolated target breast cancer-associated protein which are useful in assays for detecting a breast cancer in an individual may be generated using standard immunological procedures well known and described in the art. See, for example, *Practical Immunology*, Butt, N.R., ed., Marcel Dekker, NY, 1984. Briefly, an isolated target protein is used to raise antibodies in a xenogeneic host, such as a mouse, goat or other suitable mammal. The marker protein is
10 combined with a suitable adjuvant capable of enhancing antibody production in the host, and is injected into the host, for example, by intraperitoneal administration. Any adjuvant suitable for stimulating the host's immune response may be used. A commonly used adjuvant is Freund's complete adjuvant (an emulsion comprising killed and dried microbial cells and available from, for example, Calbiochem Corp., San Diego, or Gibco, Grand Island, NY). Where multiple
15 antigen injections are desired, the subsequent injections may comprise the antigen in combination with an incomplete adjuvant (e.g., cell-free emulsion). Polyclonal antibodies may be isolated from the antibody-producing host by extracting serum containing antibodies to the protein of interest. Monoclonal antibodies may be produced by isolating host cells that produce the desired antibody, fusing these cells with myeloma cells using standard procedures known in
20 the immunology art, and screening for hybrid cells (hybridomas) that react specifically with the target protein and have the desired binding affinity.

Antibody binding domains also may be produced biosynthetically and the amino acid sequence of the binding domain manipulated to enhance binding affinity with a preferred epitope on the target protein. Specific antibody methodologies are well understood and described in the
25 literature. A more detailed description of their preparation can be found, for example, in "Practical Immunology" (1984) (*supra*).

In addition, genetically engineered biosynthetic antibody binding sites, also known in the art as BABS or sFv's, may be used in the practice of the instant invention. Methods for making and using BABS comprising (i) non-covalently associated or disulfide bonded synthetic V_H and V_L
30 dimers, (ii) covalently linked V_H - V_L single chain binding sites, (iii) individual V_H or V_L domains, or (iv) single chain antibody binding sites are disclosed, for example, in U.S. Patent

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 18 -

Nos.: 5,091,513; 5,132,405; 4,704,692; and 4,946,778. Furthermore, BABS having requisite specificity for the breast cancer-associated proteins can be derived by phage antibody cloning from combinatorial gene libraries (see, for example, Clackson *et al.* (1991) *Nature* **352**: 624-628). Briefly, phage each expressing on their coat surfaces BABS having immunoglobulin variable regions encoded by variable region gene sequences derived from mice pre-immunized with isolated breast cancer-associated proteins, or fragments thereof, are screened for binding activity against immobilized breast cancer-associated protein. Phage which bind to the immobilized breast cancer-associated proteins are harvested and the gene encoding the BABS is sequenced. The resulting nucleic acid sequences encoding the BABS of interest then may be expressed in conventional expression systems to produce the BABS protein.

The isolated breast cancer-associated protein also may be used for the development of diagnostic and other tissue evaluating kits and assays to monitor the level of the proteins in a tissue or fluid sample. For example, the kit may include antibodies or other specific binding proteins which bind specifically to the breast cancer-associated proteins and which permit the presence and/or concentration of the breast cancer-associated proteins to be detected and/or quantitated in a tissue or fluid sample.

Suitable kits for detecting breast cancer-associated proteins are contemplated to include, *e.g.*, a receptacle or other means for capturing a sample to be evaluated, and means for detecting the presence and/or quantity in the sample of one or more of the breast cancer-associated proteins described herein. As used herein, "means for detecting" in one embodiment includes one or more antibodies specific for these proteins and means for detecting the binding of the antibodies to these proteins by, *e.g.*, a standard sandwich immunoassay as described herein. Where the presence of a protein within a cell is to be detected, *e.g.*, as from a tissue sample, the kit also may comprise means for disrupting the cell structure so as to expose intracellular proteins.

2.B. Nucleic Acid-based Assays

The presence of a breast cancer in an individual also may be determined by detecting, in a tissue or body fluid sample, a nucleic acid molecule encoding a breast cancer-associated protein. Using methods well known to those of ordinary skill in the art, the breast cancer-associated proteins of the invention may be sequenced, and then, based on the determined sequence, oligonucleotide probes designed for screening a cDNA library (see, for example, Sambrook *et al.* (1989) *supra*).

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 19 -

A target nucleic acid molecule encoding a marker breast cancer-associated protein may be detected using a labeled binding moiety capable of specifically binding the target nucleic acid. The binding moiety may comprise, for example, a protein, a nucleic acid or a peptide nucleic acid. Additionally, a target nucleic acid, such as an mRNA encoding a breast cancer-associated protein, may be detected by conducting, for example, a Northern blot analysis using labeled oligonucleotides. *e.g.*, nucleic acid fragments complementary to and capable of hybridizing specifically with at least a portion of a target nucleic acid.

More specifically, gene probes comprising complementary RNA or, preferably, DNA to the breast cancer-associated nucleotide sequences or mRNA sequences encoding breast cancer-associated proteins may be produced using established recombinant techniques or oligonucleotide synthesis. The probes hybridize with complementary nucleic acid sequences presented in the test specimen, and can provide exquisite specificity. A short, well-defined probe, coding for a single unique sequence is most precise and preferred. Larger probes are generally less specific. While an oligonucleotide of any length may hybridize to an mRNA transcript, oligonucleotides typically within the range of 8-100 nucleotides, preferably within the range of 15-50 nucleotides, are envisioned to be most useful in standard hybridization assays. Choices of probe length and sequence allow one to choose the degree of specificity desired. Hybridization is carried out at from 50° to 65°C in a high salt buffer solution, formamide or other agents to set the degree of complementarity required. Furthermore, the state of the art is such that probes can be manufactured to recognize essentially any DNA or RNA sequence. For additional particulars, see, for example, *Guide to Molecular Techniques*, Berger *et al.*, Methods of Enzymology, Vol. 152, 1987.

A wide variety of different labels coupled to the probes or antibodies may be employed in the assays. The labeled reagents may be provided in solution or coupled to an insoluble support, depending on the design of the assay. The various conjugates may be joined covalently or noncovalently, directly or indirectly. When bonded covalently, the particular linkage group will depend upon the nature of the two moieties to be bonded. A large number of linking groups and methods for linking are taught in the literature. Broadly, the labels may be divided into the following categories: chromogens; catalyzed reactions; chemiluminescence; radioactive labels; and colloidal-sized colored particles. The chromogens include compounds which absorb light in a distinctive range so that a color may be observed, or emit light when irradiated with light of a

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 20 -

particular wavelength or wavelength range, e.g., fluorescers. Both enzymatic and nonenzymatic catalysts may be employed. In choosing an enzyme, there will be many considerations including the stability of the enzyme, whether it is normally present in samples of the type for which the assay is designed, the nature of the substrate, and the effect if any of conjugation on the enzyme's properties. Potentially useful enzyme labels include oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases, ligases, or synthetases. Interrelated enzyme systems may also be used. A chemiluminescent label involves a compound that becomes electronically excited by a chemical reaction and may then emit light that serves as a detectable signal or donates energy to a fluorescent acceptor. Radioactive labels include various radioisotopes found in common use such as the unstable forms of hydrogen, iodine, phosphorus or the like. Colloidal-sized colored particles involve material such as colloidal gold that, in aggregate, form a visually detectable distinctive spot corresponding to the site of a substance to be detected. Additional information on labeling technology is disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 4,366,241.

A common method of *in vitro* labeling of nucleotide probes involves nick translation wherein the unlabeled DNA probe is nicked with an endonuclease to produce free 3'-hydroxyl termini within either strand of the double-stranded fragment. Simultaneously, an exonuclease removes the nucleotide residue from the 5'-phosphoryl side of the nick. The sequence of replacement nucleotides is determined by the sequence of the opposite strand of the duplex. Thus, if labeled nucleotides are supplied, DNA polymerase will fill in the nick with the labeled nucleotides. Using this well-known technique, up to 50% of the molecule can be labeled. For smaller probes, known methods involving 3' end labeling may be used. Furthermore, there are currently commercially available methods of labeling DNA with fluorescent molecules, catalysts, enzymes, or chemiluminescent materials. Biotin labeling kits are commercially available (Enzo Biochem Inc.) under the trademark Bio-Probe. This type of system permits the probe to be coupled to avidin which in turn is labeled with, for example, a fluorescent molecule, enzyme, antibody, etc. For further disclosure regarding probe construction and technology, see, for example, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y., 1982).

The oligonucleotide selected for hybridizing to the target nucleic acid, whether synthesized chemically or by recombinant DNA methodologies, is isolated and purified using standard techniques and then preferably labeled (e.g., with ^{35}S or ^{32}P) using standard labeling protocols.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 21 -

A sample containing the target nucleic acid then is run on an electrophoresis gel, the dispersed nucleic acids transferred to a nitrocellulose filter and the labeled oligonucleotide exposed to the filter under stringent hybridizing conditions, *e.g.*, 50% formamide, 5 X SSPE, 2 X Denhardt's solution, 0.1% SDS at 42°C, as described in Sambrook *et al.* (1989) *supra*. The filter may then
 5 be washed using 2 X SSPE, 0.1% SDS at 68°C, and more preferably using 0.1 X SSPE, 0.1% SDS at 68°C. Other useful procedures known in the art include solution hybridization, and dot and slot RNA hybridization. Optionally, the amount of the target nucleic acid present in a sample is then quantitated by measuring the radioactivity of hybridized fragments, using standard procedures known in the art.

10 In addition, oligonucleotides also may be used to identify other sequences encoding members of the target protein families. The methodology also may be used to identify genetic sequences associated with the nucleic acid sequences encoding the proteins described herein, *e.g.*, to identify non-coding sequences lying upstream or downstream of the protein coding sequence, and which may play a functional role in expression of these genes. Additionally,
 15 binding assays may be conducted to identify and detect proteins capable of a specific binding interaction with a nucleic acid encoding a breast cancer-associated protein, which may be involved, *e.g.*, in gene regulation or gene expression of the protein. In a further embodiment, the assays described herein may be used to identify and detect nucleic acid molecules comprising a sequence capable of recognizing and being specifically bound by a breast cancer-associated
 20 protein.

In addition, it is anticipated that using a combination of appropriate oligonucleotide primers, *i.e.*, more than one primer, the skilled artisan may determine the level of expression of a target gene *in vivo* by standard polymerase chain reaction (PCR) procedures, for example, by quantitative PCR. Conventional PCR based assays are discussed, for example, in Innes *et al.*
 25 (1990) "PCR Protocols: A guide to methods and Applications". Academic Press and Innes *et al.* (1995) "PCR Strategies" Academic Press, San Diego, CA.

3. Identification of Proteins Which Interact In Vivo With Breast Cancer-associated Proteins

In addition, it is contemplated that the skilled artisan, using procedures like those described hereinbelow, may identify other molecules which interact *in vivo* with the breast
 30 cancer-associated proteins described herein. Such molecules also may provide possible targets for chemotherapy.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 22 -

By way of example, cDNA encoding proteins or peptides capable of interacting with breast cancer-associated proteins can be determined using a two-hybrid assay, as reported in Durfee *et al.* (1993) *Genes & Develop.* 7: 555-559. The principle of the two hybrid system is that noncovalent interaction of two proteins triggers a process (transcription) in which these proteins normally play no direct role, because of their covalent linkage to domains that function in this process. For example, in the two-hybrid assay, detectable expression of a reporter gene occurs when two fusion proteins, one comprising a DNA-binding domain and one comprising a transcription initiation domain, interact.

The skilled artisan can use a host cell that contains one or more reporter genes, such as yeast strain Y153, reported in Durfee *et al.* (1993) *supra*. This strain carries two chromosomally located reporter genes whose expression is regulated by Gal4. A first reporter gene, is the *E. coli lacZ* gene under the control of the *Gal4* promoter. A second reporter gene is the selectable *HIS3* gene. Other useful reporter genes may include, for example, the luciferase gene, the *LEU2* gene, and the *GFP* (Green Fluorescent Protein) gene.

