

(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2005-500059

(P2005-500059A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/52	C O 7 K 14/52	2 G O 5 4
C 0 7 K 16/24	C O 7 K 16/24	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
		4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-521780 (P2003-521780)	(71) 出願人	399052796
(86) (22) 出願日	平成14年8月13日 (2002.8.13)		ダナーファーバー キャンサー インステ
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月13日 (2004.2.13)		イテュート インク.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/025603		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
(87) 国際公開番号	W02003/016471		ストン ビニー ストリート 4 4
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/312, 123		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成13年8月13日 (2001.8.13)	(74) 代理人	100108774
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 橋本 一憲
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	チェン ラン ボー
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レ
			キシントン イースト エマーソン ロー
			ド 1 8 4
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ペリオスチンに基づく診断アッセイ法

(57) 【要約】

本発明には、新規ヒトペリオスチンポリペプチドおよびそれをコードするDNAが含まれる。ヒトペリオスチン特異的抗体、乳癌の骨への転移および子癇前症を調べる診断アッセイ法も同様に本発明に含まれる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトペリオスチンに対して特異的に結合する精製抗体。

【請求項 2】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項 3】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項 4】

モノクローナル抗体が5H8ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号CRL-2646)、または8H11ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号_____)によって分泌される、請求項3記載の抗体。 10

【請求項 5】

ヒトペリオスチンに結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ。

【請求項 6】

ハイブリドーマが5H8ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号CRL-2646)、または8H11ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号_____)である、請求項5記載のハイブリドーマ。

【請求項 7】

以下の段階を含む、試料中にヒトペリオスチンを検出する方法：

(a) ヒトペリオスチンに結合する抗体を試料に接触させる段階；および 20

(b) 抗体が試料の成分に結合すれば、試料中にペリオスチンが存在することが示される、抗体が試料の成分に結合するか否かを決定する段階。

【請求項 8】

第1の抗体が結合するヒトペリオスチン上のエピトープが、第2の抗体が結合するエピトープとは同じでない、ヒトペリオスチンに結合する第1の抗体に試料を接触させる前に、ヒトペリオスチンに結合する第2の抗体に試料を接触させる段階をさらに含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

第2の抗体が固相基質に結合する、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項7記載の方法。 30

【請求項 11】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項7記載の方法。

【請求項 12】

モノクローナル抗体が5H8ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号CRL-2646)、または8H11ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号_____)によって分泌されるモノクローナル抗体である、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

第2の抗体がモノクローナル抗体である、請求項8記載の方法。

【請求項 14】

モノクローナル抗体が5H8ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号CRL-2646)、または8H11ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号_____)によって分泌されるモノクローナル抗体である、請求項13記載の方法。 40

【請求項 15】

第2の抗体がポリクローナル抗体である、請求項8記載の方法。

【請求項 16】

方法がイムノプロットアッセイ法を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 17】

方法がELISAアッセイ法を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 18】

検出段階が化学発光を検出する段階を含む、請求項7記載の方法。

【請求項19】

検出段階が、放射活性または蛍光を検出する段階を含む、請求項7記載の方法。

【請求項20】

検出段階が、可視光または紫外光の吸光度を測定する段階を含む、請求項7記載の方法。

【請求項21】

抗体がビオチン化されている、請求項7記載の方法。

【請求項22】

検出段階がアビジンを用いることを含む、請求項7記載の方法。

【請求項23】

検出段階が、免疫グロブリン分子に結合する抗体を用いることを含む、請求項7記載の方法。

【請求項24】

以下の段階を含む、乳癌の骨への転移を診断する方法：

(a) 乳癌の骨への転移を有することが疑われる、または有するリスクのある乳癌患者を同定する段階；および

(b) 試料中のペリオスチンレベルが対照ペリオスチンレベルと比較して上昇していれば、患者の乳癌が骨に転移していることが示される、患者からの体液試料中のペリオスチンレベルを測定する段階。

【請求項25】

体液が血液である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

体液が尿である、請求項24記載の方法。

【請求項27】

以下の段階を含む、患者における子癇前症を診断する方法：

(a) 子癇前症を有することが疑われる、または有するリスクのある妊娠患者を同定する段階；および

(b) 試料中のペリオスチンレベルが対照ペリオスチンレベルと比較して上昇していれば、患者が子癇前症を有することが示される、患者からの体液試料中のペリオスチンレベルを測定する段階。

【請求項28】

体液が血液である、請求項27記載の方法。

【請求項29】

体液が尿である、請求項27記載の方法。

【請求項30】

配列番号：6または配列番号：14を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離されたDNA。

【請求項31】

核酸配列が配列番号：5または配列番号：13である、請求項30記載の単離されたDNA。

【請求項32】

DNAが配列番号：4または配列番号：12を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項30記載の単離されたDNA。

【請求項33】

核酸配列が配列番号：3または配列番号：11である、請求項32記載の単離されたDNA。

【請求項34】

請求項30記載のDNAを含むベクター。

【請求項35】

核酸配列が転写調節要素に機能的に結合している、請求項34記載のベクター。

【請求項36】

請求項35記載のベクターを含む細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

配列番号：6または配列番号：14を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 38】

配列番号：4または配列番号：12を含む、請求項37記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 39】

(a) 完全長のポリペプチドより短く、かつ

(b) 構成的に配列番号：4の725番目および726番目の残基を含む、または構成的に配列番号：12の768～771番目の残基を含む、
請求項37記載のポリペプチドの抗原性断片。

【請求項 40】

以下の段階を含む、ポリペプチドを作製する方法：

(a) 請求項36記載の細胞を培養する段階；および

(b) 培養物からポリペプチドを単離する段階。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は2001年8月13日に提出された米国特許仮出願第60/312,123号の優先権を主張する。

【0002】

技術分野

本発明は、診断方法、より詳しくは、乳癌の骨への転移および子癇前症を診断する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

転移性の骨腫瘍は、成人に認められる悪性骨病変の最も一般的なタイプであり、肺および肝臓に次いで最も発生率が高い転移部位である[Yonedaら(2000)、J. Orthop. Sci. 5(1): 75～81]。骨芽細胞性骨転移および溶骨性骨転移はいずれも、乳癌患者における病的状態が深刻化し、最終的には死亡の主な原因となる。乳癌のために死亡する女性の約75%が剖検時に骨転移を示す[Galasko、「Incidence and distribution of skeletal metastases」、C.S.B. Galasko(編)、「Skeletal Metastases」、14～21頁、バターワース、ロンドン、1986; Rubens、「The nature of metastatic bone disease.」、「Bone Metastases, Diagnosis and Treatment」、1～10頁、スプリンガー、ロンドン、1991]。

【0004】

子癇前症は、母親の死亡および周産期死亡の最もよくある原因の一つである[Robertsら(1993)、Lancet 341: 1447～1451]。

【0005】

上記の検討を考慮すると、乳癌の骨転移および子癇前症に関する単純で信頼できる試験を利用できることが重要である。

【発明の開示】

【0006】

概要

本発明者らは、当初骨芽細胞特異的因子-2(OSF-2)と呼ばれ、今ではペリオスチン[Take-shitaら(1993)、Biochem. J. 294: 272～278; Horiuchiら(1999)、J. Bone Miner. Res. 14: 1239～1249]と呼ばれているタンパク質の新規ヒト欠失変種を同定した。新規ペリオスチン変種の一つは、結腸癌細胞から単離され、TCG1と命名されている。特定の変種を明記せずにペリオスチンについて述べているテキストは、本明細書に開示の全ての変種に対して直接関係がある。本発明には、これらの新規ペリオスチンポリペプチド、それらをコードするDNAs、DNAsを含むベクター、およびベクターを含む細胞が含まれる。本発明はまた、ヒトペリオスチンに対して特異的なモノクローナル抗体(mAbs)、および試料(

10

20

30

40

50

例えば、血液試料)中のペリオスチンを測定するためにそのような抗体を用いるアッセイ法を特徴とする。さらに、本発明は、乳癌の骨への転移および子癇前症を診断する方法を具体化する。

【0007】

より詳しく述べると、本発明は、ヒトペリオスチンに対して特異的に結合する精製抗体を特徴とする。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体(mAb)、例えば5H8ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号CRL-2646)、8H11ハイブリドーマ(ATCCアクセッション番号_____)、1B11ハイブリドーマ、2C6ハイブリドーマ、6B1ハイブリドーマ、8E3ハイブリドーマ、10A3ハイブリドーマ、もしくは7E4ハイブリドーマによって分泌されるmAbとなりうる。同様に、ヒトペリオスチンに結合するmAbを分泌するハイブリドーマ、例えば上記の任意のハイブリドーマも本発明によって具体化される。

10

【0008】

本発明のもう一つの局面は、試料中のヒトペリオスチンを検出する方法である。方法は：(a)ヒトペリオスチンに結合する抗体に試料を接触させる段階；および(b)抗体が試料の成分に結合するか否かを決定する段階を含む。試料の成分に抗体が結合すれば、試料中にペリオスチンが存在することを示している。方法にはさらに、ヒトペリオスチンに結合する第1の抗体に試料を接触させる前に、ヒトペリオスチンに結合する第2の抗体に試料を接触させることが含まれうる。第1の抗体が結合するヒトペリオスチン上のエピトープは、第2の抗体が結合するエピトープと同じではない。第2の抗体は固相基質に結合させることができる。第1の抗体はポリクローナル抗体またはmAbとなりうる。mAbは上記の任意のハイブリドーマによって分泌されるmAbとなりうる。さらに、第2の抗体は、mAb(上記の任意のmAbsのような)またはポリクローナル抗体となりうる。方法は、例えば、イムノブロットアッセイ法またはELISAアッセイ法を含み、検出段階は例えば、化学発光、放射活性、または蛍光を検出することを含みうる。または、検出段階は、例えば、可視光または紫外光の吸光度を測定することを含みうる。第1の抗体はビオチン化することができ、検出段階はアビジンを用いることを含む。または、検出段階は、免疫グロブリン分子に結合する抗体を用いることを含む。

20

【0009】

乳癌の骨への転移を診断する方法も同様に本発明に含まれる。方法は(a)乳癌の骨への転移が疑われる、または転移のリスクを有する乳癌患者を同定する段階；および(b)患者からの体液試料中のペリオスチンレベルを測定する段階を含む。ペリオスチンの対照レベルと比較して、試料中のペリオスチンレベルが上昇すれば、患者が乳癌の骨への転移を有することが示される。体液は、血液または本明細書において引用した他の任意の体液、例えば尿となりうる。

30

【0010】

本発明のもう一つの局面は、患者にける子癇前症を診断する方法である。方法は(a)子癇前症を有することが疑われる、または子癇前症のリスクを有する妊娠患者を同定する段階；および(b)患者からの体液試料中のペリオスチンレベルを測定する段階を含む。ペリオスチンの対照レベルと比較して、試料中のペリオスチンレベルが上昇すれば、患者が子癇前症を有することを示している。体液は、血液または本明細書において引用した他の任意の体液、例えば尿となりうる。

40

【0011】

本発明のもう一つの局面は、配列番号：6または配列番号：14を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離されたDNAである；核酸配列は配列番号：5または配列番号：13となりうる。または、単離されたDNAは配列番号：4または配列番号：12を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含みうる；核酸配列は配列番号：3または配列番号：11となりうる。本発明にはまた、上記の任意のDNAsを含むベクター、例えば核酸配列が転写調節要素(TRE)に機能的に結合しているベクターも含まれる。同様に、上記の任意のベクターを含む細胞も本発明に含まれる。

【0012】

50

配列番号：4または配列番号：6、配列番号：12または配列番号：14を含む単離されたポリペプチドも同様に本発明の特徴である。本発明はまた、任意のポリペプチドの抗原性断片を提供する。断片は完全長のポリペプチドより短い。断片は、構成的に、配列番号：4の725番目および726番目の残基または配列番号：12の768～771番目の残基を含みうる。本発明の任意のポリペプチドを作製する方法も同様に本発明に含まれる。方法は（a）細胞が含むベクターに、ポリペプチドをコードする核酸配列に機能的に結合したTREが含まれる限り、本発明の任意の細胞を培養する段階；および（b）培養物からポリペプチドを単離する段階を含む。

【0013】

「ポリペプチド」および「タンパク質」は、互換的に用いられ、長さまたは翻訳後改変によらず、アミノ酸の任意のペプチド結合鎖を意味する。 10

【0014】

本発明において用いられる「単離された」ポリペプチドまたはペプチド断片という用語は、天然に存在する相対物を有しない、または例えば肺、腎臓、もしくは胎盤のような正常組織、結腸癌組織のような腫瘍組織、または血液、血清、もしくは尿のような体液において本来それが付随する成分から分離または精製されているポリペプチドまたはペプチド断片を意味する。典型的に、ポリペプチドまたはペプチド断片は、それが本来会合しているタンパク質および他の天然に存在する有機分子を乾燥重量で少なくとも70%含まない場合に「単離された」と見なされる。好ましくは、本発明のポリペプチド（またはそのペプチド断片）調製物は、本発明のポリペプチド（またはそのペプチド断片）を乾燥重量で少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%である。このように、例えば、ポリペプチドxの調製物は、ポリペプチドxの乾燥重量で少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%である。化学合成されるポリペプチドは、その特性によって、それが本来付随する成分から分離されていることから、合成ポリペプチドは「単離されて」いる。 20

【0015】

本発明の単離ポリペプチド（またはペプチド断片）は、例えば、天然起源（例えば、組織または体液）からの抽出によって；ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって；または化学合成によって得ることができる。それが本来由来する起源とは異なる細胞系において産生されたポリペプチドは、それが本来付随する成分を必ずしも含まないことから、「単離されている」。単離または純度の程度は、任意の適当な方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定することができる。 30

【0016】

「単離されたDNA」とは、（1）任意の天然に存在する配列とは同一でない配列を含むDNA、または（2）天然に存在する配列を有するDNA（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）の意味において、対象となるDNAを含む遺伝子が本来存在する生物のゲノムにおいて対象となるDNAを含む遺伝子に隣接する遺伝子を少なくとも一つ含まないDNA、のいずれかである。したがって、この用語には、ベクター、自律的に複製するプラスミドまたはウイルス、または原核細胞もしくは真核細胞のゲノムDNAに組み入れられた組換えDNAが含まれる。用語にはまた、対応するゲノムDNAがイントロンを有し、したがって異なる配列を有するcDNA；少なくとも一つの隣接遺伝子を欠損するゲノム断片；ポリメラーゼ連鎖反応によって産生され、少なくとも一つの隣接遺伝子を欠損するcDNAまたはゲノムDNAの断片；少なくとも一つの隣接遺伝子を欠損する制限断片；融合タンパク質、ムテイン、または所定のタンパク質の断片のような天然に存在しないタンパク質をコードするDNA；およびcDNAまたは天然に存在する核酸の縮重変種である核酸、といった分離された分子が含まれる。配列番号：3、配列番号：5、配列番号：11、または配列番号：13の一部が含まれる組換えDNAも同様に含まれる。「単離されたDNA」という用語には、例えば、cDNAもしくはゲノムDNAライブラリ内に存在するDNA、または例えば制限消化反応混合物もしくは電気泳動ゲルスライス中のゲノムDNA制限消化物は含まれない。 40

【0017】

本明細書において用いられるように、ペリオスチンポリペプチドの「抗原性断片」は、完全長のポリペプチドより短く、ペリオスチンに対して特異的な抗体に結合する完全長のポリペプチドの能力の少なくとも5%（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、100%またはそれ以上）を有するポリペプチドの断片である。対象となる断片は、組換え、合成、またはタンパク質溶解消化法によって作製することができる。次に、そのような断片を単離して、当技術分野で既知の方法によってペリオスチンに対して特異的な抗体との結合能に関して調べることができる。本明細書において用いられるように、「完全長の」ペリオスチンは、未成熟なペリオスチンであり、このようにペリオスチンの本来のシグナル配列を含む。

10

【0018】

本明細書において用いられるように、コード配列に「機能的に結合した」発現制御配列は、発現制御配列がコード配列の発現を有効に制御するように遺伝子構築物に組み入れられる。

【0019】

本明細書において用いられるように、「抗体」という用語は、全抗体分子のみならず、抗原結合断片、例えばFab、F(ab')₂、Fv、および一本鎖Fv(scFv)断片も意味する。本明細書において用いられるように、「scFv断片」は、単一のポリペプチド鎖において免疫グロブリン(Ig)重鎖およびIg軽鎖の抗原結合領域を含む抗体分子の組換え断片である。scFv断片は一般的に、(a) Ig重鎖もしくはIg軽鎖の定常領域を含まないか、または(b) Ig重鎖および/またはIg軽鎖の全定常領域より短い定常領域を含むかのいずれかである。同様にキメラ抗体も含まれる。

20

【0020】

本明細書において用いられるように、「非小細胞癌(NSCLC)組織におけるペリオスチン遺伝子の発現を調べる」とは、腫瘍内部および腫瘍に直ちに隣接するNSCLC細胞および間質細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現を、それがインビボで起こっているように調べることの意味する。

【0021】

特に定義していなければ、本明細書において用いる技術用語および科学用語は全て、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。矛盾する場合は、定義を含めて本文書が優先する。好ましい方法および材料を下記に説明するが、本明細書に記載したものと類似または同等の方法および材料を、本発明の実施または試験において用いることができる。本明細書において言及した全ての出版物、特許出願、特許、および他の参考文献はその全文が参照として本明細書に組み入れられる。本明細書に開示の材料、方法、および実施例は、説明するためであって、制限すると解釈してはならない。

30

【0022】

本発明の他の特徴および長所、例えば、乳癌の骨への転移の試験は、以下の説明、図面、および請求の範囲から明らかとなるであろう。

【0023】

詳細な説明

40

様々な組織から単離したRNAの逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析のcDNA産物のシーケンシングから、ヒトペリオスチンの新規スプライス変種が明らかとなった。胎盤および肺において発現される一つの変種を、本明細書においてペリオスチンLと呼ぶ。腎臓において発現されるもう一つの変種をペリオスチンKと呼ぶ。さらに、結腸癌組織および正常結腸組織に由来するcDNAのディファレンシャルディスプレイによって誘導されたDNA断片によるヒト癌のcDNAライブラリのスクリーニングから、結腸癌細胞において過剰発現された転写物が同定された。同定されたcDNA分子は、ペリオスチン分子のもう一つの変種(本明細書においてTCG1またはペリオスチンCと名付ける)をコードする。

【0024】

本発明者らはまた、ペリオスチンに結合するポリクローナル抗体(E17)および多様なモ

50

ノクローナル抗体を産生した。これらの抗体を用いて、本発明者らは検出のために化学発光を用いる「サンドイッチ」ELISAアッセイ法を開発した。

【0025】

臨床試験において、本発明者らは、骨転移を有する乳癌患者において（骨転移の兆候を示さない乳癌患者と比較して）、および子癇前症の患者において（血圧が正常な妊娠女性と比較して）ペリオスチンの血清レベルが上昇していることを示した。多様な肺癌を有する患者の試験において、患者の24%の血清中ペリオスチンレベルが上昇していることが判明した。その上、レベルが非常に高い（すなわち、 $> 1,000 \text{ ng/ml}$ ）患者は全員死亡した。これらの知見は、ペリオスチンが癌（例えば、肺癌）、特に進行癌のマーカーであることを示唆している。それらはまた、乳癌における骨転移および子癇前症を診断するアッセイ法のための基礎となる。

10

【0026】

さらに、卵巣癌および脳腫瘍細胞は、ペリオスチンを過剰発現する[Ismailら(2000)、Cancer Res. 60: 6744~6749; Lalら(1999)、Cancer Res. 59: 5403~5407]。

【0027】

ペリオスチン核酸分子

本発明のペリオスチン核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、またはRNAとなりえて、二本鎖または一本鎖（すなわちセンスまたはアンチセンス鎖のいずれか）となりうる。これらの分子のセグメントも同様に、本発明の範囲内であると見なされ、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって産生することができ、または一つまたはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼによる処置によって産生することができる。リボ核酸（RNA）分子は、インビトロ転写によって産生することができる。好ましくは、核酸分子は、長さによらず、通常の生理的条件下で可溶性であるポリペプチドをコードする。

20

【0028】

本発明の核酸分子は、天然に存在する配列、または天然に存在する配列とは異なるが、遺伝子コードの縮重のために同じポリペプチドをコードする配列（例えば、配列番号：4、6、12および14のポリペプチド）を含みうる。さらに、これらの核酸分子はコード配列に限定されない、例えばそれらにはコード配列から上流または下流に存在する非コード配列の一部または全てが含まれうる。

【0029】

本発明の核酸分子は合成することができる（例えば、ホスホラミダイトに基づく合成）、または哺乳類の細胞のような生物細胞から得ることができる。核酸は、ヒト、ヒト以外の霊長類（例えば、サル）、マウス、ラット、モルモット、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、またはネコの核酸となりうる。これらの核酸種のなかでのヌクレオチドの組み合わせまたは改変も同様に含まれる。

30

【0030】

さらに、本発明の単離された核酸分子は、天然の状態ではそのように認められないセグメントを含む。このように、本発明は、組換え核酸分子（例えば、ベクター（例えば、プラスミドもしくはウイルスベクター）、または異種細胞のゲノム（または、天然の染色体の位置以外の位置で相同な細胞のゲノム）に組み入れられたペリオスチンをコードする単離核酸分子）を含む。組換え核酸分子およびその利用は、下記にさらに詳しく考察する。

40

【0031】

遺伝子の検出または調節に関連した技術は、当業者に周知である。そのような技術は、異常なペリオスチン発現に関連した障害を診断および/または治療するために用いることができる。

【0032】

ペリオスチンファミリー遺伝子またはタンパク質は、それぞれ、関連するペリオスチン遺伝子またはタンパク質とのその類似性に基づいて同定することができる。例えば、同定は、配列同一性に基づくことができる。本発明は、（a）配列番号：2、4、6または8のヌクレオチド配列、および（b）配列番号：3、5、11、または13の少なくとも30（例えば、少

50

なくとも50、100、150、150、200、250、300、350、400、500、700、900、1,100、1,400、1,700、2,000、2,200、2,250、2,300、または2,310)ヌクレオチドのセグメントを含む核酸分子、と少なくとも50% (または55%、65%、75%、85%、95%、または98%) 同一である単離された核酸分子を特徴とする。

【0033】

2つの配列間の%同一性の決定は、KarlinおよびAltschul (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873~5877の数学的アルゴリズムを用いて行われる。そのようなアルゴリズムは、Altschulら (1990)、J. Mol. Biol. 215: 403~410のBLASTNおよびBLASTPプログラムに組み入れられている。BLASTヌクレオチド検索は、ペリオスチンコード核酸と相同なヌクレオチド配列を得るために、BLASTNプログラムによって、スコア = 100、ワード長 = 12で行われる。BLASTタンパク質検索は、ペリオスチンポリペプチドと相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTPプログラムによって、スコア = 50、ワード長 = 3で行われる。比較目的のためのギャップを挿入したアラインメントを得るために、Altschulら (1997)、Nucleic Acids Res. 25: 3389~3402に記述されるようなギャップドBLASTを用いる。BLASTおよびギャップドBLASTプログラムを用いる場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ (例えば、XBLASTおよびNBLAST) を用いる (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい)。

10

【0034】

ハイブリダイゼーションはまた、2つの核酸配列のあいだの相同性の手段として用いることができる。ペリオスチンコード核酸配列またはその一部は、標準的なハイブリダイゼーション技術に従ってハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。ペリオスチンプローブと試験源 (例えば、哺乳類細胞) からのDNAまたはRNAがハイブリダイズすれば、試験源にペリオスチンDNAまたはRNAが存在することが示される。ハイブリダイゼーション条件は当業者に既知であり、「Current Protocols in Molecular Biology」、ジョンウィリー & サンズ、ニューヨーク、6.3.1~6.3.6、1991に認めることができる。中等度のハイブリダイゼーション条件は、2×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) において30 でのハイブリダイゼーションの後、1×SSC、0.1% SDSにおいて50 での洗浄と同等であると定義される。非常にストリンジェントな条件は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) において45 でのハイブリダイゼーションの後、0.2×SSC、0.1% SDSにおいて65 での洗浄と同等であると定義される。

20

30

【0035】

本発明はまた、以下を含む: (a) 任意の前述のペリオスチン関連コード配列および/またはその相補体 (すなわち、「アンチセンス」配列) を含むベクター (下記参照); (b) コード配列の発現を指示するために必要な任意の転写/翻訳調節要素 (その例を下記に示す) に機能的に結合した任意の前述のペリオスチン関連コード配列を含む発現ベクター; (c) ペリオスチンポリペプチドの他に、レポーター、マーカー、またはペリオスチンに融合したシグナルペプチドといったペリオスチンに無関係な配列をコードする発現ベクター; および (d) 任意の前述の発現ベクターを含み、それによって本発明の核酸分子を発現する遺伝子操作された宿主細胞 (下記参照)。

【0036】

組換え核酸分子は、ペリオスチンまたは異種シグナル配列を有するペリオスチンをコードする配列を含みうる。完全長のペリオスチンポリペプチド、またはその断片を、下記のようにそのような異種シグナル配列またはさらなるポリペプチドに融合させてもよい。同様に、本発明の核酸分子は、ペリオスチンの成熟型または分泌を促進する外因性のポリペプチドを含む型をコードしうる。

40

【0037】

上記で述べたそしてさらに後に記述する転写/翻訳調節要素には、誘導型および非誘導型プロモーター、エンハンサー、オペレーター、および当業者に既知で、遺伝子発現を促進またはそうでなければ調節する他の要素が含まれるがこれらに限定されない。そのような調節要素には、サイトメガロウイルスhCMV前初期遺伝子、SV40アデノウイルスの初期また

50

は後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージAの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fd外皮タンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター、および酵母α接合因子のプロモーターが含まれるがこれらに限定されない。

【0038】

同様に、核酸は、さらなるポリペプチド配列、例えばマーカーまたはレポーターとして機能する配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部を形成することができる。マーカーおよびレポーター遺伝子の例には、βラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、アデノシンデアミナーゼ (ADA)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (neo^r、G418^r)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ (HPH)、チミジンキナーゼ (TK)、lacZ (βガラクトシダーゼをコードする)、およびキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPR) が含まれる。本発明の実施に関連する多くの標準的な技法に関して、当業者はさらに有用な試薬、例えば、マーカーまたはレポーターの機能の役割を果たすことができるさらなる配列を知っているであろう。一般的に、ハイブリッドポリペプチドには、第1の部分と第2の部分とが含まれ、第1の部分はペリオスチンポリペプチドであり、第2の部分は例えば上記のレポーターまたはIg定常領域もしくはIg定常領域の一部、例えば、IgG2a重鎖のCH2およびCH3ドメインである。他のハイブリッドには、精製を促進するために抗原性タグまたはHisタグが含まれる。

