

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07K 14/47
A61K 38/17

(11) 공개번호 특2001-0006220
(43) 공개일자 2001년01월26일

(21) 출원번호 10-1999-7009300
(22) 출원일자 1999년10월09일
 번역문제출일자 1999년10월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US 98/06939 (87) 국제공개번호 WO 98/45328
(86) 국제출원출원일자 1998년04월09일 (87) 국제공개일자 1998년10월15일
(81) 지정국 AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨
 가나 감비아

EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐
 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스
 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투
 칼 스웨덴 핀란드 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카
 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 보스니아-
 헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스
 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루
 지아 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민
 국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아
 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위
 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크
 메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키스탄
 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 가
 나 감비아 기네비소 짐바브웨 인도네시아

(30) 우선권 주장 08/838,762 1997년04월09일 미국(US)
 08/991,789 1997년12월11일 미국(US)
(71) 출원인 코락사 코포레이션 길리스 스티브
(72) 발명자 미국 워싱턴주 98104 시애틀 콜럼비아 스트리트 1124 슈트 464
 프루다키스토니엔
 미국워싱턴주99232-0232시애틀피.오.박스99232
 스미스존엠
 미국워싱턴주98208에버레트116번플레이스사우스이스트208
 리드스티븐지
 미국워싱턴주98005벨레뷰122번플레이스노오쓰이스트2843
(74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

(54) 유방암 치료 및 진단용 조성물 및 방법

요약

본 발명은 유방암의 검출 및 치료용 조성물 및 방법을 제공한다. 제공되는 방법은 유방암 조직에서 우선적으로 발현되는 뉴클레오타이드 서열 뿐만 아니라 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 포함한다. 상기 화합물을 포함하는 백신 및 억제학적 조성물이 또한 제공되며, 예를 들어, 유방암의 예방 및 치료용으로 사용될 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 항체 생산용으로 사용될 수 있으며, 상기 항체는 환자에서 유방암의 진행을 진단하고 모니터링하는데 사용된다.

대표도

도1

색인어

유방암, 뉴클레오타이드, 에피토프, 모노클로날 항체, 발현 벡터, 백신

영세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 유방암의 검출 및 치료에 관한 것이다. 본 발명은 보다 구체적으로 유방암 조직에서 우선적으로 발현되는 뉴클레오타이드 서열 및 이러한 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드에 관한 것이다. 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드는 유방암의 예방 및 치료용 백신 및 억제학적 조성물에 사용할 수 있다. 폴리펩타이드는 환자에서 유방암의 진행을 진단하고 모니터링하는데 유용한 항체와 같은 화합물의 제조에 사용할 수도 있다.

배경기술

유방암은 미국 및 전세계에 걸쳐 여성에게 있어 중요한 건강상 문제이다. 질환의 검출 및 치료가 진보되었음에도 불구하고, 유방암은 미국에서 매년 180,000명의 여성이 걸리는, 여성에서 암-관련된 사망의 두 번째로 손꼽히는 원인으로 남아있다. 북미 여성의 경우, 유방암에 걸릴 생애 확률이 현재 1/8이다.

유방암의 예방용 및 치료용 백신 또는 이외의 보편적으로 성공적인 방법은 현재 입수가능하지 않다. 질환의 치료는 현재 조기 진단(정기적인 유방 스크리닝 과정을 통해)과 수술, 방사선 치료법, 화학 요법 및 호르몬 치료법과 같은 하나 이상의 각종 치료를 포함할 수 있는 적극적인 치료와의 조합에 의존한다. 특정 유방암의 치료 과정은 종종 특정 종양 마커의 분석을 포함한 각종 예후의 변수를 기초로 하여 선택된다. 문헌 참조[Poter-Jordan and Lippman, Breast Cancer 8:73-100(1994)]. 그러나, 확립된 마커의 사용은 종종 설명하기 어려운 결과를 유발하며, 유방암 환자에서 관찰되는 높은 사망률은 질환의 치료, 진단 및 예방에서 개선이 필요하다는 것을 지적한다.

따라서, 유방암의 치료 및 진단을 위한 개선된 방법이 당해 분야에서 요망되고 있다. 본 발명은 상기 요구를 충족시키며 또한 이외의 관련된 이점을 제공한다.

발명의 요약

간단히 말하자면, 본 발명은 유방암 진단 및 치료용 조성물 및 방법을 제공한다. 한 양태에서, (a) 정상 조직과 비교하여, 유방암 조직에서 우선적으로 발현되는 뉴클레오타이드 서열; (b) 하나 이상의 치환, 결실, 삽입 및/또는 변형을 뉴클레오타이드 위치 중 20% 이하(바람직하게는 5% 이하)로 함유하여, 당해 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 항원 및/또는 면역원의 특성이 유지되는, 상기 서열의 변이체; 또는 (c) 하나 이상의 상기 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 분리된 DNA 분자를 제공한다. 한 양태에서, 분리된 DNA 분자는 서열 1로 나타낸 사람 내인성 레트로바이러스성 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 분리된 DNA 분자는 서열 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297 중 하나로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

관련된 양태에서, 분리된 DNA 분자는 폴리펩타이드가 (a)가 엄격한 조건하에 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297 중 하나로 나타낸 뉴클레오타이드 서열에 하이브리드화하고; (b)가 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297 중 하나로 나타낸 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 동일한 뉴클레오타이드에 의해 암호화되고; 상기 뉴클레오타이드 서열에 상응하는 RNA가 사람 유방암 조직에서 정상 유방 조직에서 보다 높은 수준으로 발현되는, 폴리펩타이드의 에피토프를 암호화한다.