Two sets of plasmids are used in the two hybrid system. One set of plasmids contains DNA encoding a *Gal4* DNA-binding domain fused in frame to DNA encoding a breast cancer-associated protein. The other set of plasmids contain DNA encoding a *Gal4* activation domain fused to portions of a human cDNA library constructed from human lymphocytes. Expression from the first set of plasmids results in a fusion protein comprising a *Gal4* DNA-binding domain and a breast cancer-associated protein. Expression from the second set of plasmids produces a transcription activation protein fused to an expression product from the lymphocyte cDNA library. When the two plasmids are transformed into a *Gal4*-deficient host cell, such as the yeast Y153 cells described above, interaction of the *Gal4* DNA binding domain and transcription activation domain occurs only if the breast cancer-associated protein fused to the DNA binding domain binds to a protein expressed from the lymphocyte cDNA library fused to the transcription activating domain. As a result of the protein-protein interaction between the breast cancer-associated protein and its *in vivo* binding partner detectable levels of reporter gene expression occur.

In addition to identifying molecules which interact *in vivo* with the breast cancer-associated proteins, the skilled artisan may also screen for molecules, for example, small

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 23 -

molecules which alter or inhibit specific interaction between a breast cancer-associated protein and its *in vivo* binding partner.

For example, a host cell can be transfected with DNA encoding a suitable DNA binding domain/breast cancer-associated protein hybrid and a translation activation domain/putative breast cancer-associated protein binding partner, as disclosed above. The host cell also contains a suitable reporter gene in operative association with a *cis*-acting transcription activation element that is recognized by the transcription factor DNA binding domain. The level of reporter gene expressed in the system is assayed. Then, the host cell is exposed to a candidate molecule and the level of reporter gene expression is detected. A reduction in reporter gene expression is indicative of the candidate's ability to interfere with complex formation or stability with respect to the breast cancer-associated protein and its *in vivo* binding partner. As a control, the candidate molecule's ability to interfere with other, unrelated protein-protein complexes is also tested. Molecules capable of specifically interfering with a breast cancer-associated protein/binding partner interaction, but not other protein-protein interactions, are identified as candidates for production and further analysis. Once a potential candidate has been identified, its efficacy in modulating cell cycling and cell replication can be assayed in a standard cell cycle model system.

Candidate molecules can be produced as described hereinbelow. For example, DNA encoding the candidate molecules can be inserted, using conventional techniques well described in the art (see, for example, Sambrook (1989) *supra*) into any of a variety of expression vectors and transfected into an appropriate host cell to produce recombinant proteins, including both full length and truncated forms. Useful host cells include *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, the insect/baculovirus cell system, myeloma cells, and various other mammalian cells. The full length forms of such proteins are preferably expressed in mammalian cells, as disclosed herein. The nucleotide sequences also preferably include a sequence for targeting the translated sequence to the nucleus, using, for example, a sequence encoding the eight amino acid nucleus targeting sequence of the large T antigen, which is well characterized in the art. The vector can additionally include various sequences to promote correct expression of the recombinant protein, including transcription promoter and termination sequences, enhancer sequences, preferred ribosome binding site sequences, preferred mRNA leader sequences, preferred protein processing sequences, preferred signal sequences for protein secretion, and the like. The DNA sequence encoding the gene of interest can also be manipulated to remove potentially inhibiting sequences

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 24 -

or to minimize unwanted secondary structure formation. As will be appreciated by the practitioner in the art, the recombinant protein can also be expressed as a fusion protein.

After translation, the protein can be purified from the cells themselves or recovered from the culture medium. The DNA can also include sequences which aid in expression and/or purification of the recombinant protein. The DNA can be expressed directly or can be expressed as part of a fusion protein having a readily cleavable fusion junction.

The DNA may also be expressed in a suitable mammalian host. Useful hosts include fibroblast 3T3 cells, (e.g., NIH 3T3, from CRL 1658) COS (simian kidney ATCC, CRL-1650) or CHO (Chinese hamster ovary) cells (e.g., CHO-DXB11, from Chasin (1980) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 77:4216-4222), mink-lung epithelial cells (MVLu), human foreskin fibroblast cells, human glioblastoma cells, and teratocarcinoma cells. Other useful eukaryotic cell systems include yeast cells, the insect/baculovirus system or myeloma cells.

In order to express a candidate molecule, the DNA is subcloned into an insertion site of a suitable, commercially available vector along with suitable promoter/enhancer sequences and 3' termination sequences. Useful promoter/enhancer sequence combinations include the CMV promoter (human cytomegalovirus (MLE) promoter) present, for example, on pCDM8, as well as the mammary tumor virus promoter (MTV) boosted by the Rous sarcoma virus LTR enhancer sequence (e.g., from Clontech, Inc., Palo Alto). A useful inducible promoter includes, for example, a Zn²⁺-inducible promoter, such as the Zn²⁺ metallothionein promoter (Wrana *et al.* (1992) *Cell* 71: 1003-1014). Other inducible promoters are well known in the art and can be used with similar success. Expression also can be further enhanced using *trans*-activating enhancer sequences. The plasmid also preferably contains an amplifiable marker, such as DHFR under suitable promoter control, e.g., SV40 early promoter (ATCC #37148). Transfection, cell culturing, gene amplification and protein expression conditions are standard conditions, well known in the art, such as are described, for example in Ausubel *et al.*, ed., (1989) "*Current Protocols in Molecular Biology*", John Wiley & Sons, NY. Briefly, transfected cells are cultured in medium containing 5-10% dialyzed fetal calf serum (dFCS), and stably transfected high expression cell lines obtained by amplification and subcloning and evaluated by standard Western and Northern blot analysis. Southern blots also can be used to assess the state of integrated sequences and the extent of their copy number amplification.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 25 -

The expressed candidate protein is then purified using standard procedures. A currently preferred methodology uses an affinity column, such as a ligand affinity column or an antibody affinity column. The column then is washed, and the candidate molecules selectively eluted in a gradient of increasing ionic strength, changes in pH, or addition of mild detergent. It is appreciated that in addition to the candidate molecules which bind to the breast cancer-associated proteins, the breast cancer associated proteins themselves may likewise be produced using such recombinant DNA technologies.

4. Breast Cancer Therapy and Methods for Monitoring Therapy

The skilled artisan, after identification of breast cancer-associated proteins and proteins which interact with the breast cancer-associated proteins, can develop a variety of therapies for treating breast cancer. Because the marker proteins described herein are present at detectably higher levels in breast cancer cells relative to normal breast cells, the skilled artisan may employ, for example, the marker proteins and/or nucleic acids encoding the marker proteins as target molecules for a cancer chemotherapy.

4.A. Anti-sense-based Therapeutics

A particularly useful cancer therapeutic envisioned is an oligonucleotide or peptide nucleic acid sequence complementary and capable of hybridizing under physiological conditions to part, or all, of the gene encoding the marker protein or to part, or all, of the transcript encoding the marker protein thereby to reduce or inhibit transcription and/or translation of the marker protein gene. Alternatively, the same technologies may be applied to reduce or inhibit transcription and/or translation of the proteins which interact with the breast cancer-associated proteins.

Anti-sense oligonucleotides have been used extensively to inhibit gene expression in normal and abnormal cells. See, for example, Stein *et al.* (1988) *Cancer Res.* 48: 2659-2668, for a pertinent review of anti-sense theory and established protocols. In addition, the synthesis and use of peptide nucleic acids as anti-sense-based therapeutics are described in PCT publications PCT/EP92/01219 published November 26, 1992, PCT/US92/10921 published June 24, 1993, and PCT/US94/013523 published June 1, 1995. Accordingly, the anti-sense-based therapeutics may be used as part of chemotherapy, either alone or in combination with other therapies.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 26 -

Anti-sense oligonucleotide and peptide nucleic acid sequences are capable of hybridizing to a gene and/or mRNA transcript and, therefore, may be used to inhibit transcription and/or translation of the protein described herein. It is appreciated, however, that oligoribonucleotide sequences generally are more susceptible to enzymatic attack by ribonucleases than are deoxyribonucleotide sequences. Hence, oligodeoxyribonucleotides are preferred over oligoribonucleotides for *in vivo* therapeutic use. It is appreciated that the peptide nucleic acid sequences, unlike regular nucleic acid sequences, are not susceptible to nuclease degradation and, therefore, are likely to have greater longevity *in vivo*. Furthermore, it is appreciated that peptide nucleic acid sequences bind complementary single stranded DNA and RNA strands more strongly than corresponding DNA sequences (see, for example, PCT/EP92/20702 published November 26, 1992). Accordingly, peptide nucleic acid sequences are preferred for *in vivo* therapeutic use.

Therapeutically useful anti-sense oligonucleotides or peptide nucleic acid sequences may be synthesized by any of the known chemical oligonucleotide and peptide nucleic acid synthesis methodologies well known and thoroughly described in the art. Alternatively, a sequence complementary to part or all of the natural mRNA sequence may be generated using standard recombinant DNA technologies.

Because the complete nucleotide sequence encoding the entire marker protein as well as additional 5' and 3' untranslated sequences are known for each of the marker proteins and/or can be determined readily using techniques well known in the art, anti-sense oligonucleotides or peptide nucleic acids which hybridize with any portion of the mRNA transcript or non-coding sequences may be prepared using conventional oligonucleotide and peptide nucleic acid synthesis methodologies.

Oligonucleotides complementary to, and hybridizable with, any portion of the mRNA transcripts encoding the marker proteins are, in principle, effective for inhibiting translation of the target proteins as described herein. For example, as described in U.S. Pat. No. 5,098,890, issued March 24, 1992, oligonucleotides complementary to mRNA at or near the translation initiation codon site may be used to inhibit translation. Moreover, it has been suggested that sequences that are too distant in the 3' direction from the translation initiation site may be less effective in hybridizing the mRNA transcripts because of potential ribosomal "read-through", a

WO 01/36470

PCT/U500/31483

- 27 -

phenomenon whereby the ribosome is postulated to unravel the anti-sense/sense duplex to permit translation of the message.

A variety of sequence lengths of oligonucleotide or peptide nucleic acid may be used to hybridize to mRNA transcripts. However, very short sequences (e.g., sequences containing less than 8-15 nucleobases) may bind with less specificity. Moreover, for *in vivo* use, short oligonucleotide sequences may be particularly susceptible to enzymatic degradation. Peptide nucleic acids, as mentioned above, likely are resistant to nuclease degradation. Where oligonucleotide and peptide nucleic acid sequences are to be provided directly to the cells, very long sequences may be less effective at inhibition because of decreased uptake by the target cell. Accordingly, where the oligonucleotide or peptide nucleic acid is to be provided directly to target cells, oligonucleotide and/or peptide nucleic acid sequences containing about 8-50 nucleobases, and more preferably 15-30 nucleobases, are envisioned to be most advantageous.

An alternative means for providing anti-sense oligonucleotide sequences to a target cell is gene therapy where, for example, a DNA sequence, preferably as part of a vector and associated with a promoter, is expressed constitutively inside the target cell. Oeller *et al.* (Oeller *et al.* (1992) *Science* 254: 437-539) describe the *in vivo* inhibition of the ACC synthase enzyme using a constitutively expressible DNA sequence encoding an anti-sense sequence to the full length ACC synthase transcript. Accordingly, where the anti-sense oligonucleotide sequences are provided to a target cell indirectly, for example, as part of an expressible gene sequence to be expressed within the cell, longer oligonucleotide sequences, including sequences complementary to substantially all the protein coding sequence, may be used to advantage.