10

【0039】

本発明の目的のために用いてもよい発現系には、本発明の核酸分子を含む組換えバクテリアファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターによって形質転換した細菌 (例えば、大腸菌および枯草菌 (*B. subtilis*)) ; 本発明の核酸分子を含む組換え酵母発現ベクターによって形質転換した酵母 (例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) およびピチア (*Pichia*)) のような微生物 ; 本発明の核酸分子を含む組換えウイルス発現系 (例えば、バキュロウイルス) に感染させた昆虫細胞系 ; ペリオスチンヌクレオチド配列を含む組換えウイルス発現ベクター (例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)) もしくはタバコモザイクウイルス (TMV)) を感染させた、もしくは組換えプラスミド発現ベクター (例えば、Tiプラスミド) によって形質転換した植物細胞系 ; または哺乳類細胞のゲノム (例えば、メタロチオネインプロモーター) もしくは哺乳類ウイルス (例えば、アデノウイルス後期プロモーターおよびワクシニアウイルス7.5 Kプロモーター) に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を有する哺乳類細胞系 (例えば、COS、CHO、BHK、293、VERO、HeLa、MDCK、WI38、およびNIH3T3細胞) が含まれるがこれらに限定されない。同様に宿主細胞として有用であるのは、哺乳類から直接得て、プラスミドベクターをトランスフェクトしたまたはウイルスベクターを感染させた一次または二次細胞である。

20

30

【0040】

本発明の発現ベクターをトランスフェクトまたは形質導入した細胞は、例えば、当技術分野で既知の方法によってペリオスチンポリペプチドまたは抗原性断片をインビトロで大規模または小規模に産生するために用いることができる。本質的に、そのような方法は、ポリペプチドまたは抗原性断片の産生を最大限にする条件で細胞を培養すること、および細胞または培養培地からそれを単離することを含む。

40

【0041】

ペリオスチンポリペプチドおよびポリペプチド断片

本発明のポリペプチドには、ペリオスチンL、シグナルペプチドを含まないペリオスチンL、ペリオスチンC、およびシグナルペプチドを含まないペリオスチンCと共に、これらのポリペプチドの抗原性断片が含まれる。ペリオスチンLの抗原性断片には、連続的に (a) 配列番号 : 4の669番目および670番目の残基および / または (b) 配列番号 : 4の725番目および726番目の残基が含まれる。ペリオスチンCの抗原性断片には、連続的に、(a) 配列番号 : 12の669番目および670番目の残基および / または (b) 配列番号 : 12の768 ~ 771番

50

目の残基が含まれる。抗原性断片にはまた、N末端のアミノ酸残基18、19、20、21、22、23、24、または25個が欠失している任意のペリオスチン分子の完全長型が含まれる。本発明に含まれるポリペプチドにはまた、無関係なアミノ酸配列に融合した完全長のペリオスチン（本明細書に開示の任意の形を含む）またはその抗原性断片のいずれかを含む融合タンパク質が含まれる。無関係な配列は、さらなる機能的ドメインまたはシグナルペプチドとなりうる。シグナルペプチドは下記により詳細に説明して示す。ポリペプチドは、保存的置換を多くて50個（すなわち、多くて、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個）含む上記の任意のポリペプチドとなりうる。

【0042】

ペリオスチン分子およびその抗原性断片のアミノ酸配列は、それらが野生型ペリオスチン分子において起こるようにそれぞれ、ペリオスチン分子の野生型配列および断片の配列と同一となりうる。または、任意の成分は欠失、付加、または置換のような変異を含みうる。必要条件は、野生型ペリオスチン分子またはその抗原性断片が、野生型ペリオスチン分子において起こるように野生型ペリオスチンに対して特異的な抗体に結合する能力の少なくとも5%（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%またはそれ以上）を、変異体ペリオスチン分子が有することである。置換は、好ましくは保存的置換である。保存的置換には典型的に、以下の群内での置換が含まれる：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシン、およびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリン、およびトレオニン；リジン、ヒスチジン、およびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。

【0043】

ポリペプチドは、天然の起源（例えば、血液、血清、血漿、正常な肺もしくは胎盤のような組織もしくは細胞、結腸癌組織、またはペリオスチンポリペプチドを本来産生する任意の細胞）から精製することができる。ペリオスチン分子および抗原性断片は、ヒト、ヒト以外の霊長類（例えば、サル）、マウス、ラット、モルモット、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、またはネコの分子となりうる。より小さいペプチド（長さがアミノ酸100個未満）も同様に、標準的な化学的手段によって都合よく合成することができる。さらに、ポリペプチドおよびペプチドはいずれも、適当なポリペプチドまたはペプチドをコードするヌクレオチド配列を用いて、標準的なインビトロ組換えDNA技術およびインビトロトランスジェネシスによって産生することができる。当業者に周知の方法を用いて、関連するコード配列および適当な転写／翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」（第2版）、[コールドスプリングハーバー研究所、ニューヨーク、1989]およびAusubelら「Current Protocols in Molecular Biology」[グリーンパブリッシングアソシエーツ&ウィリーインターサイエンス、ニューヨーク、1989]に記載の技術を参照されたい。

【0044】

本発明のポリペプチドおよび抗原性断片は、抗ペリオスチン抗体を作製するために、またはペリオスチン機能に関する基礎研究、例えば様々な癌および子癇前症とのその関連の重要性に関する研究のために用いることができる。ポリペプチドおよび機能的断片も同様に、本発明の診断アッセイ法において陽性対照として用いることができる（下記を参照されたい）。

【0045】

本発明のポリペプチドおよび断片にはまた、インビボで関連するポリペプチドの生存を促進するためにブロッキング剤をアミノおよび／またはカルボキシ末端で付加することによって、インビボで用いられるように改変されている上記のポリペプチドおよび断片が含まれる。これは、ペプチド末端が細胞に取り込まれる前にプロテアーゼによって分解される傾向がある状況では有用となりうる。そのようなブロッキング剤には、投与されるペプチドのアミノおよび／またはカルボキシ末端残基に結合させることができるさらに関連するまたは無関係なペプチド配列が含まれうるがこれらに限定されない。これは、当業者に公知の方法によって、ペプチド合成の際に化学的にまたは組換えDNA技術によって行うこと

10

20

30

40

50

ができる。

【0046】

または、ピログルタミン酸または当技術分野で既知の他の分子のようなブロッキング剤をアミノおよび/またはカルボキシ末端に結合させることができ、またはアミノ末端のアミノ基またはカルボキシ末端のカルボキシ基を異なる部分に置換することができる。同様に、ペプチドは、投与前に、薬学的に許容される「担体」タンパク質に共有結合または非共有結合によってカップリングさせることができる。

【0047】

同様に、機能的ペプチド断片のアミノ酸配列に基づいて設計されたペプチド模倣化合物も重要である。ペプチド模倣化合物は、選択したペプチドの三次元コンフォメーションと実質的に同じである三次元コンフォメーション（すなわち、「ペプチドモチーフ」）を有する合成化合物である。ペプチドモチーフは、ペプチド模倣体が由来するペリオスチン機能的断片と質的に同一のように、ペリオスチンに対して特異的な抗体との結合能を有するペプチド模倣化合物を提供する。ペプチド模倣化合物は、細胞透過性の増加および生物学的半減期の延長のような、インビボ有用性を増強させるさらなる特徴を有しうる。

10

【0048】

ペプチド模倣体は典型的に、部分的または完全に非ペプチドである骨格を有するが、側鎖は、ペプチド模倣体に基づくペプチドに起こるアミノ酸残基の側鎖と同一である。いくつかの化学結合種、例えば、エステル、チオエステル、チオアミド、レトロアミド、還元カルボニル、ジメチレンおよびケトメチレン結合は、当技術分野において、プロテアーゼ抵抗性ペプチド模倣体を構築するためのペプチド結合の一般的に有用な代用結合であることが知られている。

20

【0049】

本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片のインビボ半減期はまた、本来の分子または機能的断片のL-アミノ酸残基の全てまたは一部をD-アミノ酸に置換することによって延長させることができる。

【0050】

ペリオスチン抗体

本発明は、任意のペリオスチンポリペプチドまたはそのようなポリペプチドの断片に特異的に結合する抗体を特徴とする。そのような抗体は、当技術分野で既知の方法と選択的にアジュバントとを用いて、関連するペリオスチンポリペプチドまたはペプチド断片によって免疫した動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ヒツジ、ウマ、ヤギ、ウシまたはブタ）の血清または血漿中に存在するポリクローナル抗体となりうる。そのようなポリクローナル抗体は、当技術分野で既知の方法によって、例えば、血清、血漿、または腹水から単離することができる。そのようなポリクローナル抗体の例は、E17ポリクローナル抗体である。上記のポリペプチドまたは断片に結合するモノクローナル抗体も同様に本発明に含まれる。モノクローナル抗体を作製およびスクリーニングする方法は当技術分野で周知である。

30

【0051】

所望の抗体産生ハイブリドーマを選択してクローニングした後、得られた抗体を当技術分野で既知の多くのインビボおよびインビトロ法によって産生することができる。例えば、ハイブリドーマを適した培地において適した時間インビトロで培養した後、上清から所望の抗体を回収することができる。培養期間および培地は既知であるか、または容易に決定することができる。

40

【0052】

さらに、ヒトの部分と非ヒトの部分とを含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体のような、ペリオスチンに対する特異的な組換え抗体が、本発明の範囲に含まれる。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、Robinsonら、国際特許出願PCT/US第86/02269号；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；Taniguchi、欧州特許出願第171,496号；Morrisonら、欧州特許出願第173,494号；Nerbergerら、PCT出願国際公開公報第86/01533号；C

50

abillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許出願第125,023号；Betterら（1998）Science 240：1041～43；Liuら（1987）J. Immunol. 139：3521～26；Sunら（1987）、PNAS 84：214～18；Nishimuraら（1987）Canc. Res. 47：999～1005；Woodら（1985）Nature 314：446～49；Shawら（1988）J. Natl. Cancer Inst. 80：1553～59；Morrison（1985）Science 229：1202～07；Oiら（1986）BioTechniques 4：214；Winter、米国特許第5,225,539号；Jonesら（1986）Nature 321：552～25；Verwoeyら（1988）Science 239：1534；およびBeidlerら（1988）J. Immunol. 141：4053～60に記載される方法を用いて、当技術分野で既知の組換えDNA技術によって産生することができる。

【0053】

ペリオスチンに特異的に結合する抗体の抗原決定ドメインの少なくとも機能的部分を含む抗体断片および誘導体も同様に、本発明の範囲に含まれる。分子の結合ドメインを含む抗体断片は、既知の技術によって作製することができる。例えば、そのような断片には、以下が含まれるがこれらに限定されない：抗体分子のペプシン消化によって産生することができるF(ab')₂断片；F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製することができるFab断片；およびパインと還元剤とによって抗体分子を処理することによって作製することができるFab断片。例えば、米国国立衛生研究所、「1 Current Protocols in Immunology」、Coliganら編2.8、2.10（ウィリーインターサイエンス、1991）を参照されたい。抗体断片にはまた、Fv（例えば、一本鎖Fv(scFv)）断片、すなわち定常領域アミノ酸残基をほとんどまたは全く有しない抗体産物が含まれる。scFv断片は、scFvが由来する抗体の重鎖および軽鎖可変領域の双方を含む単一のポリペプチド鎖である。そのような断片は、例えばその全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,642,334号に記載されるように産生することができる。

【0054】

本発明の抗体は、すべてのペリオスチンスプライス変種、スプライス変種体のサブグループ、または単一のスプライス変種に結合することができる。スプライス変種特異的抗体を作製してスクリーニングする方法は当業者に既知である。例えば、ペリオスチン変種xには存在しないがペリオスチン変種yには存在するペリオスチンドメインに対して特異的な抗体を作製することが望ましい場合、ペリオスチン変種yによって動物（例えば、マウス）を免疫して、ペリオスチン変種yに結合するがペリオスチン変種xには結合しない抗体を選択することができるであろう。または、動物を、対象となるドメインからなるペリオスチンの機能的断片によって免疫することができるであろう。抗体は、ペリオスチンの機能的断片と変種yとに結合できるが、変種xに結合できないことに基づいて選択することができるであろう。

【0055】

出願人は、ブダペスト条約に基づいて5H8および8H11ハイブリドーマをアメリカ、メリーランド州20852ロックビルのアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）に寄託した。5H8ハイブリドーマはATCCアクセッション番号CRL-2646、そして8H11ハイブリドーマはATCCアクセッション番号_____を与えられた。ATCCに寄託されたハイブリドーマは、本出願の優先権の日付より前以降、ダナ・ファーマー癌研究所によって維持された寄託物から作製した。ハイブリドーマの寄託は、ATCC寄託所において30年間、一番最近の要請から5年間、または特許の有効期限内のいずれかの長いあいだ、制限されることなく維持され、寄託物がその期間に死滅した場合には取り替えられるであろう。

【0056】

診断アッセイ法

本発明はさらに診断アッセイ法を特徴とする。そのようなアッセイ法は、ペリオスチンの血清レベルが、骨転移を有する乳癌患者において（骨転移の兆候を示さない乳癌患者と比較して）および子癰前症の患者において（血圧が正常な妊娠女性と比較して）上昇しているという知見に基づいている。これらの知見は、乳癌における骨転移および子癰前症を診断するアッセイ法の基礎を提供する。そのようなアッセイ法は、単独で、または好ましくは関連する臨床状態を調べるための他の技法と共に用いることができる。

10

20

30

40

50

【0057】

本発明のアッセイ法において、(1) 癌組織におけるペリオスチンタンパク質もしくはペリオスチン mRNA の存在を調べるもしくはそのレベルを測定する、または(2) 体液(例えば、尿、唾液、精液、血液、または血液に由来する血清もしくは血漿)、肺洗浄液、胃洗浄液、直腸もしくは結腸洗浄液、もしくは腔洗浄液のような洗浄液、または細胞培養物からの上清のような液体、のような液体試料中のペリオスチンタンパク質レベルを測定することのいずれかを行う。細胞におけるペリオスチン mRNA レベルの有無を調べるまたはレベルを測定するために、細胞を溶解して、当技術分野で既知の多様な任意の方法によって、総 RNA を溶解物から精製または半精製することができる。特定の mRNA 転写物レベルを検出または測定する方法も当業者に周知である。そのようなアッセイ法には、検出可能に標識したペリオスチン特異的 DNA またはプローブを用いるハイブリダイゼーションアッセイ法、および適当なペリオスチン特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる定量的または半定量的 RT-PCR 方法論が含まれるがこれらに限定されない(実施例1を参照されたい)。細胞溶解物における mRNA を定量するさらなる方法には、RNA 保護アッセイ法および連続遺伝子発現分析(SAGE)が含まれる。または、例えば組織切片または非溶解細胞浮遊液、および検出可能に(例えば、蛍光もしくは酵素)標識した DNA または RNA プローブを用いて、定性的、定量的、または半定量的インサイチューハイブリダイゼーションアッセイ法を行うことができる。

10

【0058】

細胞において対象となるタンパク質(例えば、ペリオスチン)のレベルを検出または測定する方法は当技術分野で既知である。そのような多くの方法は、タンパク質に特異的に結合する抗体(例えば、ポリクローナル抗体または mAb)を用いる。そのようなアッセイ法において、抗体そのもの、またはそれに結合する二次抗体を検出可能に標識することができる。または、抗体は、ビオチンに結合させることができ、検出可能に標識したアビジン(ビオチンに結合するタンパク質)を用いてビオチン化抗体の有無を検出することができる。当業者に周知であるこれらのアプローチ(「多層」アッセイ法を含む)の組み合わせを用いて、アッセイ法の感度を増強することができる。これらのアッセイ法のいくつか(例えば、免疫組織学的方法または蛍光フローサイトメトリー)を組織切片または非溶解細胞浮遊液に適用することができる。液体試料中のペリオスチンを検出するための下記の方法はまた、細胞溶解物中のペリオスチンを検出するために用いることができる。

20

30

【0059】

液体試料中のペリオスチンを検出する方法(上記)は基本的に、ペリオスチンを含むことが疑われる試料を本発明の抗体に接触させる段階、および試料の成分に対する抗体の結合を調べる段階を含む。そのようなアッセイ法において、抗体は検出可能に標識する必要はなく、ペリオスチンに結合する第2の抗体を用いずに用いることができる。例えば、表面プラズモン共鳴現象を活用することによって、適当な固相基質に結合したペリオスチンに対して特異的な抗体を試料に曝露する。固相基質上の抗体に対するペリオスチンの結合によって、表面プラズモン共鳴の強度が変化して、これを適当な機器、例えばピアコア装置(ピアコアインターナショナル AB (Biacore International AB)、ラプスガタン、スウェーデン)によって定性的または定量的に検出することができる。

40

【0060】

その上、液体試料中のペリオスチンを検出するためのアッセイ法は、例えば(a)検出可能に標識した単一のペリオスチン特異的抗体；(b)非標識ペリオスチン特異的抗体および検出可能に標識した二次抗体；または(c)ビオチン化ペリオスチン特異的抗体と検出可能に標識したアビジン、を用いることを含みうる。さらに、細胞におけるタンパク質の検出に関して先に記述したように、当業者に周知のこれらのアプローチ(「多層」アッセイ法を含む)の組み合わせを用いて、アッセイ法の感度を増強することができる。これらのアッセイ法において、ペリオスチンを含むことが疑われる試料(または少量のアリコート)は、例えば液体試料の少量を「スポッティングする」ことによって、または試料もしくは少量のアリコートを電気泳動で分離し、電気泳動ゲルをプロッティングすることによ

50

って、ナイロンまたはニトロセルロースメンブレンのような固相基質上に固定することができる。次に、固相基質上のペリオスチンの存在または量を、ペリオスチン特異的抗体の上記の任意の型、および必要であれば、適当な検出可能に標識した二次抗体またはアビジンを用いてアッセイする。

【0061】

本発明はまた、「サンドイッチ」アッセイ法を特徴とする。これらのサンドイッチアッセイ法では、上記の方法によって固相基質上に試料を固定する代わりに、試料中に存在する可能性がある任意のペリオスチンを、固相基質を試料に曝露する前に、当技術分野で既知の多様な任意の方法によって第2の（「捕獲」）ペリオスチン特異的抗体（ポリクローナル抗体またはmAb）を固相基質に結合させることによって、固相基質に固定することができ10
（または少量のアリコート）中の任意のペリオスチンが、固相基質上の第2のペリオスチン特異的抗体に結合するであろう。次に、結合した第2のペリオスチン特異的抗体に結合したペリオスチンの有無または量を、単一のペリオスチン特異的抗体を用いる上記の方法と本質的に同じ方法によって、「検出用の」ペリオスチン特異的抗体を用いることによってアッセイする。これらのサンドイッチアッセイ法において、捕獲抗体は、検出アッセイ法と同じエピトープ（またはポリクローナル抗体の場合にはある範囲のエピトープ）に結合してはならないと理解される。このように、mAbを捕獲抗体として用いる場合、検出抗体は、（a）それに対して捕獲mAbが結合するエピトープとは完全に物理的に離れている、もしくはごく部分的に重なっているに過ぎないエピトープに結合するもう一つのmAb、また20
または（b）それに対して捕獲mAbが結合するエピトープ以外のもしくはそのエピトープの他にエピトープに結合するポリクローナル抗体のいずれかとなりうる。一方、ポリクローナル抗体を捕獲抗体として用いる場合、検出抗体は、（a）それに対して捕獲ポリクローナル抗体が結合する任意のエピトープとは完全に物理的に離れている、もしくは部分的に重なり合うエピトープに結合するmAb、または（b）捕獲ポリクローナル抗体が結合するエピトープ以外のまたはそのエピトープの他にエピトープに結合するポリクローナル抗体、のいずれかとなりうる。捕獲および検出抗体を用いることを含むアッセイ法には、サンドイッチELISAアッセイ法、サンドイッチウェスタンブロットアッセイ法、およびサンドイッチ免疫磁気検出アッセイ法が含まれる。

【0062】

それに対して捕獲抗体が結合することができる適した固相基質には、マイクロタイタープレートのウェルのプラスチックの底および側面、ナイロンまたはニトロセルロースメンブレンのようなメンブレン、ポリマー（例えば、アガロース、セルロース、またはポリアクリルアミド、これらに限定されない）ビーズまたは粒子が含まれるがこれらに限定されない。そのようなビーズまたは粒子に結合したペリオスチン特異的抗体も同様に、ペリオスチンの免疫アフィニティ精製のために用いることができることに注目される。

【0063】

検出可能な標識を検出または定量する方法は、標識の特性に依存して、当技術分野において既知である。適当な標識には、放射性核種（例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{32}P 、または ^{14}C ）、蛍光部分（例えば、フルオレセイン、ローダミン、またはフィコエリスリン）40
、発光部分（例えば、クアンタムドットコーポレーション（Quantum Dot Corporation）、カリフォルニア州パロアルト）によって供給されるQdot（商標）ナノ粒子、規定の波長の光を吸収する化合物、または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）が含まれるがこれらに限定されない。適当な酵素によって触媒される反応産物は、蛍光、発光、もしくは放射活性物質となりうるがこれらに限定されず、または可視光もしくは紫外光を吸収してもよい。検出器の例には、x線フィルム、放射活性カウンター、シンチレーションカウンター、分光光度計、比色計、蛍光計、発光計、および濃度計が含まれるがこれらに限定されない。

【0064】

乳癌の骨転移を診断するアッセイ法において、例えば、一つまたはそれ以上の骨転移を有50

することが疑われる乳癌患者の血清中のペリオスチン濃度を対照値と比較する。この対照値は、例えば、骨転移が検出されない乳癌患者の対照群におけるペリオスチン濃度の平均値となりうる。または、患者の血清中のペリオスチンレベルは、乳癌診断後の様々な時期に測定することができる。測定前と比較して特定の時点で血清中に検出されたペリオスチンレベルが増加すれば、患者の乳癌が骨に転移したことを示すであろう。この場合、関連する先の測定値が対照値となるであろう。対照値と比較して患者の血清中のペリオスチン濃度が有意に高ければ、患者の乳癌が骨に転移したことを示すであろう。

【0065】

子癇前症を診断するアッセイ法において、患者の血清中ペリオスチンレベルを対照値と比較する。対照値は、例えば、血圧が正常な妊娠女性の対照群の血清におけるペリオスチン濃度の平均値となりうる。患者および対照被験者からの血清試料は、ほぼ同じ妊娠段階で得られるはずである。子癇前症の患者の血清中のペリオスチンレベルの有意な増加は、レベルが妊娠期と共に上昇する第1トリメスターもの早期に検出することができる。このように、もう一つの対照値は、妊娠初期段階で対象となる患者における血清中ペリオスチンレベルとなりうるであろう。対照値と比較して患者の血清中のペリオスチンの濃度が有意に高ければ、患者が子癇前症を有することが示されるであろう。

10

【0066】

診断アッセイ法に関する上記の説明は、血清に関するアッセイ法について言及したが、アッセイ法はまた、本明細書に記載の他の任意の液体試料について行うことができると理解される。さらに、上記の患者および対照被験者は、ヒト患者である必要はないことに注意すべきである。それらは例えば、ヒト以外の霊長類（例えば、サル）、ウマ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、イヌ、モルモット、ハムスター、ラット、ウサギ、またはマウスとなりうる。

20

【0067】

以下の実施例は、本発明を説明するためであって制限することを意味しない。

【0068】

実施例

実施例1. 方法および材料

骨転移の試験における患者

本試験には、ダナ・ファーマー癌研究所においてネオアジュバント化学療法および/または骨髄移植を受けた乳癌患者58人と肺の小細胞癌患者44人が含まれた。

30

【0069】

全ての試験について血液試料を採取して、採取後2時間以内に処理した。血清はアッセイするまで-80℃で保存した。

【0070】

子癇前症の試験における患者

子癇前症の未経産妊娠女性30人を、マギー女性病院（ペンシルバニア州ピッツバーグ）の正常な未経産妊娠女性30人と妊娠期に応じてマッチさせた。マギー女性研究所（ピッツバーグ大学、ペンシルバニア州ピッツバーグ）での院内審査委員会が承認した子癇前症に関する縦断的試験の一部としてインフォームドコンセントを得て、第3トリメスター（妊娠約36週）において血液試料を得た。子癇前症は、血圧が拡張期で15 mmHgまたは収縮期で30 mmHg増加し、タンパク尿（カテーテル挿管尿について300 mg/24時間または1+、または排出尿に関して2+、またはタンパク質クレアチニン比が0.3で高尿酸血症がそれぞれの妊娠期の正常値を>1SD上回る）を有する初めての満期産妊娠女性において診断された。本試験における患者はいずれも、あいまいな血圧の増加を有さず、すなわち患者は全員収縮期圧が少なくとも140 mmHgを維持して、拡張期圧90 mmHgを維持した。

40

【0071】

抗体の産生

発現ベクターCMV-6×His-ペリオスチンは、（a）異種リーダー配列；および（b）エンテロキナーゼ認識配列によってヘキサヒスチジン配列、に結合した成熟ヒトペリオスチンC

50

(下記参照)をコードするcDNA配列を含む。発現ベクターCMV-Fc-ペリオスチンは、(a)異種リーダー配列、および(b)マウス免疫グロブリン γ_2a 重鎖定常領域(「Fc-ペリオスチン」)[Loら(1998)、Protein Eng. 11:495~500]、に結合した成熟ヒトペリオスチンCをコードするcDNA配列を含む。発現ベクターはいずれも、NS/Oマウス骨髄腫細胞株の電気穿孔によってトランスフェクトして、安定にトランスフェクトした細胞をメソトレキセートによって選択した。CMV-6×His-ペリオスチントランスフェクト細胞株によって産生されたペリオスチン(「His-ペリオスチン」)を、HisBind精製キット(ノバゲン(Novagen)、ウィスコンシン州マジソン)を用いて培養上清から精製した。ヒスチジンタグをエンテロキナーゼ(インビトロジェン(Invitrogen)、カリフォルニア州カールスバッド)によって切断した後、ペリオスチンタンパク質をウサギに注射した。この免疫によって産生されたE17ポリクローナル抗体を、Affi-ゲル10をCMV-6×His-ペリオスチントランスフェクト細胞によって産生したペリオスチンに結合させたAffi-ゲル10カラム(アマシャム・ファルマシア・バイオテック(Amersham Pharmacia Biotech)、ニュージャージー州ピスカタウェイ)上でアフィニティ精製した。

10

【0072】

同様に、Fc-ペリオスチンは、CMV-Fc-ペリオスチントランスフェクト細胞株の培養上清から、プロテインAアフィニティクロマトグラフィー(アマシャム・ファルマシア・バイオテック)によって精製した。Fc-ペリオスチン融合タンパク質をマウスに注射して、標準的な技法を用いて5H8モノクローナル抗体(mAb)を産生した。他のヒトペリオスチン特異的mAb(1B11、2C6、6B1、8H11、8E3、10A3、および7E4)は、同じ方法によって誘導した。mAbsは全てIgGクラスである。5H8および8H11 mAbsはIgG1サブクラスであり、 κ 軽鎖を有する。精製5H8 IgG抗体は、スルホ-NHS-LS-ビオチン化キット(ピアス(Pierce)、イリノイ州ロックフォード)を用いてビオチン化した。

20

【0073】

細胞培養

mAb産生ハイブリドーマおよび悪性中皮腫細胞株、JMN1Bを、10%ウシ胎児血清(ギブコBRL(GibcoBRL)、グランドアイランド、ニューヨーク)を含むDMEM(ギブコBRL)において培養した。