다른 양태에서, 본 발명은 폴리펩타이드의 에피토프를 암호화하는 분리된 DNA 분자를 제공하는데, 상기 폴리펩타이드는 (a) 서열 141로부터 전사된 뉴클레오타이드 서열; 또는 (b) 뉴클레오타이드 자리의 20%만이 뉴클레오타이드 치환, 결실, 삽입 및/또는 변형된 상기 뉴클레오타이드 서열의 변종에 의해 암호화되며, 따라서 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 항원성 및/또는 면역성이 유지된다. 본 발명은 또한 전술한 DNA 분자에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 DNA 및 RNA 분자를 제공한다.

관련된 양태에서, 본 발명은 전술한 DNA 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 이러한 발현 벡터로 형질 전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 제공한다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 DAN 분자에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 이러한 폴리펩타이드에 결합하는 모노클로날 항체를 제공한다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 환자에 유방암이 존재하는가를 검출하는 방법을 제공한다. 한가지 양태에서, 상기 방법은 전술한 폴리펩타이드를 생물학적 샘플에서 검출하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 상기 방법은 전술한 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA 분자를 생물학적 샘플에서 검출하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 (a) 전술한 폴리펩타이드를 환자에 피내 주사하는 단계; (b) 환자의 피부 면역반응을 검사하여 이로부터 환자에 유방암이 존재하는가를 검출하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명은 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 염

격한 조건하에서 상기 서열에 혼성화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 이용하여 전술한 방법으로 환자에 유방암이 존재하는가를 측정하는 방법을 제공한다.

관련된 양태에서, 본 발명은 유방암 검사에 유용한 진단 키트를 제공한다. 상기 진단 키트는 일반적으로, 하나 이상의 전술한 모노클로날 항체 또는 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 결합하는 하나 이상의 모노클로날 항체, 및 검출시약을 포함한다.

관련된 양태에서, 상기 진단 키트는 제1 폴리머라제 연쇄 반응 프라이머 및 제2 폴리머라제 연쇄 반응 프라이머를 포함하는데, 상기 프라이머 중 하나 이상의 프라이머는 여기서 기술한 RNA 분자에 대한 특이성을 갖는다. 한가지 양태에서, 상기 프라이머중 하나 이상은, 전술한 RNA 분자 또는 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA 분자에 있는 약 10개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함한다.

다른 관련된 양태에서, 상기 진단 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는데, 상기 프로브는 여기서 기술한 DNA 분자에 대한 특이성을 갖는다. 한가지 양태에서, 상기 프로브는 전술한 DNA 분자 또는 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA 분자중 약 15개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함한다.

다른 관련된 양태에서, 본 발명은 환자에서 유방암의 진행을 모니터링하는 방법을 제공한다. 한가지 양태에서, 상기 방법은 (a) 제1 시점에서 생물학적 샘플로부터 전술한 폴리펩타이드의 양을 측정하는 단계; (b) 그 다음 시점에서 (a) 단계를 반복하는 단계; 및 (c) (a) 단계 및 (b) 단계에서 검출된 폴리펩타이드 양을 비교하여 이로부터 환자에서 유방암의 진행 정도를 모니터링하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 (a) 제1 시점에서, 혈액샘플로부터 전술한 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA 분자의 양을 측정하는 단계; (b) 그 다음 시점에서 (a) 단계를 반복하는 단계; 및 (c) (a) 단계 및 (b) 단계에서 측정된 RNA 분자의 양을 비교하여 이로부터 환자에서 유방암의 진행 정도를 모니터링하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명은 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에서 상기 서열에 혼성화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드를 이용하여 전술한 방법으로 환자에서 유방암의 진행을 모니터링하는 방법을 제공한다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 생리학적으로 허용가능한 담체와 복합된 전술한 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물 및 면역 반응 증강제 또는 면역 보조제와 복합된 전술한 폴리펩타이드를 포함하는 백신을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에서 상기 서열에 혼성화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물 및 백신을 제공한다.

관련된 양태에서, 본 발명은 전술한 약제학적 조성물 또는 백신을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 유방암의 진행을 억제시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 상기 양태 및 기타 양태들은 후술하는 상세한 설명 및 첨부 도면을 참고하여 명백할 것이다. 여기에서 기술한 모든 참고문헌은 마치 각 문헌이 개별적으로 본 명세서에 포함되는 것처럼 그 내용이 그대로 본 명세서에 포함된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 겔 전기영동으로 분리된, 동일 환자로부터의 정상 유방 조직으로부터 제조된 cDNA(레인 1 및 2) 및 유방암 조직으로부터 제조된 cDNA(레인 3 및 4)에서 수득된 시차 디스플레이 PCR(DD-PCR) 생성물을 나타낸다. 화살표는 B18Ag1에 반응하는 밴드를 나타낸다.