Finally, therapeutically useful oligonucleotide sequences envisioned also include not only native oligomers composed of naturally occurring nucleotides, but also those comprising modified nucleotides, for example, to improve stability and lipid solubility and thereby enhance cellular uptake. For example, it is known that enhanced lipid solubility and/or resistance to nuclease digestion results by substituting a methyl group or sulfur atom for a phosphate oxygen in the internucleotide phosphodiester linkage. Phosphorothioates ("S-oligonucleotides" wherein a phosphate oxygen is replaced by a sulfur atom), in particular, are stable to nuclease cleavage, are soluble in lipids, and are preferred, particularly for direct oligonucleotide administration. S-oligonucleotides may be synthesized chemically using conventional synthesis methodologies well known and thoroughly described in the art.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 28 -

Preferred synthetic internucleoside linkages include phosphorothioates, alkylphosphonates, phosphorodithioates, phosphate esters, alkylphosphonothioates, phosphoramidates, carbamates, carbonates, phosphate triesters, acetamidate, and carboxymethyl esters. Furthermore, one or more of the 5'-3' phosphate group may be covalently joined to a low molecular weight (e.g., 15-500 Da) organic group, including, for example, lower alkyl chains or aliphatic groups (e.g., methyl, ethyl, propyl, butyl), substituted alkyl and aliphatic groups (e.g., aminoethyl, aminopropyl, aminohydroxyethyl, aminohydroxypropyl), small saccharides or glycosyl groups. Other low molecular weight organic modifications include additions to the internucleoside phosphate linkages such as cholesteryl or diamine compounds with varying numbers of carbon residues between the amino groups and terminal ribose. Oligonucleotides with these linkages or with other modifications can be prepared using methods well known in the art (see, for example, U.S. Pat. No. 5,149,798).

Suitable oligonucleotide and/or peptide nucleic acid sequences which inhibit transcription and/or translation of the marker proteins can be identified using standard *in vivo* assays well characterized in the art. Preferably, a range of doses is used to determine effective concentrations for inhibition as well as specificity of hybridization. For example, in the cases of an oligonucleotide, a dose range of 0-100 µg oligonucleotide/ml may be assayed. Further, the oligonucleotides may be provided to the cells in a single transfection, or as part of a series of transfections. Anti-sense efficacy may be determined by assaying a change in cell proliferation over time following transfection, using standard cell counting methodology and/or by assaying for reduced expression of marker protein, e.g., by immunofluorescence. Alternatively, the ability of cells to take up and use thymidine is another standard means of assaying for cell division and may be used here, e.g., using ³H-thymidine. Effective anti-sense inhibition should inhibit cell division sufficiently to reduce thymidine uptake, inhibit cell proliferation, and/or reduce detectable levels of marker proteins.

It is anticipated that therapeutically effective oligonucleotide or peptide nucleic acid concentrations may vary according to the nature and extent of the neoplasm, the particular nucleobase sequence used, the relative sensitivity of the neoplasm to the oligonucleotide or peptide nucleic acid sequence, and other factors. Useful ranges for a given cell type and oligonucleotide and/or peptide nucleic acid may be determined by performing standard dose range experiments. Dose range experiments also may be performed to assess toxicity levels for

WO 01/36470

PCT/US90/31483

- 29 -

normal and malignant cells. It is contemplated that useful concentrations may range from about 1 to 100 µg/ml per 10⁵ cells.

For *in vivo* use, the anti-sense oligonucleotide or peptide nucleic acid sequences may be combined with a pharmaceutically acceptable carrier, such as a suitable liquid vehicle or excipient, and optionally an auxiliary additive or additives. Liquid vehicles and excipients are conventional and are available commercially. Illustrative thereof are distilled water, physiological saline, aqueous solutions of dextrose, and the like. For *in vivo* cancer therapies, the anti-sense sequences preferably can be provided directly to malignant cells, for example, by injection directly into the tumor. Alternatively, the oligonucleotide or peptide nucleic acid may be administered systemically, provided that the anti-sense sequence is associated with means for directing the sequences to the target malignant cells.

In addition to administration with conventional carriers, the anti-sense oligonucleotide or peptide nucleic acid sequences may be administered by a variety of specialized oligonucleotide delivery techniques. For example, oligonucleotides may be encapsulated in liposomes, as described in Mannino *et al.* (1988) *BioTechnology* 6: 682, and Felgner *et al.* (1989) *Bethesda Res. Lab. Focus* 11:21. Lipids useful in producing liposomal formulations include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art (see, for example, in U.S. Pat. No. 4,235,871; U.S. Pat. No. 4,501,728; U.S. Pat. No. 4,837,028; and U.S. Pat. No. 4,737,323). The pharmaceutical composition of the invention may further include compounds such as cyclodextrins and the like which enhance delivery of oligonucleotides into cells. When the composition is not administered systemically but, rather, is injected at the site of the target cells, cationic detergents (e.g. Lipofectin) may be added to enhance uptake. In addition, reconstituted virus envelopes have been successfully used to deliver RNA and DNA to cells (see, for example, Arad *et al.* (1986) *Biochem. Biophys. Acta* 859: 88-94).

For therapeutic use *in vivo*, the anti-sense oligonucleotide and/or peptide nucleic acid sequences are administered to the individual in a therapeutically effective amount, for example, an amount sufficient to reduce or inhibit target protein expression in malignant cells. The actual dosage administered may take into account whether the nature of the treatment is prophylactic or therapeutic in nature, the age, weight, health of the patient, the route of administration, the size and nature of the malignancy, as well as other factors. The daily dosage may range from about

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 30 -

0.01 to 1,000 mg per day. Greater or lesser amounts of oligonucleotide or peptide nucleic acid sequences may be administered, as required. As will be appreciated by those skilled in the medical art, particularly the chemotherapeutic art, appropriate dose ranges for *in vivo* administration would be routine experimentation for a clinician. As a preliminary guideline, effective concentrations for *in vitro* inhibition of the target molecule may be determined first.

4.B. Binding Protein-based Therapeutics.

As mentioned above, a cancer marker protein or a protein that interacts with the cancer marker protein may be used as a target for chemotherapy. For example, a binding protein designed to bind the marker protein essentially irreversibly can be provided to the malignant cells, for example, by association with a ligand specific for the cell and known to be absorbed by the cell. Means for targeting molecules to particular cells and cell types are well described in the chemotherapeutic art.

Binding proteins may be obtained and tested using technologies well known in the art. For example, the binding portions of antibodies may be used to advantage. It is contemplated, however, that intact antibodies or BABS that have preferably been humanized may be used in the practice of the invention. As used herein, the term "humanized" is understood to mean a process whereby the framework region sequences of a non-human immunoglobulin variable region are replaced by corresponding human framework sequences. Accordingly, it is contemplated that such humanized binding proteins will elicit a weaker immune response than their unhumanized counterparts. Particularly useful are binding proteins identified with high affinity for the target protein, e.g., greater than about 10^9 M^{-1} . Alternatively, DNA encoding the binding protein may be provided to the target cell as part of an expressible gene to be expressed within the cell following the procedures used for gene therapy protocols well described in the art. See, for example, U.S. Patent No. 4,497,796, and "Gene Transfer", Vijay R. Baichwal, ed., (1986). It is anticipated that, once bound by binding protein, the target protein will be inactivated or its biological activity reduced thereby inhibiting or retarding cell division.

As described above, suitable binding proteins for *in vivo* use may be combined with a suitable pharmaceutically-acceptable carrier, such as physiological saline or other useful carriers well characterized in the medical art. The pharmaceutical compositions may be provided directly to malignant cells, for example, by direct injection, or may be provided systemically, provided the binding protein is associated with means for targeting the protein to target cells. Finally,

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 31 -

suitable dose ranges and cell toxicity levels may be assessed using standard dose range experiments. Therapeutically-effective concentrations may range from about 0.01 to about 1,000 mg per day. As described above, actual dosages administered may vary depending, for example, on the nature of the malignancy, the age, weight and health of the individual, as well as other factors.

4.C. Small Molecule-based Therapeutics.

After having isolated breast cancer-associated proteins, the skilled artisan can, using methodologies well known in the art, screen small molecule libraries (either peptide or non-peptide based libraries) to identify candidate molecules that reduce or inhibit the biological function of the breast cancer-associated proteins. The small molecules preferably accomplish this function by reducing the *in vivo* expression of the target molecule, or by interacting with the target molecule thereby to inhibit either the biological activity of the target molecule or an interaction between the target molecule and its *in vivo* binding partner.

It is contemplated that, once the candidate small molecules have been elucidated, the skilled artisan may enhance the efficacy of the small molecule using rational drug design methodologies well known in the art. Alternatively, the skilled artisan may use a variety of computer programs which assist the skilled artisan to develop quantitative structure activity relationships (QSAR) which further to assist the design of additional candidate molecules *de novo*. Once identified, the small molecules may be produced in commercial quantities and subjected to the appropriate safety and efficacy studies.

It is contemplated that the screening assays may be automated thereby facilitating the screening of a large number of small molecules at the same time. Such automation procedures are within the level of skill in the art of drug screening and, therefore, are not discussed herein.

Candidate peptide-based small molecules may be produced by expression of an appropriate nucleic acid sequence in a host cell or using synthetic organic chemistries. Similarly, non-peptidyl-based small molecules may be produced using conventional synthetic organic chemistries well known in the art.

As described above, for *in vivo* use, the identified small molecules may be combined with a suitable pharmaceutically acceptable carrier, such as physiological saline or other useful carriers well characterized in the medical art. The pharmaceutical compositions may be provided

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 32 -

directly to malignant cells, for example, by direct injection, or may be provided systemically, provided the binding protein is associated with means for targeting the protein to target cells. Finally, suitable dose ranges and cell toxicity levels may be assessed using standard dose range experiments. As described above, actual dosages administered may vary depending, for example, on the nature of the malignancy, the age, weight and health of the individual, as well as other factors.

4.D. Methods for Monitoring the Status of Breast Cancer in an Individual

The progression of the breast cancer or the therapeutic efficacy of chemotherapy may be measured using procedures well known in the art. For example, the efficacy of a particular chemotherapeutic agent can be determined by measuring the amount of a breast cancer-associated protein released from breast cancer cells undergoing cell death. As reported in U.S. Patent Nos. 5,840,503 and 5,965,376, soluble nuclear matrix proteins and fragments thereof are released by cells upon cell death. Such soluble nuclear matrix proteins can be quantitated in a body fluid and used to monitor the degree or rate of cell death in a tissue. Similarly, the levels of one or more breast cancer-associated proteins could be used as an indication of the status of breast cancer in the individual.

For example, the concentration of a breast cancer-associated protein or a fragment thereof released from cells is compared to standards from healthy, untreated tissue. Fluid samples are collected at discrete intervals during treatment and compared to the standard. It is contemplated that changes in the level of the breast cancer-associated protein, for example, will be indicative of the efficacy of treatment (that is, the rate of cancer cell death). It is contemplated that the release of soluble, breast cancer-associated proteins can be measured in blood, plasma, urine, sputum, vaginal secretion, and breast exudate and other body fluids.

Where the assay is used to monitor tissue viability or progression of breast cancer, the step of detecting the presence and abundance of the marker protein or its transcript in samples of interest is repeated at intervals and these values then are compared, the changes in the detected concentrations reflecting changes in the status of the tissue. For example, an increase in the level of one or more breast cancer-associated proteins may correlate with progression of the breast cancer. Where the assay is used to evaluate the efficacy of a therapy, the monitoring steps occur following administration of the therapeutic agent or procedure (e.g., following administration of

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 33 -

a chemotherapeutic agent or following radiation treatment). Similarly, a decrease in the level of breast cancer-associated proteins may correlate with a regression of the breast cancer.

Thus, breast cancer may be identified by the presence of breast cancer-associated proteins as taught herein. Once identified, the breast cancer may be treated using compounds that reduce *in vivo* the expression and/or biological activity of the breast cancer-associated proteins. Furthermore, the methods provided herein can be used to monitor the progression and/or treatment of the disease. The following non-limiting examples provide details of the isolation and characterization of breast cancer-associated proteins and methods for their use in the detection of breast cancer.