【0074】

免疫組織化学

ヒト浸潤性乳管癌組織の切片をノバゲン(Novagen)から購入した。パラフィン包埋切片をキシレン中でインキュベートしてパラフィンを除去して、段階的なエタノール水溶液において再度水和した。試料をマイクロウェーブオーブンにおいてクエン酸緩衝液(pH 6.0)中で15分間処置した。内因性のペルオキシダーゼは、0.3% H_2O_2 のメタノール溶液によって阻害して、非特異的タンパク質結合部位を正常ウマ血清によってブロックした。切片の染色は、Vecastain(登録商標) Universal Elite(登録商標) ABCキット(ベクターラボラトリーズ(Vector Laboratories)、カリフォルニア州バーリングラム)を用いて行った。切片を、希釈したアフィニティ精製E17ポリクローナル抗体(実施例2を参照されたい)と共に4℃で一晩インキュベートして、洗浄後、ビオチン化二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。さらに洗浄した後、切片を、アビジンとビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼとの予め形成された高分子複合体からなる試薬と共に室温で30分間インキュベートした。色素反応の基質は3,3'-ジアミノベンジジンであった。切片をスライドガラスに載せる前にヘマトキシリンによって対比染色した。陰性対照スライドガラスも同時に処理した；この対照スライドガラスでは、E17ポリクローナル抗体の代わりに「免疫前血清」を用いた。

30

40

【0075】

インサイチューRNAハイブリダイゼーション

上記のヒト浸潤性乳管癌の切片およびヒト肺扁平上皮癌組織の他の切片(いずれもノバゲン(Novagen)から購入した)を、インサイチューRNAハイブリダイゼーションのために用いた。パラフィン包埋切片をキシレン中でインキュベートしてパラフィンを除去して、段

50

階的なエタノール水溶液において再度水和した。インサイチューRNAハイブリダイゼーションは、既に記述されているように実施した[Gunnら(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 95(1): 258~263]。ヒトペリオスチンCのN末端(ATG開始コドンから開始して)をコードする392bp断片を、ヒトペリオスチンcDNAからBam HIおよびEcoRIを用いて切除して、pBluescript(ストラタジーン(Stratagene)、カリフォルニア州ラホヤ)にクローニングした。 [³⁵S]-UTPの存在下で、392bp断片を鋳型として用いてT3およびT7 RNAポリメラーゼによってそれぞれ、センスおよびアンチセンスプローブを作製した。この時点で特徴が示されたペリオスチン変種をコードするcDNAは全て、392bp断片に対応するN末端領域において同一のヌクレオチド配列を有し、このように、断片を鋳型として用いて作製されたプローブは全ての変種mRNA分子を検出するのであろう。

10

【0076】

ペリオスチン化学発光アッセイ法

患者の血清試料を20 mMトリス-塩酸(pH 8.0)によって2倍希釈して、Sep-Pak(登録商標)QMAカートリッジ(マサチューセッツ州ニューベッドフォード)に適用して、これを0.1 M NaClを含む20 mMトリス-塩酸(pH 8.0)によって洗浄した。次にカートリッジを、0.25 M NaClを含む20 mMトリス-塩酸(pH 8.0)によって溶出した。溶出物を直ちに凍結して凍結乾燥した。アッセイ用に凍結乾燥した試料を標準的な希釈緩衝液(0.1% BSAおよび0.05% ツイーン20を含むトリス緩衝生理食塩液(TBS)、pH 7.4)によって溶解して希釈した(8倍または40倍)。

【0077】

試料は全て、1試料あたり2本ずつアッセイした。Reacti-Bind(商標)NeutrAvidinコーティングポリスチレン白色プレート(ピアス、イリノイ州ロックフォード)を希釈した緩衝液によって予め3回洗浄した。アビジンを予めコーティングしたプレートにビオチン結合5H8モノクローナル抗体(100 μl/ウェル)を加えて、これを4で一晩インキュベートした。いくつかのアッセイ法において、正常なプレート(すなわち、アビジンをコーティングしていないプレート)を用いて、これらのアッセイ法では、ビオチンを結合しない5H8モノクローナル抗体をプレートのウェルの底に直接コーティングした。プレートを希釈緩衝液において1回10分間の洗浄を3回行った。ウェルにおける非特異的タンパク質結合部位は、ウシ血清アルブミン(BSA; 3% w/v)を含むPBS(リン酸緩衝生理食塩液)をウェルに加えて、プレートを37 で2時間インキュベートすることによってブロックした。次に、プレートを希釈緩衝液によって3回洗浄した。希釈した試料または精製ペリオスチン(CMV-6×His-ペリオスチンベクターを用いて産生; 上記を参照)(標準物質として様々な濃度で)をウェルに加えて、プレートを37 で3時間インキュベートした。さらに洗浄した後(上記のように)、アフィニティ精製ポリクローナル抗体E17をウェルに加えて、プレートを37 で2時間インキュベートした。未結合抗体を洗浄して除去し、ウサギIgGに対して特異的なアルカリホスファターゼ結合アフィニティ精製抗体を全てのウェル(トロピクス(Tropix)、マサチューセッツ州ベッドフォード)に加えた。プレートを37 で2時間インキュベートした。さらに洗浄した後、アッセイ緩衝液(トロピクス)100 μlを加えて、室温で10分間インキュベートした。アッセイ緩衝液はプレートを上下にして軽くたたくことによって完全に除去した。次に、CSPD(3-(4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3-2'(5'-クロロ)-トリシクロ[3.3.1.1]デカン]-4-イル)フェニルホスフェート)化学発光基質(トロピクス)を加えた。化学発光の強度はFL 600蛍光マイクロプレートリーダー(バイオテックインストルメンツ(Bio-tek Instruments)、バーモント州ウィヌースキ)を用いて製造元の説明書に従って30分以内に読み取った。

20

30

40

【0078】

ペリオスチンのRT-PCRアッセイ法

多様なヒト組織から単離したポリA+ RNAから合成したcDNAは、カリフォルニア州パロアルトのクロンテック(Clontech)社から購入した。PCRは以下のように行った。完全長のペリオスチンDNAを増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマー配列は、

5'-ATGATTCCTTTTACCCATGTTTTCTCTA-3'(フォワード)(配列番号:15)

および

5'-TCACTGAGAACGACCTTCCCTTAATCGTCTTCTA-3'(リバーズ)(配列番号:16)

であった。PCRは、38サイクル(94 で30秒、49 で45秒、72 で150秒)行った。6 μ lの少量を1%アガロースゲル上での電気泳動に供して、アンブリコンをエチジウムブロマイド染色によって可視化した。PCRの特異性は、産物のシーケンシングによって確認した。対照PCRは、上記のようにGAPDH特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて行った。

10

【0079】

パリンドロームPCR cDNAディスプレイ

Tri試薬(リードメディカルラボ(Leedo Medical Lab.)、テキサス州ハウストン)を用いて、腫瘍もしくは正常組織(外科標本)、または培養細胞から総細胞RNAを抽出した。外科標本は、既に記述されているように[Barnardら(1992)、Cancer Res. 52: 3067~3072]、ニューイングランドディーコネス病院外科から得た。ポリA+mRNAはオリゴdT磁気ビーズ(プロメガ(Promega)、ウィスコンシン州マディソン)を用いて精製した。

【0080】

組織からのポリA+mRNA(100 ng)を単一のパリンドロームプライマー

(5'-CTGATCCATG-3')(配列番号:17)

20

(2 mM)およびrTh DNAポリメラーゼ(パーキンエルマーシートス(Perkin Elmer Cetus))0.5単位によって、 $MnCl_2$ (1.0 mM)の存在下で70 で12分間cDNAに逆転写した(全量:5 μ l)(3サイクル)。逆転写の後に、逆転写に用いた試験管と同じ試験管(全量、25 μ l)において、 $MgCl_2$ (2.0 mM)および $[^{35}S]$ -dATPの存在下で同じパリンドロームプライマー(0.4 mM)およびrTh DNAポリメラーゼによって、パリンドロームPCR反応(94 で30秒;40 で100秒;72 で35秒)を40サイクル行った。増幅されたパリンドロームPCR産物(^{35}S -標識)をポリアクリルアミドゲル上で分解した。腫瘍および隣接する正常組織に由来するcDNAパターンを直接比較した。

【0081】

対象となるcDNAバンドを切除して、ゲルから回収した。回収したcDNA断片は、トリスPCR緩衝液の代わりにトリシン緩衝液(10 mMトリシン、50 mM KCl、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.001%ゼラチン、pH 8.4)においてTaq DNAポリメラーゼ(パーキンエルマー)によって再増幅した。再増幅されたcDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって分析した。

30

【0082】

統計学的方法

統計分析は、対応のない試料に関するマン・ホイットニーU検定を用いて行った。変数間の比例関係は、単純な直線回帰によって決定した。相関係数は、スピアマン検定を用いる順位相関によって決定した。クラスカル・ウォリスの検定およびフィッシャーのPLSD検定を用いて、平均値の差の有意性を調べた。分析は全て、StatView(商標)ソフトウェアパッケージ(アバカスコンセプトツインク(Abacus Concepts Inc.))を用いて行った。差は、p値が0.05未満である場合に有意であると見なされた。

40

【0083】

実施例2. ペリオスチンJMN1Bは90 kDa分泌タンパク質である

本発明者らのこれまでの研究から、ペリオスチン転写物が多くの癌組織において検出可能であるが、悪性中皮腫細胞株JMNおよびJMN1Bを除き、調べた如何なる癌細胞株にも検出できないことが示された[Behbehaniら(1982)Hum Pathol. 13(9): 862~866; Demetriら(1989)Blood, 74: 940~946]。JMN1B細胞の条件培地を10倍濃縮して、この濃縮物とJMN1B細胞溶解物の双方をウェスタンブロットによって分析した。ヒトペリオスチンに対して産生されたE17ポリクローナル抗体調製物は、ペリオスチンと β igH3の双方に結合する抗体

50

を含んだ。E17ポリクローナル抗体によるウェスタンブロットは、ペリオスチンと β igH3がいずれも細胞溶解物よりもJMN1B上清において量が多いことを明らかにした。固相基質に結合したペリオスチンによるアフィニティ精製後、 β igH3に対するE17ポリクローナル抗体の結合能は消失し、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）上での90 kDaのバンドとして移動したペリオスチンとの結合能のみが残された。E17ポリクローナル抗体は、ペリオスチンを免疫沈降しなかったが、5H8 mAbは免疫沈降した。このように、ペリオスチンに関する「サンドイッチ」アッセイ法において、5H8モノクローナル抗体は捕獲のために用い、アフィニティ精製E17ポリクローナル抗体はペリオスチンを検出するために用いた。

【0084】

JMN1B細胞を、細胞内小胞輸送の阻害剤である1.5 μ Mモネンシン（シグマ（Sigma Co.）、ミズーリ州セントルイス）によって処置した。モネンシンを細胞培養物に添加した5時間後、ペリオスチンは、ウェスタンブロットによって細胞溶解物では検出されたが、培養培地には検出されなかった。さらに、アフィニティ精製E17抗体は対照細胞のゴルジを染色した。しかし、モネンシン処置によって細胞質染色が斑点状となった。

【0085】

全体として、上記の知見はペリオスチン（JMN1B細胞によって発現される）が90 kDa分泌型タンパク質であることを示している。

【0086】

実施例3．乳癌におけるペリオスチンの発現

ペリオスチンタンパク質は、上記のように免疫精製されたE17抗体を用いて免疫組織化学によって検出することができた。浸潤性乳癌細胞において強い染色を認めたが、周辺の正常間質細胞はかすかに染色されたに過ぎなかった。強い染色は同様に、腫瘍の中心領域とは対照的に乳癌の進行辺縁部においても認められた。一方、強い染色は、非浸潤性の正常乳腺組織の切片には検出されなかった。ペリオスチンmRNAは、インサイチュウRNAハイブリダイゼーションによって検出できた。ペリオスチン遺伝子の高い発現は、乳癌周辺の間質細胞において認めたが、癌細胞にはほとんど発現を認めなかった。本発明は、如何なる特定の作用機序に限定されないが、腫瘍辺縁部の間質細胞の薄い層がペリオスチンを分泌して、これが腫瘍細胞の表面に結合する可能性があるように思われる。本来、腫瘍細胞は、おそらく腫瘍の辺縁部の間質細胞より低いレベルでペリオスチンを産生する可能性がある。正常な乳腺組織切片にはシグナルを認めなかった。

【0087】

実施例4．癌患者における骨転移の予測物質としての血清中ペリオスチンレベル

調べた乳癌患者58人の臨床および病理学的特徴を表1に示す。これらには、II期7人、III期15人、およびIV期36人が含まれた。年齢の中央値は44.5歳（31～63歳）であった。IV期患者36人において、15人（42%）が転移部位1個であると診断され、21人（58%）が2個より多い転移部位を有した。患者40人のサブセット（様々な進行期）において、24人（60%）の腫瘍がエストロゲン受容体陽性であった。患者38人のサブセットにおいて、24人（63%）の腫瘍がプロゲステロン受容体陽性であった。患者40人のサブセットにおいて、29人（72.5%）が閉経前であり、11人（27.5%）が閉経後であった。

【0088】

（表1） 乳癌患者58人の臨床病理学的データ

10

20

30

40

要因	患者数	血清中ペリオスチン	
		ペリオスチンレベル (ng/ml)	p 値
平均年齢	44.4±1.1 歳	58	0.2012 $r^2=0.0369^*$
閉経			
閉経前	29 (72.5%)	89.8±25.3	0.4309
閉経後	11 (27.5%)	41.7±11.0	
腫瘍の状態			
T1	11(27.5%)	65.7±15.7	NS
T2	17(42.5%)	63.6±24.7	
T3	4(10.0%)	91.8±52.8	
T4	8(20.0%)	124.4±72.8	
進行期			
II	7 (12.1%)	56.1±14.3	NS
III	15 (25.9%)	28.0±4.7	
IV	36 (62.1%)	85.3±20.5	
骨転移			
陰性	37 (63.8%)	55.0±16.6	0.04
陽性	21 (36.2%)	89.3±21.8	
転移部位の数			
1個	15 (41.7%)	75.9±29.7	0.2546
2個より多い	21 (58.3%)	92.0±28.6	
リンパ節転移			
陽性	36 (78.3%)	95.3±25.0	0.5411
陰性	10 (21.7%)	44.4±8.4	
ER 状態			
陰性	24 (60.0%)	72.1±19.0	0.8359
陽性	16 (40.0%)	88.4±38.0	
PR 状態			
陰性	24 (63.2 %)	72.3±19.1	0.9758
陽性	14 (36.8%)	94.8±43.1	
等級			
II	6(17.1%)	128.3±62.0	0.189
III	29 (82.9%)	65.8±21.1	

* 患者58人全員に関する年齢とペリオスチンレベルの相関

NS、有意差なし；ER、エストロゲン受容体；PR、プロゲステロン受容体。

【 0 0 8 9 】

肺小細胞癌患者44人の臨床および病理学的特徴を表2に示す。この群の患者には、III期32例およびIV期12例が含まれた。年齢の中央値は51歳（範囲26～62歳）であった。IV期患者12人において、5人は転移部位1個を有し、7人は、2個より多い転移部位を有すると診断された（表2）。

【 0 0 9 0 】

（表2） 肺小細胞癌患者44人の臨床病理学的データ

		血清中ペリオスチン		p 値
要因		患者数	ペリオスチンレベル (ng/ml)	
平均年齢	51.3±7.5 歳	44		0.3579 $r^2=0.0202^*$
性別				
	男性	27 (61.4%)	79.7±12.5	0.3349
	女性	17 (38.6%)	68.2±21.3	
腫瘍状態				
	T1	6(14.0%)	36.3±7.5	T4 対 T2
	T2	14(31.8%)	64.9±16.1	0.0304
	T3	11(25.0%)	70.6±15.0	T4 対 T1
	T4	12(27.3%)	126.5±29.7	0.0136
進行期				
	III	32 (72.7%)	84.9±13.5	0.2641
	IV	12 (27.3%)	55.7±17.0	
骨転移				
	陰性	36 (81.8%)	75.6 ±12.7	0.4559
	陽性	8 (18.2%)	88.6±23.9	
転移部位の数				
	1個	5 (41.7%)	28.8±7.6	0.4649
	2個より多い	7 (58.3%)	77.0±26.8	
リンパ節転移				
	N0	2 (4.7%)	14.0±5.0	N3 対 N2
	N2	18 (41.9%)	49.7±10.9	0.0091
	N3	23(53.5%)	108.7±17.3	
動作状況				
	0	9 (25.7%)	59.9±21.7	NS
	1	22 (62.9%)	66.7±13.7	
	2	4(11.4%)	104.5±27.3	
LDH		27		0.6752
	466.9±291.2 U/l			$r^2=0.0074^*$
CEA		17		0.7287
	7.7±16.7 ng/ml			$r^2=0.088^*$

* このパラメータに関してモニターした患者全員に関するペリオスチンレベルとの相関
NS、有意差なし；LDH、乳酸デヒドロゲナーゼ；CEA、癌胎児抗原

【0091】

乳癌患者における血清中ペリオスチンの平均値は以下の通りであった：II期、56.1±14.3 ng/ml；III期、28.0±4.7 ng/ml；およびIV期、85.3±20.5 ng/ml（表1）。正常な健康ボランティア（n=20）では、平均血清中ペリオスチンレベル38.5±5.8 ng/mlを認めた。これらの群では血清中ペリオスチンレベルに有意差を認めなかった。

【0092】

確立された予後因子に従って、患者の群をさらに階層化した。血清中ペリオスチンレベルは、骨転移の証拠を有しない患者（55.0±16.6 ng/ml；p=0.04）と比較して骨転移を有する乳癌患者（89.3±21.8 ng/ml）では上昇した（表1）。しかし、エストロゲンまたはプロゲステロン受容体状態（それぞれ、p=0.8359および0.9758）、腫瘍進行期（p=0.1890）、閉経状態（p=0.4309）、単数対複数の転移部位（p=0.2546）、リンパ節転移の存在（p=0.5471）、または原発腫瘍の大きさ（T）の状態（T1-T4）に従う血清中ペリオスチンレベルには有意差を示さなかった。T1肺腫瘍は、その最大の寸法が3.0 cmまたはそれ未満であり、肺または臓側胸膜によって取り囲まれ、気管支鏡で葉気管支に対して近位の浸潤の証拠を認めない。T2肺腫瘍は、その最大寸法が3.0 cmより大きく、臓側胸膜に浸潤しているか、または肺門領域に伸びる肺拡張不全または閉塞性肺炎に関連している任意の

大きさの肺腫瘍である。気管支鏡では、証明可能な腫瘍の近位の程度は、葉気管支内または気管竜骨に対して少なくとも2.0 cm遠位でなければならない。任意の関連する肺拡張不全または閉塞性肺炎も肺全体に及んではない。T3肺腫瘍は、(a) 心臓、大血管、気管、食道、もしくは椎体を含まない、胸壁(上肺溝腫瘍を含む)、横隔膜、縦隔胸膜、もしくは心膜に直接伸長する任意の大きさの腫瘍、または(b) 気管竜骨を含まない気管竜骨の2 cm内部での主要な気管支における腫瘍、または肺全体の肺拡張不全もしくは閉塞性肺炎に関連した腫瘍である。T4肺腫瘍は、縦隔胸膜の浸潤を認め、肺、大血管、気管、食道、椎体、もしくは気管竜骨に及ぶ、悪性胸膜もしくは心膜浸出液が存在する、または同側の原発腫瘍の肺葉内で孤立性腫瘍結節を有する任意の大きさの腫瘍である。

【0093】

調べた患者の母集団の大きさは限られていたが、HER-2陽性(n=4)対HER-2陰性(n=8)患者(p=0.3958)におけるペリオスチンレベルに有意差を認めなかった。

【0094】

肺小細胞癌患者における血清中ペリオスチンレベルの平均値は、III期に関して 84.9 ± 13.5 ng/ml、IV期患者に関して 55.7 ± 17.0 ng/mlであった(表2)。疾患の進行期のあいだに、または患者と正常対照とのあいだに有意差を認めなかった。しかし、異なるT状態(腫瘍サイズの状態)およびN-状態(リンパ節転移の状態)の患者において血清中ペリオスチンレベルに有意差を認めた。血清中ペリオスチンレベルは、T4患者では(126.5 ± 29.7 ng/ml)、T2(64.9 ± 16.1 ng/ml、p=0.03)およびT1(36.3 ± 7.5 ng/ml、p=0.01)と比較して上昇していた。N3状態の患者(108.7 ± 17.3 ng/ml)では血清中ペリオスチンレベルの差は、N2状態の患者(49.7 ± 10.9 ng/ml、p=0.01)とは有意に異なった。血清中ペリオスチンレベルは、骨転移の証拠を有しない患者(75.6 ± 12.7 ng/ml)と比較して、骨転移を有する肺癌患者(88.6 ± 23.9 ng/ml)において差がなかった。同様に、性別(p=0.3349)、動作状況(身体活動を行う能力)(PS 0-2)、または転移部位1個対2個またはそれ以上の転移部位(p=0.4649)のようなパラメータに従う血清中ペリオスチンレベルに有意差を認めなかった。ペリオスチンレベルは、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)または癌胎児抗原(CEA)のいずれのレベルとも関連しなかった。

【0095】

実施例5. 正常ヒト組織におけるペリオスチンmRNAの発現

ペリオスチンmRNAは、ヒト肺、腎臓および胎盤からのRNAにおいてRT-PCRによって検出された。しかし、ヒト心臓、肝臓、脳、および骨格筋からのRNAには検出されなかった。肺、腎臓、および胎盤からのRT-PCR産物のDNA配列は、骨肉腫からクローニングされた産物(OSF-2)とは異なるヒトペリオスチンcDNAの型であることが判明した[Takeshitaら(1993)、Biochem. J. 294: 271~278]。OSF-2をコードするcDNAのヌクレオチド配列(配列番号: 1)を図1Aに示し、OSF-2のアミノ酸配列(配列番号: 2)を図1Bに示す。OSF-2 cDNAと比較して、胎盤および肺からクローニングしたペリオスチンcDNAは、残基2009~2179位(171塩基対、アミノ酸57個)および残基2360~2443位(84塩基対、アミノ酸28個)においてそれぞれ2つの欠失を有した。ペリオスチンのこのスプライス変種(ペリオスチンLと命名)をコードするcDNAのヌクレオチド配列(配列番号: 3)を図2Aに示し、ペリオスチンLのアミノ酸配列(配列番号: 4)を図2Bに示す。ペリオスチンLの成熟型(すなわち、配列番号: 3のヌクレオチド1~63位を欠損する)をコードするcDNAのヌクレオチド配列を、配列番号: 5と呼び、成熟ペリオスチンLのアミノ酸配列を配列番号: 6と呼ぶ。配列番号: 3のヌクレオチド2220位(および配列番号: 5の対応するヌクレオチド)は、T残基よりむしろA残基となりうることに注目される。腎臓からクローニングしたペリオスチンcDNAは、残基2009~2179位(171塩基対、アミノ酸57個)で欠失一つのみを有する。ペリオスチンのこのスプライス変種(ペリオスチンK)をコードするcDNAのヌクレオチド配列(配列番号: 7)を図3Aに示し、ペリオスチンKのアミノ酸配列(配列番号: 8)を図3Bに示す。ペリオスチンKの成熟型(すなわち、配列番号: 7のヌクレオチド1~63位を欠損する)をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号: 9と呼び、成熟ペリオスチンKのアミノ酸配列を配列番号: 10と呼ぶ。配列番号: 7のヌクレオチド2304位(および配列番号: 9の

10

20

30

40

50

対応するヌクレオチド)は、T残基よりむしろA残基となりうることに注目される。上記の欠失は全てインフレーション欠失である。胎盤および肺からのペリオスチンクロンは、細胞の細胞外マトリクスとの結合に関与しうる α ヘリックス部位(残基2403~2466位)の一部を欠損した。インサイチュハイブリダイゼーションから、ペリオスチンmRNAが正常な胎盤組織の間質に存在することが判明した。

【0096】

実施例6. 子癰前症の患者における血清中ペリオスチンレベル

子癰前症の女性および正常な妊娠女性の試験母集団の臨床特徴を表3に示す。群のあいだで妊娠前体重、ヘマトクリット、または出産時の胎盤重量に有意差を認めなかった。本試験において用いられる分類基準によって必要とされるように、子癰前症の群と正常な妊娠群とのあいだの有意差は、収縮期圧および拡張期圧の双方について認められた。

【0097】

年齢の有意差を群のあいだに認めた。子癰前症群では出産時の平均年齢は 29.8 ± 1.2 歳であったのに対し、正常妊娠群では 22.8 ± 0.7 歳であった。しかし、いずれの群においても母親のペリオスチンレベルと出産時の年齢とのあいだに有意な相関を認めなかった。子癰前症の女性の乳児(2240.1 ± 183.9 g)と正常な妊娠女性の乳児(3413.3 ± 78.7 g)の出生時体重の平均値には統計学的に有意差を認めた。しかし、母親のペリオスチンレベルと乳児の体重のあいだには有意な相関を認めなかった。

【0098】

妊娠満期時の血清中ペリオスチン濃度は、子癰前症の患者(311.8 ± 56.3 ng/ml)では、正常な妊娠女性(218.8 ± 37.3 ng/ml)と比較して上昇した。正常な健康な非妊娠ボランティア($n=20$)に関する血清中ペリオスチン濃度の平均値は、これまでに 38.5 ± 6.1 ng/mlであることが判明している。第1トリメスターでの妊娠ボランティア($n=58$)のペリオスチン濃度は 77.5 ± 13.7 ng/mlであった。このように、満期時の子癰前症の患者および正常妊娠女性における血清中ペリオスチン濃度は、非妊娠($p=0.0001$)および第1トリメスター妊娠被験者($p=0.01$)と比較して上昇していた。初期の妊娠および非妊娠女性における濃度は、統計学的な差はなかった。他の要因も同様に決定した(表3)。血清中のTGF- β 1レベルは、子癰前症の患者(8.0 ± 0.3 ng/ml)では、血圧が正常な妊娠女性(7.2 ± 0.3 ng/ml、 $p=0.0406$)より高かった。しかし、TGF- β 1濃度は、ペリオスチン濃度($r=0.03$ 、 $p=0.82$)と相関しなかった。血清中のVCAM-1濃度(1.74 ± 0.12 mg/ml対 1.28 ± 0.07 mg/ml、 $p=0.0018$)およびE-セレクトリン(50.4 ± 4.3 ng/ml対 32.0 ± 3.6 ng/ml、 $p=0.0007$)は、血圧が正常な妊娠女性と比較して子癰前症の患者では有意に上昇した。それらのレベルも同様に血清中ペリオスチンレベルとは相関しなかった。子癰前症の患者の血清中のインターロイキン6のレベル(0.86 ± 0.17 ng/ml)は、正常な妊娠女性(1.33 ± 0.20 ng/ml)より低かったが、差は選択した有意水準に達しなかった。インターロイキン6濃度とペリオスチン濃度は相関しなかった。