도 2는 유방암 조직에서의 B18Ag1의 수준과 정상 유방 조직에서의 수준을 비교하는 노던 브롯팅이다.

도 3은 RNase 보호 분석으로 측정된 유방암 조직에서의 B18Ag1 mRNA의 수준과 여러가지 정상 및 비-유방암 조직에서의 수준을 비교하는 것이다.

도 4는 B18Ag1에 비해 XbaI 제한 절단물의 말단으로부터 수득된 부가 레트로바이러스성 서열(서열 3 내지 서열 10으로 나타냄)의 위치를 보여주는 계능 클론 지도이다.

도 5A 및 5B는 서열 전략, 계능 구성 및 B18Ag1을 포함하는 레트로바이러스성 성분에 대한 예상된 개방 판독 프레임을 보여준다.

도 6은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B18Ag1의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.

도 7은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B17Ag1의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.

도 8은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B17Ag2의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.

도 9는 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B13Ag2a의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.

도 10은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B13Ag1b의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.

도 11은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B13Ag1a의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 12는 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B11Ag1a의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 13은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B3CA3c의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 14는 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B9CG1의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 15는 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B9CG3의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 16은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B2CA2의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 17은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B3CA1의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 18은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B3CA2의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 19는 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B3CA3의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 20은 대표적인 유방암-특이적인 cDNA B4CA1의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.
 도 21A는 유방암 조직(레인 1 내지 8) 및 정상 유방 조직(레인 9 내지 13) 및 H₂O(레인 14)내의 유방암 유전자의 RT-PCR 분석을 나타낸다.
 도 21B는 전립선암(레인 1,2), 결장암(레인 3), 폐암(레인 4), 정상 전립선(레인 5), 정상 결장(레인 6), 정상 신장(레인 7), 정상 간(레인 8), 정상 폐(레인 9), 정상 난소(레인 10,18), 정상 이차(레인 11,12), 정상 골격근(레인 13), 정상 피부(레인 17), 정상 위장(레인 15), 정상 정소(레인 16), 정상 소장(레인 17), HBL-100(레인 19), MCF-12A(레인 20), 유방암(레인 21 내지 23), H₂O(레인 24) 및 결장 종양(레인 25)내의 유방암 유전자의 RT-PCR 분석을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

상기한 바와 같이, 본 발명은 일반적으로 유방암의 진단, 모니터링 및 요법을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본원에 기재된 조성물은 폴리펩타이드, 핵산 서열 및 항체를 포함한다. 본 발명의 폴리펩타이드는 일반적으로 정상 유방 조직에서보다 인체 유방암 조직에서 더 높은 수준으로 발현되는 단백질의 한 부분 이상을 포함한다(즉, 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA의 수준이 종양 조직에서 2배 이상 높음). 이러한 폴리펩타이드는 본원에서 유방암-특이적인 폴리펩타이드라고 하고, 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 cDNA 분자를 유방암-특이적인 cDNA라고 한다. 본 발명의 핵산 서열은 일반적으로 상기의 폴리펩타이드의 일부 또는 전체를 암호화하는, 또는 이러한 서열에 상보성 DNA 또는 RNA 서열을 포함한다. 항체는 일반적으로 상기의 폴리펩타이드의 일부에 결합할 수 있는 면역 체계 단백질 또는 이의 단편이다. 항체는 세포 배양 기술로 제조되거나, 재조합된 항체를 생산하기 위해 항체 유전자를 적당한 세균 또는 포유 숙주세포로 감염시킴으로써 생산될 수 있다.

본 발명의 범주내의 폴리펩타이드는 사람 내인성 레트로바이러스성 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드(및 이의 에피토프), 예를 들어, B18Ag1으로 명명된 서열(도 5 및 서열 1)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 범주내의 서열은 B18Ag1을 함유하는 레트로바이러스성 계통내의 다른 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드(서열 141)이다. 이러한 서열은 서열 3 내지 서열 10으로 나타난 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. B18Ag1은 문헌[참고: Werner et al., *Virology* 174:225-238(1990)]에 기술된 바와 같은, 내인성 사람 레트로바이러스성 인자 S71의 gag p30 유전자에 대한 상동성을 가지고 또한 약 30개의 다른 레트로바이러스성 gag 유전자에 대한 상동성을 나타낸다. 하기에서 보다 상세히 논의한 바와 같이, 본 발명은 또한 다수의 추가의 유방암-특이적 폴리펩타이드, 예를 들어, 서열 11 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297 중 하나로 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩타이드"는 본원에 인용된 서열을 함유하는 완전한 길이의 단백질을 포함한, 특정 길이의 아미노산 쇄를 포함한다. 본원에서 기술한 바와 같은 서열을 함유하는 단백질의 에피토프를 함유하는 폴리펩타이드는 완전히 에피토프로 이루어질 수 있거나, 부가 서열을 함유할 수 있다. 부가 서열은 천연 단백질로부터 유래하거나 이종성일 수 있으며, 이러한 서열은 면역원 또는 항원의 특성을 가질 수 있다(반드시 가지는 것은 아니다).