10 **Example 1 – Identification of Breast Cancer Markers**

To identify markers for breast cancer, the sera of individuals with breast cancer were compared to the sera of normal individuals by surface-enhanced laser desorption and ionization (SELDI) mass spectrometry. Briefly, 0.5 mL aliquots of sera harvested from the individuals were thawed. Then, 1 μ L of a 1 mg/mL solution of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and 1 μ L of
15 a 1 mg/mL solution of leupeptin were added to each aliquot. To remove lipids, 350 μ L of 1,1,2-trifluoroethanol was added to each sample. The samples then were vortexed for five minutes and centrifuged in a microcentrifuge for five minutes at 4°C. The resulting supernatants were applied to a 1 mL column of agarose coupled to protein G (Hitrap Protein G column, Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) to remove immunoglobulin proteins. The column then was
20 rinsed with 3 mL of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, with SBTI and leupeptin ("binding buffer"), and the resulting flowthrough applied directly to a 5 mL column of 6% Sepharose coupled to Cibacron blue (Hitrap blue column, Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) to remove albumin proteins. The Hitrap blue column was rinsed with 20 mL of binding buffer. The resulting flowthrough was concentrated using four centrifugation-based concentrators with a
25 10kD cutoff (Centricon 10, Millipore Corporation, Bedford, MA) to a final volume of about 0.7 mL.

The resulting serum (substantially free of immunoglobulin and albumin) was subdivided into twelve fractions containing approximately equal amounts of protein by ion exchange chromatography. Specifically, the serum was applied to a Mono Q (Pharmacia and Upjohn,
30 Peapack, NJ) ion exchange column (a strong anion exchanger with quaternary ammonium groups) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 and proteins were eluted from the column by

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 34 -

increasing the concentration of sodium chloride in a stepwise manner. Thus, the serum was divided into twelve fractions based on the concentration of sodium chloride used for elution. These fractions accordingly were designated flow through, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM, and 2M sodium chloride. After
5 elution, each fraction was concentrated to approximately 100 µg/mL and buffer exchanged into binding buffer.

Then 4-10 µL from each of the twelve fractions were applied and allowed to bind to each of four SELDI chip surfaces, each surface holding up to eight samples. The intended location of each sample on the chip was demarcated with a circle drawn using a hydrophobic marker like
10 those used in Pap smears. The SELDI chips used herein were purchased from Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, California, and used as described below.

For copper or nickel surfaces, a chip containing ethylenediaminetriacetic acid moieties (IMAC, Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA) was pretreated with two five-minute applications of five µL of a copper salt or nickel salt solution, and washed with deionized water.
15 After a five-minute treatment with five µL of binding buffer, two to three microliters of sample were applied to the surface for thirty to sixty minutes. Another two to three microliters of sample were then applied for an additional thirty to sixty minutes. The chips then were washed twice with binding buffer to remove unbound proteins. 0.5 µL of sinapinic acid (12.5 mg/mL) was added twice and allowed to dry each time. The presence of sinapinic acid enhances the
20 vaporization and ionization of the bound proteins upon mass spectrometry.

For chip surfaces containing carboxyl moieties (WCX-2, Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA), before use of the hydrophobic pen, the surface was washed with 10 mM HCl for thirty minutes and rinsed five times with deionized water. After use of the pen, the surface was washed five times with five µL of binding buffer and once with deionized water. Two to three
25 µL of sample were applied in two applications of thirty to sixty minutes each. The surface was washed twice with 5 µL of binding buffer, and 0.5 µL of sinapinic acid were applied twice.

For chip surfaces containing quaternary ammonium moieties (SAX-2, Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA), after use of the pen, the surface was washed five times with five µL of binding buffer and once with deionized water. Application of sample, washing, and
30 application of sinapinic acid were done as described above.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 35 -

The chips then were subjected to mass spectrometry utilizing a Ciphergen SELDI PBS One (Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA) running the software program "SELDI v. 2.0". For all chips, "high mass" was set to 200,000 Daltons, "starting detector sensitivity" was set to 9 (from a range of 1-10, with 10 being the highest sensitivity), NDF (neutral density filter) was set to "OUT", data acquisition method was set to "Seldi Quantitation", SELDI acquisition parameters were set to 20, with increments of 5, and warming with two shots at intensity 50 (out of 100) was included. For IMAC chips, mass was optimized from 3000 Daltons to 3001 Daltons, starting laser intensity was set to 80 (out of 100), and transients set to 5 (i.e., 5 laser shots per site). Peaks were identified automatically by the computer. For WCX-2 chips, mass was optimized from 3,000 Daltons to 50,000 Daltons, starting laser intensity was set to 80, and transients set to 8. Peaks were identified automatically by the computer. For SAX-2 chips, mass was optimized from 3,000 Daltons to 50,000 Daltons, starting laser intensity was set to 85, and transients set to 8. Peaks were identified automatically by the computer.

Ten serum samples (five from normal individuals and five from individuals with breast cancer) were analyzed by mass spectrometry to identify the proteins present in the sixty fractions described above. The resulting peaks in the mass spectrometry trace were compared to identify those peaks present in the serum samples from individuals with breast cancer but not present in the normal samples. If peaks in different samples had a mass difference of no more than one percent, the peaks were presumed to be the same. Eleven mass spectrometry peaks ranging in size from just over 11,000 Da to approximately 103,000 Da were identified as present in all five serum samples from individuals with breast cancer and in none of the samples from normal individuals. The presence or absence of these peaks was then determined for an additional thirty serum samples (fifteen from normal individuals and fifteen from individuals with breast cancer). Seven other peaks that were present in four of the original five breast cancer serum samples, but not in any of the normal samples, were also analyzed because they were present in the same fraction and on the same SELDI surface as one or more of the eleven peaks already under evaluation. Of the eighteen peaks studied, fifteen were present in fifteen or more of the twenty breast cancer serum samples, but absent from 15 or more of the normal serum samples.

The results of the foregoing analyses are summarized in Table 1. The masses listed in the table are presumed accurate to within one percent.

WD 01/36470

PCT/US00/31483

- 36 -
TABLE 1.

Mass (Da)	Mono Q fraction (mM sodium chloride)	SELDI chip surface used	Number of positive samples from individuals with breast cancer	Number of positive samples from individuals without breast cancer
16210	0 (flow-through)	Nickel	17	1
17188	25 mM	WCX-2	17	2
30183	25 mM	WCX-2	15	3
34664	25 mM	WCX-2	16	4
20050	50 mM	Nickel	19	0
28258	50 mM	Nickel	20	0
24170	50 mM	Nickel	17	0
35393	50 mM	Nickel	17	3
34908	50 mM	WCX-2	16	2
70908	100 mM	WCX-2	20	0
17840	100 mM	WCX-2	18	2
11709	150 mM	SAX-2	20	0
42354	200 mM	Nickel	17	0
56280	200 mM	Nickel	16	0
34517	400 mM	Copper	18	1

Example 2 - Sequencing of Breast Cancer Marker Proteins

Breast cancer-associated proteins based upon the biochemical and mass spectrometry data provided above may be better characterized using well-known techniques. For example, samples of the serum can be fractionated using, for example, column chromatography and/or electrophoresis, to produce purified protein samples corresponding to each of the proteins

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 37 -

identified in Table 1. The sequences of the isolated proteins can then be determined using conventional peptide sequencing methodologies (see Examples 3 and 6). It is appreciated that the skilled artisan, in view of the foregoing disclosure, would be able to produce an antibody directed against any breast cancer-associated protein identified by the methods described herein.

- 5 Moreover, the skilled artisan, in view of the foregoing disclosure, would be able to produce nucleic acid sequences that encode the fragments described above, as well as nucleic acid sequences complementary thereto. In addition, the skilled artisan using conventional recombinant DNA methodologies, for example, by screening a cDNA library with such a nucleic acid sequence, would be able to isolate full length nucleic acid sequences encoding target breast
10 cancer-associated proteins. Such full length nucleic acid sequences, or fragments thereof, may be used to generate nucleic acid-based detection systems or therapeutics.

Example 3 - Production of Antibodies Which Bind Specifically to Breast Cancer-associated Proteins

- Once identified, a breast cancer-associated protein may be detected in a tissue or body
15 fluid sample using numerous binding assays that are well known to those of ordinary skill in the art. For example, as discussed above, a breast cancer-associated protein may be detected in either a tissue or body fluid sample using an antibody, for example, a monoclonal antibody, which binds specifically to an epitope disposed upon the breast cancer-associated protein. In such detection systems, the antibody preferably is labeled with a detectable moiety.

- 20 Provided below is an exemplary protocol for the production of an anti-breast cancer-associated monoclonal antibody. Other protocols also are envisioned. Accordingly, the particular method of producing antibodies to target proteins is not envisioned to be an aspect of the invention.

- Balb/c by J mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) are injected intraperitoneally
25 with the target protein every 2 weeks until the immunized mice obtain the appropriate serum titer. Thereafter, the mice are injected with 3 consecutive intravenous boosts. Freund's complete adjuvant (Gibco, Grand Island) is used in the first injection, incomplete Freund's in the second injection; and saline is used for subsequent intravenous injections. The animal then is sacrificed and its spleen removed. Spleen cells (or lymph node cells) then are fused with a mouse myeloma
30 line, e.g., using the method of Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256: 495. Hybridomas producing antibodies that react with the target proteins then are cloned and grown as ascites. Hybridomas

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 38 -

are screened by reactivity to the immunogen in any desirable assay. Detailed descriptions of screening protocols, ascites production and immunoassays also are disclosed in PCT/US92/09220, published May 13, 1993.

Example 4 - Antibody-based Assay for Detecting Breast Cancer in an Individual

5 The following assay has been developed for tissue samples; however, it is contemplated that similar assays for testing fluid samples may be developed without undue experimentation. A typical assay may employ a commercial immunodetection kit, for example, the ABC Elite Kit from Vector Laboratories, Inc.

10 A biopsy sample is removed from the patient under investigation in accordance with the appropriate medical guidelines. The sample then is applied to a glass microscope slide and the sample fixed in cold acetone for 10 minutes. Then, the slide is rinsed in distilled water and pretreated with a hydrogen peroxide containing solution (2 mL 30% H₂O₂ and 30 mL cold methanol). The slide then is rinsed in a Buffer A comprising Tris Buffered Saline (TBS) with 0.1% Tween and 0.1% Brij. A mouse anti-breast cancer-associated protein monoclonal antibody
15 in Buffer A is added to the slide and the slide then incubated for one hour at room temperature. The slide then is washed with Buffer A, and a secondary antibody (ABC Elite Kit, Vector Labs, Inc) in Buffer A is added to the slide. The slide then is incubated for 15 minutes at 37°C in a humidity chamber. The slides are washed again with Buffer A, and the ABC reagent (ABC Elite Kit, Vector Labs, Inc.) is then added to the slide for amplification of the signal. The slide is then
20 incubated for a further 15 minutes at 37°C in the humidity chamber.

The slide then is washed in distilled water, and a diaminobenzidine (DAB) substrate added to the slide for 4-5 minutes. The slide then is rinsed with distilled water, counterstained with hematoxylin, rinsed with 95% ethanol, rinsed with 100% ethanol, and then rinsed with xylene. A cover slip is then applied to the slide and the result observed by light microscopy.

25 **Example 5 - Purification and Characterization of 28.3 kD Breast Cancer Protein**

The 28.3 kD breast cancer protein identified in Example 1 was isolated and further characterized as follows.

Approximately 30 mL of serum (combined from multiple breast cancer patients) was depleted of immunoglobulin G and serum albumin using Protein G chromatography and
30 Cibacron Blue agarose chromatography, respectively, using standard methodologies such as

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 39 -

those described in Example 1. The albumin and immunoglobulin depleted serum then was fractionated by Mono Q ion-exchange affinity chromatography. Briefly, the serum proteins were applied to a 5 mL Mono Q column (Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) in 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, and the flow through fraction collected. Thereafter, the serum proteins were eluted stepwise from the column using 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing increasing concentrations of sodium chloride. In this manner, 12 serum fractions were obtained, each containing a different amount of sodium chloride. The fractions included flow through, and elution buffers of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 25mM, 50mM, 75mM, 100mM, 125mM, 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 400mM, and 2M sodium chloride.