【0099】

(表3) 子癰前症の患者30人と正常血圧の妊娠女性30人に関する臨床病理学データ

要因	全女性 60 人 (100%)		p 値	
	子癰前症 30(50%)	正常 30(50%)		
出産時の年齢(歳)	29.8±1.2	22.8±0.7	0.0001	
妊娠前体重(kg)	67.9±3.1	69.8±1.2	0.7449	
母親の出産前 ヘマトクリット(%)	36.1±0.7	36.4±0.6	0.5894	
母親の出産前血小板	182.6±9.5	250.1±14.9	0.0003	
胎盤の重量 (g)	318.4±19.0	438.3±59.3	0.06	10
出生時体重 (g)	2240.1±183.9	3413.3±78.7	0.0001	
出産時収縮期圧(mmHg)	157.1±2.0	121.3±1.8	0.0001	
出産時拡張期圧(mmHg)	93.8±1.4	72.2±1.7	0.0001	
母親の出産前 クレアチニン(mg/dL)	0.85±0.03	0.66±0.05	0.01	
出産時妊娠齢 (週)	35.1±0.8	39.9±0.3	0.0001	
母親の出産前尿酸	6.7±0.2	4.0±0.2	0.0005	20
ペリオスチンと 血清中 TGF-β1 レベルの相関	8.0±0.3	7.2±0.3	0.0406 0.82 r=0.03	
ペリオスチンと 血清中 VCAM-1 レベルの相関	1.74±0.12	1.28±0.07	0.0018 0.5229 r=0.085	
ペリオスチンと 血清中 E-セ렉チン レベルの相関	50.5±4.3	32.0±3.6	0.0007 0.1852 r=0.173	
血清中インターロイキン 6 レベル	0.86±0.17	1.33±0.20	0.0591 0.5649 r=0.076	30
血清中ペリオスチンレベル (ng/ml)	311.2±56.3	218.8±37.3	0.0385	

【 0 1 0 0 】

実施例 7. ヒト結腸癌からの TCG1 cDNA の単離

TCG1 mRNA は、パリンドローム PCR cDNA ディスプレイ技術を用いて、ヒト結腸癌において過剰発現されているものとして当初同定された。簡単に説明すると、ヒト結腸癌組織および同じ患者からの隣接する正常結腸組織からの対応のある mRNA 調製物を逆転写して、得られた cDNA をパリンドローム PCR によって増幅した。増幅された PCR cDNA 断片 (^{35}S -標識) をポリアクリルアミド電気泳動ゲル上で分離した。腫瘍および正常組織の cDNA パターンは類似であったが、発現された一つの cDNA 断片は腫瘍組織において顕著であるが隣接する正常組織では顕著でないと同定された。この cDNA 断片をポリアクリルアミドゲルから回収して、cDNA ディスプレイに用いたものと同じプライマー (PP12) を用いて再増幅した。再増幅された cDNA 断片を PCR2.1 TA クローニングベクター (インビトロジェン、グロニンゲン、ドイツ) にクローニングした。ヌクレオチド配列分析から、この断片が二本鎖 cDNA の双方の 5' 末端で同じ PP12 プライマーを有する 636bp を含むことが判明した。

【 0 1 0 1 】

636bp TCG1 断片をプローブとしてヒト結腸癌由来 cDNA ライブラリ (ラムダ ZAP II) をスク

40

30

50

リーニングすることによって、完全長のcDNAを得た。完全長のクローンは、予想分子量85 kDaでアミノ酸771個の配列をコードする2313bpのオープンリーディングフレームを有することが判明した。TCG1をコードするcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：11）を図4Aに示し、TCG1のアミノ酸配列（配列番号：12）を図4Bに示す。TCG1 cDNAは、OSF-2 cDNA（配列番号：1）のヌクレオチド2009～2089位および2349～2432位を欠損する。さらに、OSF-2 cDNAは、2472～2477位でA残基6個を有するが、TCG1 cDNAは、対応する小配列においてA残基7個を有する。このように、TCG1タンパク質は、（1）配列番号：2のアミノ酸670～726番目を欠損して、この小配列の代わりにアルギニン残基を有する（配列番号：1のヌクレオチド2009～2089位の欠失により）；（2）配列番号：2のアミノ酸783～810番目を欠損する（配列番号：1のヌクレオチド2349～2432位の欠失により）；および（3）配列番号：2のアミノ酸残基823～836番目をアミノ酸配列SSRI（配列番号：18）に置換する（TCG1 cDNA配列における余分のA残基により、フレームシフトおよび未成熟な停止コドンが起こる）。さらに、TCG1コード領域（配列番号：11）の最後のコドンの最初のヌクレオチドは、AではなくてTとなりうる。この場合、TCG1の最後のアミノ酸はIではなくてFである。アミノ酸配列分析により、TCG1がN末端シグナルペプチド（SP）または分泌リーダ配列の後にシステインリッチドメイン（CRD）、内部相同反復4個（それぞれ、長さがアミノ酸約135個）、および疎水性C末端ドメインを含むことが判明した（図5）。ペリオスチン変種によって不均一性が起こるのは疎水性C末端ドメインにおいてである。一つのケモカインBファミリーのモチーフ（C-C）が、アミノ酸残基79～80番目のシステインリッチドメインにおいて認められた。タンパク質は、アミノ酸残基599～601番目に予想されるN結合グリコシル化（NDT）部位を1個有する。N末端でのシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインがないことから、これが分泌型タンパク質であることが示唆される。TCG1を発現する細胞の培養培地のウェスタンブロット分析から、これが実際に分泌型タンパク質であることが確認された。成熟TCG1（すなわち、配列番号：11のヌクレオチド1～63位を欠損する）をコードするcDNAのヌクレオチド配列、配列番号：13と呼び、成熟TCG1を配列番号：14と呼ぶ。

10

20

30

40

【0102】

予想アミノ酸配列に関するデータベース検索により、これが、MEC-3T3骨芽細胞からサブトラクティブスクリーニングによって同定されたマウスOSF-2のヒト相同体のスプライス変種であることが判明した[Takeshitaら（1993）、Biochem. J. 294：271～278]。ノザンブロット分析から、このタンパク質が骨芽細胞特異的ではないことが判明した。OSF-2と骨芽細胞特異的転写因子OSF2/Cbfa1との混同を避けるために、タンパク質をTCG1と命名した（TGF- α およびTGF- β 調節および癌関連遺伝子1）。詳しい分析により、TCG1が、ヒト肺癌A5409細胞から最初に同定されたTGF- β 誘導遺伝子である β igH3と有意な構造および配列相同性を有することが示された[Skonierら（1992）、DNA Cell Biol. 11：511～522]。TCG1は、アミノ酸レベルで β igH3と45.2%同一性または82.9%類似性を有する（DNAスターアルゴリズム；ウィスコンシン州マディソン）。しかし、TCG1は、C末端でさらなる親水性ドメインを含む。さらに、 β igH3タンパク質はC末端で、TCG1には含まれないRGD配列を含む[Skonierら（1992）、DNA Cell Biol. 11：511～522]。TCG1と β igH3とのアミノ酸配列が相同であって、構造的に類似であることは、それらの機能が類似であることを示している。しかし、C末端でのアミノ酸配列が多様であることは、2つのタンパク質間の機能的な差を反映する可能性がある。実際に、様々な細胞株におけるTCG1および β igH3の発現パターンは非常に異なっている。さらに、増殖因子によるそれらの発現の調節が異なる。興味深いことに、TCG1および β igH3はいずれも、キリギリスおよびショウジョウバエからのファシクリンIと有意な相同性を有する[Bastianiら（1987）、Cell 48：745～755；Zinnら（1988）、Cell 53：577～587]。ファシクリンIは、昆虫の胚において神経系発達の際の成長円錐の誘導に関係する外因性の膜糖タンパク質である。

【0103】

実施例8．ヒト結腸癌および乳癌におけるTCG1の過剰発現

ヒト原発性結腸腫瘍組織（T）およびその隣接する正常結腸組織（N）から個々に単離した全RNA試料27対を、 32 P-標識TCG1プローブによるノザンブロット分析によって調べた。マ

50

ツチした対27組中24組において、TCG1 mRNA発現レベルは、隣接する正常結腸組織より腫瘍組織においてかなり大きかった。発現パターンの詳しい分析から、27例におけるTCG1 mRNAのT/N比（腫瘍／正常比）が3.8～42の範囲であることが示された。T/N比の平均値は16.5であった。TCG1 mRNAのT/N比と結腸癌の疾患進行期とのあいだの相関の可能性を調べるために、T/N比を疾患の進行期に対してプロットした。データは、TCG1 mRNA発現のより高いT/N比と疾患の後期段階との相関を示さなかった。しかし、再発性の結腸癌5例全てにおいて、T/N比は、平均値より有意に高かった。これらの5例におけるT/N比は、22.4～42の範囲であった（平均値＝29.6）。この結果は、腫瘍細胞におけるTCG1 mRNAの高レベル発現が腫瘍の再発に関連していることを示唆した。腫瘍再発率が高頻度であることは、通常、関連する癌細胞の腫瘍形成性がより強いことを示している。悪性結腸癌はしばしば肝臓に転移する。これらの転移性結腸腫瘍におけるTCG1 mRNAの発現パターンを調べるために、転移性結腸癌とその隣接する正常肝臓組織からの総RNA試料6対を、TCG1 cDNAプローブによるノザンプロット分析によって調べた。TCG1 mRNAレベルは、6例全てにおいて、隣接する正常肝組織より転移性腫瘍においてかなり大きかった。実際に、TCG1 mRNAは、調べた6例中5例において正常肝組織において検出できなかった。

10

【0104】

実施例9. 肺癌患者のパネルの血清中ペリオスチンレベルの増加

肺癌患者116人（肺小細胞癌、肺の非小細胞癌、扁平上皮癌、および大細胞癌）の血清中ペリオスチンレベルを、上記のように化学発光アッセイ法の改変版を用いて測定した。上記のアッセイ法のように、5H8モノクローナル抗体を「捕獲」抗体として用いた。しかし、対照的に8H11モノクローナル抗体（E17ポリクローナル抗体ではなく）を、「検出」抗体として用いた。検出抗体としてE17ポリクローナル抗体を用いて行った乳癌試験において、正常被験者20人の群の血清中ペリオスチンレベルの平均値は 38.5 ± 5.8 ng/mlを認めた。一方、肺癌患者に対する試験において検出抗体として8H11モノクローナル抗体を用いると、患者の76%からの血清が、アッセイ緩衝液（血清試料の代わりに）を加えたアッセイウェルについて認められた値と有意差がない化学発光値を生じた。このように、検出抗体として8H11モノクローナル抗体を用いるアッセイ法において測定したように、ペリオスチンの「正常な」血清中レベルは、本質的に0であった。重要なことに、このアッセイ法は、2 ng/mlの血清中ペリオスチンレベルを検出するために十分な感度であった（下記の表4における16番の患者を参照されたい）。

20

30

【0105】

調べた肺癌患者116人において、28人（24%）の血清中ペリオスチンレベルが有意に増加した。これらの患者28人において検出された血清中ペリオスチンレベルを表4に示す。患者116人中、6人（5%）の血清中ペリオスチンレベルは1,000 ng/mlより大きく、22人（19%）の血清中ペリオスチンレベルは1 ng/ml～400 ng/mlのあいだであった。特に、1,000 ng/mlより高い血清中ペリオスチンレベルを示した患者は全員初回試験の1年以内に死亡した。対照的に、1 ng/ml～400 ng/mlの範囲の血清中ペリオスチンレベルを示した患者は、その少なくとも10人を、原稿を書いている前に1年以上調べ、原稿を書いているあいだモニターを継続した。

【0106】

（表4） 肺癌患者28人における血清中ペリオスチンレベル

40

患者番号	血清ペリオスチンレベル (ng/ml)
1	>1,000
2	>1,000
3	>1,000
4	>1,000
5	>1,000
6	>1,000
7	81
8	73
9	80
10	130
11	190
12	190
13	220
14	113
15	32
16	2
17	91
18	87
19	3
20	120
21	235
22	184
23	470
24	74
25	120
26	80
27	68
28	182

10

20

【0107】

これらのデータは、体液（例えば、血液または尿）中のペリオスチンレベルが肺癌の有用なマーカーとなりうること、そして高い血清中ペリオスチンレベル（例えば、1,000 ng/ml）を超える）は、肺癌患者の予後が不良であることの指標となることを示している。

30

【0108】

本発明に関して多くの態様を説明してきた。それにもかかわらず、様々な改変を行ってもよく、それらも本発明の趣旨および範囲に入ると理解されるであろう。したがって、本発明は添付の請求の範囲に限りて制限される。

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1A】完全長のOSF-2をコードするcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：1）を示す。

【図1B】完全長のOSF-2のアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。

40

【図2A】完全長のペリオスチンLをコードするcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：3）を示す。

【図2B】完全長のペリオスチンLのアミノ酸配列（配列番号：4）を示す。

【図3A】完全長のペリオスチンKをコードするcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：7）を示す。

【図3B】完全長のペリオスチンKのアミノ酸配列（配列番号：8）を示す。

【図4A】完全長のペリオスチンC（TCG1）をコードするcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：11）を示す。

【図4B】完全長のペリオスチンC（TCG1）のアミノ酸配列（配列番号：12）を示す。

【図5】N末端リーダー配列、システインリッチドメイン（「CRD」）、4つの内部相同反

50

復配列（「1」、「2」、「3」、および「4」）、ならびにペリオスチン変種のあいだで変化するC末端ドメイン（「可変C末端」）の相対的な位置を示す、ペリオスチンC（TCG1）の略図である。

【図 1 A】

atgattcccttttaaccatgtttcttactattgtctgattgttaacccataaacgccacaacattatgacaagaattgttgcctat
agtcgtatcagggttcgggaaccagcccaatgtcttgctccccaacagatttggccaccaanaanaatacttcaacatt
gaaagacttgatanaaagtcctcttggacnganaagacgctgtttatgtatgttgccctgttatgagaatggagaa
gaaaggctgccagcgttttcccatgacatgtttatgacacttgccatctggagccagccacaacgcagcgtattct
gacgctcaaaactgaggaggagatcgagggaagggtaccttcaactcttgcaccagatcatgagcttggacaacttg
gattcgtatccgtagagggttgagagcaacgtgaaatgttaattgaatgaattgacatgacatgataaagaagaatgt
gaccaaggacttaanaaatgcatgatttccctcaatgataacatttgggcttttcaaccattatcctaatggggttgcac
tgttaattgtctcgaatcccttgggaaccagatgacaanaatgggtgttccatgtcattgaccgtgtgtctacacaaattgta
cctcaattcaagacttcaatgagaagatgaccttcaactttttagcagcagcctcatcacaatggacatttggagcccttg
gaagagacgtctacacactcttgcctccaccaatgaggttttgaanaacttccacgaggtgtctcagaanaaggcttccgga
gacaaagtgcctccgaagctcttatgaagtaccacacttaatacttccaggtgtctgtatatttgggagggagcagcttttg
agacgttggaaggaaatacnaattgagatgaggtgagcaggtgacagttaacataatggaatcaanaatggggaacaaag
gataatgtgacaaataatgggtgtgatccattgattgacagctcctantctgtatctgccaacaaatgattgagctggctgga
acagaacaccccttcaaggatctgtggcccaatgagcttgcatctgtctgagggccagatggagaatacatttgcctgga
cctgtgataatgcatcttctgatactctcagactggttcagcgcctcctaattatctgcagaatcacaatgaaagtanaa
gttgccctaatgagcttcaacgggcaaatctggaacacatcgagagcaaacagctcagagcttctgtatctgtacagctgt
ctgattgaaattcatcgatggagaagggaaggatgaagcaagggaagaacgggtgcgattcacaattccgcgagatcacaagcc
agcagagaaatccctcatgaaaagttaaaaagaatgaagcgttttagcacttccatgcacttgaagctgcagacttgaan
gagctctgacacacacaggagagactggacattatttggccaacaaatgatgtcttaagggaatgactagtgagaanaaagaat
tctgtatcgggacaaatgctctcaaaactcaatttcaatcagcaccagagggttctcattggaaaaggattgaacctgggt
gtactcaacttttaagaagccacaaagggaanaaatcttctgaagagcgttgaatgatacccttggtaagtgattgaatca
aaagatctgcatcactatgacaaagctgtgattctgttggaactcttcaatcagcagcagcaacacctgttgaatgat
caactgtggaatcactaataaattcaataactcaaatgaattgttggttggtgacccctcaagaanaacccctgactgt
ctatacactaaattataccaactgaatgttggaacaaataatgaatgattgaagcagcttccagctctattatcaaacatgaag
accacactcaaaagtcaaaatgaagtggaacttgaatcagctgattgaagaagtggaacaaataatgaatgacatcat
ggagagcnaattataaanaatacacaatacttggatgagctgtcgttgaataactgaanaagagacagagaagaacg
aactattacaggtcctgaataaatactacaggtttctatgaggtgaggaacaagaacacttgaagaatgtttacaag
agaggtcaccaaggtcaccaaatcattgaaggtgtgattgattgaatgaatgaanaatgaagaacttgcagga
gacacaccctggaggaaggttgcgaagccacaanaaagtctcaggttctagaagacgattaaagggaaggtctgtctcag

【図 1 B】

MIPFLPMFSLLLLLLVNPNANNNHYDKILAHSRIRGRDQGNVNCALQQLGTKKKY
FSTCKNWYKKSICGQKTTVLYECCPGYMRMEGMKGCPAVLPIDHVVYGLGIVG
ATTQRYSDASKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLSDIRRGLESNVNVELLNA
LHSHMINKRMLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNVGVTVNVCARIHGNQIAT
NGVVHVDRVLTQIGTSIQDFIEAEDDLSFRAAAITSDILEALGRDGHFTLPAPIN
EAFEKLPRGVLERFMDGKVASEALMKYHILNTLQCSSESIMGGAVFTELEGNITIE
GCDGDSITVNGIKMVNKKDVTNNGVHILIDQVLPDSAKQVIELAGKQQTTFD
LVAQLGLASALRPDGEYTLAPVNNAFSDDTLSMVQRLKILQNHILKVKVGL
NELYNGQILETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCEMEKGSQQRNGAIHFIREIIPAE
KSLHEKLDQDKRFSFLSLEAADLKELLTQPGDWLTFVPTNDAFKGMTSEEKEI
LIRDKNALQNILYHLTPGVHIGKGFEPGVNINLKTQGSKIFLKEVNDLLVNLK
SKESDIMITNGVHVVDKLLYPADTPVGNQDQLEILNKLKIQIKFVRGSTFKFIP
VTYVYTKIITKVVPEPKJIEGSLQHIKTEGTLTKVKIGEPFRLIKEGTEITEVI
HGEPIIKYTKIIDGVPISETEKREERIITGEPIYRISTGGOBTETELKQLQEE
VTKVTKFIEGQDGHLEFEIEKRLKQDTPVRLKQANKKVQGSRRRLREGRSQ

【図 2 A】

atgattcccttttaaccatgtttcttactattgtctgattgttaacccataaacgccacaacattatgacaagaattgttgcctat
agtcgtatcagggttcgggaaccagcccaatgtcttgctccccaacagatttggccaccaanaanaatacttcaacatt
gaaagacttgatanaaagtcctcttggacagaacacgctgtttatgtatgttgccctgttatgagaatggagaa
gaaaggctgccagcgttttcccatgacatgtttatgacacttgccatctggagccagccacaacgcagcgtattct
gacgctcaaaactgaggaggagatcgagggaagggtaccttcaactcttgcaccagatcatgagcttggacaacttg
gattcgtatccgtagagggttgagagcaacgtgaaatgtgaaatcgtatgattcattatgataaagaagaatgt
gaccaaggacttaanaaatgcatgatttccctcaatgataacatttgggcttttcaaccatttcaatgggtgtcacc
tgttaattgtctcgaatcaccatgggaacacagctcattgataacaaatgttggcttcaatgacccttcaatgggtgtcacc
cctcaattcaagacttcaatgagaagagatgaccttcaactttttagagcagctgccatcaccatggacataatggagcccttg
gaagagacgtctacacactcttgcctccaccaatgaggttttgaanaacttccacgaggtgtctcagaanaaggcttccgga
gacaaagtgcctccgaagctcttatgaagtaccacacttaatacttccaggtgtctgtatatttgggagggagcagcttttg
agacgttggaaggaaatacnaattgagatgaggtgagcaggtgacagctataacagtaaatggaaatcaanaatggggaacaaag
gataatgtgacaaataatgggtgtgatccattgattgacagctcctantctgtatctgccaacaaatgattgagctggctgga
acagaacaccccttcaaggatctgtggcccaatgagcttgcatctgtctgagggccagatggagaatacatttgcctgga
cctgtgataatgcatcttctgatactctcagactggttcagcgcctcctaattatctgcagaatcacaatgaaagtanaa
gttgccctaatgagcttcaacgggcaaatctggaacacatcgagagcaaacagctcagagcttctgtatctgtacagctgt
ctgattgaaattcatcgatggagaagggaaggatgaagcaagggaagaacgggtgcgattcacaattctcgcgagatcacaagcc
agcagagaaatccctcatgaaaagttaaaaagaatgaagcgttttagcacttccatgcacttgaagctgcagacttgaan
gagctctgacacacacaggagagactggacattatttggccaacaaatgatgtcttaagggaatgactagtgagaanaaagaat
tctgtatcgggacaaatgctctcaaaactcaatttcaatcagcaccagagggttctcattggaaaaggattgaacctgggt
gtactcaacttttaagaagccacaaagggaanaaatcttctgaagagcgttgaatgatacccttggtaagtgattgaatca
aaagatctgcatcactatgacaaagctgtgattctgttggaactcttcaatcagcagcagcaacacctgttgaatgat
caactgtggaatcactaataaattcaataactcaaatgaattgttggttggtgacccctcaagaanaacccctgactgt
ctatacactaaattataccaactgaatgttggaacaaataatgaatgattgaagcagcttccagctctattatcaaacatgaag
accacactcaaaagtcaaaatgaagtggaacttgaatcagctgattgaagaagtggaacaaataatgaatgacatcat
ggagagcnaattataaanaatacacaatacttggatgagctgtcgttgaataactgaanaagagacagagaagaacg
aactattacaggtcctgaataaatactacaggtttctatgaggtgaggaacaagaacacttgaagaatgtttacaag
agaggtcaccaaggtcaccaaatcattgaaggtgtgattgattgaatgaatgaanaatgaagaacttgcagga
gacacaccctggaggaaggttgcgaagccacaanaaagtctcaggttctagaagacgattaaagggaaggtctgtctcag

【図 2 B】

MIPFLPMFSLLLLLLVNPNANNNHYDKILAHSRIRGRDQGNVNCALQQLGTKKKY
FSTCKNWYKKSICGQKTTVLYECCPGYMRMEGMKGCPAVLPIDHVVYGLGIVG
ATTQRYSDASKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLSDIRRGLESNVNVELLNA
LHSHMINKRMLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNVGVTVNVCARIHGNQIAT
NGVVHVDRVLTQIGTSIQDFIEAEDDLSFRAAAITSDILEALGRDGHFTLPAPIN
EAFEKLPRGVLERFMDGKVASEALMKYHILNTLQCSSESIMGGAVFTELEGNITIE
GCDGDSITVNGIKMVNKKDVTNNGVHILIDQVLPDSAKQVIELAGKQQTTFD
LVAQLGLASALRPDGEYTLAPVNNAFSDDTLSMVQRLKILQNHILKVKVGL
NELYNGQILETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCEMEKGSQQRNGAIHFIREIIPAE
KSLHEKLDQDKRFSFLSLEAADLKELLTQPGDWLTFVPTNDAFKGMTSEEKEI
LIRDKNALQNILYHLTPGVHIGKGFEPGVNINLKTQGSKIFLKEVNDLLVNLK
SKESDIMITNGVHVVDKLLYPADTPVGNQDQLEILNKLKIQIKFVRGSTFKFIP
VTYVYTKIITKVVPEPKJIEGSLQHIKTEGTLTKVKIGEPFRLIKEGTEITEVI
HGEPIIKYTKIIDGVPISETEKREERIITGEPIYRISTGGOBTETELKQLQEE
VTKVTKFIEGQDGHLEFEIEKRLKQDTPVRLKQANKKVQGSRRRLREGRSQ

CRD

N末端リダー配列

1 2 3 4

可変C末端

【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
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016471 A2(51) International Patent Classification⁷: C12N

European patent (AT, BI, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number: PCT/US02/25603

(22) International Filing Date: 13 August 2002 (13.08.2002)

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW; ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/312,123 13 August 2001 (13.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
[US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CHEN, Lan, Bo [US]; 184 East Emmerson Road, Lexington, MA 02420 (US); DAI, Meiru [CN/US]; Apt. 3, 81 Washington Street, Malden, MA 02148 (US); SASAKI, Hidefumi [JP/JP]; 3-53-12 Iseiwagaoka, Meito-ku, Nagoya 465-0097 (JP); AUCLAIR, Daniel [CA/US]; 2 Alenquin Trail, Ashland, MA 01721 (US).

(74) Agent: FRASER, Janis, K.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

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.

(54) Title: PERIOSTIN-BASED DIAGNOSTIC ASSAYS

(57) Abstract: The invention includes novel human periostin polypeptides and DNAs encoding them. Also embraced by the invention are human periostin specific antibodies, diagnostic assays for metastasis of breast cancer to bone, and proclampsia.



WO 03/016471 A2

WO 03/016471

PCT/US02/25603

PERIOSTIN-BASED DIAGNOSTIC ASSAYS

This application claims priority of U.S. provisional application no. 60/312,123, filed August 13, 2001.

TECHNICAL FIELD

This invention relates to methods of diagnosis, and more particularly to methods of diagnosing metastasis of breast cancer to bone and preeclampsia.

BACKGROUND

Metastatic bone tumors are the most common type of malignant bone lesion seen in adults, and are the most frequent metastatic site after lung and liver [Yoneda et al. (2000) J. Orthop. Sci. 5(1):75-81]. Both osteoblastic and osteolytic bone metastases are major causes of increased morbidity and eventual mortality in breast cancer patients. Approximately 75% of women who die of breast cancer display bone metastases at autopsy [Galasko, Incidence and distribution of skeletal metastases. *In*: C.S.B. Galasko (ed.) Skeletal Metastases. pp. 14-21, Butterworth, London, 1986; Rubens, The nature of metastatic bone disease. *In*: Bone Metastases. Diagnosis and Treatment, pp. 1-10, Springer, London, 1991].

Preeclampsia is among the most frequent causes of maternal death and perinatal mortality [Roberts et al. (1993) Lancet 341:1447-1451].

In light of the above considerations, it is important that there be available simple and reliable tests for metastasis of breast cancer to bone and preeclampsia.

SUMMARY

The inventors have identified novel human deletion variants of the protein originally designated osteoblast-specific factor-2 (OSF-2) and now called periostin [Takeshita et al. (1993) Biochem. J. 294:272-278; Horiuchi et al. (1999) J. Bone Miner. Res. 14:1239-1249]. One of the novel periostin variants was isolated from colon cancer cells and is designated TCG1. Text that refers to periostin without specifying a particular variant is pertinent to all the variants disclosed herein. The invention includes these novel periostin polypeptides, DNAs encoding them, vectors containing the DNAs, and cells containing the vectors. The invention also features antibodies,

WO 03/016471

PCT/US02/25603

including monoclonal antibodies (mAbs), specific for human periostin and assays using such antibodies for measuring periostin in samples (e.g., blood samples). In addition, the invention embodies methods for diagnosing metastasis of breast cancer to bone and preeclampsia.