본원에서 사용된 바와 같이, "에피토프"는 B-세포 및/또는 T-세포 표면 항원 수용체에 의해 인지되는(즉, 특이적으로 결합되는) 폴리펩타이드의 부분이다. 에피토프는 일반적으로 익히 공지된 기술, 예를 들어, 문헌[참고: Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243 내지 247(Raven Press, 1993)] 및 본원에 인용된 참고 문헌]에 요약된 기술을 사용하여 동정할 수 있다. 이러한 기술은 천연 폴리펩타이드로부터 유래된 폴리펩타이드를 항원-특이적인 항혈청 및/또는 T-세포주 또는 클론과 반응하는 능력에 대해 스크리닝하는 것을 포함한다. 폴리펩타이드의 에피토프는 이러한 항혈청 및/또는 T-세포와 완전한 길이의 폴리펩타이드의 반응성(예를 들어, ELISA 및/또는 T-세포 반응성 검정에서)과 유사한 수준으로 반응하는 부분이다. 이러한 스크리닝은 일반적으로 당해 분야의 숙련자에게 익히 공지된 방법, 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]에 기술된 방법을 사용하여 수행할 수 있다. B-세포 및 T-세포 에피토프는 컴퓨터 분석에 의해 추정할 수 있다. 종양 조직에서 우선적으로 발현되는 폴리펩타이드의 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드(추가 아미노산 서열 함유 또는 비함유)는 본 발명의 범주내에 있다.

본 발명의 조성물 및 방법은 또한 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 상기 폴리펩타이드 및 핵산 서열의 변이체를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리펩타이드 "변이체"는 치환 및/또는 개질된 고유한 폴리펩타이드와는 상이하여, 폴리펩타이드의 항원 및/또는 면역 특성이 보유되도록 하는 폴리펩타이드이다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 폴리펩타이드 서열중 하나를 개질시키고 상기한 바와 같은 면역학

청 및/또는 T-세포와 개질된 폴리펩타이드와의 반응성을 측정함으로써 나타낼 수 있다. 핵산 변이체는 하나 이상의 치환, 삭제, 삽입 및/또는 개질을 함유하여 암호화된 폴리펩타이드의 항원 및/또는 면역 특성이 보유되도록 할 수 있다. 본원에서 기술된 폴리펩타이드의 한가지 바람직한 변이체는 뉴클레오타이드 치환, 삭제, 삽입 및/또는 변이체를 함유하는 변이체이다.

바람직하게는, 변이체는 보존적 치환을 함유한다. "보존적 치환"은 아미노산이 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환되어, 펩타이드 화학의 기술 분야의 숙련가가 펩타이드의 2차 구조 및 수치요법 특성이 사실상 변하지 않은 것으로 예상하도록 하는 것이다. 일반적으로, 아미노산의 다음 그룹은 보존적 변화를 나타낸다: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 및 (5) phe, tyr, trp, his.

변이체는 또한 예를 들면, 폴리펩타이드의 면역 또는 항원 특성, 2차 구조 및 수치요법 특성에 최소의 영향을 미치는 아미노산을 결실시키거나 부가함으로써 개질될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩타이드는 단백질의 전이를 공-해독적으로 또는 오히려 해독 후 지시하는 단백질의 N-말단에서 신호(또는 전구) 서열로 결합될 수 있다. 폴리펩타이드는 폴리펩타이드(예: 폴리-His)의 합성, 정제 또는 동정을 용이하게 하기 위하여, 또는 폴리펩타이드의 고체 지지체에 대한 결합을 강화시키기 위하여 결합제 또는 다른 서열에 결합될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역에 결합될 수 있다.

일반적으로, 본원에서 기술된 폴리펩타이드의 전체 또는 일부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 몇가지 기술 중 어느것이나 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 cDNA 분자는 시차 디스플레이 PCR을 사용하여, 상응하는 mRNA의 유방암 특정 표면을 기본으로 하여 클론화될 수 있다. 이러한 기술은 정상 조직 및 유방암 조직으로부터 제조된 RNA 주형으로부터의 증폭된 생성물과 비교된다. cDNA는 (dT)₁₂AG 프라이머를 사용한 RNA의 역전사에 의해 제조할 수 있다. 랜덤 프라이머를 사용하여 cDNA의 증폭을 후속하면, 중앙 RNA에 특이적인 증폭된 생성물에 상응하는 밴드는 은 염색된 겔로부터 절단되어 적합한 벡터(예: T-벡터, Novagen, Madison, WI)로 서브 클론화될 수 있다. 본원에서 공개된 유방암-특이적인 폴리펩타이드의 전체 또는 일부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 87 내지 125에 나타난 랜덤 프라이머를 사용하여 상기한 바와 같이 제조된 cDNA로부터 증폭시킬 수 있다.