The 50mM sodium chloride fraction containing the protein of interest was subsequently buffer exchanged back into 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 and concentrated by means of a Centricon 10 (Millipore) in accordance with the manufacturer's instructions. The resulting sample then was fractionated by size exclusion chromatography on a Sephacryl S-200 column (Pharmacia) using an isocratic buffer containing 100mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4. Fractions that eluted from the column were evaluated for the presence of the 28.3kD protein using the Ciphergen SELDI mass spectroscopy as described in Example 1. Fractions containing the 28.3 kD protein were pooled and applied to an IMAC column (Sigma) which had been pre-loaded with Ni^{2+} by prior incubation with 50mM NiCl_2 . The IMAC column then was washed with 6 bed volumes of a solution containing 100mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4, and the bound protein fraction eluted with the same solution containing 100mM imidazole. The eluted fraction then was concentrated by means of a Minicon 10 (Millipore) and then was fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12% Tris glycine SDS-PAGE gel. Samples of the protein fraction were applied to two separate lanes of the gel. After electrophoresis, the resulting gel then was stained with Coomassie Brilliant Blue dye and destained to reveal the presence of proteins. Three bands of about 28.3 kD (characterized as the heaviest molecular weight protein, the medium molecular weight protein, and the lightest molecular weight protein) were excised from one of the 2 lanes and were eluted from the acrylamide slices.

The proteins were eluted from the gel as follows. Briefly, the gel slices were washed five times with HPLC grade water with vigorous vortexing. The washed slices then were cut into small pieces in 120 μL of 100mM sodium acetate pH 8.5, 0.1% SDS and incubated overnight at 37°C. The supernatant was decanted into a fresh tube and dried in a speedvac. The resulting

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 40 -

pellet then was reconstituted in 37 μ L HPLC grade water. Approximately 1480 μ L of cold ethanol then was added and the resulting mixture incubated overnight at -20°C. The sample was centrifuged at 4°C for 15 minutes at 11,000 rpm. The supernatant was removed and the resulting pellet reconstituted in 5 μ L of water. The resulting protein solutions were run on the SELDI and the 28.3kD protein was identified in one of the three preparations (see Fig. 1A which corresponds to the heaviest 28 kD protein). The corresponding band then was excised from the second of the 2 lanes on the gel. After proteolysis with trypsin, the tryptic fragments were eluted from the gel and submitted for microsequence analysis via mass spectrometry.

Four individual masses were detected by mass spectrometry. When the four masses were used to search the Swiss Protein Database, all four masses were found to match amino acid sequences present in the protein referred to in the art as U2 small nuclear ribonucleoprotein B" (U2 snRNP B") (Habeis *et al.* (1987) *supra*, Swiss Protein Database Accession Number 4507123). The results are summarized in Table 2.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 41 -

TABLE 2.

Peptide	Sequence	SEQ ID NO	Protein
1	QLQGFPPYGGKPMR	1	U2 snRNP B"
2	HDIAFVEFENDGQAGAAR	2	U2 snRNP B"
3	LVPGRHDIAFVEFENDGQAGAAR	3	U2 snRNP B"
4	TVEQTATTTNK	4	U2 snRNP B"

The amino acid sequence, in an N- to C- terminal direction, of the U2 SnRNP B" protein in single amino acid code is :

5 MDIRPNHTIY INNMNDKIKK EELKRSLYAL FSQFGHVVDI VALKTMKMRG QAFVIFKELG
SSTNALRQLQ GPPFYGGKPMR IQYAKTDSDI ISKMRGTAD KKKKKKKKA KTVEQTATTT
10 NKKPGQGTPN SANTQGNSTP NPQVPDYPPN YILFLNNLPE ETNEMMLSM LFNQFPGFKEV
RLVPGRHDIA FVEFENDGQA GAARDALQGF KITPSHAMKI TYAKK (SEQ ID NO: 5)

15 Example 6 – Purification and Characterization of 71 kD Breast Cancer Protein

The 71 kD breast cancer protein identified in Example 1 was isolated and further characterized as follows.

50 mL of serum from each of four individuals was pooled to give a single aliquot of 200 mL. This 200 mL aliquot was subdivided into six aliquots of 33 mL each. Each aliquot was
20 treated with 19 mL of trifluorotrichloroethane as described in Example 1. Each aliquot was applied to Protein G and Cibacron Blue columns as described in Example 1. Fractions containing protein in the flowthrough (approximately 500 mL/aliquot) were pooled and concentrated to approximately 10 mL/aliquot (60 mL total) using Centricon concentrators.

3 mL aliquots were loaded onto 5 mL mono Q sepharose columns (60 mL/ 3mL = 20
25 aliquots). Fractionation was performed as described in Example 1, except that all volumes were multiplied by 5. The fractions eluted with 100 mM sodium chloride from each fractionation were pooled into a single 200 mL fraction and buffer exchanged into binding buffer as described in Example 1.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 42 -

The 200 mL fraction was applied to a series of antibody columns to remove abundant proteins of 50-70 kD. Each of these proteins, alpha-1 anti-trypsin, ceruloplasmin, kallikrein, and GC-globulin, had been identified and sequenced during preliminary attempts to isolate the 71 kD protein. Commercial antibodies to each of the proteins were purchased and coupled to a solid support (agarose) using conventional NHS ester chemistry (Pierce Aminolink Plus kit—part number 44894). The 200 mL fraction was applied to each column in turn until the protein in question could no longer be seen in the flowthrough by Western blot analysis.

The flowthrough was subjected to size exclusion chromatography using an S200 column. Fractions containing the 71 kD peak were identified by SELDI as described in Example 1.

Because these fractions also appeared to contain a fragment of human serum albumin (HSA) that would not bind to the Cibacron blue column, the fractions were applied to an HSA affinity column with two murine antibodies to HSA to deplete the remaining HSA from the sample. SDS-PAGE analysis of the sample revealed a single band in the 71 kD range by silver staining. The remaining sample was divided into two aliquots and run on two lanes of a 10% tris-glycine gel. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue dye. The 71 kD band from one of the two lanes was excised and eluted from the gel as described in Example 5. Its identity as the 70.972 kD marker protein was confirmed by SELDI. The 71 kD band from the other lane was excised and treated with trypsin. The resulting peptides were eluted from the gel and subjected to microsequence analysis by mass spectrometry. Sixteen of the predicted trypsin fragments of the 64-kD subunit of cleavage stimulation factor have masses corresponding to those identified in the mass spectrum of the 71 kD protein. The sixteen sequences are set forth in Table 2. Two reported sequences for cleavage stimulation factor are set forth in the Sequence Listing as SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:23.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 43 -

TABLE 3.

Peptide	Sequence	SEQ ID NO:	Protein
1	GQVPMQDPR	6	Cleavage Stimulation Factor
2	GSLPANVPTPR	7	Cleavage Stimulation Factor
3	GLLGDAFNDPR	8	Cleavage Stimulation Factor
4	AGLTVRDPVDR	9	Cleavage Stimulation Factor
5	ALRVDNAASEKNK	10	Cleavage Stimulation Factor
6	GGTLLSVTGEVEPR	11	Cleavage Stimulation Factor
7	DIFSEVGPVVSFR	12	Cleavage Stimulation Factor
8	GIDARGMEARAMEAR	13	Cleavage Stimulation Factor
9	GMEARAMEARGLDAR	14	Cleavage Stimulation Factor
10	AVASLPPEQMFELMK	15	Cleavage Stimulation Factor
11	AMEARAMEVRGMEAR	16	Cleavage Stimulation Factor
12	GYLGPPHQGPPMHVPGHESR	17	Cleavage Stimulation Factor
13	GPIPSGMQGPSINMGAVVPQGSR	18	Cleavage Stimulation Factor
14	NMLLQNPLAYALLQAQVVMR	19	Cleavage Stimulation Factor
15	GGPLPEPRPLMAEPRGPMLDQR	20	Cleavage Stimulation Factor
16	SLGTGAPVIESPYGETISPEDAPESISK	21	Cleavage Stimulation Factor

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 44 -

Equivalents

The invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential characteristics thereof. The foregoing embodiments are therefore to be considered in all respects illustrative rather than limiting on the invention described herein. Scope of the
5 invention is thus indicated by the appended claims rather than by the foregoing description, and all changes that come within the meaning and range of equivalency of the claims are intended to be embraced by reference therein.

Incorporation By Reference

10 The entire disclosure of each of the aforementioned patent and scientific documents cited hereinabove is expressly incorporated by reference herein.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 45 -

What is claimed is:

1. An isolated, breast cancer-associated polypeptide, said polypeptide comprising the characteristics of:
 - (i) detectable at a higher concentration in serum of a human with breast cancer than in serum of a human without breast cancer; and
 - (ii) has a molecular weight of about 16 kD, and fails to bind an anion ion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0.
 - (iii) has a molecular weight of about 17 kD, about 30 kD, or about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the anion ion exchange resin in the presence of 25 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0,
 - (iv) has a molecular weight of about 20 kD, about 24 kD, or about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from the ion exchange resin in the presence of 50 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0,
 - (v) has a molecular weight of about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7, and elutes from the ion exchange resin in the presence of 50 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0,
 - (vi) has a molecular weight of about 18 kD or about 71 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from an ion exchange resin in the presence of 100 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0,
 - (vii) has a molecular weight of about 12 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from an ion exchange resin in the presence of 150 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0,
 - (viii) has a molecular weight of about 42 kD or about 56 kD, binds to an anion exchange resin in the presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from an ion exchange resin in the presence of 200 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, or

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 46 -

- 31 (viii) has a molecular weight of about 35 kD, binds to an anion exchange resin in the
 32 presence of 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and elutes from an ion exchange
 33 resin in the presence of 400 mM sodium chloride in 50 mM sodium phosphate,
 34 pH 7.0.
- 1 2. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide of clause (i), (iii) or (vii) is further
 2 characterized as having an affinity to a nickel SELDI chip.
- 1 3. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide of clause (ii), (iv) or (v) is further
 3 characterized as having an affinity to a WCX-2 SELDI chip.
- 1 4. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide of clause (vi) is further characterized
 2 as having an affinity to a SAX-2 SELDI chip.
- 1 5. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide of clause (viii) is further
 2 characterized as having an affinity to a copper SELDI chip.
- 1 6. The polypeptide of claim 1, comprising the additional characteristic of being a
 2 non-immunoglobulin protein.
- 1 7. The polypeptide of claim 1, comprising the additional characteristic of being a non-
 2 albumin protein.
- 1 8. The polypeptide of claim 1, further comprising an epitope.
- 1 9. A method of diagnosing cancer in an individual comprising detecting in a sample isolated
 2 from the individual the presence of the polypeptide of claim 1, which if present is indicative of
 3 cancer in the individual.
- 1 10. The method of claim 9, wherein the cancer is breast cancer.
- 1 11. The method of claim 9, wherein the sample comprises breast tissue.
- 1 12. The method of claim 9, wherein the sample comprises a body fluid.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 47 -

- 1 13. The method of claim 12, wherein the body fluid is selected from the group consisting of
2 blood, serum, plasma, sweat, tears, urine, peritoneal fluid, lymph, vaginal secretions, semen,
3 spinal fluid, ascitic fluid, saliva, sputum, and breast exudate.
- 1 14. The method of claim 13, wherein the body fluid is serum.
- 1 15. A method of diagnosing cancer in an individual, the method comprising the steps of:
2 (a) contacting a sample from the individual with a binding moiety that binds
3 specifically to a cancer-associated protein to produce a binding moiety-cancer-
4 associated protein complex, wherein the binding moiety binds specifically to the
5 polypeptide of claim 1; and
6 (b) detecting the presence of the complex, which if present is indicative of the
7 presence of cancer in the individual.
- 1 16. The method of claim 15, wherein the binding moiety is an antibody.
- 1 17. The method of claim 16, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
- 1 18. The method of claim 16, wherein the antibody is a polyclonal antibody.
- 1 19. The method of claim 16, wherein the antibody is labeled with a detectable moiety.
- 1 20. The method of claim 19, wherein the detectable moiety comprises a member selected
2 from the group consisting of a radioactive label, a hapten label, a fluorescent label, and an
3 enzymatic label.
- 1 21. An isolated binding moiety that binds specifically the polypeptide of claim 1.
- 1 22. The binding moiety of claim 21, wherein the moiety is an antibody, an antigen-binding
2 fragment thereof or a biosynthetic antibody binding site.
- 1 23. The binding moiety of claim 21, wherein the binding moiety is a monoclonal antibody.
- 1 24. A pharmaceutical composition comprising the binding moiety of claim 21 in a
2 pharmaceutically-acceptable carrier.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 48 -