More specifically, the invention features a purified antibody that binds specifically to human periostin. The antibody can be a polyclonal antibody or a monoclonal antibody (mAb), e.g., a mAb secreted by the 5H8 hybridoma (ATCC accession no. CRL-2646), the 8H11 hybridoma (ATCC accession no. _____), the 1B11 hybridoma, the 2C6 hybridoma, the 6B1 hybridoma, the 8E3 hybridoma, the 10A3 hybridoma, or the 7E4 hybridoma. Also embodied by the invention is a hybridoma that secretes a mAb that binds to human periostin, e.g., any of the hybridomas listed above.

Another aspect of the invention is a method of detecting human periostin in a sample. The method involves: (a) contacting the sample with an antibody that binds to human periostin; and (b) determining whether the antibody binds to a component of the sample. Binding of the antibody to a component of the sample indicates the presence of periostin in the sample. The method can further include, prior to contacting the sample with the first antibody that binds to human periostin, contacting the sample with a second antibody that binds to human periostin. An epitope on human periostin to which the first antibody binds is not the same as an epitope to which the second antibody binds. The second antibody can be bound to a solid substrate. The first antibody can be a polyclonal antibody or a mAb. The mAb can be a mAb that is secreted by any of the above-mentioned hybridomas. In addition, the second antibody can be a mAb (such as any of the above-mentioned mAbs) or a polyclonal antibody. The method can comprise, for example, an immunoblot assay or an ELISA assay and the detecting step can involve detecting, for example, chemiluminescence, radioactivity or fluorescence. Alternatively, the detecting step can involve measuring, for example, absorbance of visible or ultraviolet light. The first antibody can be biotinylated and the detecting step involve the use of avidin. Alternatively, the detecting step can involve the use of an antibody that binds to an immunoglobulin molecule.

Also embraced by the invention is a method of diagnosing a metastasis of breast cancer to bone. The method involves: (a) identifying a breast cancer patient suspected of having or being at risk of having a metastasis of breast cancer to bone; and (b) measuring the level of periostin in a sample of a body fluid from the patient. An elevated level of periostin in the sample, compared to a control level of periostin, is an indication that the patient has a metastasis

WO 03/016471

PCT/US02/25603

of breast cancer to the bone. The body fluid can be blood or any other body fluid recited herein, e.g., urine.

Another aspect of the invention is a method of diagnosing preeclampsia in a patient. The method involves: (a) identifying a pregnant patient suspected of having or being at risk of having preeclampsia; and (b) measuring the level of periostin in a sample of a body fluid from the patient. An elevated level of periostin in the sample, compared to a control level of periostin, is an indication that the patient has preeclampsia. The body fluid can be blood or any other body fluid recited herein, e.g., urine.

Another aspect of the invention is an isolated DNA that includes a nucleic acid sequence encoding a polypeptide that contains SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:14; the nucleic acid sequence can be SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:13. Alternatively, the isolated DNA can include a nucleic acid sequence encoding a polypeptide containing SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:12; the nucleic acid sequence can be SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:11. The invention also includes a vector containing any of the above DNAs, e.g., a vector in which the nucleic acid sequence is operably linked to a transcriptional regulatory element (TRE). Also included in the invention is a cell containing any of the above vectors.

Also featured by invention is an isolated polypeptide containing SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:12 or SEQ ID NO:14. The invention also provides an antigenic fragment of any of the polypeptides. The fragment is shorter than the full-length polypeptide. The fragment can contain, consecutively, residues 725 and 726 of SEQ ID NO:4 or residues 768-771 of SEQ ID NO:12. Also embraced by the invention is a method of making any of the polypeptides of the invention. The method involves: (a) culturing any of the cells of the invention, provided that the vector that the cell contains includes a TRE operably linked to nucleic acid sequence encoding the polypeptide; and (b) isolating the polypeptide from the culture.

"Polypeptide" and "protein" are used interchangeably and mean any peptide-linked chain of amino acids, regardless of length or post-translational modification.

The term "isolated" polypeptide or peptide fragment as used herein refers to a polypeptide or a peptide fragment which either has no naturally-occurring counterpart or has been separated or purified from components which naturally accompany it, e.g., in normal tissues such as lung, kidney, or placenta, tumor tissue such as colon cancer tissue, or body fluids

WO 03/016471

PCT/US02/25603

such as blood, serum, or urine. Typically, the polypeptide or peptide fragment is considered "isolated" when it is at least 70%, by dry weight, free from the proteins and other naturally-occurring organic molecules with which it is naturally associated. Preferably, a preparation of a polypeptide (or peptide fragment thereof) of the invention is at least 80%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 99%, by dry weight, the polypeptide (or the peptide fragment thereof), respectively, of the invention. Thus, for example, a preparation of polypeptide x is at least 80%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 99%, by dry weight, polypeptide x. Since a polypeptide that is chemically synthesized is, by its nature, separated from the components that naturally accompany it, the synthetic polypeptide is "isolated."

An isolated polypeptide (or peptide fragment) of the invention can be obtained, for example, by extraction from a natural source (e.g., from tissues or bodily fluids); by expression of a recombinant nucleic acid encoding the polypeptide; or by chemical synthesis. A polypeptide that is produced in a cellular system different from the source from which it naturally originates is "isolated," because it will necessarily be free of components which naturally accompany it. The degree of isolation or purity can be measured by any appropriate method, e.g., column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, or HPLC analysis.

An "isolated DNA" is either (1) a DNA that contains sequence not identical to that of any naturally occurring sequence, or (2) in the context of a DNA with a naturally-occurring sequence (e.g., a cDNA or genomic DNA), a DNA free of at least one of the genes that flank the gene containing the DNA of interest in the genome of the organism in which the gene containing the DNA of interest naturally occurs. The term therefore includes a recombinant DNA incorporated into a vector, into an autonomously replicating plasmid or virus, or into the genomic DNA of a prokaryote or eukaryote. The term also includes a separate molecule such as: a cDNA where the corresponding genomic DNA has introns and therefore a different sequence; a genomic fragment that lacks at least one of the flanking genes; a fragment of cDNA or genomic DNA produced by polymerase chain reaction (PCR) and that lacks at least one of the flanking genes; a restriction fragment that lacks at least one of the flanking genes; a DNA encoding a non-naturally occurring protein such as a fusion protein, mutein, or fragment of a given protein; and a nucleic acid which is a degenerate variant of a cDNA or a naturally occurring nucleic acid. Also included is a recombinant DNA that includes a portion of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11, or

WO 03/016471

PCT/US02/25603

SEQ ID NO:13. The term "isolated DNA" does not include a DNA present within, for example, cDNA or genomic DNA libraries or genomic DNA restriction digests in, for example, a restriction digest reaction mixture or an electrophoretic gel slice.

As used herein, an "antigenic fragment" of a periostin polypeptide is a fragment of the polypeptide that is shorter than the full-length polypeptide and has at least 5% (e.g., 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%, or more) of the ability of the full-length polypeptide to bind to an antibody specific for periostin. Fragments of interest can be made by recombinant, synthetic, or proteolytic digestive methods. Such fragments can then be isolated and tested for their ability to bind to an antibody specific for periostin by methods known in the art. As used herein, "full-length" periostin is immature periostin and thus includes the periostin native signal sequence.

As used herein, an expression control sequence that is "operably linked" to a coding sequence is incorporated into a genetic construct so that the expression control sequence effectively controls expression of the coding sequence.

As used herein, the term "antibody" refers not only to whole antibody molecules, but also to antigen-binding fragments, e.g., Fab, F(ab')₂, Fv, and single chain Fv (scFv) fragments. As used herein, a "scFv" fragment is a recombinant fragment of an antibody molecule that contains, in a single polypeptide chain, the antigen-binding regions of an immunoglobulin (Ig) heavy and an Ig light chain. scFv fragments generally either contain (a) no Ig heavy or Ig light chain constant regions or (b) less than the whole constant region of an Ig heavy and/or Ig light chain. Also included are chimeric antibodies.

As used herein, "testing for expression of a periostin gene in non-small cell cancer (NSCLC) tissue" means testing for expression of a periostin gene in NSCLC cells and stromal cells within and immediately surrounding the tumor as it occurs *in vivo*.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention pertains. In case of conflict, the present document, including definitions, will control. Preferred methods and materials are described below, although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention. All publications, patent applications, patents and other references mentioned herein

WO 03/016471

PCT/US02/25603

are incorporated by reference in their entirety. The materials, methods, and examples disclosed herein are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention, e.g., testing for metastasis of breast cancer to bone, will be apparent from the following description, from the drawings and from the claims.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

FIG. 1A is a depiction of the nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of cDNA encoding full-length OSF-2.

FIG. 1B is a depiction of the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of full-length OSF-2.

FIG. 2A is a depiction of the nucleotide sequence (SEQ ID NO:3) of cDNA encoding full-length periostin-L.

FIG. 2B is a depiction of the amino acid sequence (SEQ ID NO:4) of full-length periostin-L.

FIG. 3A is a depiction of the nucleotide sequence (SEQ ID NO:7) of cDNA encoding full-length periostin-K.

FIG. 3B is a depiction of the amino acid sequence (SEQ ID NO:8) of full-length periostin-K.

FIG. 4A is a depiction of the nucleotide sequence (SEQ ID NO:11) of cDNA encoding full-length periostin-C (TCG1).

FIG. 4B is a depiction of amino acid sequence (SEQ ID NO:12) of full-length periostin-C (TCG1).

FIG. 5 is a schematic representation of the periostin-C (TCG1) molecule showing the relative positions of an N-terminal leader sequence, a cysteine-rich domain ("CRD"), four internal homologous repeats ("1", "2", "3", and "4"), and a C-terminal domain that varies between periostin variants ("Variable C-terminus").

DETAILED DESCRIPTION

Sequencing of cDNA products of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of RNA isolated from various tissues revealed novel splice variants of human periostin. One variant that is expressed in placenta and lung is referred to herein as periostin-L.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Another that is expressed in kidney is designated periostin-K. In addition, screening of a human carcinoma cDNA library with a DNA fragment derived by differential display of cDNA derived from colon cancer tissue and from normal colon tissue identified a transcript that is over-expressed in colon cancer cells. The cDNA molecule identified encodes another variant (designated herein as TCG1 or periostin-C) of the periostin molecule.

The inventors have also produced a polyclonal antibody (E17) and a variety of monoclonal antibodies that bind to periostin. Using these antibodies, they have also developed a "sandwich" ELISA assay using chemiluminescence for detection.

In clinical studies, the inventors have shown that serum levels of periostin are elevated in breast cancer patients having metastases to bone (compared to breast cancer patients having no sign of bone metastasis), and in patients with preeclampsia (compared to normotensive pregnant women). In a study of patients with a variety of lung cancers, 24% of the patients were found to have elevated serum periostin levels. Moreover, all the patients with very high levels (i.e., > 1,000 ng/ml) have died. These findings suggest that periostin is a marker for cancer (e.g., lung cancer), particularly advanced cancer. They also provide the bases for assays to diagnose bone metastasis in breast cancer and preeclampsia.

In addition, ovarian cancer cells and brain tumor cells overexpress periostin [Ismail et al. (2000) Cancer Res. 60:6744-6749; Lal et al. (1999) Cancer Res. 59:5403-5407].

Periostin Nucleic Acid Molecules

The periostin nucleic acid molecules of the invention can be cDNA, genomic DNA, synthetic DNA, or RNA, and can be double-stranded or single-stranded (i.e., either a sense or an antisense strand). Segments of these molecules are also considered within the scope of the invention, and can be produced by, for example, the polymerase chain reaction (PCR) or generated by treatment with one or more restriction endonucleases. A ribonucleic acid (RNA) molecule can be produced by *in vitro* transcription. Preferably, the nucleic acid molecules encode polypeptides that, regardless of length, are soluble under normal physiological conditions.

The nucleic acid molecules of the invention can contain naturally occurring sequences, or sequences that differ from those that occur naturally, but, due to the degeneracy of the genetic code, encode the same polypeptide (for example, the polypeptides with SEQ ID NOS:4, 6, 12

WO 03/016471

PCT/US02/25603

and 14). In addition, these nucleic acid molecules are not limited to coding sequences, e.g., they can include some or all of the non-coding sequences that lie upstream or downstream from a coding sequence.

The nucleic acid molecules of the invention can be synthesized (for example, by phosphoramidite-based synthesis) or obtained from a biological cell, such as the cell of a mammal. The nucleic acids can be those of a human, non-human primate (e.g., monkey), mouse, rat, guinea pig, cow, sheep, horse, pig, rabbit, dog, or cat. Combinations or modifications of the nucleotides within these types of nucleic acids are also encompassed.

In addition, the isolated nucleic acid molecules of the invention encompass segments that are not found as such in the natural state. Thus, the invention encompasses recombinant nucleic acid molecules (for example, isolated nucleic acid molecules encoding periostin incorporated into a vector (for example, a plasmid or viral vector) or into the genome of a heterologous cell (or the genome of a homologous cell, at a position other than the natural chromosomal location)). Recombinant nucleic acid molecules and uses therefor are discussed further below.

Techniques associated with detection or regulation of genes are well known to skilled artisans. Such techniques can be used to diagnose and/or treat disorders associated with aberrant periostin expression.

A periostin family gene or protein can be identified based on its similarity to the relevant periostin gene or protein, respectively. For example, the identification can be based on sequence identity. The invention features isolated nucleic acid molecules which are at least 50% (or 55%, 65%, 75%, 85%, 95%, or 98%) identical to: (a) the nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 2, 4, 6 or 8; and (b) a nucleic acid molecule which includes a segment of at least 30 (e.g., at least 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 700, 900, 1,100, 1,400, 1,700, 2,000, 2,200, 2,250, 2,300 or 2,310) nucleotides of SEQ ID NO: 3, 5, 11 or 13.

The determination of percent identity between two sequences is accomplished using the mathematical algorithm of Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Such an algorithm is incorporated into the BLASTN and BLASTP programs of Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. BLAST nucleotide searches are performed with the BLASTN program, score = 100, wordlength = 12, to obtain nucleotide sequences homologous to periostin encoding nucleic acids. BLAST protein searches are performed with the BLASTP program, score = 50, wordlength = 3, to obtain amino acid sequences homologous to the

WO 03/016471

PCT/US02/25603

periostin polypeptide. To obtain gapped alignments for comparative purposes, Gapped BLAST is utilized as described in Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) are used (*See* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Hybridization can also be used as a measure of homology between two nucleic acid sequences. A periostin-encoding nucleic acid sequence, or a portion thereof, can be used as a hybridization probe according to standard hybridization techniques. The hybridization of a periostin probe to DNA or RNA from a test source (e.g., a mammalian cell) is an indication of the presence of periostin DNA or RNA in the test source. Hybridization conditions are known to those skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Moderate hybridization conditions are defined as equivalent to hybridization in 2X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at 30°C, followed by a wash in 1 X SSC, 0.1% SDS at 50°C. Highly stringent conditions are defined as equivalent to hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at 45°C, followed by a wash in 0.2 X SSC, 0.1% SDS at 65°C.

The invention also encompasses: (a) vectors (see below) that contain any of the foregoing periostin related coding sequences and/or their complements (that is, "antisense" sequences); (b) expression vectors that contain any of the foregoing periostin related coding sequences operably linked to any transcriptional/translational regulatory elements (examples of which are given below) necessary to direct expression of the coding sequences; (c) expression vectors encoding, in addition to a periostin polypeptide, a sequence unrelated to periostin, such as a reporter, a marker, or a signal peptide fused to periostin; and (d) genetically engineered host cells (see below) that contain any of the foregoing expression vectors and thereby express the nucleic acid molecules of the invention.

Recombinant nucleic acid molecules can contain a sequence encoding periostin or periostin having an heterologous signal sequence. The full length periostin polypeptide, or a fragment thereof, may be fused to such heterologous signal sequences or to additional polypeptides, as described below. Similarly, the nucleic acid molecules of the invention can encode the mature form of periostin or a form that includes an exogenous polypeptide that facilitates secretion.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

The transcriptional/translational regulatory elements referred to above and further described below include but are not limited to inducible and non-inducible promoters, enhancers, operators and other elements that are known to those skilled in the art and that drive or otherwise regulate gene expression. Such regulatory elements include but are not limited to the cytomegalovirus hCMV immediate early gene, the early or late promoters of SV40 adenovirus, the *lac* system, the *trp* system, the *TAC* system, the *TRC* system, the major operator and promoter regions of phage λ , the control regions of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of acid phosphatase, and the promoters of the yeast α -mating factors.

Similarly, the nucleic acid can form part of a hybrid gene encoding additional polypeptide sequences, for example, a sequence that functions as a marker or reporter. Examples of marker and reporter genes include β -lactamase, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), adenosine deaminase (ADA), aminoglycoside phosphotransferase (neo^r, G418^r), dihydrofolate reductase (DHFR), hygromycin-B-phosphotransferase (HPH), thymidine kinase (TK), *lacZ* (encoding β -galactosidase), and xanthine guanine phosphoribosyltransferase (XGPRT). As with many of the standard procedures associated with the practice of the invention, skilled artisans will be aware of additional useful reagents, for example, additional sequences that can serve the function of a marker or reporter. Generally, the hybrid polypeptide will include a first portion and a second portion; the first portion being a peristatin polypeptide and the second portion being, for example, the reporter described above or an Ig constant region or part of an Ig constant region, e.g., the CH2 and CH3 domains of IgG2a heavy chain. Other hybrids could include an antigenic tag or His tag to facilitate purification.

The expression systems that may be used for purposes of the invention include but are not limited to microorganisms such as bacteria (for example, *E. coli* and *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA expression vectors containing the nucleic acid molecules of the invention; yeast (for example, *Saccharomyces* and *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing the nucleic acid molecule of the invention; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (for example, baculovirus) containing the nucleic acid molecule of the invention; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (for example, cauliflower mosaic virus (CaMV) or tobacco mosaic virus (TMV)) or transformed with recombinant plasmid expres-

WO 03/016471

PCT/US02/25603

sion vectors (for example, Ti plasmid) containing a periostin nucleotide sequence; or mammalian cell systems (for example, COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI38, and NIH 3T3 cells) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (for example, the metallothionein promoter) or from mammalian viruses (for example, the adenovirus late promoter and the vaccinia virus 7.5K promoter). Also useful as host cells are primary or secondary cells obtained directly from a mammal and transfected with a plasmid vector or infected with a viral vector.

Cells transfected or transduced with the expression vectors of the invention can then be used, for example, for large or small scale *in vitro* production of a periostin polypeptide or antigenic fragment thereof by methods known in the art. In essence, such methods involve culturing the cells under conditions which maximize production of the polypeptide or antigenic fragment and isolating it from the cells or from the culture medium.

Periostin Polypeptides and Polypeptide Fragments

The polypeptides of the invention include periostin-L, periostin-L without a signal peptide, periostin-C, and periostin-C without a signal peptide, as well as antigenic fragments of these polypeptides. Antigenic fragments of periostin-L can include, consecutively, (a) residues 669 and 670 of SEQ ID NO: 4 and/or (b) residues 725 and 726 of SEQ ID NO:4. Antigenic fragments of periostin-C can include, consecutively, (a) residues 669 and 670 of SEQ ID NO:12 and/or (b) residues 768-771 of SEQ ID NO:12. Antigenic fragments also include the full-length forms of any of the periostin molecules but with the N-terminal 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 amino acid residues deleted. The polypeptides embraced by the invention also include fusion proteins that contain either full-length periostin (including any of the forms disclosed herein) or an antigenic fragment of it fused to unrelated amino acid sequence. The unrelated sequences can be additional functional domains or signal peptides. Signal peptides are described in greater detail and exemplified below. The polypeptides can be any of those described above but with not more than 50 (i.e., not more than: 50; 40; 30; 20; 15; 12; 10; nine; eight; seven; six; five; four; three; two; or one) conservative substitutions.

The amino acid sequences of the periostin molecules and antigenic fragments thereof can be identical to the wild-type sequences of the periostin molecules and the sequences of the fragments as they occur in the wild-type periostin molecules, respectively. Alternatively, any of

WO 03/016471

PCT/US02/25603

the components can contain mutations such as deletions, additions, or substitutions. All that is required is that the mutant periostin molecule have at least 5% (e.g., 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100%, or even more) of the ability of the wild-type periostin molecule or the antigenic fragment as it occurs in the wild-type periostin molecule to bind to an antibody specific for wild-type periostin. Substitutions will preferably be conservative substitutions. Conservative substitutions typically include substitutions within the following groups: glycine and alanine; valine, isoleucine, and leucine; aspartic acid and glutamic acid; asparagine, glutamine, serine and threonine; lysine, histidine and arginine; and phenylalanine and tyrosine.

The polypeptides can be purified from natural sources (e.g., blood, serum, plasma, tissues or cells such as normal lung or placenta or colon cancer tissue, or any cell that naturally produces periostin polypeptides). The periostin molecules and antigenic fragments can be those of a human, non-human primate (e.g., a monkey), mouse, rat, guinea pig, cow, sheep, horse, pig, rabbit, dog, or cat. Smaller peptides (less than 100 amino acids long) can also be conveniently synthesized by standard chemical means. In addition, both polypeptides and peptides can be produced by standard *in vitro* recombinant DNA techniques and *in vivo* transgenesis using nucleotide sequences encoding the appropriate polypeptides or peptides. Methods well-known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing relevant coding sequences and appropriate transcriptional/translational control signals. See, for example, the techniques described in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.) [Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989], and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* [Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989].

The polypeptides and antigenic fragments of the invention can be used to generate anti-periostin antibodies or for basic studies on periostin function, e.g., investigations into the significance of its association with various cancers and preeclampsia. The polypeptides and functional fragments can also be used as positive controls in the diagnostic assays of the invention (see below).

Polypeptides and fragments of the invention also include those described above, but modified for *in vivo* use by the addition, at the amino- and/or carboxyl-terminal ends, of a blocking agent to facilitate survival of the relevant polypeptide *in vivo*. This can be useful in those situations in which the peptide termini tend to be degraded by proteases prior to cellular

WO 03/016471

PCT/US02/25603

uptake. Such blocking agents can include, without limitation, additional related or unrelated peptide sequences that can be attached to the amino and/or carboxyl terminal residues of the peptide to be administered. This can be done either chemically during the synthesis of the peptide or by recombinant DNA technology by methods familiar to artisans of average skill.

Alternatively, blocking agents such as pyroglutamic acid or other molecules known in the art can be attached to the amino and/or carboxyl terminal residues, or the amino group at the amino terminus or carboxyl group at the carboxyl terminus can be replaced with a different moiety. Likewise, the peptides can be covalently or noncovalently coupled to pharmaceutically acceptable "carrier" proteins prior to administration.

Also of interest are peptidomimetic compounds that are designed based upon the amino acid sequences of the functional peptide fragments. Peptidomimetic compounds are synthetic compounds having a three-dimensional conformation (i.e., a "peptide motif") that is substantially the same as the three-dimensional conformation of a selected peptide. The peptide motif provides the peptidomimetic compound with the ability to bind to an antibody specific for periostin in a manner qualitatively identical to that of the periostin functional fragment from which the peptidomimetic was derived. Peptidomimetic compounds can have additional characteristics that enhance their *in vivo* utility, such as increased cell permeability and prolonged biological half-life.

The peptidomimetics typically have a backbone that is partially or completely non-peptide, but with side groups that are identical to the side groups of the amino acid residues that occur in the peptide on which the peptidomimetic is based. Several types of chemical bonds, e.g., ester, thioester, thioamide, retroamide, reduced carbonyl, dimethylene and ketomethylene bonds, are known in the art to be generally useful substitutes for peptide bonds in the construction of protease-resistant peptidomimetics.

The *in vivo* half life of the polypeptides or polypeptide fragments of the invention can also be prolonged by substitution of all or some of the L-amino acid residues of the native molecule or functional fragment with D-amino acids.

Periostin Antibodies

The invention features antibodies that bind specifically to any of the periostin polypeptides or fragments of such polypeptides. Such antibodies can be polyclonal antibodies

WO 03/016471

PCT/US02/25603

present in the serum or plasma of animals (e.g., mice, rabbits, rats, guinea pigs, sheep, horses, goats, cows, or pigs) that have been immunized with the relevant periostin polypeptide or peptide fragment using methods, and optionally adjuvants, known in the art. Such polyclonal antibodies can be isolated from, for example, serum, plasma, or ascites by methods known in the art. An example of such a polyclonal antibody is the E17 polyclonal antibody. Monoclonal antibodies that bind to the above polypeptides or fragments are also encompassed by the invention. Methods of making and screening monoclonal antibodies are well known in the art.

Once the desired antibody-producing hybridoma has been selected and cloned, the resultant antibody can be produced by a number of *in vivo* and *in vitro* methods known in the art. For example, the hybridoma can be cultured *in vitro* in a suitable medium for a suitable length of time, followed by the recovery of the desired antibody from the supernatant. The length of time and medium are known or can be readily determined.

Additionally, recombinant antibodies specific for periostin, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies comprising both human and non-human portions, are within the scope of the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example, using methods described in Robinson et al., International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira et al., European Patent Application 184,187; Taniguchi, European Patent Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., PCT Application WO 86/01533; Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al. (1988) Science 240:1041-43; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-26; Sun et al. (1987) PNAS 84:214-18; Nishimura et al. (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-49; Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-59; Morrison, (1985) Science 229:1202-07; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-25; Verocayan et al. (1988) Science 239:1534; and Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-60.

Also included within the scope of the invention are antibody fragments and derivatives which contain at least the functional portion of the antigen binding domain of an antibody that binds specifically to periostin. Antibody fragments that contain the binding domain of the molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include, but are not limited to: F(ab')₂ fragments that can be produced by pepsin digestion of antibody molecules;

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Fab fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of F(ab')₂ fragments; and Fab fragments that can be generated by treating antibody molecules with papain and a reducing agent. See, e.g., National Institutes of Health, 1 Current Protocols In Immunology, Coligan *et al.*, ed. 2.8, 2.10 (Wiley Interscience, 1991). Antibody fragments also include Fv (e.g., single chain Fv (scFv)) fragments, *i.e.*, antibody products in which there are few or no constant region amino acid residues. An scFv fragment is a single polypeptide chain that includes both the heavy and light chain variable regions of the antibody from which the ScFv is derived. Such fragments can be produced, for example, as described in U.S. Patent No. 4,642,334, which is incorporated herein by reference in its entirety.

The antibodies of the invention can bind to all periostin splice variants, a subgroup of splice variants, or a single splice variant. Ways for making and screening for splice variant-specific antibodies are known to those in the art. For example, if it were desired to make an antibody specific for a periostin domain absent in periostin variant x but present in periostin variant y, one could immunize an animal (e.g., a mouse) with periostin variant y and select for antibodies that bind to periostin variant y but not to periostin variant x. Alternatively, the animal could be immunized with a functional fragment of periostin composed of the domain of interest. Antibodies could be selected on the basis of their ability to bind to the functional fragment of periostin and variant y and their inability to bind to variant x.

Applicants have deposited under the Budapest Treaty the 5H8 and 8H11 hybridomas with the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD 20852, U.S.A. The 5H8 hybridoma was assigned the ATCC accession no. CRL-2646 and the 8H11 hybridoma the ATCC accession no. _____. The hybridomas deposited with the ATCC were taken from a deposit maintained by the Dana Farber Cancer Institute, Inc., since prior to the priority date of this application. The deposits of hybridomas will be maintained without restriction in the ATCC depository for a period of 30 years, or five years after the most recent request, or for the effective life of the patent, whichever is the longer, and will be replaced if the deposit becomes non-viable during that period.