또 다른 방법으로, 본원에서 기술된 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자(또는 이의 일부)는 사람 게놈 DNA 또는 유방암 cDNA로부터 폴리머라제 연쇄 반응을 통하여 증폭될 수 있다. 이러한 접근에 대하여, B18A1 서열 특이적인 프라이머는 서열 1에서 나타난 서열에 근거하여 디자인될 수 있고, 구입하거나 합성할 수 있다. 유방암 cDNA로부터의 증폭에 대한 하나의 적합한 프라이머 쌍은 (5'ATG GCT ATT TTC GGG GGC TGA CA)(서열 126) 및 (5'CCG GTA TCT CCT CGT GGG TAT T)(서열 127)이다. 그 다음, B18AG1의 증폭된 부분을 사용하여 사람 게놈 DNA 라이브러리로부터 또는 유방암 cDNA 라이브러리로부터, 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY(1989)]과 같이 공지된 기술을 사용하여, 전장(full length) 유전자를 분리시킬 수 있다. B18AG1가 부분인 레트로바이러스성 게놈내의 다른 서열은 프로브로서 B18AG1 특이 서열을 사용하여 사람 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 유사하게 제조될 수 있다. 이후, 서열 141에 나타난 레트로바이러스성 게놈으로부터 단백질로 해독된 뉴클레오타이드는 상응하는 cDNA를 클론화하고, 개방 판독 프레임을 예측하고, 적합한 cDNA를 바이러스성 프로모터(예: T7)를 함유한 벡터로 클론화시킴으로써 결정할 수 있다. 생성되는 작제물은 당해 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 해독 반응시켜 발현된 단백질을 생성하는 뉴클레오타이드 서열을 확인한다. 유사하게, 본원에서 기술된 남아있는 유방암-특이적인 폴리펩타이드에 특이적인 프라이머는 서열 11 내지 86 및 서열 142 내지 297에서 나타난 뉴클레오타이드 서열을 기본으로 하여 디자인할 수 있다.

위에서 기술된 DNA 서열에 의해 암호화된 재조합 폴리펩타이드는 DAN 서열로부터 신속하게 제조할 수 있다. 예를 들면, 재조합 단백질 또는 폴리펩타이드를 배양 배지내로 분비하는 적합한 숙주/벡터 시스템으로부터의 상등액은 시판중인 필터를 사용하여 우선 농축시킬 수 있다. 농축 후, 농축물을 친화도 매트릭스 또는 이온 교환 수지와 같은 적합한 정제 매트릭스에 적용할 수 있다. 최종적으로, 하나 이상의 역상 HPLC 단계를 사용하여 추가로 재조합 폴리펩타이드를 정제한다.

일반적으로, 당해 기술 분야의 통상의 숙련자에게 공지된 어떠한 다양한 발현 벡터도 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 발현시키는데 사용할 수 있다. 발현은 재조합 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 분자를 함유한 발현 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 모든 적합한 숙주 세포에서도 달성될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모 및 고등 진핵 생물을 포함한다. 바람직하게는, 사용되는 숙주 세포는 이. 콜라이, 효모 또는 포유동물 세포주(예: COS 또는 CHO)이다.

또한 상기 기술들은 천연 폴리펩타이드의 에피토프 또는 변이체를 포함한 폴리펩타이드를 제조하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 고유 폴리펩타이드 변이체는 일반적으로는 올리고뉴클레오타이드-지시된 부위-특이적인 돌연변이 유발과 같은 표준 돌연변이 유발 기술을 사용하여 제조할 수 있고, DNA 서열의 단편을 제거하여 말단이 절단된 폴리펩타이드를 제조할 수 있다. 약 100개 미만의 아미노산, 바람직하게는 약 50개 미만의 아미노산을 갖는 부분 또는 다른 변이체는 또한 당해 분야의 숙련자에게 익히 공지된 기술을 사용하는 합성 수단에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 이러한 폴리펩타이드는, 아미노산을 순차적으로 가하여 아미노산 쇄를 증가시키는 메리필드 고상 합성법(Merrifield solid-phase synthesis method)과 같은 시판중인 임의의 고상 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 문헌 참조[참조 문헌: Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146 (1963)]. 폴리펩타이드의 자동 합성용 장치는 캐나다 포스터 시티의 퍼킨 엘머/어플라이드 바이오시스템스 디비전(Perkin Elmer/Applied BioSystems Division)과 같은 공급자로부터 입수하여, 제조자의 설명서에 따라 사용할 수 있다.

특정 양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146, 152, 153 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209, 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297 중 하나로 인용되는 서열을 갖는 DNA 분자에 의해 암호화되는 아미노산 서열, 20% 이상의 뉴클레오타이드 위치에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 결실, 삽입

및/또는 변형을 포함하는 DNA 분자에 의해 암호화되는 상기한 폴리펩타이드의 변이체 및 상기한 폴리펩타이드의 에피토프를 포함한다. 본 발명의 범주내의 폴리펩타이드는 또한, 엄격한 조건하에 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146, 152, 153 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209, 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297 중 하나로 인용되는 서열을 갖는 DNA 분자와 하이브리드화되는 DNA 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드(및 이의 에피토프)를 포함하는데, 여기서 DNA 서열은 전체 서열이 인용된 서열에 대해 80% 이상이 동일하고 뉴클레오타이드 서열에 상응하는 RNA가 정상 유방 조직에서보다 사람의 유방암 조직에서 더 많이 발견된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "엄격한 조건"은 $6\times\text{SSC}$, 0.2% SDS에서 예비 세척하고; 65°C 에서 $6\times\text{SSC}$, 0.2% SDS로 방새 하이브리드화하고; 65°C 에서 $1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS로 각각 30분 동안 2회 세척하고, 65°C 에서 $0.2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS로 각각 30분 동안 2회 세척하는 것을 의미한다.