- 1 25. A method of treating cancer in an individual, the method comprising administering to the
2 individual a therapeutically-effective amount of the composition of claim 24.
- 1 26. The method of claim 25, wherein the cancer is breast cancer.
- 1 27. An isolated nucleic acid sequence encoding the protein of claim 1, or a sequence
2 complementary thereto.
- 1 28. An isolated nucleic acid sequence comprising at least 15 nucleotides and capable of
2 hybridizing under stringent hybridization conditions to the nucleic acid of claim 27.
- 1 29. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 28.
- 1 30. A composition comprising the nucleic acid of claim 28 admixed with a pharmaceutically
2 acceptable carrier.
- 1 31. A composition comprising the nucleic acid of claim 29 admixed with a pharmaceutically
2 acceptable carrier.
- 1 32. A method of treating cancer in an individual, the method comprising introducing into
2 cells of the individual the nucleic acid of claim 28.
- 1 33. The method of claim 32, wherein the cancer is breast cancer.
- 1 34. A method of detecting the presence of breast cancer in a human, the method comprising
2 detecting the presence of a nucleic acid molecule in a tissue or body fluid sample of the human
3 thereby to indicate the presence of breast cancer in the human, wherein the nucleic acid molecule
4 comprises a nucleic acid sequence encoding at least a portion of the breast cancer-associated
5 protein of claim 1 or a nucleic acid sequence capable of recognizing and being specifically bound
6 by the breast cancer-associated protein.
- 1 35. The method of claim 34, wherein the method comprises the step of reacting the sample
2 with a labeled hybridization probe capable of hybridizing specifically to the nucleic acid
3 molecule.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 49 -

- 1 36. A method of detecting the presence of cancer in an individual, the method comprising the
2 steps of
3 exposing a sample from the individual under specific hybridization conditions to a
4 nucleic acid probe capable of hybridizing specifically to a target nucleic acid encoding the
5 polypeptide of claim 1; and
6 detecting the presence of a duplex comprising the nucleic acid probe.
7 the presence of the duplex being indicative of cancer in the individual.
- 1 37. The method of claim 36 further comprising the step of amplifying the target nucleic acid
2 in the sample prior to exposing the sample to the nucleic acid probe.
- 1 38. The method of claim 36, wherein the cancer is breast cancer.
- 1 39. The method of claim 36, wherein the nucleic acid probe is labeled with a detectable
2 moiety.
- 1 40. The method of claim 39, wherein the detectable moiety comprises a member selected
2 from the group consisting of a radioactive label, a hapten label, a fluorescent label, and an
3 enzymatic label.
- 1 41. A kit for detecting the presence of breast cancer or for evaluating the efficacy of a
2 therapeutic treatment of a breast cancer, the kit comprising in combination:
3 a receptacle for receiving a tissue or body fluid sample from a mammal;
4 a binding moiety which binds specifically to the breast cancer-associated protein of claim
5 1;
6 a means for detecting the binding moiety bound to the breast cancer-associated protein;
7 and
8 a reference sample.
- 1 42. The kit of claim 41, wherein the reference sample is indicative of a normal breast sample.

WO 01/36470

PCT/US99/31483

- 56 -

- 1 43. A method of diagnosing cancer in a mammal, the method comprising the steps of:
- 2 (a) obtaining a sample isolated from the mammal; and
- 3 (b) detecting in the sample the presence of a protein characterized as comprising an
- 4 amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ
- 5 ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID
- 6 NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ
- 7 ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20;
- 8 SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; and SEQ ID NO: 23, which if present is indicative of cancer in
- 9 the mammal.
- 1 44. The method of claim 43, wherein the cancer is breast cancer.
- 1 45. The method of claim 44, wherein the sample comprises breast tissue.
- 1 46. The method of claim 43, wherein the sample comprises a body fluid.
- 1 47. The method of claim 46, wherein the body fluid is selected from the group consisting of
- 2 blood, serum, plasma, sweat, tears, urine, peritoneal fluid, lymph, vaginal secretions, semen,
- 3 spinal fluid, ascitic fluid, saliva, sputum, and breast exudate.
- 1 48. A method of diagnosing cancer in a mammal, the method comprising the steps of:
- 2 (a) contacting a sample derived from the mammal with a binding moiety that binds
- 3 specifically to a cancer-associated protein to produce a binding moiety-cancer-associated protein
- 4 complex, wherein said binding moiety binds specifically to a protein comprising an amino acid
- 5 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 22, and SEQ ID
- 6 NO: 23; and
- 7 (b) detecting the presence of the complex, which if present is indicative of the
- 8 presence of cancer in the mammal.
- 1 49. The method of claim 48, wherein the cancer is breast cancer.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 51 -

- 1 50. The method of claim 48, wherein the binding moiety is selected from the group
2 consisting of an antibody, an antibody fragment and a biosynthetic antibody binding site.
- 3 51. The method of claim 48, wherein the binding moiety is an antibody.
- 1 52. The method of claim 51, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
- 1 53. The method of claim 50, wherein the binding moiety is labeled with a detectable moiety.
- 1 54. The method of claim 48, wherein the absence of a detectable amount of the protein is
2 indicative of the absence of cancer.
- 1 55. The method of claim 48, further comprising the additional steps of:
2 (c) measuring an amount of the protein in the sample; and
3 (d) comparing the amount of the protein in the sample with a threshold value
4 indicative of cancer in a mammal, wherein an amount of the protein in the sample greater than or
5 equal to the threshold value is indicative of the presence of the cancer in the mammal.
- 1 56. A method of detecting the presence of cancer in a mammal, the method comprising:
2 detecting the presence of a nucleic acid molecule in a tissue or body fluid sample of the mammal
3 thereby to indicate the presence of cancer in the mammal, wherein the nucleic acid molecule
4 comprises a nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1;
5 SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; SEQ
6 ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13; SEQ
7 ID NO:14; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:19;
8 SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; or SEQ ID NO:23, or a fragment thereof.
- 1 57. The method of claim 56, wherein the detecting step comprises combining the sample with
2 a labeled hybridization probe capable of hybridizing specifically to the nucleic acid molecule.
- 1 58. A method of detecting the presence of cancer in a mammal, the method comprising the
2 steps of:

WO 01/36470

PCT/US00/31483

- 52 -

- 3 (a) combining a sample from the mammal under specific hybridization conditions
4 with a nucleic acid probe capable of hybridizing specifically to a target nucleic acid encoding the
5 amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4;
6 SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10;
7 SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:14; SEQ ID NO:15; SEQ ID
8 NO:16; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ
9 ID NO:22; or SEQ ID NO:23; and
10 (b) detecting the presence of a duplex comprising the nucleic acid probe, the presence
11 of the duplex being indicative of cancer in the mammal.
- 1 59. The method of claim 58, further comprising the step of amplifying the target nucleic acid
2 in the sample prior to combining the sample with the nucleic acid probe.
- 1 60. The method of claim 58, wherein the cancer is breast cancer.
- 1 61. The method of claim 58, where the nucleic acid probe is labeled with a detectable moiety.
- 1 62. The method of claim 61, wherein the detectable moiety comprises a member selected
2 from the group consisting of a radioactive label, a hapten label, a fluorescent label, and an
3 enzymatic label.

WO 01/36470

PCT/US00/31483

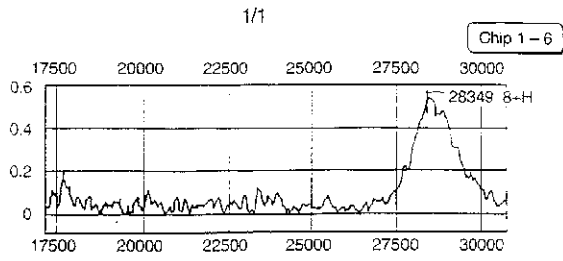


FIG. 1A

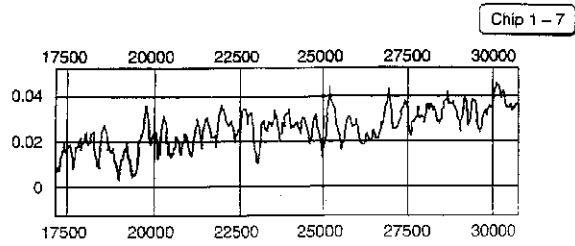


FIG. 1B

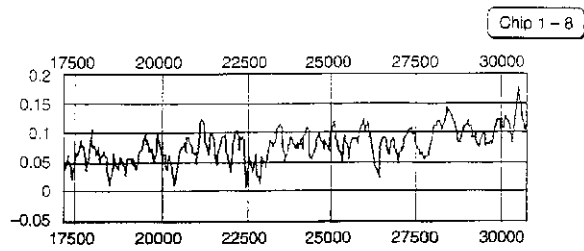


FIG. 1C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/36470

1

PCT/US00/31483

SEQUENCE LISTING

<110> Watkins, Strymer

<120> Materials and Methods for Detection and Treatment of Breast Cancer

<130> MIP-03480

<140>

<141>

<150> US 60/165,173

<151> 1999-11-16

<150> US 60/172,170

<151> 1999-12-17

<150> US 60/178,860

<151> 2000-01-27

<150> US 60/201,721

<151> 2000-05-03

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide

<400> 1

Gln Leu Gln Gly Phe Pro Phe Tyr Gly Lys Pro Met Arg

1 5 13

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide

<400> 2

His Asp Ile Ala Phe Val Glu Phe Glu Asn Asp Gly Gln Ala Gly Ala

1 5 10 15

Ala Arg

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 01/36470

2

PCT/US00/31483

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide

<400> 3
Leu Val Pro Gly Arg His Asp Ile Ala Phe Val Glu Phe Glu Asn Asp
 1          5          10          15

Gly Gln Ala Gly Ala Ala Arg
          20

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide

<400> 4
Thr Val Glu Gln Thr Ala Thr Thr Thr Asn Lys
 1          5          10

<210> 5
<211> 225
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Asp Ile Arg Pro Asn His Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Asn Asp
 1          5          10          15

Lys Ile Lys Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ser Leu Tyr Ala Leu Phe Ser
          20          25          30

Gln Phe Gly His Val Val Asp Ile Val Ala Leu Lys Thr Met Lys Met
          35          40          45

Arg Gly Gln Ala Phe Val Ile Phe Lys Glu Leu Gly Ser Ser Thr Asn
          50          55          60

Ala Leu Arg Gln Leu Gln Gly Phe Pro Phe Tyr Gly Lys Pro Met Arg
          65          70          75          80

Ile Gln Tyr Ala Lys Thr Asp Ser Asp Ile Ile Ser Lys Met Arg Gly
          85          90          95

Thr Phe Ala Asp Lys Glu Lys Lys Lys Glu Lys Lys Lys Ala Lys Thr
          100          105          110

Val Glu Gln Thr Ala Thr Thr Thr Asn Lys Lys Pro Gly Gln Gly Thr
          115          120          125

Pro Asn Ser Ala Asn Thr Gln Gly Asn Ser Thr Pro Asn Pro Gln Val
          130          135          140