Diagnostic assays

The invention features diagnostic assays. Such assays are based on the findings that serum levels of periostin are elevated in breast cancer patients having metastases to bone

WO 03/016471

PCT/US02/25603

(compared to breast cancer patients having no sign of bone metastasis) and in patients with preeclampsia (compared to normotensive pregnant women). These findings provide the bases for assays to diagnose bone metastasis in breast cancer and preeclampsia. Such assays can be used on their own or, preferably, in conjunction with other procedures to test for the relevant clinical condition.

In the assays of the invention either: (1) the presence of periostin protein or periostin mRNA in cancer tissue (including surrounding stromal cells) is tested for or their levels are measured; or (2) the level of periostin protein is measured in a liquid sample such as a body fluid (e.g., urine, saliva, semen, blood, or serum or plasma derived from blood); a lavage such as a lung lavage, a gastric lavage, a rectal or colonic lavage, or a vaginal lavage; or a fluid such as a supernatant from a cell culture. In order to test for the presence or measure the level of periostin mRNA in cells, the cells can be lysed and total RNA can be purified or semi-purified from the lysates by any of a variety of methods known to those in the art. Methods of detecting or measuring levels of particular mRNA transcripts are also familiar to those in the art. Such assays include, without limitation, hybridization assays using detectably labeled periostin-specific DNA or probes and quantitative or semi-quantitative RT-PCR methodologies employing appropriate periostin-specific oligonucleotide primers (see Example 1). Additional methods for quantitating mRNA in cell lysates include RNA protection assays and serial analysis of gene expression (SAGE). Alternatively, qualitative, quantitative, or semi-quantitative *in situ* hybridization assays can be carried out using, for example, tissue sections or unlysed cell suspensions, and detectably (e.g., fluorescently or enzyme) labeled DNA or RNA probes.

Methods of detecting or measuring the levels of a protein of interest (e.g., periostin) in cells are known in the art. Many such methods employ antibodies (e.g., polyclonal antibodies or mAbs) that bind specifically to the protein. In such assays, the antibody itself or a secondary antibody that binds to it can be detectably labeled. Alternatively, the antibody can be conjugated with biotin, and detectably labeled avidin (a protein that binds to biotin) can be used to detect the presence of the biotinylated antibody. Combinations of these approaches (including "multi-layer" assays) familiar to those in the art can be used to enhance the sensitivity of assays. Some of these assays (e.g., immunohistological methods or fluorescence flow cytometry) can be applied to histological sections or unlysed cell suspensions. The methods described below for detecting periostin in a liquid sample can also be used to detect periostin in cell lysates.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Methods of detecting periostin in a liquid sample (see above) basically involve contacting a sample suspected of containing periostin with an antibody of the invention and testing for binding of the antibody to a component of the sample. In such assays the antibody need not be detectably labeled and can be used without a second antibody that binds to periostin. For example, by exploiting the phenomenon of surface plasmon resonance, an antibody specific for periostin bound to an appropriate solid substrate is exposed to the sample. Binding of periostin to the antibody on the solid substrate results in a change in the intensity of surface plasmon resonance that can be detected qualitatively or quantitatively by an appropriate instrument, e.g., a Biacore apparatus (Biacore International AB, Rapskatan, Sweden).

Moreover, assays for detection of periostin in a liquid sample can involve the use, for example, of: (a) a single periostin-specific antibody that is detectably labeled; (b) an unlabeled periostin-specific antibody and a detectably labeled secondary antibody; or (c) a biotinylated periostin-specific antibody and detectably labeled avidin. In addition, as described above for detection of proteins in cells, combinations of these approaches (including "multi-layer" assays) familiar to those in the art can be used to enhance the sensitivity of assays. In these assays, the sample or an (aliquot of the sample) suspected of containing periostin can be immobilized on a solid substrate such as a nylon or nitrocellulose membrane by, for example, "spotting" an aliquot of the liquid sample or by blotting of an electrophoretic gel on which the sample or an aliquot of the sample has been subjected to electrophoretic separation. The presence or amount of periostin on the solid substrate is then assayed using any of the above described forms of the periostin-specific antibody and, where required, appropriate detectably labeled secondary antibodies or avidin.

The invention also features "sandwich" assays. In these sandwich assays, instead of immobilizing samples on solid substrates by the methods described above, any periostin that may be present in a sample can be immobilized on the solid substrate by, prior to exposing the solid substrate to the sample, conjugating a second ("capture") periostin-specific antibody (polyclonal or mAb) to the solid substrate by any of a variety of methods known in the art (e.g., see Example 1 below). In exposing the sample to the solid substrate with the second periostin-specific antibody bound to it, any periostin in the sample (or sample aliquot) will bind to the second periostin-specific antibody on the solid substrate. The presence or amount of periostin bound to the conjugated second periostin-specific antibody is then assayed using a "detection" periostin-

WO 03/016471

PCT/US02/25603

specific antibody by methods essentially the same as those described above using a single periostin-specific antibody. It is understood that in these sandwich assays, the capture antibody should not bind to the same epitope (or range of epitopes in the case of a polyclonal antibody) as the detection antibody. Thus, if a mAb is used as a capture antibody, the detection antibody can be either: (a) another mAb that binds to an epitope that is either completely physically separated from or only partially overlaps with the epitope to which the capture mAb binds; or (b) a polyclonal antibody that binds to epitopes other than or in addition to that to which the capture mAb binds. On the other hand, if a polyclonal antibody is used as a capture antibody, the detection antibody can be either: (a) a mAb that binds to an epitope that is either completely physically separated from or partially overlaps with any of the epitopes to which the capture polyclonal antibody binds; or (b) a polyclonal antibody that binds to epitopes other than or in addition to that to which the capture polyclonal antibody binds. Assays which involve the use of a capture and detection antibody include sandwich ELISA assays, sandwich Western blotting assays, and sandwich immunomagnetic detection assays.

Suitable solid substrates to which the capture antibody can be bound include, without limitation, the plastic bottoms and sides of wells of microtiter plates, membranes such as nylon or nitrocellulose membranes, polymeric (e.g., without limitation, agarose, cellulose, or polyacrylamide) beads or particles. It is noted that periostin-specific antibodies bound to such beads or particles can also be used for immunoaffinity purification of periostin.

Methods of detecting or for quantifying a detectable label depend on the nature of the label and are known in the art. Appropriate labels include, without limitation, radionuclides (e.g., ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{32}P , or ^{14}C), fluorescent moieties (e.g., fluorescein, rhodamine, or phycoerythrin), luminescent moieties (e.g., Qdot™ nanoparticles supplied by the Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA), compounds that absorb light of a defined wavelength, or enzymes (e.g., alkaline phosphatase or horseradish peroxidase). The products of reactions catalyzed by appropriate enzymes can be, without limitation, fluorescent, luminescent, or radioactive or they may absorb visible or ultraviolet light. Examples of detectors include, without limitation, x-ray film, radioactivity counters, scintillation counters, spectrophotometers, colorimeters, fluorometers, luminometers, and densitometers.

In assays to diagnose metastasis of breast cancer to bone, the concentration of periostin in, for example, serum from a breast cancer patient suspected of having one or more metastases

WO 03/016471

PCT/US02/25603

to bone is compared to a control value. This control value can be, for example, the mean of the concentrations of periostin in a control group of breast cancer patients in whom no bone metastases have been detected. Alternatively, the levels of periostin in the serum of the patient can be measured at various times after a diagnosis of breast cancer. An increase in the level of periostin detected in the serum at a particular time point relative to prior measurements would indicate that the patient's breast cancer had metastasized to bone. In this case the relevant prior measurement would be the control value. A significantly higher concentration of periostin in the serum of the patient relative to the control value would indicate that the patient has a metastasis to bone of her breast cancer.

In assays to diagnose preeclampsia, the patient's serum level of periostin is compared to a control value. The control value can be, for example, the mean of the concentrations of periostin in the sera of control group of normotensive pregnant women. The serum sample from the patient and the control subjects should be obtained at approximately the same stage of pregnancy. Significantly increased levels of periostin in the sera of preeclampsia patients can be detected as early as the first trimester with levels rising with time of gestation. Thus another control value could be the serum level of periostin in a patient of interest at an earlier stage of her pregnancy. A significantly higher concentration of periostin in the serum of the patient relative to the control value would indicate that the patient had preeclampsia.

It is understood that, while the above descriptions of the diagnostic assays refer to assays on serum, the assays can also be carried out on any of the other fluid samples listed herein. In addition, it is noted that the patients and control subjects referred to above need not be human patients. They can be for example, non-human primates (e.g., monkeys), horses, sheep, cattle, goats, pigs, dogs, guinea pigs, hamsters, rats, rabbits or mice.

The following examples are meant to illustrate, not limit, the invention.

EXAMPLES

Example 1. Methods and Materials

Patients in study on bone metastasis

The study groups included 58 breast cancer and 44 small cell lung cancer patients who had undergone neoadjuvant chemotherapy and/or bone marrow transplantation at the Dana-Farber Cancer Institute.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Blood samples for all studies were collected and processed within 2 hours of collection. Sera were stored at -80 °C until assay.

Patients in study on preeclampsia

Thirty nulliparous pregnant women with preeclampsia were matched according to gestational stage with 30 nulliparous normal pregnant women at Magee-Womens Hospital (Pittsburgh, PA). Blood samples were obtained in the third trimester (at approximately week 36 of pregnancy) with informed consent as part of an institutional review board-approved longitudinal study of preeclampsia at Magee-Womens Research Institute (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA). Preeclampsia was diagnosed in women in their first full term pregnancy whose blood pressure increased by 15 mm Hg diastolic or 30 mm Hg systolic and had proteinuria (300 mg /24 hours or 1+ on a catheterized urine or 2+ on a voided urine or 0.3 on a protein creatinine ratio and hyperuricemia > 1SD above normal values for their stage of gestation). None of the patients in this study had an equivocal blood pressure increase i.e., all patients had sustained systolic blood pressures of at least 140 mm Hg and sustained diastolic blood pressures of 90 mm Hg.

Production of antibodies

The expression vector CMV-6xHis-Periostin contains a cDNA sequence encoding mature human periostin-C (see below) linked to: (a) a heterologous leader sequence; and (b) via an enterokinase recognition sequence to a hexa-histidine sequence. The expression vector CMV-Fc-Periostin contains a cDNA sequence encoding mature human periostin-C linked to: (a) a heterologous leader sequence; and (b) a mouse immunoglobulin γ_{2a} heavy chain constant region ("Fc-periostin") [Lo et al. (1998) Protein Eng. 11:495-500]. Both expression vectors were transfected by electroporation of the NS/0 mouse myeloma cell line, and stably transfected cells were selected with methotrexate. Periostin produced by the CMV-6xHis-Periostin-transfected cell line ("His-periostin") was purified from culture supernatant using the HisBind Purification Kit (Novagen, Madison, WI). After cleavage of the histidine tag with enterokinase (InVitrogen, Carlsbad, CA), the periostin protein was injected into rabbits. The E17 polyclonal antibody produced by this immunization was affinity-purified on Affi-gel 10 columns (Amersham

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) in which the Affi-gel 10 was conjugated to periostin produced by CMV-6xHis-Periostin-transfected cells.

Similarly, Fc-periostin was purified from culture supernatant of the CMV- Fc-Periostin-transfected cell line by Protein A affinity chromatography (Amersham Pharmacia Biotech). Fc-periostin fusion protein was injected into mice and the 5H8 monoclonal antibody (mAb) was produced using standard procedures. Seven other human periostin-specific mAb (1B11, 2C6, 6B1, 8H11, 8E3, 10A3, and 7E4) were derived by the same method. All the mAbs are of the IgG class. The 5H8 and 8H11 mAbs are of the IgG1 subclass and have kappa light chains. Purified 5H8 IgG antibody was biotinylated using the Sulfo-NHS-LS Biotinylation Kit (Pierce, Rockford, IL).

Cell culture

The mAb producing hybridomas and the malignant mesothelioma cell line, JMN1B, were cultured in DMEM (GibcoBRL, Grand Island, NY) containing 10% fetal bovine serum (GibcoBRL).

Immunohistochemistry

Sections of human invasive ductal breast cancer tissue were purchased from Novagen. The paraffin-embedded slides were deparaffinized by incubation in xylene and rehydrated in graded ethanol-water solutions. The samples were treated in a microwave oven for 15 minutes with citrate buffer (pH6.0). Endogenous peroxidases were inhibited with 0.3% H₂O₂ in methanol and non-specific protein-binding sites were blocked with normal horse serum. Staining of the sections was carried out using the Vectastain® Universal Elite® ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The sections were incubated overnight at 4°C with diluted affinity-purified E17 polyclonal antibody (see Example 2), and then, after washing, with the biotinylated secondary antibody for 1 hour at room temperature. After further washing, the sections were incubated for 30 minutes at room temperature with a reagent composed of a preformed macromolecular complex of avidin and biotinylated horseradish peroxidase. The substrate for the color reaction was 3,3'-diaminobenzidine. Sections were counterstained with hematoxylin before mounting. A negative control slide was processed simultaneously; in this control slide "preimmune serum" was used instead of the E17 polyclonal antibody.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

In situ RNA hybridization

The sections of human invasive ductal breast cancer described above and others of human squamous lung cancer tissues (also purchased from Novagen) were used for *in situ* RNA hybridization. The paraffin embedded sections were deparaffinized by incubation in xylene and rehydrated in graded ethanol water solutions. *In situ* RNA hybridization was performed as described previously [Gunn et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(1):258-263]. A 392-bp fragment encoding the N-terminus (starting from the ATG initiation codon) of human periostin-C was excised using BamHI and EcoRI from human periostin cDNA and then cloned in pBluescript (Stratgene, La Jolla, CA). Sense and antisense probes were generated with the T3 and T7 RNA polymerases, respectively, in the presence of [³⁵S]-UTP, using the 392-bp fragment as a template. All periostin variant-encoding cDNAs characterized at this time have identical nucleotide sequences in the N-terminal region corresponding to the 392-bp fragment, and thus probes made using the fragment as a template would detect all the variant mRNA molecules.

Periostin chemiluminescence assay

Patient serum samples were diluted 2-fold with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and applied to Sep-PakTM QMA cartridges (New Bedford, MA), which were then washed with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.1 M NaCl. The cartridges were then eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.25 M NaCl. The eluates were immediately frozen and lyophilized. Lyophilized samples were reconstituted and diluted (8-fold or 40-fold) for assay with standard diluent buffer (Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4, containing 0.1% BSA and 0.05% Tween 20).

All samples were assayed in duplicate. Reacti-BindTM NeutrAvidin-coated polystyrene white plates (Pierce, Rockford, IL) were pre-washed three times with diluent buffer. Biotin-conjugated 5H8 monoclonal antibody (100 µl/well) was added to each well of the avidin pre-coated plates which were then incubated overnight at 4°C. In some assays, normal plates (i.e., plates not coated with avidin) were used and in these assays 5H8 monoclonal antibody without biotin was coated directly onto the plate well bottoms. The plates were washed 3 times for 10 minutes per wash in diluent buffer. Non-specific protein-binding sites in the wells were blocked by adding PBS (phosphate buffered saline) containing bovine serum albumin (BSA; 3% w/v) to the wells and incubating the plates for 2 hours at 37°C. The plates were then washed three times

WO 03/016471

PCT/US02/25603

with diluent buffer. The diluted samples or purified periostin (produced using the CMV-6xHis-Periostin vector; see above) (at various concentrations as standards) were added to the wells and the plates were incubated for 3 hours at 37°C. After further washes (as above) affinity-purified polyclonal antibody E17 was added to the wells, and the plates were incubated for 2 hours at 37°C. Unbound antibody was washed away and an alkaline phosphatase-conjugated, affinity-purified antibody specific for rabbit IgG was added to all the wells (Tropix, Bedford, MA). The plates were incubated for 2 hours at 37°C. After further washes, 100 µl of Assay buffer (Tropix) was added and incubated for 10 minutes at room temperature. The Assay buffer was completely removed by inverting and tapping the plates. The CSPD (3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3-2' (5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1] decan]-4-yl) phenyl phosphate) chemiluminescence substrate (Tropix) was then added. Chemiluminescence intensity was read within 30 minutes using a FL 600 fluorescence microplate reader (Bio-tek Instruments, Winooski, VT) following the manufacturer's instructions.

RT-PCR assay for periostin

cDNAs synthesized from poly A+ RNA isolated from a variety of human tissues were purchased from Clontech, Palo Alto, CA. PCR was performed as follows. The oligonucleotide primer sequences designed to amplify full length periostin DNA were 5'-ATGATTCCCTTTTACCCATGTTTCTCTA-3' (forward) (SEQ ID NO:15) and 5'-TCACTGAGAACGACCTTCCCTTAATCGTCTTCTA-3'(reverse) (SEQ ID NO:16). PCR was performed for 38 cycles (30 sec. at 94°C, 45 sec. at 49°C, 150 sec. at 72°C). Six µl aliquots were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, and the amplicons were visualized by ethidium bromide staining. The specificity of the PCR was confirmed by sequencing of the product. Control PCRs were performed using GAPDH specific oligonucleotide primers as described above.

Palindromic PCR cDNA display

Total cellular RNA was extracted from tumor or normal tissues (surgical specimens) or cultured cells by using Tri-reagent (Leedo Medical Lab., Houston, TX). Surgical specimens were obtained from the New England Deaconess Hospital Department of Surgery as previously

WO 03/016471

PCT/US02/25603

described [Barnard et al. (1992) Cancer Res., 52:3067-3072]. PolyA+ mRNA was purified using oligo dT magnetic beads (Promega, Madison, WI).

PolyA+ mRNA (100ng) from tissue was reverse transcribed to cDNA with a single palindromic primer (5'-CTGATCCATG-3') (SEQ ID NO:17) (2mM) and 0.5 unit of rTh DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) in the presence of MnCl₂ (1.0mM) at 70°C for 12min (total volume: 5μl) (3 cycles). Reverse transcription was followed by 40 cycles of a palindromic PCR reaction (94°C, 30 sec.; 40°C, 100 sec.; 72°C, 35 sec.) with the same palindromic primer (0.4mM) and rTh DNA polymerase in the presence of MgCl₂ (2.0mM) and [³²S]-dATP in the same reaction tube used for reverse transcription (total volume: 25μl). Amplified palindromic PCR products (³²S-labeled) were resolved on a polyacrylamide gel. cDNA patterns derived from tumor and the adjacent normal tissue were directly compared.

The cDNA bands of interest were excised and recovered from the gel. Recovered cDNA fragments were reamplified with Taq DNA polymerase (Perkin Elmer) in Tricine buffer (10mM Tricine, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, pH 8.4) instead of standard Tris PCR buffer. Reamplified cDNA fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Statistical Methods

Statistical analyses were carried out using the Mann-Whitney U-test for unpaired samples. Linear relationships between variables were determined by means of simple linear regression. Correlation coefficients were determined by rank correlation using Spearman's test. Differences between means were tested for significance using the test of Kruskal-Wallis and Fisher's PLSD test. All analyses were done using the StatView™ software package (Abacus Concepts Inc.). Differences were considered significant when the p value was less than 0.05.

Example 2. Periostin JMNI1B is a 90 kDa secreted protein

Previous studies of the inventors showed that periostin transcripts are detectable in many cancer tissues but not in any of the cancer cell lines tested except the malignant mesothelioma cell lines JMN and JMNI1B [Behbehani et al. (1982) Hum Pathol, 13(9):862-866; Demetri et al. (1989) Blood, 74:940-946]. Conditioned medium of JMNI1B cells was concentrated 10-fold and both this concentrate and JMNI1B cell lysate were analyzed by Western blotting. The E17 polyclonal antibody preparation raised against human periostin contained antibodies that bound

WO 03/016471

PCT/US02/25603

to both periostin and β igH3. Western blotting with the E17 polyclonal antibody revealed both periostin and β igH3 to be more abundant in JMN1B supernatant than in cell lysate. After affinity purification with periostin bound to a solid substrate, the ability of the E17 polyclonal antibody to bind to β igH3 was eliminated leaving only the ability to bind to periostin which migrated as a 90 kDa band on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The E17 polyclonal antibody did not immunoprecipitate periostin but the 5H8 mAb did. Thus, the 5H8 monoclonal antibody was used for capture and the affinity-purified E17 polyclonal antibody for detection of periostin in "sandwich" assays for periostin.

JMN1B cells were treated with 1.5 μ M of monensin (Sigma Co., St. Louis, MO) which is an inhibitor of intracellular vesicular transport. Five hours after addition of monensin to the cell cultures, periostin could be detected by Western blotting in cell lysate but not in culture medium. In addition, the affinity-purified E17 antibody stained the Golgi of control cells. However, monensin treatment resulted in punctate cytoplasmic staining.

In toto, the above findings indicate that periostin (as expressed by JMN1B cells) is a 90 kDa secreted protein.

Example 3. Expression of periostin in breast cancer

Periostin protein could be detected by immunohistochemistry using the E17 antibody immunopurified as described above. Strong staining was seen in the invasive breast cancer cells, but the surrounding normal stromal cells were only faintly stained. Strong staining was also observed in the advancing margin of breast cancer, as opposed to the central area of the tumor. On the other hand, strong staining was not detected in sections of non-invasive, normal breast tissues. Periostin mRNA could also be detected by *in situ* RNA hybridization. High expression of the periostin gene was observed in the stromal cells surrounding breast carcinoma whereas very little expression was found in cancer cells. While the invention is not limited by any particular mechanism of action, it seems likely that the thin layer of stromal cells at the edge of the tumor secrete periostin, which then binds to the surface of the tumor cells. Naturally, it is also possible that the tumor cells are producing periostin, possibly at a lower level than the stromal cells at the edge of the tumor. No signal was seen in normal breast tissue sections.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Example 4. Serum level of periostin in cancer patients as a predictor of bone metastases

The clinical and pathological characteristics of the 58 breast cancer patients studied are shown in Table 1. These included 7 cases at stage II, 15 at stage III, and 36 at stage IV. The median age was 44.5 years (range 31-63). Among the 36 stage IV patients, 15 (42%) were diagnosed with one metastasis site, and 21 (58%) had more than two. Among a subset of 40 patients (mixed stages), the tumors in 24 (60%) were estrogen receptor-positive. In a subset of 38 patients, the tumors in 24 (63%) were progesterone receptor-positive. In a subset of 40 patients, 29 (72.5%) were premenopausal and 11 (27.5%) were postmenopausal.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

TABLE 1. CLINICOPATHOLOGICAL DATA ON 58 BREAST CANCER PATIENTS

Factors	No. of patients	Serum Periostin	
		Periostin levels (ng/ml)	p-value
Mean age	44.4±1.1 years	58	0.2012 $r^2=0.0369^*$
Menopause			
Pre menopausal	29 (72.5%)	89.8±25.3	0.4309
post menopausal	11 (27.5%)	41.7±11.0	
Tumor status			
T1	11(27.5%)	65.7±15.7	NS
T2	17(42.5%)	63.6±24.7	
T3	4(10.0%)	91.8±52.8	
T4	8(20.0%)	124.4±72.8	
Stage			
II	7 (12.1%)	56.1±14.3	NS
III	15 (25.9%)	28.0±4.7	
IV	36 (62.1%)	85.3±20.5	
Bone metastasis			
negative	37 (63.8%)	55.0±16.6	0.04
positive	21 (36.2%)	89.3±21.8	
No. of metastasis sites			
one	15 (41.7%)	75.9±29.7	0.2546
more than two	21 (58.3%)	92.0±28.6	
Lymph node metastasis			
Positive	36 (78.3%)	95.3±25.0	0.5411
Negative	10 (21.7%)	44.4±8.4	
ER status			
negative	24 (60.0%)	72.1±19.0	0.8359
positive	16 (40.0%)	88.4±38.0	
PR status			
negative	24 (63.2 %)	72.3±19.1	0.9758
positive	14 (36.8%)	94.8±43.1	
Grading			
II	6(17.1%)	128.3±62.0	0.189
III	29 (82.9%)	65.8±21.1	

* Correlation of age with periostin levels for all 58 patients

NS, not significant; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor

The clinical and pathological characteristics of the 44 small cell lung cancer patients are shown in Table 2. This group of patients included 32 cases at stage III and 12 cases at stage IV.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

The median age was 51 years (range 26-62). Among the 12 stage IV patients, 5 had a single metastasis site, and 7 were diagnosed with more than two metastasis sites (Table 2).

TABLE 2. CLINICOPATHOLOGICAL DATA ON 44 SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

Factors	No. of Patients	Serum Periostin	
		Periostin levels (ng/ml)	p-value
Mean age	51.3±7.5 years	44	0.3579 $r^2=0.0202^*$
Gender			
Male	27 (61.4%)	79.7±12.5	0.3349
Female	17 (38.6%)	68.2±21.3	
Tumor status			
T1	6(14.0%)	36.3±7.5	T4 vs T2
T2	14(31.8%)	64.9±16.1	0.0304
T3	11(25.0%)	70.6±15.0	T4 vs T1
T4	12(27.3%)	126.5±29.7	0.0136
Stage			
III	32 (72.7%)	84.9±13.5	0.2641
IV	12 (27.3%)	55.7±17.0	
Bone metastasis			
negative	36 (81.8%)	75.6 ±12.7	0.4559
positive	8 (18.2%)	88.6±23.9	
No. of metastasis sites			
one	5 (41.7%)	28.8±7.6	0.4649
more than two	7 (58.3%)	77.0±26.8	
Lymph node metastasis			
N0	2 (4.7%)	14.0±5.0	N3 vs N2
N2	18 (41.9%)	49.7±10.9	0.0091
N3	23(53.5%)	108.7±17.3	
Performance status			
0	9 (25.7%)	59.9±21.7	NS
1	22 (62.9%)	66.7±13.7	
2	4(11.4%)	104.5±27.3	
LDH	27		0.6752 $r^2=0.0074^*$
CEA	466.9±291.2 U/l	17	0.7287 $r^2=0.088^*$
	7.7±16.7 ng/ml		

* Correlation with periostin levels for all patients monitored for this parameter

NS, not significant; LDH, lactate dehydrogenase; CEA, carcinoembryonic antigen

WO 03/016471

PCT/US02/25603

The mean values for serum periostin in breast cancer patients were: at stage II, 56.1 ± 14.3 ng/ml; at stage III, 28.0 ± 4.7 ng/ml; and at stage IV, 85.3 ± 20.5 ng/ml (Table 1). In normal healthy volunteers (n=20) a mean serum periostin level of 38.5 ± 5.8 ng/ml was observed. No significant difference in serum periostin levels was found between these groups.