본 발명의 다른 양태에서는 항체가 제공된다. 상기한 항체는 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 공지된 임의의 다양한 기술에 의해 제조할 수 있다. 문헌 참조[참조 문헌: Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]. 상기한 한가지 기술에서는, 폴리펩타이드를 포함하는 면역원을 각종 동물(예: 마우스, 랫트, 토끼, 양 및 영소)에게 먼저 주입시킨다. 이 단계에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 개질되지 않은 면역원으로서 작용할 수 있다. 선택적으로, 특히 비교적 짧은 폴리펩타이드의 경우, 폴리펩타이드가 담체 단백질[예: 소 혈청 알부민 또는 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)]에 연결될 경우, 뛰어난 면역 반응을 발휘한다. 면역원은 바람직하게는 예정된 스케줄에 따라 하나 이상의 면역 상승제를 혼입시키면서 동물 숙주로 주입시키고 주기적으로 혈액을 채취한다. 이어서, 폴리펩타이드에 특이적인 폴리클로날 항체는 예를 들어, 적합한 고체 지지체로 커플링된 폴리펩타이드를 사용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 상기한 면역 혈청으로부터 분리시킬 수 있다.

흥미로운 항원성 폴리펩타이드에 특이적인 모노클로날 항체는 예를 들어, 코흘러(Kohler) 및 밀스테인(Milstein)의 기술 및 이에 대한 개선책을 사용하여 제조할 수 있다[참조 문헌: J. Immunol. 6:511-519 (1976)]. 간단히, 이러한 기술들은 목적하는 특이성(즉, 흥미로운 폴리펩타이드와의 반응성)을 갖는 항체를 생성할 수 있는 영속 세포주의 제조를 포함한다. 이러한 세포주는 예를 들어, 상기한 바와 같이 면역화된 동물로부터 수득한 비장 세포로부터 제조할 수 있다. 이어서, 비장 세포는 예를 들어, 골수종 세포 융합 파트너, 바람직하게는 면역화된 동물과 상승작용을 할 수 있는 것과 융합시킴으로써 영속시킨다. 다양한 융합 기술을 사용할 수 있다. 예를 들어, 비장 세포 및 골수종 세포는 수분 동안 비이온성 계면활성제와 혼합시킨 다음, 골수종 세포가 아닌 하이브리드 세포의 성장을 지지하는 선택 배지상에 저밀도로 플레이팅시킬 수 있다. 바람직한 선택 기술은 HAT(하이포산틴, 아미노프테린, 티미딘) 선택을 사용한다. 충분한 시간, 일반적으로 약 1 내지 2주가 경과한 후, 하이브리드 콜로니가 관찰된다. 단일 콜로니를 선택하고, 이의 배양 상층액을 폴리펩타이드에 대한 결합 활성에 사용한다. 반응성 및 특이성이 높은 하이브리도마가 바람직하다.

모노클로날 항체는 성장하는 하이브리도마 콜로니의 상층액으로부터 분리시킬 수 있다. 또한, 하이브리도마 세포주를 적합한 숙주 세포, 예를 들어 마우스의 복강내에 주입시키는 것과 같이, 수율을 증진시키는데 다양한 기술을 사용할 수 있다. 이어서, 모노클로날 항체를 복수 또는 혈액으로부터 수집할 수 있다. 오염물은 통상적인 기술, 예를 들어 크로마토그래피, 겔 여과, 침전 및 추출에 의해 항체로부터 제거할 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드는 정제 단계, 예를 들어 친화성 크로마토그래피 단계에 사용할 수 있다.

항체는, 예를 들어 환자에게 유방암을 검출하는 방법에 사용할 수 있다. 이러한 방법은 적합한 생물학적 샘플중에서, 본원에서 기술한 바와 같은 유방암-특이적인 폴리펩타이드의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 항체의 사용을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 생물학적 샘플은 종양 또는 정상 조직 생체검 사물, 유방 절제물, 혈액, 임파절, 혈청 또는 뇨 샘플, 및 기타 조직, 환자로부터 수득한 균질물 또는 이의 추출물을 포함한다.

샘플에서 폴리펩타이드 마커를 검출하는데 항체를 사용하기 위한 각종 검정 양식이 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 참조[참조 문헌: Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]. 예를 들어, 검정법은 생물학적 샘플로부터의 단백질 제조물을 겔 전기영동시키고 적합한 막으로 이전시키고 항체와 반응시키는 웨스턴 블롯 양식에서 수행할 수 있다. 막 위에 항체의 존재는 하기 기술하는 바와 같이 적합한 검출 시약을 사용하여 검출할 수 있다.