Pro Asp Tyr Pro Pro Asn Tyr Ile Leu Phe Leu Asn Asn Leu Pro Glu
          145          150          155          160

```

WO 01/36470

3

PCT/US00/31483

Glu Thr Asn Glu Met Met Leu Ser Met Leu Phe Asn Gln Phe Pro Gly
 165 170 175
 Phe Lys Glu Val Arg Leu Val Pro Gly Arg His Asp Ile Ala Phe Val
 180 185 190
 Glu Phe Glu Asn Asp Gly Gln Ala Gly Ala Ala Arg Asp Ala Leu Gln
 195 200 205
 Gly Phe Lys Ile Thr Pro Ser His Ala Met Lys Ile Thr Tyr Ala Lys
 210 215 220
 Lys
 225

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: tryptic peptide

<400> 6
 Gly Gln Val Pro Met Gln Asp Pro Arg
 1 5

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: tryptic peptide

<400> 7
 Gly Ser Leu Pro Ala Asn Val Pro Thr Pro Arg
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: tryptic peptide

<400> 8
 Gly Leu Leu Gly Asp Ala Pro Asn Asp Pro Arg
 1 5 10

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

WO 01/36470

4

PCT/US00/31483

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 9
Ala Gly Leu Thr Val Arg Asp Pro Ala Val Asp Arg
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 10
Ala Leu Arg Val Asp Asn Ala Ala Ser Glu Lys Asn Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 11
Gly Gly Thr Leu Leu Ser Val Thr Gly Glu Val Glu Pro Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 12
Asp Ile Phe Ser Glu Val Gly Pro Val Val Ser Phe Arg
1 5 10

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 13
Gly Ile Asp Ala Arg Gly Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg
1 5 10 15

WO 01/36470

5

PCT/US00/31483

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 14
 Gly Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 15
 Ala Val Ala Ser Leu Pro Pro Glu Gln Met Phe Glu Leu Met Lys
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 16
 Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Val Arg Gly Met Glu Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 17
 Gly Tyr Leu Gly Pro Pro His Gln Gly Pro Pro Met His His Val Pro
 1 5 10 15

Gly His Glu Ser Arg
 20

<210> 18
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

WO 01/36470

6

PCT/US00/31483

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide
 <400> 15
 Gly Pro Ile Pro Ser Gly Met Gln Gly Pro Ser Pro Ile Asn Met Gly
 5 10 15
 Ala Val Val Pro Gln Gly Ser Arg
 20

<210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide
 <400> 19
 Asn Met Leu Leu Gln Asn Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Leu Gln Ala
 1 5 10 15
 Gln Val Val Met Arg
 20

<210> 20
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide
 <400> 20
 Gly Gly Pro Leu Pro Glu Pro Arg Pro Leu Met Ala Glu Pro Arg Gly
 1 5 10 15
 Pro Met Leu Asp Gln Arg
 20

<210> 21
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide
 <400> 21
 Ser Leu Gly Thr Gly Ala Pro Val Ile Glu Ser Pro Tyr Gly Glu Thr
 1 5 10 15
 Ile Ser Pro Glu Asp Ala Pro Glu Ser Ile Ser Lys
 20 25

WQ 01/36470

7

PCT/US00/31483

<210> 22
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

Met Ala Gly Leu Thr Val Arg Asp Pro Ala Val Asp Arg Ser Leu Arg
  1      5      10      15

Ser Val Phe Val Gly Asn Ile Pro Tyr Glu Ala Thr Glu Glu Gln Leu
  20      25      30

Lys Asp Ile Phe Ser Glu Val Gly Pro Val Val Ser Phe Arg Leu Val
  35      40      45

Tyr Asp Arg Glu Thr Gly Lys Pro Lys Gly Tyr Gly Phe Cys Glu Tyr
  50      55      60

Gln Asp Gln Glu Thr Ala Leu Ser Ala Met Arg Asn Leu Asn Gly Arg
  65      70      75      80

Glu Phe Ser Gly Arg Ala Leu Arg Val Asp Asn Ala Ala Ser Glu Lys
  85      90      95

Asn Lys Glu Glu Leu Lys Ser Leu Gly Thr Gly Ala Pro Val Ile Glu
 100     105     110

Ser Pro Tyr Gly Glu Thr Ile Ser Pro Glu Asp Ala Pro Glu Ser Ile
 115     120     125

Ser Lys Ala Val Ala Ser Leu Pro Pro Glu Gln Met Phe Glu Leu Met
 130     135     140

Lys Gln Met Lys Leu Cys Val Gln Asn Ser Pro Gln Glu Ala Arg Asn
 145     150     155     160

Met Leu Leu Gln Asn Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Leu Gln Ala Gln
 165     170     175

Val Val Met Arg Ile Val Asp Pro Glu Ile Ala Leu Lys Ile Leu His
 180     185     190

Arg Gln Thr Asn Ile Pro Thr Leu Ile Ala Gly Asn Pro Gln Pro Val
 195     200     205

His Gly Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Asn Val Ser Met Asn Gln Gln
 210     215     220

Asn Pro Gln Ala Pro Gln Ala Gln Ser Leu Gly Gly Met His Val Asn
 225     230     235     240

Gly Ala Pro Pro Leu Met Gln Ala Ser Met Gln Gly Gly Val Pro Ala
 245     250     255

Pro Gly Gln Met Pro Ala Ala Val Thr Gly Pro Gly Pro Gly Ser Leu
 260     265     270

Ala Pro Gly Gly Gly Met Gln Ala Gln Val Gly Met Pro Gly Ser Gly
 275     280     285

```

WO 01/36470

8

PCT/US00/31483

Pro Val Ser Met Glu Arg Gly Gln Val Pro Met Gln Asp Pro Arg Ala
 290 295 300
 Ala Met Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ala Asn Val Pro Thr Pro Arg Gly
 305 310 315 320
 Leu Leu Gly Asp Ala Pro Asn Asp Pro Arg Gly Gly Thr Leu Leu Ser
 325 330 335
 Val Thr Gly Glu Val Glu Pro Arg Gly Tyr Leu Gly Pro Pro His Gln
 340 345 350
 Gly Pro Pro Met His His Val Pro Gly His Glu Ser Arg Gly Pro Pro
 355 360 365
 Pro His Glu Leu Arg Gly Gly Pro Leu Pro Glu Pro Arg Pro Leu Met
 370 375 380
 Ala Glu Pro Arg Gly Pro Met Leu Asp Gln Arg Gly Pro Pro Leu Asp
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Gly Arg Asp Pro Arg Gly Ile Asp Ala Arg Gly Met Glu
 405 410 415
 Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg Gly Leu Glu Ala
 420 425 430
 Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg
 435 440 445
 Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Val Arg Gly Met Glu Ala Arg Gly
 450 455 460
 Met Asp Thr Arg Gly Pro Val Pro Gly Pro Arg Gly Pro Ile Pro Ser
 465 470 475 480
 Gly Met Gln Gly Pro Ser Pro Ile Asn Met Gly Ala Val Val Pro Gln
 485 490 495
 Gly Ser Arg Gln
 500

 <210> 23
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 23
 Met Ala Gly Leu Thr Val Arg Asp Pro Ala Val Asp Arg Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Val Gly Asn Ile Pro Tyr Glu Ala Thr Glu Glu Gln Leu
 20 25 30
 Lys Asp Ile Phe Ser Glu Val Gly Pro Val Val Ser Phe Arg Leu Val
 35 40 45
 Tyr Asp Arg Glu Thr Gly Lys Pro Lys Gly Tyr Gly Phe Cys Glu Tyr
 50 55 60

WO 01/36470

9

PCT/US00/31483

Gln Asp Gln Glu Thr Ala Leu Ser Ala Met Arg Asn Leu Asn Gly Arg
 65 70 75 80
 Glu Phe Ser Gly Arg Ala Leu Arg Val Asp Asn Ala Ala Ser Glu Lys
 85 90 95
 Asn Lys Glu Glu Leu Lys Ser Leu Gly Thr Gly Ala Pro Val Ile Glu
 100 105 110
 Ser Pro Tyr Gly Glu Thr Ile Ser Pro Glu Asp Ala Pro Glu Ser Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Val Ala Ser Leu Pro Pro Glu Gln Met Phe Glu Leu Met
 130 135 140
 Lys Gln Met Lys Leu Cys Val Gln Asn Ser Pro Gln Glu Ala Arg Asn
 145 150 155 160
 Met Leu Leu Gln Asn Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Leu Gln Ala Gln
 165 170 175
 Val Val Met Arg Ile Val Asp Pro Glu Ile Ala Leu Lys Ile Leu His
 180 185 190
 Arg Gln Thr Asn Ile Pro Thr Leu Ile Ala Gly Asn Pro Gln Pro Val
 195 200 205
 His Gly Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Asn Val Ser Met Asn Gln Gln
 210 215 220
 Asn Pro Gln Ala Pro Gln Ala Gln Ser Leu Gly Gly Met His Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Ala Pro Pro Leu Met Gln Ala Ser Met Gln Gly Gly Val Pro Ala
 245 250 255
 Pro Gly Gln Met Pro Ala Ala Val Thr Gly Pro Gly Pro Gly Ser Leu
 260 265 270
 Ala Pro Gly Gly Gly Met Gln Ala Gln Val Gly Met Pro Gly Ser Gly
 275 280 285
 Pro Val Ser Met Glu Arg Gly Gln Val Pro Met Gln Asp Pro Arg Ala
 290 295 300
 Ala Met Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ala Asn Val Pro Thr Pro Arg Gly
 305 310 315 320
 Leu Leu Gly Asp Ala Pro Asn Asp Pro Arg Gly Gly Thr Leu Leu Ser
 325 330 335
 Val Thr Gly Glu Val Glu Pro Arg Gly Tyr Leu Gly Pro Pro His Gln
 340 345 350
 Gly Pro Pro Met His His Val Pro Gly His Glu Ser Arg Gly Pro Pro
 355 360 365
 Pro His Glu Leu Arg Gly Gly Pro Leu Pro Glu Pro Arg Pro Leu Met
 370 375 380

WO 01/36470

10

PCT/US90/31483

Ala Glu Pro Arg Gly Pro Met Leu Asp Gln Arg Gly Pro Pro Leu Asp
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Gly Arg Asp Pro Arg Gly Ile Asp Ala Arg Gly Met Glu
 405 410 415
 Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg Gly Leu Glu Ala
 420 425 430
 Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg
 435 440 445
 Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Val Arg Gly Met Glu Ala Arg Gly
 450 455 460
 Met Asp Thr Arg Gly Pro Val Pro Gly Pro Arg Gly Pro Ile Pro Ser
 465 470 475 480
 Gly Met Gln Gly Pro Ser Pro Ile Asn Met Gly Ala Val Val Pro Gln
 485 490 495
 Gly Ser Arg Gln Val Pro Val Met Gln Gly Thr Gly Met Gln Gly Ala
 500 505 510
 Ser Ile Gln Gly Gly Ser Gln Pro Gly Gly Phe Ser Pro Gly Gln Asn
 515 520 525
 Gln Val Thr Pro Gln Asp His Glu Lys Ala Ala Leu Ile Met Gln Val
 530 535 540
 Leu Gln Leu Thr Ala Asp Gln Ile Ala Met Leu Pro Pro Glu Gln Arg
 545 550 555 560
 Gln Ser Ile Leu Ile Leu Lys Glu Gln Ile Gln Lys Ser Thr Gly Ala
 565 570 575
 Pro

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 May 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/36470 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/47; (72) Inventor: WATKINS, Brynmor; 99 Summer Street,
16/30, G01N 33/574, C12Q 1/68 Waltham, MA 02452 (US);(21) International Application Number: PCT/US00/31483 (74) Agent: BRODOWSKI, Michael, H.; Testa, Horwitz
& Tibbeault, LLP, High Street Towers, 125 High Street,
Boston, MA 02110 (US);

(22) International Filing Date: 16 November 2000 (16.11.2000) (81) Designated States (national): AU, CA, JP;

(25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
(26) Publication Language: English NL, PT, SE, TR);(30) Priority Data: Published: with international search report
60/165,673 16 November 1999 (16.11.1999) US
60/172,170 17 December 1999 (17.12.1999) US
60/178,860 27 January 2000 (27.01.2000) US
60/201,721 5 May 2000 (05.05.2000) US
Not furnished 10 November 2000 (10.11.2000) US(71) Applicant: MATRITECTIL INC. (US); 300 Nevada
Street, Newton, MA 02460 (US); (88) Date of publication of the international search report: 24 January 2002*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 01/36470 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR DETECTION AND TREATMENT OF BREAST CANCER, BASED ON
BREAST CANCER ASSOCIATED POLYPEPTIDES