Patient groups were further stratified according to established prognostic factors. Serum periostin levels were elevated in breast cancer patients with bone metastases (89.3 ± 21.8 ng/ml) compared to patients without evidence of bone metastasis (55.0 ± 16.6 ng/ml; $p=0.04$) (Table 1). However, there were no significant differences in the serum periostin levels according to estrogen or progesterone receptor status ($p=0.8359$ and 0.9758 , respectively), tumor grading ($p=0.1890$), menopausal status ($p=0.4309$), single vs. multiple metastatic sites ($p=0.2546$), the presence of lymph node metastases ($p=0.5411$), or the original tumor size (T) status (T1 - T4). A T1 lung tumor is 3.0 cm or less in its greatest dimension, is surrounded by lung or visceral pleura, and is without evidence of invasion proximal to a lobar bronchus at bronchoscopy. A T2 lung tumor is greater than 3.0 cm in its greatest dimension or is a lung tumor of any size that either invades the visceral pleura or has associated atelectasis or obstructive pneumonitis extending to the hilar region. At bronchoscopy, the proximal extent of demonstrable tumor must be within a lobar bronchus or at least 2.0 cm distal to the carina. Any associated atelectasis or obstructive pneumonitis must involve less than entire lung. A T3 lung tumor is (a) a tumor of any size with direct extension into the chest wall (including the superior sulcus tumors), diaphragm, or the mediastinal pleura or pericardium without involving the heart, great vessels trachea, esophagus or vertebral body, or (b) a tumor in the main bronchus within 2 cm of carina without involving the carina, or associated atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung. A T4 lung tumor is a tumor of any size with invasion of the mediastinum or involving heart, great vessels, trachea, esophagus, vertebral body, or carina or presence of malignant pleural or pericardial effusion, or with satellite tumor nodules within the ipsilateral, primary tumor lobe of the lung.

There was also no significant difference in periostin levels in HER-2-positive (n=4) vs. HER-2-negative (n=8) patients ($p=0.3958$) although sample size of patients studied was limited.

The mean serum periostin levels in patients with small cell lung cancer were 84.9 ± 13.5 ng/ml for stage III and 55.7 ± 17.0 ng/ml for stage IV patients (Table 2). There was no significant

WO 03/016471

PCT/US02/25603

difference between stages of disease or between the patients and normal controls. Significant differences in serum periostin levels were seen, however, between patients with different T-status (tumor size status) and N-status (lymph node metastasis status). Serum periostin levels were elevated in T4 patients (126.5 ± 29.7 ng/ml) compared to T2 (64.9 ± 16.1 ng/ml, $p=0.03$) and T1 (36.3 ± 7.5 ng/ml, $p=0.01$). The difference in serum periostin levels in patients with N3 status (108.7 ± 17.3 ng/ml) was significantly different from those with N2 status (49.7 ± 10.9 ng/ml, $p=0.01$). Serum periostin levels were not different in lung cancer patients with bone metastases (88.6 ± 23.9 ng/ml) compared to patients who had no evidence of bone metastasis (75.6 ± 12.7 ng/ml). There were also no significant differences in serum periostin levels according to parameters such as gender ($p=0.3349$), performance status (ability to carry out physical activity) (PS 0-2), or one metastatic site vs. two or more metastatic sites ($p=0.4649$). Periostin levels did not correlate with the levels of either lactate dehydrogenase (LDH) or carcinoembryonic antigen (CEA).

Example 5. Expression of periostin mRNA in normal human tissues

Periostin mRNA was detected by RT-PCR in RNA from the human lung, kidney and placenta. However, it was not detectable in RNA from human heart, liver, brain and skeletal muscle. The DNA sequences of RT-PCR products from lung, kidney and placenta revealed forms of human periostin cDNA that differed from that (OSF-2) cloned from osteosarcoma [Takeshita et al. (1993) *Biochem. J.* 294:271-278]. The nucleotide sequence of cDNA (SEQ ID NO:1) encoding OSF-2 is shown in Fig. 1A and the amino acid sequence of OSF-2 (SEQ ID NO:2) is shown in Fig. 1B. Compared with OSF-2 cDNA, periostin cDNA cloned from placenta and lung had two deletions at residues 2009-2179 (171 base pairs, 57 amino acids) and residues 2360-2443 (84 base pairs, 28 amino acids), respectively. The nucleotide sequence of cDNA (SEQ ID NO:3) encoding this splice variant of periostin (designated periostin-L) is shown in Fig. 2A, and the amino acid sequence of periostin-L (SEQ ID NO:4) is shown in Fig. 2B. The nucleotide sequence of cDNA encoding the mature form of periostin-L (i.e., lacking nucleotides 1 to 63 of SEQ ID NO:3) is designated SEQ ID NO:5 and the amino acid sequence of mature periostin-L is designated SEQ ID NO:6. It is noted that nucleotide 2220 of SEQ ID NO:3 (and the corresponding nucleotide of SEQ ID NO:5) can be an A rather than a T residue. Periostin cDNA cloned from kidney had only one deletion at residues 2009-2179 (171 base pairs,

WO 03/016471

PCT/US02/25603

57 amino acids). The nucleotide sequence of cDNA (SEQ ID NO:7) encoding this splice variant of periostin (periostin-K) is shown in Fig. 3A, and the amino acid sequence of periostin-K (SEQ ID NO:8) is shown in Fig. 3B. The nucleotide sequence of cDNA encoding the mature form of periostin-K (i.e., lacking nucleotides 1 to 63 of SEQ ID NO:7) is designated SEQ ID NO:9, and the amino acid sequence of mature periostin-K is designated SEQ ID NO:10. It is noted that nucleotide 2304 of SEQ ID NO:7 (and the corresponding nucleotide of SEQ ID NO:9) can be an A rather than a T residue. All the above deletions are in-frame deletions. The periostin clones from placenta and lung lacked part of an α -helix site (residues 2403-2466) that could be involved in attachment to the cell extracellular matrix. *In situ* hybridization revealed periostin mRNA localized in the stroma of normal placenta tissue.

Example 6. Serum periostin levels in patients with preeclampsia

The clinical characteristics of the study sample of women with preeclampsia and normal pregnant women are shown in Table 3. There was no significant difference in pre-pregnancy body weight, hematocrit, or placenta weight at delivery between the groups. As required by the classification criteria used in this study, significant differences between the groups with preeclampsia and the normal pregnant group were noted for both systolic and diastolic blood pressures.

A significant difference in the age was noted between the groups. The mean age at delivery in the group with preeclampsia was 29.8 ± 1.2 years while that of normal pregnant group was 22.8 ± 0.7 years. There was, however, no significant correlation between maternal periostin levels and age at delivery in either group. There was a significant statistical difference in the mean birth weight between the infants of the women with preeclampsia (2240.1 ± 183.9 g) and those of normal pregnant women (3413.3 ± 78.7 g). However, there was no significant correlation between maternal periostin levels and infant body weight.

Serum periostin concentrations were elevated in preeclampsia patients (311.8 ± 56.3 ng/ml) compared to normal pregnant women at term (218.8 ± 37.3 ng/ml). The mean serum periostin concentration for normal healthy nonpregnant volunteers (n=20) was previously found to be 38.5 ± 6.1 ng/ml. Periostin concentrations in pregnant volunteers in the first trimester (n=58) were 77.5 ± 13.7 ng/ml. Thus, serum periostin concentrations in preeclampsia patients and in normal pregnant women at term were elevated compared to nonpregnant (p=0.0001) and first trimester

WO 03/016471

PCT/US02/25603

pregnant subjects ($p=0.01$). Concentrations in early pregnant and nonpregnant women were not significantly different. Other factors were also determined (Table 3). Serum TGF- β 1 levels were higher in preeclampsia patients ($8.0\pm 0.3\text{ng/ml}$) than in normotensive pregnant women ($7.2\pm 0.3\text{ng/ml}$, $p=0.0406$). However, TGF- β 1 concentrations did not correlate with periostin concentrations ($r=0.03$, $p=0.82$). The concentrations of serum VCAM-1 ($1.74\pm 0.12\text{mg/ml}$ vs. $1.28\pm 0.07\text{mg/ml}$, $p=0.0018$) and E-selectin ($50.4\pm 4.3\text{ng/ml}$ vs. $32.0\pm 3.6\text{ng/ml}$, $p=0.0007$) were significantly elevated in preeclampsia patients compared to normotensive pregnant women. Their levels also did not correlate with serum periostin levels. The level of interleukin-6 in serum of preeclampsia patients ($0.86\pm 0.17\text{ng/ml}$) was lower than in normal pregnant women ($1.33\pm 0.20\text{ng/ml}$), although the difference did not reach the level of significance selected. Interleukin-6 and periostin concentrations did not correlate.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

TABLE 3. CLINICOPATHOLOGICAL DATA ON 30 PATIENTS WITH PREECLAMPSIA AND 30 NORMOTENSIVE PREGNANT WOMEN

Factors	total 60 women	(100%)	p-value
	preeclampsia 30(50%)	normal 30(50%)	
Age at delivery(years)	29.8±1.2	22.8±0.7	0.0001
Body weight before pregnant(kg)	67.9±3.1	69.8±1.2	0.7449
Maternal predelivery hematocrit(%)	36.1±0.7	36.4±0.6	0.5894
Maternal predelivery Platelet	182.6±9.5	250.1±14.9	0.0003
Placenta weight (g)	318.4±19.0	438.3±59.3	0.06
Birth weight (g)	2240.1±183.9	3413.3±78.7	0.0001
Systolic blood pressure at delivery(mmHg)	157.1±2.0	121.3±1.8	0.0001
Diastolic blood pressure at delivery(mmHg)	93.8±1.4	72.2±1.7	0.0001
Maternal predelivery creatinine(mg/dL)	0.85±0.03	0.66±0.05	0.01
Gestational age at delivery (wk)	35.1±0.8	39.9±0.3	0.0001
Maternal predelivery uric acid	6.7±0.2	4.0±0.2	0.0005
Serum TGF-β1 levels correlation with periostin	8.0±0.3	7.2±0.3	0.0406 r=0.82
Serum VCAM-1 levels correlation with periostin	1.74±0.12	1.28±0.07	0.0018 r=0.5229
Serum E-selectin levels correlation with periostin	50.5±4.3	32.0±3.6	0.0007 r=0.1852
Serum Interleukin-6 levels	0.86±0.17	1.33±0.20	0.0591 r=0.173
Serum Periostin levels (ng/ml)	311.2±56.3	218.8±37.3	0.5649 r=0.076 0.0385

Example 7. Isolation of TCG1 cDNA from human colon carcinoma

TCG1 mRNA was initially identified as being overexpressed in human colon cancers (compared to normal colon tissue) using a palindromic PCR cDNA display technique. Briefly,

WO 03/016471

PCT/US02/25603

paired mRNA preparations from human colon carcinoma tissue and from the adjacent normal colon tissue from the same patient were reverse transcribed and the resulting cDNA amplified by palindromic PCR. Amplified PCR cDNA fragments (35 S-labeled) were resolved on a polyacrylamide electrophoretic gel. The cDNA patterns for tumor and normal tissue were similar, though one expressed cDNA fragment was identified to be dominant in the tumor tissue but not in the adjacent normal tissue. This cDNA fragment was recovered from the polyacrylamide gel and then reamplified with the same primer (PP12) used for the cDNA display. The reamplified cDNA fragment was then cloned in the PCR2.1 TA cloning vector (Invitrogen, Groningen, Germany). Nucleotide sequence analysis revealed that this fragment contained 636 bp with the same PP12 primer at both 5'-ends of the double stranded cDNA.

The full-length cDNA was obtained by screening a human colon carcinoma-derived cDNA library (Lambda ZAP II) with the 636 bp TCG1 fragment as a probe. A full-length clone was found to have an open reading frame of 2313 bp encoding a 771 amino acid sequence with a predicted molecular weight of 85 kDa. The nucleotide sequence of cDNA encoding TCG1 (SEQ ID NO:11) is shown in Fig. 4A and the amino acid sequence of TCG1 (SEQ ID NO:12) is shown in Fig. 4B. TCG1 cDNA lacks nucleotides 2009-2089 and 2349-2432 of OSF-2 cDNA (SEQ ID NO:1). In addition, while OSF-2 cDNA has 6 A residues at positions 2472-2477, TCG1 cDNA has 7 A residues in the corresponding subsequence. Thus, TCG1 protein: (1) lacks amino acids 670-726 of SEQ ID NO:2 and has an arginine residue in place of this subsequence (due to the deletion of nucleotides 2009-2089 of SEQ ID NO:1); (2) lacks amino acids 783-810 of SEQ ID NO:2 (due to the deletion of nucleotides 2349-2432 of SEQ ID NO:1); and (3) replaces amino acid residues 823-836 of SEQ ID NO:2 with the amino acid sequence SSRI (SEQ ID NO:18) (due to the extra A residue in the TCG1 cDNA sequence, which results in a frame shift and a premature stop codon). Furthermore, the first nucleotide of last codon of the TCG1 coding region (SEQ ID NO:11) can be a T rather than an A. In this case, the last amino acid of TCG1 is F rather than I. Amino acid sequence analysis revealed that TCG1 contains an N-terminal signal peptide (SP) or secretory leader sequence, followed by a cysteine-rich domain (CRD), four internal homologous repeats (each about 135 amino acids in length) and a hydrophilic C-terminal domain (Fig. 5). It is in the hydrophilic C-terminal domain that heterogeneity between the periostin variants occurs. One chemokine B family motif (C-C) was found in the cysteine-rich domain at amino acid residues 79-80. The protein contains one predicted site of N-linked

WO 03/016471

PCT/US02/25603

glycosylation (NDT) at amino acid residue 599-601. The signal peptide at the N-terminus and lack of a transmembrane domain suggest that it is a secreted protein. Western blot analysis of culture medium of cells expressing TCG1 confirmed that it is indeed a secreted protein. The nucleotide sequence of cDNA encoding mature TCG1 (i.e., lacking nucleotides 1 to 63 of SEQ ID NO:11) is designated SEQ ID NO:13 and mature TCG1 is designated SEQ ID NO:14.

A database search with the deduced amino acid sequence revealed that it is a splice variant of the human homologue of the mouse OSF-2 which was identified from MEC-3T3 osteoblast cells by subtractive screening [Takeshita et al. (1993) *Biochem J*, 294:271-278]. Northern blot analysis revealed that this protein is not osteoblast specific. To avoid confusion of OSF-2 with the Osteoblast Specific Transcription Factor OSF2/Cbfa1, the protein was designated TCG1 (TGF- α - and TGF- β -regulated and Cancer-associated Gene 1). Further analysis indicated that the TCG1 has significant structural and sequence homology with BigH3, a TGF- β inducible gene initially identified from human lung carcinoma A549 cells [Skonier et al. (1992) *DNA Cell Biol*, 11:511-522]. TCG1 shares 45.2% identity or 82.9% similarity with BigH3 at the amino acid level (DNASTAR algorithm; Madison, WI). However, TCG1 contains an additional hydrophilic domain at the C-terminus. In addition, the BigH3 protein contains an RGD sequence at the C-terminus [Skonier et al. (1992) *DNA Cell Biol*, 11:511-522] that TCG1 does not contain. The amino acid sequence homology and structural similarity between TCG1 and BigH3 indicate their functional similarity. However, divergent amino acid sequences at the C-termini may reflect functional differences between the two proteins. Indeed, the expression patterns in various cell lines of TCG1 and BigH3 are very different. In addition, regulation of their expression by growth factors differs. Interestingly, both TCG1 and BigH3 share significant homology with Fasciclin I from Grasshopper and *Drosophila* [Bastiani et al. (1987) *Cell*, 48:745-755; Zinn et al. (1988) *Cell*, 53:577-587]. Fasciclin I is an extrinsic membrane glycoprotein involved in growth cone guidance during nervous system development in the insect embryo.

Example 8. Overexpression of TCG1 in human colon carcinomas and breast cancers

27 pairs of total RNA samples separately isolated from human primary colon tumor tissue (T) and their adjacent normal colon tissue (N) were examined by Northern Blot analysis with a 32 P-labeled TCG1 probe. In 24 of the 27 matched pairs, the TCG1 mRNA expression level was much greater in the tumor tissue than in the adjacent normal colon tissue. Further

WO 03/016471

PCT/US02/25603

analysis of the expression pattern indicated that the T/N ratio (tumor/normal ratio) of TCG1 mRNA in the 27 cases ranged from 3.8 to 42. The mean T/N ratio was 16.5. To test for a possible correlation between the T/N ratio of TCG1 mRNA and the disease stage of colon cancer, the T/N ratios were plotted against the stages of disease. The data indicated no correlation between higher T/N ratios of TCG1 mRNA expression with later stages of the disease. However, in all 5 cases with recurrent colon cancer, the T/N ratios were significantly higher than the average. The T/N ratio in these 5 cases ranged from 22.4 to 42 (mean = 29.6). This result suggested that high level of expression of TCG1 mRNA in tumor cells is associated with recurrence of the tumor. A higher frequency of tumor recurrence usually indicates stronger tumorigenicity of relevant cancer cells. Malignant colon carcinoma frequently metastasizes to the liver. To test the expression pattern of TCG1 mRNA in these metastatic colon tumors, six pairs of total RNA samples from metastatic colon carcinomas and their adjacent normal liver tissues were examined by Northern Blot analysis with a TCG1 cDNA probe. The level of TCG1 mRNA was much greater in the metastatic tumors than in the adjacent normal liver tissue in all 6 cases. Indeed, TCG1 mRNA was not detectable in normal liver tissue in 5 of the 6 cases studied.

Example 9. Increased levels of periostin in the sera of a panel of lung cancer patients

The levels of periostin in the sera of 116 lung cancer (small cell lung carcinoma, non-small cell lung carcinoma, squamous cell carcinoma, and large cell carcinoma) patients were measured using a modification of the chemiluminescence assay described above. As in the assay described above, the 5H8 monoclonal antibody was used as a "capture" antibody. In contrast, however, the 8H11 monoclonal antibody (rather than the E17 polyclonal antibody) was used as a "detection" antibody. In the breast cancer study performed using the E17 polyclonal antibody as a detection antibody, a mean serum periostin level in a group of 20 normal subjects of 38.5 ± 5.8 ng/ml was observed. On the other hand, using the 8H11 monoclonal antibody as a detection antibody in the study on lung cancer patients, sera from 76% of the patients gave chemiluminescence values not significantly different from values observed for assay wells to which assay buffer (instead of a serum sample) was added. Thus, the "normal" serum level of periostin, as measured in the assay using the 8H11 monoclonal antibody as a detection antibody,

WO 03/016471

PCT/US02/25603

was essentially 0. Importantly, this assay was sufficiently sensitive to detect a serum periostin level of only 2 ng/ml (see patient no. 16 in Table 4 below)

Of the 116 lung cancer patients studied, 28 (24%) had significantly increased serum periostin levels. The serum periostin levels detected in these 28 patients are shown in Table 4. Of the 116 patients, 6 (5%) had serum periostin levels greater than 1,000 ng/ml and 22 (19%) had serum periostin levels of between 1 ng/ml and 400 ng/ml. Notably, all the patients with serum periostin levels higher than 1,000 ng/ml died within a year of initial testing. In contrast, those showing serum periostin levels between 1 ng/ml and 400 ng/ml, at least ten of whom were first tested more than a year before the time of writing, continue to be monitored at the time of writing.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

TABLE 4. SERUM PERIOSTIN LEVELS IN 28 LUNG CANCER PATIENTS

Patient No.	Serum periostin level (ng/ml)
1	>1,000
2	>1,000
3	>1,000
4	>1,000
5	>1,000
6	>1,000
7	81
8	73
9	80
10	130
11	190
12	190
13	220
14	113
15	32
16	2
17	91
18	87
19	3
20	120
21	235
22	184
23	470
24	74
25	120
26	80
27	68
28	182

These data indicate that a body fluid (e.g., blood or urine) level of periostin can be a useful marker for lung cancer and that a high serum level (e.g., greater than 1,000 ng/ml) of periostin is indicative of a poor prognosis for lung cancer patients.

A number of embodiments of the invention have been described. Nevertheless, it will be understood that various modifications may be made without departing from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is limited only by the following claims.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

WHAT IS CLAIMED

1. A purified antibody that binds specifically to human periostin.
2. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a polyclonal antibody
3. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a monoclonal antibody (mAb).
4. The antibody of claim 3, wherein the mAb is secreted by the 5H8 hybridoma (ATCC accession no. CRL-2646) or by the 8H11 hybridoma (ATCC accession no. _____).
5. A hybridoma that secretes a mAb that binds to human periostin.
6. The hybridoma of claim 5, wherein the hybridoma is the 5H8 hybridoma (ATCC accession no. CRL-2646) or the 8H11 hybridoma (ATCC accession no. _____).
7. A method of detecting human periostin in a sample, the method comprising
(a) contacting the sample with an antibody that binds to human periostin; and
(b) determining whether the antibody binds to a component of the sample,
wherein binding of the antibody to a component of the sample indicates the presence of periostin in the sample.
8. The method of claim 7, further comprising, prior to contacting the sample with the first antibody that binds to human periostin, contacting the sample with a second antibody that binds to human periostin, wherein an epitope on human periostin to which the first antibody binds is not the same as an epitope to which the second antibody binds.
9. The method of claim 8, wherein the second antibody is bound to a solid substrate.
10. The method of claim 7, wherein the antibody is a polyclonal antibody.
11. The method of claim 7, wherein the antibody is a mAb.
12. The method of claim 11, wherein the mAb is a mAb that is secreted by the 5H8 hybridoma (ATCC accession no. CRL-2646) or by the 8H11 hybridoma (ATCC accession no. _____).

WO 03/016471

PCT/US02/25603

13. The method of claim 8, wherein the second antibody is a mAb.
14. The method of claim 13, wherein the mAb is a mAb that is secreted by the 5H8 hybridoma (ATCC accession no. CRL-2646) or by the 8H11 hybridoma (ATCC accession no. _____).
15. The method of claim 8, wherein the second antibody is a polyclonal antibody.
16. The method of claim 7, wherein the method comprises an immunoblot assay.
17. The method of claim 7, wherein the method comprises an ELISA assay.
18. The method of claim 7, wherein the detecting step comprises detecting chemiluminescence.
19. The method of claim 7, wherein the detecting step comprises detecting radioactivity or fluorescence.
20. The method of claim 7, wherein the detecting step comprises measuring absorbance of visible or ultraviolet light.
21. The method of claim 7, wherein the antibody is biotinylated.
22. The method of claim 7, wherein the detecting step comprises the use of avidin.
23. The method of claim 7, wherein the detecting step comprises the use of an antibody that binds to an immunoglobulin molecule.
24. A method of diagnosing a metastasis of breast cancer to bone, the method comprising:
 - (a) identifying a breast cancer patient suspected of having or being at risk of having a metastasis of breast cancer to bone; and
 - (b) measuring the level of periostin in a sample of a body fluid from the patient, wherein an elevated level of periostin in the sample, compared to a control level of periostin, is an indication that the patient has a metastasis of breast cancer to the bone.
25. The method of claim 24, wherein the body fluid is blood.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

26. The method of claim 24, wherein the body fluid is urine.
27. A method of diagnosing preeclampsia in a patient, the method comprising:
 - (a) identifying a pregnant patient suspected of having or being at risk of having preeclampsia; and
 - (b) measuring the level of periostin in a sample of a body fluid from the patient, wherein an elevated level of periostin in the sample, compared to a control level of periostin, is an indication that the patient has preeclampsia.
28. The method of claim 27, wherein the body fluid is blood.
29. The method of claim 27, wherein the body fluid is urine.
30. An isolated DNA comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:14.
31. The isolated DNA of claim 30, wherein the nucleic acid sequence is SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:13.
32. The isolated DNA of claim 30, wherein the DNA comprises a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:12.
33. The isolated DNA of claim 32, wherein nucleic acid sequence is SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:11.
34. A vector comprising the DNA of claim 30.
35. The vector of claim 34, wherein the nucleic acid sequence is operably linked to a transcriptional regulatory element (TRE).
36. A cell comprising the vector of claim 35.
37. An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:14.
38. The isolated polypeptide of claim 37, comprising SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:12.
39. An antigenic fragment of the polypeptide of claim 37, wherein the fragment:

WO 03/016471

PCT/US02/25603

- (a) is shorter than the full-length polypeptide; and
 - (b) includes, consecutively, residues 725 and 726 of SEQ ID NO:4 or includes, consecutively, residues 768-771 of SEQ ID NO:12.
40. A method of making a polypeptide, the method comprising:
- (a) culturing the cell of claim 36; and
 - (b) isolating the polypeptide from the culture.