또 다른 양태에서, 검정법은 폴리펩타이드에 결합시키고 이를 나머지 샘플로부터 제거하기 위한 고체 지지체 상에 고정시킨 항체의 사용을 포함한다. 결합된 폴리펩타이드는 리포터 그룹을 함유하는 제2 항체 또는 시약을 사용하여 검출할 수 있다. 또는, 폴리펩타이드를 리포터 그룹으로 표지하고 항체를 샘플로 향한 처리한 후 고정시킨 항체에 결합시키는 경쟁 검정법을 사용할 수 있다. 샘플의 성분이 표지된 폴리펩타이드의 항체에 대한 결합을 억제하는 정도는 고정시킨 항체와의 샘플의 반응성을 지시하며, 그 결과, 샘플에서 폴리펩타이드의 농도를 지시한다.

고체 지지체는 항체를 수득할 수 있는 분야의 통상의 숙련가에게 공지된 임의의 물질일 수 있다. 예를 들면, 고체 지지체는 미세 역가 플레이트 또는 니트로셀룰로즈 필터에서 시험 웰 또는 기타 적합한 막일 수 있다. 또는, 지지체는 비드 또는 디스크, 예를 들면, 유리, 유리 섬유, 라텍스 또는 플라스틱 물질, 예를 들면, 폴리스티렌 또는 폴리비닐클로라이드일 수 있다. 지지체는 또한 자기 입자 또는 섬유 광학 센서, 예를 들면, 문헌[미국 특허 제5,359,681호]에 기술된 바와 같은 것일 수 있다.

항체를 특허 및 과학 문헌에 상세히 기술된 바와 같이 공지된 다양한 기술을 사용하여 고체 지지체 상에 고정시킬 수 있다. 본 발명에서, 용어 "고정화"는 비공유 결합, 예를 들면, 흡착 및 공유 결합(지지체 상의 항원 및 작용성 그룹간의 직접 결합 또는 가교-결합제를 사용하는 결합일 수 있다)을 의미한다. 미세 역가 플레이트에서 웰 또는 막에 대한 흡착에 의한 고정화가 바람직하다. 이러한 경우에서, 흡착은 항체를 적합한 완충액 속에서 적합한 시간 동안 고체 지지체와 접촉시킴으로써 얻어질 수 있다. 접촉 시

간은 온도에 따라 좌우되나, 통상 약 1시간 내지 1일이다. 일반적으로, 플라스틱 미세 역가 플레이트(예: 폴리스티렌 또는 폴리비닐클로라이드)의 웰과 약 10ng 내지 약 1 μ g, 바람직하게는 약 100 내지 200ng의 항체와의 접촉이 폴리펩타이드의 적당량을 고정시키는데 충분하다.

고체 지지체에 대한 항체의 공유 결합은 일반적으로 우선 지지체를 지지체를 항체 위의 작용성 그룹, 예를 들면, 하이드록실 또는 아미노 그룹 둘 다와 반응할 수 있는 이작용성 시약과 반응시킴으로써 달성할 수도 있다. 예를 들면, 항체는 적합한 중합체 피복물을 갖는 지지체에 벤조퀴논을 사용하여 공유 결합시키거나 지지체 상의 알데하이드 그룹을 항체 파트너 상의 아민 및 활성 수소와 축합시켜 공유 결합시킬 수 있다[참조: Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) at A12-A13].

특정 양태에서, 샘플에서 폴리펩타이드의 검출 검정법은 2-항체 샌드위치 검정법이다. 이러한 검정법은 우선 고체 지지체, 통상 미세 역가 플레이트의 웰 상에서 고정시킨 항체를 생물학적 샘플과 접촉시켜 샘플 내의 폴리펩타이드를 고정시킨 항체에 결합시킴으로써 수행할 수 있다. 비결합 샘플을 고정시킨 폴리펩타이드-항체 착물로부터 제거하고, 폴리펩타이드 상의 상이한 부위에 결합할 수 있는 제2 항체(리포터 그룹을 함유)를 가한다. 고체 지지체에 결합된 제2 항체의 양을 특이적인 리포터 그룹에 대한 적절한 방법을 사용하여 측정한다.

보다 구체적으로는, 항체를 상기 기술한 바와 같이 지지체 상에 고정시키며, 지지체 상에 남아있는 단백질 결합 부위는 통상 차단된다. 적합한 차단제, 예를 들면, 소 혈청 알부민 또는 Tween 20TM(제조원: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)은 당해 분야의 숙련자들에게 공지되어 있다. 고정시킨 항체는 샘플과 항온처리하고, 폴리펩타이드를 항체에 결합시킨다. 샘플을 적합한 희석제, 예를 들면, 인산염-완충염수(PBS)로 희석한 다음 항온 처리할 수 있다. 일반적으로, 적합한 접촉 시간(즉, 항온처리 시간)은 유방암에 걸린 개체로부터 수득한 샘플 내에 폴리펩타이드의 존재가 검출되기에 충분한 시간이다. 바람직하게는 접촉 시간은 결합된 폴리펩타이드 및 비결합 폴리펩타이드 간에 95% 이상의 평형이 달성되는 결합 수준을 얻기에 충분하다. 당해 분야의 숙련가는 평형을 달성하기에 필요한 시간을 일정 시간에 걸쳐 결합 수준을 검정하여 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 실온에서, 약 30분의 항온처리 시간이 일반적으로 충분하다.