(57) Abstract: The invention provides a wide range of methods and compositions for detecting and treating breast cancer in an individual. Specifically, the invention provides target breast cancer associated proteins, which permit a rapid detection, preferably before metastases occur, of breast cancer. The target breast cancer-associated protein may be detected, for example, by reacting the sample with a labeled binding moiety, for example, a labeled antibody capable of binding specifically to the protein. The invention also provides kits useful in the detection of breast cancer in an individual. In addition, the invention provides methods utilizing the breast cancer-associated protein either as targets for treating breast cancer or as indicators for monitoring the efficacy of such a treatment.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/31483
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C07K16/30 G01N33/574 C12Q1/68		
A, according to (1) 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 C07K G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Reason or document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; BAZEL, SHAMIDEH ET AL: "Characterization of purified cathepsin D from malignant human breast tissue" retrieved from STN Database accession no. 130:334429 CA XP002166729 & INT. J. ONCOL. (1999), 14(2), 315-319, 1999, abstract	1
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.		
☒ Patent family members are listed in annex		
Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document(s) published on or after the international filing date *C* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the prior art state of the art or other special reasons (as specified) *D* document relating to an oral disclosure, test, exhibition or other means *E* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
F 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 *G* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step which the document is taken into account in the prior art *H* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step which the document is combined with one or more other prior art documents, none of which alone being obvious to a person skilled in the art *I* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 September 2001		Date of mailing of the international search report 05/10/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 7 NL - 2580 HV Rijswijk Tel. (+31 - 70) 340-2000, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31 - 70) 340-3010		Authorized Officer Masturzo, P

Form PCT/ISA/210 (Revised March 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/31483

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GIUFFRIDA, MARIA GABRIELLA ET AL: "Isolation and characterization of full and truncated forms of human breast carcinoma protein BA46 from human milk fat globule membranes" retrieved from STN Database accession no. 128:319654 CA XP002166730 & J. PROTEIN CHEM. (1998), 17(2), 143-148, 1998, abstract ---	1
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ALFONSO, MAURO ET AL: "Two monoclonal antibodies identifying human breast carcinoma associated antigens" retrieved from STN Database accession no. 123:81386 CA XP002166731 & BIOTECNOL. APL. (1994), 11(1), 12-19, 1994, abstract ---	1
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; AUTIERO, MONICA ET AL: "A 17 - kDa CD4-binding glycoprotein present in human seminal plasma and in breast tumor cells" retrieved from STN Database accession no. 123:30958 CA XP002166732 & EUR. J. IMMUNOL. (1995), 25(5), 1461-4, 1995, abstract ---	1
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ALFONSO, M. ET AL: "Monoclonal antibodies for camal and for cama2 identifying human breast carcinoma associated antigens" retrieved from STN Database accession no. 122:185233 CA XP002166733 & IMMUNOLOGIA (1994), 13(3), 102-4, 1994, abstract --- -/--	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/31483

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Indication of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; DAMSTRUP, LARS ET AL: "Estrogen-regulated proteins in human breast cancer: Clinical value in advanced breast cancer and correlation with estrogen receptor" retrieved from STN Database accession no. 118:188899 CA XP002166734 & RECENT ADV. CELL. MOL. BIOL., WORLD CONGR. C.M.B., 1ST (1992), MEETING DATE 1991, VOLUME 4, 243-51. EDITOR(S): WEGMANN, RAYMOND J.; WEGMANN, MARIA A. PUBLISHER: PEETERS PRESS, LEUVEN, BELG., 1992, abstract	1
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MORETTI-ROJAS, INES ET AL: "A cDNA for the estradiol-regulated 24K protein: control of mRNA levels i MCF-7 cells" retrieved from STN Database accession no. 109:123471 CA XP002166735 abstract & BREAST CANCER RES. TREAT. (1988), 11(2), 155-63, 1988, abstract	1
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; BORCHERT, G. H. ET AL: "Molecular forms of prostate-specific antigen in the serum of women with benign and malignant breast diseases." retrieved from STN Database accession no. PREV199799809221 XP002166736 & BRITISH JOURNAL OF CANCER, (1997) VOL. 76, NO. 8, PP. 1087-1094.. abstract	1

2

S. 2001/01/01 (continued from second sheet) (continued from first sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/31483

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Catalogue	Character of document with indication of the applicable category of the relevant processes	Relevant to the art No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; CHORVATH, B. (1) ET AL: "Monoclonal antibodies to two adhesive cell surface antigens (CD43 and CD59) with different distribution on hematopoietic and non-hematopoietic tumor cell lines." retrieved from STN Database accession no. PREV199395076141 XP002166737 & NEOPLASMA (BRATISLAVA), (1992) VOL. 39, NO. 6, PP. 325-329., abstract	1
X	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; SLENTZ-KESLER K A ET AL: "Identification and characterization of K12 (SECTM1), a novel human gene that encodes a Golgi-associated protein with transmembrane and secreted isoforms." retrieved from STN Database accession no. 1998149980 XP002166738 & GENOMICS, (1998 FEB 1) 47 (3) 327-40., abstract	1
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; TAKEI, YOSHIFUMI ET AL: "Partial purification of immunoreactive basic fibroblast growth factors from sera of patients with breast cancer and investigation of their mitogenic activity toward BALB/c3T3 fibroblasts." retrieved from STN Database accession no. PREV1994974998430 XP002166739 & JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION, (1994) VOL. 17, NO. 1, PP 19-28., abstract	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/31483

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I TACHIBANA ET AL.: "MAG-2, a novel transmembrane-4 superfamily (TM4SF) protein that complexes with integrins and other TM4SF proteins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 46, 14 November 1997 (1997-11-14), pages 29181-29189, XP002166726 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 the whole document	1
A	W J HABETS ET AL.: "Analysis of a cDNA clone expressing a human autoimmune antigen: full-length sequence of the U2 small nuclear RNA-associated B'' antigen" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 84, no. 8, April 1987 (1987-04), pages 2421-2425, XP002166727 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON., US ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	43-62
X	Y TAKAGAKI ET AL.: "The human 64-kDa polyadenylation factor contains a ribonucleoprotein-type RNA binding domain and unusual auxiliary motifs" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, no. 4, 15 February 1992 (1992-02-15), pages 1403-1407, XP002166728 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON., US ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1
X	US 5 561 222 A (KEENE ET AL.) 1 October 1996 (1996-10-01) the whole document	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/31483

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C P PAWELETZ ET AL.: "A novel, proteomic approach to monitor carcinogenic disease progression using surface enhance desorption ionization spectroscopy (SELDI) of laser capture microdissection (LCM)-derived cells from cancer tissue" PROC. AM. ASS. FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 40, March 1999 (1999-03), page 411 XP000993137 abstract	1
P,X	C P PAWELETZ ET AL.: "Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip" DRUG DEVELOPMENT RESEARCH., vol. 49, no. 1, 2000, pages 34-42, XP001001234 NEW YORK, NY, US ISSN: 0272-4391 the whole document	1
T	B WATKINS ET AL.: "Surface enhanced laser desorption-ionization (SELDI) mass spectroscopy in the discovery of serum markers for breast cancer" TUMOR BIOLOGY., vol. 21, no. suppl. 1, September 2000 (2000-09), page 35 XP001001193 XX, XX abstract	1-62
T	B WATKINS ET AL.: "Identification of serum nuclear matrix protein markers of breast cancer using surface enhanced laser desorption-ionization (SELDI) mass spectroscopy" BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT., vol. 64, no. 1, December 2000 (2000-12), page 98 XP001001191 NIJHOFF, BOSTON., US ISSN: 0167-6806 abstract	1-61
X	WO 98 42725 A (MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH DEVELOPMENT) 1 October 1998 (1998-10-01) page 16, line 32 - line 35	1
X	EP 0 460 607 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 11 December 1991 (1991-12-11) claim 27	1

International Application No. PCT/US 00/81483

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 34-40 and 43-62 (at least partially) are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. Although claims 25-26 and 32-33 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-62

Due to the very generic characterization of the claimed product, which involves unclarity of the whole subject matter of the present application, the search has been performed generally on the breast cancer antigen with molecular weights corresponding to those claimed in claim 1 and dependent products and methods.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/31483

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family members		Publication date
US 5561222	A	01-10-1996	US	5866680 A		02-02-1999
WO 9842725	A	01-10-1998	AU	6768598 A		20-10-1998
			EP	1007535 A1		14-06-2000
			WO	9842725 A1		01-10-1998
EP 460607	A	11-12-1991	CA	2043951 A1		06-12-1991
			EP	0460607 A2		11-12-1991
			JP	6169791 A		21-06-1994
			US	5411884 A		02-05-1995

Form PCT ISA/STC (patent family member) July 1995

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
B 0 1 D 15/04	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/47	B 0 1 D 15/04	4 D 0 1 7
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 30/88	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/574	A
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/577	B
	G 0 1 N 33/58	A
	C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 60/201,721

(32)優先日 平成12年5月3日(2000.5.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/709,947

(32)優先日 平成12年11月10日(2000.11.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, JP

(72)発明者 スザロ, ロバート ピー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 3 8, フランクリン, アンナベル レーン 1 4

F ターム(参考) 2G045 AA26 CA26 CB03 CB11 CB12 CB14 CB30 DA13 DA36 FB02
 FB03 FB06 FB08 FB12
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07 EA04 GA11 HA12 HA15
 4B063 QA19 QQ03 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZB26 ZC41
 4C085 AA12 AA13 BB01 BB11 CC02 CC05 CC17 CC21 CC29 DD23
 DD63 DD86 DD88 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
 4D017 AA11 BA20 CA17
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 DA86 EA28 EA51
 FA72 FA74

专利名称(译)	用于基于乳腺癌相关多肽检测和治疗乳腺癌的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2004500056A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001538959	申请日	2000-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	基底膜科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	基底膜科技有限公司		
[标]发明人	ワトキンスブラインモア スザロロパートピー		
发明人	ワトキンス, ブラインモア スザロ, ロパート ピー.		
IPC分类号	G01N27/62 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 B01D15/04 B01D15/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/00 C12Q1/68 G01N30/72 G01N30 /88 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/567 G01N33/574 G01N33/577 G01N33 /58 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/4702 A61K38/00 G01N33/57415 G01N2800/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 B01D15/04 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N30/88.J G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33 /566 G01N33/574.A G01N33/577.B G01N33/58.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB11 2G045/CB12 2G045/CB14 2G045/CB30 2G045 /DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024 /HA15 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064 /DA13 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZC41 4C085/AA12 4C085/AA13 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC17 4C085/CC21 4C085/CC29 4C085 /DD23 4C085/DD63 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4D017/AA11 4D017/BA20 4D017/CA17 4H045 /AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/165673 1999-11-16 US 60/172170 1999-12-17 US 60/178860 2000-01-27 US 60/201721 2000-05-03 US 09/709947 2000-11-10 US		
其他公开文献	JP2004500056A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了多种用于检测和治疗个体乳腺癌的方法和组合物。特别地，本发明提供了靶乳腺癌相关蛋白，其优选能够在转移发生之前快速检测乳腺癌。例如，可以通过使样品与标记的结合部分（例如，能够特异性结合蛋白质的标记抗体）反应来检测靶乳腺癌相关蛋白。本发明还提供了用于检测个体乳腺癌的试剂盒。此外，本发明提供了利用靶乳腺癌相关蛋白作为治疗乳腺癌的靶标或作为监测这种治疗功效的指标的方法。

質量 (Da)	モイロ 過分 (mM) 塩酸 pH (7.4)	使用した SELDIチップ 表面	乳癌と肩25 個体由来 がん細胞の 陽性数	乳癌と肩25 個体由来 がん細胞の 陽性数
16210	0 (70-スルー)	Nickel	17	1
17188	25 mM	WCX-2	17	2
30183	25 mM	WCX-2	15	3
34664	25 mM	WCX-2	16	4
20050	50 mM	Nickel	19	0
28258	50 mM	Nickel	20	0
24170	50 mM	Nickel	17	0
35393	50 mM	Nickel	17	3
34908	50 mM	WCX-2	16	2
70908	100 mM	WCX-2	20	0
17840	100 mM	WCX-2	18	2
11709	150 mM	SAX-2	20	0
42354	200 mM	Nickel	17	0
56280	200 mM	Nickel	16	0
34517	400 mM	Copper	18	1