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Fig. 1A

1/9

atggttcctttttaccatgttttctctactattgtctgtatgttaacctataaacgccaacatcattatgacaagatcttggctcat
agtctgtatcagggtctgggacccaaggcccaaatgtctgtgacctcaacagattttggcaccacaaagaaatacttcagacatt
gtagaactgtgtataaaagtccatctgtggacagaaacgactgtttatgaatttggccctgttatatgaaatggagaa
tgaaggctgtcccgagcagttttccattgacatgtttatggcactctgggcatctgtgggagccaccacaacgcagcgtatct
gacgcccaaaactggaggaggagatcgagggaagggaaccttcacttacttgcaccgagtactgggcttgggacaacttg
gattctgataccgtagaggtttggagagcaacgtgaatgtgaatfactgaatgctttacatagtcacatgattaalagagaatgtt
gaccasggacttaaaaaatggcatgtatttcttcaatgtatacaaatitgggcttttcaatccatattcctantgggtgtcac
igtlaattgtgtctgaatcatccatgggaaccagatgcaacaatgggtttccatgtcattgaccgtgtgtcttacacaaattgta
cc/caattcaagacttcattgaagcagaagatgaccttctttagagcagctgccatcacatcgacatatitggagcccttg
gaagagacgtcacttcacactcttggctcccaaatgaggcttttgaagaacttccacgaggtgtctagaaagggttcatggga
gacaagggtggcttccgaagctcttatgaagtaccacatcttaantactctccagtgtctgagtcattatggaggagcagcttgg
agacgtctgggaaggaaatacaatfgagataggtatgtgacggtagacatacaagaaatggaaacaaatgggaacaaag
gatatitgtgacaaataatgtgtgtatccattgtattgacaggtcttaattctgtatctgccaacaaagtattgagctgtggaa
acagcaaacacacctcaggtatctgtggccaattaggcttggcatctgtctgagggccagatggagaatacacttgggtgca
ccigtgaataatgacttttctgatgatactctcagcatgggtcagcgcctccttaataattctgcagaatcacatattgaaatgaa
gttggccttaattgagctttacacgggcaatactggaacacctcggaggccaacagctcagagttctgtatctgtacagctgt
ctgcatgaaatcatgcatgggaaggaggatgagcaagggaagcgggtggcattcacatattccgcgagatcatcaagcc
agcagaagaatccctccatgaaagttaaaacaagataagcgtttgacaccttctcagcctacttgaagctgcagacttgaa
gagctcctgacacaacctggagacgtggaatatttggccaacaaatgatgttttgaagggaatgactagtgaaagaagaat
tgtatagcgggaacaaatgctcttcaaaacatcttattacacctgaccacggaggtttcattgaaaggaattgaaacctgt
gttactaacattttaagacacacaaagggaagcaaaatcttctgaagaagtaaatgatacacttctgtgaaatgaattgaaatca
aagaatctgacatcatgacaacaatgtgttaattcatgttgatgaataactcctatccagcagacacacctgttggaaatgat
caactgtggaatfacttaataaataatcaaatatccaattaaagtgttctgtgtgacaccttcaagaatccccgtgactgt
ctatacaactaaatataccaagtgttggaaocaaataaagtgattgaaggcagcttctcagcclafatcaaaactgagg
accacacatacaaaagtcaaaatggaggtgaacctgaattcagactgtatgaagaagggtgaacataatgaagtgatccat
ggagagccaattattaaaaataacacaaatcatgtatggaggtgtgtgaaataactgaaagaagacagagaagancg
aatcattacagctcctgaataaaatacactagggatctctctgaggtgtggaacagagaagaactctgaagaatgttacaag
aagggtcaccacaggtcaccaatcattgaagggtgtgtgtcatttattgaagatgaagaatgaagaactgtctcagga
gacacacctgtgaggaggttgcaggccaacaaaagggtcaggtctagaaagcattgaagggaaggtctgtctcag

WO 03/016471

PCT/US02/25603

2/9

Fig. 1B

MIPFLPMFSLLLLLIVNPINANNHYDKILAHSRIRGRDQGPNVICALQQILGTTKKKY
FSTCKNWYKKSICGQKTTVL YECCPGYMRMEGMKGCPAVLPIDHVYGTLGIVG
ATTTQRYSDASKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLSDIRRGLESNVNVELLNA
LHSHMINKRMLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNGVVTVNCARIIHGNQIAT
NGVVHVDRVLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFRAAAITSDILEALGRDGHFTLFAPTN
EAFEKLPRGVLERFMGDKVASEALMKYHILNTLQCSSESIMGGAVFETLEGNTIEI
GCDGDSITVNGIKMVNKKDIVTNGVIHLIDQVLIPDSAKQVIELAGKQQTITFD
LVAQLGLASALRPDGEYTLAPVNNAFSDDTLSMVQRLLKLILQNHILKVKVGL
NELYNGQILETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCMEKGSKGGRNGAIHIFREIIPAE
KSLHEKLKQDKRFSTFLSLLAADLKELLTQPGDWTLFVPTNDAFKGMTSEEKEI
LIRDKNALQNIILYHLTPGVFIGKGFEPPGVNTNLKTTQGSKIFLKEVNDTLVNELK
SKESDITMTNGVIHVVDKLLYPADTPVGNDQLEILNLKIKYIQKFVRGSTTFKEIP
VTVYTTKIITKVVEPKIKVIEGSLQPIKTEGPTLTQVKIEGEPEFRLIKEGETITEVI
HGEPIHKKYTKIIDGVPVEITEKETREERIITGPEIKYTRISTGGGETEETLKKLLQEE
VTKVTKFIEGGDGHLEFEDEIKRLIQGDTVPVRKLQANKKVQGSRRRLREGRSQ

30062789.doc

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Fig. 2A

3/9

atgattcccttttaccatggttttctactatgctgctattgttaaccctataaacgccaacatcattatgacaagatcttggctcat
agtcgtatcagggtcggaaccaaggcccaaatgctgtgacctcaacagatttggccacaaaagaatctcagcactt
gtaagaactggatataaaagccatctgtggacagaaaacgactgtttatatgaatgttccctggttatatgaaatggaggaa
tgaaggctgcccagcagtttcccatgacctgtttatggcactcgggcatcgtgggagccaccacaacgcagcgtatct
gacgccicaaaactgagggggagatcagggaaggatccctcacttacttgcaccagtaatgaggcttgggacaacttg
gaticgtatataccgtagagggttggagagcaacgtgaatgtgaattactgaatgctttacatagtcacatgattataagagaatgtt
gaccaaggacttaaaaaatggcatgattatctccatgtataacaatttgggcttttcaacattatcctaattgggtgtgcac
tgttaattgtctcgaatccatcgggaaccagattgcaacaatggtgtgtccatgtcattgaccgtgtgcttacacaaattgtta
cccaatcaaggacttcattgagcagaaatgaccttcatcttttggcagcagctccacatcggacatattggaggcccttg
gaaggagcgggtacttcacactcttctccaccaatgaggcttgggaaacttccacgagggttctatggaagggtcattggga
gcaaaagtggctccgaagctctatgaagtaaccatcttaatactctcagtgcttctatttggaggagcgtcttgg
agcgcgtgggaggaaatacattgagataggatgtgacggtgacagtataacagtaaatggaatcaaatgttgaacaaaag
gatatgtgacaaaataatggtgtgatccattgattgatcaggtccttaattccgtatctgccaacaagttattgagctggctggaaa
acagcaaacacccttcacggatctgtgtgcccaattaggcttggcatcgtctgaggccagatggagaatacacttggctggca
cctgtgataatgcatcttctgatgatactctcagcatggttcagcgcctccttaaatctcgcagaatcacatattgaagtataaa
gttggccttaattgagctttacacgggcaaatctggaaacatcggagcgaacagctcagagctcttgatatactgacagctgt
ctgcttggaaaattcatgcatggggaagggagtaagcaaggaggaacggtgctgattcacatattccgcgagatcatcaagcc
agcagagaatccctccatgaaagttaaaacaaagataagcgttttagcacccttccacgctcctgaagctgagagcttgaaa
ggctcctgacacaaactggagactggacattattgtgccaaatgatgctttaagggaatgactagtgaaagaaaagaat
tctgatacgggacaaaatctcttcaaacatcattttacacccagacacaggagttttcattggaaaaggatttgaacctgt
gttactaaacttttaaaagaccacaaagggaagcaaatcttctgaaaagtaaatgatacactctgtggaatgaattgaatca
aaagaaatctgacatcattgacaacaatgggttaattcatgtttagataaaactcctctatccagcagacacacctgttggaaatgat
caactgtggaatacttaataaattatcaaatatccaaattatgttctgtggtgacacctcaagaaatccccgtgacgt
ctataagccaattattaaaaatacaccaaatcattgtgagtgctgtggaataactgaaaaagacacgagaaagacga
atactacaggctcgtgaaataaatacactaggtttctactggggtggggaacagaaagaaactctgaagaaattgttacaaga
agagggtcaccaaggagggttgcaggccaacaaaagtcaagggtctagaagacgattaagggaaggctgttctcag

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Fig. 2B

4/9

MIPFLPMFSLLLLLIVNPINANNHYDKILAHSRIRGRDQGPNVICALQQILGTTKKKY
FSTCKNWKYSICGQKTTVL YECCPGYMRMEGMKGCPAVLPIDHVVYGTLGIVG
ATTQRYSDASKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLSDIRRGLESNVNVELLNA
LHSHMINKRMLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNVGVTVNCARIHGNQIAT
NGVVHVDRVLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFRAAAITS DILEALGRDGHFTLPAPTN
EAFEKLPRGVLERFMGDKVASEALMKYHILNTLQCSSESIMGGAVFETLEGNTIEI
GCDGDSITVNGIKMVNKKDIVTNNGVIHLIDQVLIPDSAKQVIELAGKQQTTFID
LVAQLGLASALRPDGEYTLAPVNNAFSDDTL SMVQRLLKLJLQNHILKVKVGL
NELYNGQILETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCMEKGSKGGRNGAIHIFREIKPAE
KSLHEKLLQDKRFSTFLSLEADLKELLTQPGDWTLFVPTNDAFKGMTSEEKEI
LRDKNALQNILYHLTPGVFIGKGFEPGVNILKTTQGSKIFLKEVNDTLLVNELK
SKESDIMTTNGVIHVVDKLLYPADTPVGNDQLEILNKLKIKYIKFVRGSTFKFEP
VTVYKPIKKYTKIIDGVFVEITEKETREERIITGPEIKYTRISTGGGETEETLKKLLQ
EGR LQANKKVQGSRRRLREGRSQ

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Fig. 3A

5/9

atgaticccttttaccatgttttctctactattgtctgtatgtttaacctataaacgccaaacattatgacaagatcttggctcat
tgcgtatcaggggtcgggaccaaggcccaatgtctgtgacctcaacagattttgggccaccaaaagaatacttcagcacit
gtaaagactggtataaaaagtccatctgtggacagaaacgactgttttatgaatgttgccctgtttatlgagaatggaaggaa
tgaaggctgccagcagttttgccattgacctgtttatggcactctgggcatctgtgggagccaccacaacgcagcgtatct
gacccctcaaacctgaggaggagatcagggaaggatcttcacttacttggcaccgagtaatgaggcttgggacaacttg
gtatctgatactccgtagaggtttggagagcaactgaaigtgaattactgaatgctttaacatgacatgattaaangagaatgtt
gaaccaaggacttaaaaaatggcatgattatcttcaatgtatacaaatgttggtctttcataaacattatcctaaggggtgtcac
igttaattgtgtcgaatcatcatggaacagatgtgcaacaatgtgtgtccatgtcattgaccgtgtgtcttacaacaattggta
octcaatcaagacttcaatgaagcagaatgaccttcatcttttagagcagctgccatcacatcgacatattggagcccttg
gaagagacgggtcacttcaactcttctccaccacatgaggctttgagaacttccacgaggtgtcttagaagggtcactggga
gacaaagtgtgtctccgaagctcttatgaatgacacatcttaatactctccagtggttctgagctctatgtggagagcagcttgg
agacgtgtggaaggaaatacaatigagatggatgtgacgtgacagataacagtaaatggaatcaaatgtggaacaaanaag
gataitgtgacaaataatgtgtgtatccattgtatgacaggtccctaatcttgatctgocnaacaaagtatttgagctgtgtgaa
acagcaaacaccttcaaggatctgtggcccaattaggcttggcatctgtctgaggccagatggagaatacacattgtgtgca
:ctgtgaataatgcatttctgatactctcagcatggttcagcgcctcttaattatcttgcagatcacatattgaagtataaa
gttggccttaattgagctttacaacgggcaatacttgaacacatcggagggcaaacagctcaagctcttctgtatctgtacagctgt
ctgcatgtgaatctcatgcatggaagaagggtgaagcaagggaagaacgtgtcgaattcacatattcccgagatcatcaagcc
agcagagaatccctccatgaaagttaaaacaagataagcgttttagacaccttctccagcctactgtgaagctgcaagacttgaa
gagctcctgacacaaacctggagactggacattattgtgccaacaaatgacttttaagggaatgactagtgaagaaaaagaat
tctgatacgggcaaaaatgctctcaaacatcatctttatccctgacacccaggagttttctggaanaggaattgaacctgtgt
gttaataacattttaagaccacacaaggaagcaaatctttctgnaagaaatgaatgatacacttctgtggaatgaattgaatca
aaagaactctgacatcatgacacaaatgtgttaattcatgtgtgataaactctctatccagcagacacacctgttggaatgat
caactgtggaatatttaataaataatcaatcatcacaattatgtgtgtgtgtgtagcccttcaagaatccccgtgactgt
ctataagcccaattattataaaataacaccaaatacattgtatgaggtcctgtggaataaactgaaaaagagacagagagaacga
atcatatagctcctgaaataaaatacactaggtttctactggaggtggagaaacagaagaacctctgaagaattgtacaaga
agaggtcaccaagggtcaccaaatcattgaagggtgtgtgtgtgtatgttatttgagatgaagaatttaagactgtctcaggggg
acacacccgtgaggaagttgcaagccaacnaaaagticaagggtctagaagacgattaaagggaaggtcgttctcag

WO 03/016471

PCT/US02/25603

6/9

Fig. 3B

MIPFLPMFSLLLLLIVNPINANNHYDKILAHSRIRGRDQGPNCALQQILGTTKKY
FSTCKNWKYSICGQKTTVLVECCPGYMRMEGMKGCPAVLPIDHVVYGLGIVG
ATTQRYSDASKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLDSDIRRGLESNVNVELLNA
LHSHMINKRMLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNGVVTVNCARIHGNQIAT
NGVVHVIVDRVLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFRAAAITSDILEALGRDGHFTLFPATN
EAFEKLPBGVLERFMGDKVASEALMKYHILNLTQCSSESIMGGAVFETLEGNTIEI
GCDGDSITVNGIKMVNKKDIVTNNGVIHLIDQVLIPDSAKQVIELAGKQQTTFID
LVAQLGLASALRPDGEYTLAPVNNAFSDDTLMSVQRLLKLILQNHILKVKVGL
NELYNGQILETIGGQLRVFYRTAVCIENSCMEKSGKQGRNGAIHIFREIKPAE
KSLHEKLQDKRFSTFLSLEAADLKELLTPGDWTLFVPTNDAFKGMTSEEKEI
LIRDKNALQNIILYHLTPGVFIGKGFEFGVTNLTQGSKIFLKEVNDTLLVNELEK
SKESDIMTTNGVIHVVDKLLYPADTPVGNDQLEILNKLKYYIQKFVRGSTFEKIP
VTVYKPIIKKYTKIIDGVPVEITEKETREERIITGPEIKYTRISTGGGETEETLKKLLQ
EEVTKVTKFIEGGDGHLEFEDEEIKRLLQGDTPVRKLQANKKVQGSRRRLREGRS
Q

30062794.doc

WO 03/016471

PCT/US02/25603

Fig. 4A

7/9

atgattcccttttaccatgttttcttactatgtcttattgttaacctataaaagcccaacattatgacaagatcttggtcat
agtcgtatcagggtcgggaccaaggcccaatgtctgtgcccctcaacagattttggcaccaaaagaacttcaagcactt
gtaagaactgtgtataaaagtccatctgtgacagaaaacgactgtgtatgaatgtgcccgtgtatgatgaatggaggga
atgaaaggctgcccagctgttttcccatgacacattttatggcactctgggcacgtgtgggocaccacaaacgcagcgtatt
ctgacgctcaaaactgaggaggagatcggggaaaggatcttcaacttggcaccgagtaantgaggcttgggacaact
tggatctgataccgtagggttggagagcaacgtgaatgttgaatctgaatgttcaatgacatgacatgatttaagaagaat
gttgaccaaggacttaaaaatggcatgattatccctcaatgtataacaatttggggctttcattaaacattatcctaattggggtt
cactgttaattgtctcgaatcctcatgggaaccagattgcaacaattgtgtgtcattgaccgtgtgttaccacaatt
gttacctcaatcaagacttcattgaagcagaagatgaccttcactttttagagcagctgccatcacatcggacatattggaggcc
cttggagagacgggtcacttcacacttctgtccaccactgaggcttttggagaaactccacgaggtgtcttagaaggatcat
gggagacaaagtggcttccgaagctttagaagtaaccacatcttaatacttccaggtgtctgagcttatttgggaggagcagt
cttggagcgtggaggaaatacaattgagataggatgtgacgtgacagtaaacagtaaatggatcaaatgttgaacaa
aaaggatattgtgacaaataatgtgtgacatgttattgacaggtctaatctctgatttgcacaaacagttattgagctgtg
gaaaacagcaaacacccttcacggatctgtgtgcccatttggcttggcatctgtctggggccagatggagaaatacatttgc
ggcaccctgtgaataatgcatcttctgtatgatactctcagcatggatcagccctcttaataattctgcagaatcacatattgaa
taaaagtgtgcttaattgagctttacaacgggcaaatctgggaacctcggaggcaaacagctcagaggtcttctatattgtaca
gctgtctgcatgaaatctcatgcatgggaaagggttaagcaaggaggaaacgggtgcgattccatattccggagatc
aaggcagcagagaaatccctccatgaaaagttaaaacagataagcgtttacgaccttctcagcctacttgaagctgcagact
tgaagagctcctgacacaaacctggagactggaactatttggcccaacctatgcttttaagggaatgactaggaagaaaa
gaaattctgatacgggacaaaaatgctcttcaaacatcttattacacctgacaccaggagtttcttggaaaggatttgaac
ctggtgtactaacattttaaagaccacacaaaggaaagcaaatcttttgaagaaagttaantgatacacttctgtgaatgaattgaa
atcaaaagatctgacatctgacacaaatgtgttaattcatgtgtatgataaactctctatccagcagacacacctgttgaaa
tgataacttctggaatacttantaatnatcaaatatcccaatnaagttgtctgttggacacttcaagaaatcccggtga
ctgtctatagaccacatacaaaaagtcaaaattgaaggtgaacctgaattcagactgattaaagaaagggtgaacataactga
agtgatcatggagagccattataaaaaataccaaatcattgaggggtgtgtggaataactgaaagagacacga
gaaagacgatonttacaaggctcctgaataaaatatactaggatttctacttggagggtggagaaacagaagaactctgaagaat
tgttacagaaagacacaccctggagggaagttgcagcccaaaaaaagttcaaggatc

WO 03/016471

PCT/US02/25603

8/9

Fig. 4B

MIPFLPMFSLLLLLIVNPINANNHYDKILAHSRIRGRDQGPNVCAQQILGTTKKKY
ESTCKNWYKKSICGQKTTVL YECCPGYMRMEGMKGCPAVLPIDHVYGTLGIVG
ATTTQRYSDASKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLDSDIRRGLESNNVVELLNA
LHSHMINKRMLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNGVVTVNCARIHGNQLAT
NGVVHVHIDRVLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFRAAAITSDILEALGRDGHFTLFAPTN
EAFEKLPRGVLERIMGDKVASEALMKYHILNTLQCSSESIMGGAVFETLEGNTIEIG
CDGDSITVNGIKMVNKKDIVTNNGVIHLIDQVLIPDSAKQVIELAGKQQTTFDDL
VAQLGLASALRPDGEYTLAPVNNAFSDDTLSDMQRLKLLQNHILKVKVGLN
ELYNGQILETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCMEKGSKQGRNGAIHIFREIKPAEK
SLHEKLKQDKRFTTFLSLEAADLKELLTQPGDWTLFVPTNDAFKGMTSEEKEL
IRDKNALQNIILYHLTPGVFIGKGFEPGVTNILKTTQGSKIFLKEVNDTLVNELKS
KESDIMITNGVIHVVDKLLYPADTPVGNDQLEILNKLIKVIQIKFVRGSTFKEIFV
TVYRPTLTVKIEGEPEFRLIKEGETITEVIHGEPHKKYTKIIDGVPVEITEKETREE
RIITGPEIKYTRISTGGGETEETLKKLLQEDTPVRKLQANKKSSRI

30062795.doc

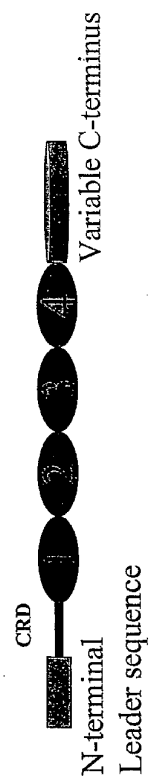


Fig. 5

【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
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016471 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/53
(21) International Application Number: PCT/US02/25603
(22) International Filing Date: 13 August 2002 (13.08.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/312,123 13 August 2001 (13.08.2001) US
(71) Applicant (for all designated States except US): DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GE, GH, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG)

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CHEN, Lan, Bo [US/US]; 184 East Immersion Road, Lexington, MA 02420 (US); DAI, Meiru [CN/US]; Apt. 3, 81 Washington Street, Malden, MA 02148 (US); SASAKI, Hidefumi [JP/JP]; 3-53-12 Ichiwagaoka, Meito-ku, Nagoya 465-0097 (JP); AUCLAIR, Daniel [CA/US]; 2 Alonquin Trail, Ashland, MA 01721 (US).

(74) Agent: FRASER, Janis, K.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 21 August 2003

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

(54) Title: PERIOSTIN-BASED DIAGNOSTIC ASSAYS

(57) Abstract: The invention includes novel human periostin polypeptides and DNAs encoding them. Also embraced by the invention are human periostin specific antibodies, diagnostic assays for metastasis of breast cancer to bone, and proclermpsia.

WO 03/016471 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/25603																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 436/548 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/548 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) HCAPLUS																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X, P</td> <td>GILLAN et al., Periostin Secreted by Epithelial Ovarian Carcinoma Is a Ligand for Integrins and Promotes Cell Motility. Cancer Research. September 15, 2002, Vol. 62, pages 5358-5364.</td> <td>1-3, 7-11, 13 ----- 15-29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SASAKI et al., Serum Level of the Periostin, a Homologue of an Insect Cell Adhesion Molecule, in Thymoma Patients. Cancer Letters. 2001, Vol. 172, pages 37-42.</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>Y, P</td> <td>SASAKI et al., Serum Level of the Periostin, a Homologue of an Insect Cell Adhesion Molecule, as Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Carcinomas. Cancer. August 15, 2001, Vol. 92, No. 4, pages 843-848.</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SASAKI et al., Expression of Periostin, Homologous with an Insect Cell Adhesion Molecules, as a Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancers. Japanese Journal of Cancer Research. August 2001, Vol. 92, pages 869-873.</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>Y, P</td> <td>SASAKI et al., Novel Chemiluminescence Assay for Serum Periostin Levels in Woman with Preeclampsia and in Mornotensive Pregnant Woman. Am. J. Obstet. Gynecol. January 2002, Vol. 186, No. 1, pages 103-108.</td> <td>1-29</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X, P	GILLAN et al., Periostin Secreted by Epithelial Ovarian Carcinoma Is a Ligand for Integrins and Promotes Cell Motility. Cancer Research. September 15, 2002, Vol. 62, pages 5358-5364.	1-3, 7-11, 13 ----- 15-29	Y	SASAKI et al., Serum Level of the Periostin, a Homologue of an Insect Cell Adhesion Molecule, in Thymoma Patients. Cancer Letters. 2001, Vol. 172, pages 37-42.	1-29	Y, P	SASAKI et al., Serum Level of the Periostin, a Homologue of an Insect Cell Adhesion Molecule, as Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Carcinomas. Cancer. August 15, 2001, Vol. 92, No. 4, pages 843-848.	1-29	Y	SASAKI et al., Expression of Periostin, Homologous with an Insect Cell Adhesion Molecules, as a Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancers. Japanese Journal of Cancer Research. August 2001, Vol. 92, pages 869-873.	1-29	Y, P	SASAKI et al., Novel Chemiluminescence Assay for Serum Periostin Levels in Woman with Preeclampsia and in Mornotensive Pregnant Woman. Am. J. Obstet. Gynecol. January 2002, Vol. 186, No. 1, pages 103-108.	1-29
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X, P	GILLAN et al., Periostin Secreted by Epithelial Ovarian Carcinoma Is a Ligand for Integrins and Promotes Cell Motility. Cancer Research. September 15, 2002, Vol. 62, pages 5358-5364.	1-3, 7-11, 13 ----- 15-29																		
Y	SASAKI et al., Serum Level of the Periostin, a Homologue of an Insect Cell Adhesion Molecule, in Thymoma Patients. Cancer Letters. 2001, Vol. 172, pages 37-42.	1-29																		
Y, P	SASAKI et al., Serum Level of the Periostin, a Homologue of an Insect Cell Adhesion Molecule, as Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Carcinomas. Cancer. August 15, 2001, Vol. 92, No. 4, pages 843-848.	1-29																		
Y	SASAKI et al., Expression of Periostin, Homologous with an Insect Cell Adhesion Molecules, as a Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancers. Japanese Journal of Cancer Research. August 2001, Vol. 92, pages 869-873.	1-29																		
Y, P	SASAKI et al., Novel Chemiluminescence Assay for Serum Periostin Levels in Woman with Preeclampsia and in Mornotensive Pregnant Woman. Am. J. Obstet. Gynecol. January 2002, Vol. 186, No. 1, pages 103-108.	1-29																		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>* Special categories of cited documents:</th> <th>*+ Later documents 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.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			* Special categories of cited documents:	*+ Later documents 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.	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*B* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Z* document member of the same patent family	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed							
* Special categories of cited documents:	*+ Later documents 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.																			
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
B earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
I document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Z* document member of the same patent family																			
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 18 March 2003 (18.03.2003)		Date of mailing of the international search report 10 APR 2003																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer G. Robert J. Nguyen Telephone No. 703-308-0196																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/25603
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☒	Claim Nos.: 30-40 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: claims 30-40 contain sequences that are not in compliance.
3.	☐	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
		☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US02/25603
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	WILDE et al., The Effect of Periostin on Osteoclast Differentiation and Activation. September 2001. Vol. 16, No. Suppl. 1, pages S381.	1-29
Y, P	WO 01/57062 A1 (GENE LOGIC, INC.) 09 August 2001 (09.08.2001), see entire document.	1-29

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 21/76	
G 0 1 N 21/76	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/78	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/53	U
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/543	5 4 1 Z
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
	G 0 1 N 33/543	5 7 5
	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ダイ メール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 マルデン ワシントン ストリート 81 アパートメン
ト 3

(72)発明者 佐々木 秀文
日本国愛知県名古屋市名東区平和が丘3-53-12

(72)発明者 オクレアー ダニエル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アッシュランド アロンクイン トレイル 2

Fターム(参考) 2G054 AA07 AB04 BB05 BB13 CA23 CA28 CB02 CB03 EA01 GA04
GB02
4B024 AA12 BA21 BA36 BA53 CA04 DA02 EA04 GA03 GA14 HA15
4B064 AG02 AG31 CA01 CA10 CA19 CA20 CC24 DA14
4B065 AA91X AB01 AB05 AC14 BA03 CA24 CA25 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA01 DA75 DA76 DA86
EA51 FA73 FA74

专利名称(译)	基于骨膜素的诊断分析		
公开(公告)号	JP2005500059A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003521780	申请日	2002-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所的油墨.		
[标]发明人	チェンランボー ダイメール 佐々木秀文 オクレアーダニエル		
发明人	チェン ラン ボー ダイ メール 佐々木 秀文 オクレアー ダニエル		
IPC分类号	C07K14/47 C07K14/475 C07K14/52 C07K16/22 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/689 C07K14/475 C07K16/22 G01N33/57415 G01N2800/368		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N21/76 G01N21/78.C G01N21/78.Z G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/543.541.B G01N33/543.541.Z G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N33/574.A G01N33/577.B C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/BB05 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/CB02 2G054/CB03 2G054/EA01 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA12 4B024/BA21 4B024/BA36 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA14 4B024/HA15 4B064/AG02 4B064/AG31 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/312123 2001-08-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括新的人骨膜素多肽和编码它们的DNA。用于检查人骨膜素特异性抗体，乳腺癌骨转移和先兆子痫的诊断测定法也包括在本发明中。

		血清中ペリオスチニン		
要因		患者数	ペリオスチニンレベル (ng/ml)	p 値
平均年齢	44.4±1.1 歳	58		0.2012 r ² =0.0369*
閉経	閉経前	29 (72.5%)	89.8±25.3	0.4309
	閉経後	11 (27.5%)	41.7±11.0	
腫瘍の状態	T1	11(27.5%)	65.7±15.7	NS
	T2	17(42.5%)	63.6±24.7	
	T3	4(10.0%)	91.8±52.8	
	T4	8(20.0%)	124.4±72.8	
進行期	II	7 (12.1%)	56.1±14.3	NS
	III	15 (25.9%)	28.0±4.7	
	IV	36 (62.1%)	85.3±20.5	
骨転移	陰性	37 (63.8%)	55.0±16.6	0.04
	陽性	21 (36.2%)	89.3±21.8	
転移部位の数	1個	15 (41.7%)	75.9±29.7	0.2546
	2個より多い	21 (58.3%)	92.0±28.6	
リンパ節転移	陽性	36 (78.3%)	95.3±25.0	0.5411
	陰性	10 (21.7%)	44.4±8.4	
ER 状態	陰性	24 (60.0%)	72.1±19.0	0.8359
	陽性	16 (40.0%)	88.4±38.0	
PR 状態	陰性	24 (63.2 %)	72.3±19.1	0.9758
	陽性	14 (36.8%)	94.8±43.1	
等級	II	6(17.1%)	128.3±62.0	0.189
	III	29 (82.9%)	65.8±21.1	