비결합 샘플을 고체 지지체를 적합한 완충액, 예를 들면, 0.1% Tween 20TM을 함유하는 PBS로 세척하여 제거할 수 있다. 리포터 그룹을 함유하는 제2 항체를 고체 지지체에 가할 수 있다. 바람직한 리포터 그룹은 효소(예: 양고추냉이 퍼옥시다제), 기질, 조인자, 억제제, 염료, 방사성 핵종, 발광 그룹, 형광 그룹 및 비오틴을 포함한다. 리포터 그룹에 대한 항체의 결합은 당해 분야에 숙련자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 달성할 수 있다.

제2 항체를 결합된 폴리펩타이드를 검출하기에 충분한 시간 동안 고정시킨 항체-폴리펩타이드 착물로 항온 처리한다. 적합한 시간은 일반적으로 일정 시간 내에 나타나는 결합 수준을 검정하여 측정할 수 있다. 비결합 제2 항체를 제거하고 결합된 제2 항체를 리포터 그룹을 사용하여 검출한다. 리포터 그룹을 검출하기 위해 사용된 방법은 리포터 그룹의 성질에 따라 좌우된다. 방사성 그룹에 대하여, 신틸레이션 카운팅 또는 방사선 사진 방법이 일반적으로 적합하다. 분광 방법이 염료, 발광 그룹 및 형광 그룹을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 비오틴은 상이한 리포터 그룹(통상, 방사성 또는 형광 그룹 또는 효소)에 커플링된 아비딘을 사용하여 검출할 수 있다. 효소 리포터 그룹은 일반적으로 (일반적으로 특정 시간 동안) 기질의 첨가에 이어 반응 생성물의 분광 또는 기타 분석에 의해 검출될 수 있다.

유방암의 존재 유무를 결정하기 위해서 고체 지지체에 결합되어 있는 리포터 그룹으로부터 검출된 시그널을 일반적으로 비중량 조직으로부터 설정된 소정의 컷-오프값에 상응하는 시그널과 비교한다. 하나의 바람직한 양태에서, 컷-오프값은 고정시킨 항체를 유방암이 없는 환자로부터의 샘플과 함께 항온 배양하였을 때 수득된 평균 시그널이다. 일반적으로, 소정의 컷-오프값을 초과하는 3개의 표준편차인 시그널을 발생하는 샘플은 유방암에 대하여 양성인 것으로 간주될 수 있다. 또 다른 바람직한 양태에서, 컷-오프값은 사켓 등(Sackett et al.)의 방법에 따라 "수용자 작동자 곡선(Receiver Operator Curve)"을 사용하여 결정한다[참조: Clinical Epidemiology: A basic Science for Clinical Medicine, p. 106-7(Little Brown and Co., 1985)]. 간략하게, 이 양태에 있어서, 컷-오프값은 진단시험 결과에 대한 각각의 가능한 컷-오프값에 상응하는 한쌍의 진성양성률(즉, 감수성)과 허위양성률(100%-특이성)의 플롯으로부터 결정할 수 있다. 상단 왼쪽 모퉁이에 가장 가까운 플롯 상의 컷-오프값(즉, 가장 넓은 면적으로 둘러싸는 값)은 가장 정확한 컷-오프값이고, 이 방법으로 결정된 컷-오프값보다 높은 시그널을 발생하는 샘플은 양성인 것으로 간주할 수 있다. 또는, 컷-오프값은 허위양성률을 최소화하기 위해서 플롯을 따라 왼쪽으로 이동시키거나 허위음성률을 최소화하기 위해서 오른쪽으로 이동시킬 수 있다. 일반적으로, 이 방법으로 결정된 컷-오프값보다 높은 시그널을 발생하는 샘플은 유방암에 대하여 양성인 것으로 간주된다.

관련된 양태에 있어서, 검정법은 항체를 니트로셀룰로스와 같은 막에 고정시키는 플로우-쓰루(flow-through) 또는 스트립(strip) 시험 형식으로 수행한다. 플로우-쓰루 시험에 있어서, 샘플내의 폴리펩타이드는 샘플이 막을 통과함에 따라 고정시킨 항체에 결합한다. 이어서, 제2의 표지된 항체는 제2 항체가 막을 통해 유동됨에 따라 항체-폴리펩타이드 착물에 결합한다. 결합된 제2 항체의 검출은 위에서 기술한 바와 같이 수행할 수 있다. 스트립 시험 형식에 있어서, 항체가 결합된 막의 한쪽 말단을 샘플을 함유하는 용액에 침지시킨다. 샘플은 막을 따라 제2 항체를 함유하는 영역을 통과하여 고정된 항체 영역으로 이동한다. 고정된 항체의 영역에서 제2 항체의 농도는 유방암의 존재를 나타낸다. 통상적으로, 그 부위에서의 제2 항체의 농도는 직선과 같은 양식으로 나타나고, 육안으로 판독할 수 있다. 이러한 양식의 부재는 음성 결과를 나타낸다. 일반적으로 막에 고정된 항체의 양은 생물학적 샘플이 2-항체 샌드위치 검정법으로 양성 시그널을 발생하는데 충분한 수치의 폴리펩타이드를 함유하는 경우, 상기 논의한 형식으로 육안으로 식별가능한 양식을 발생하도록 선택된다. 바람직하게는, 막에 고정시킨 항체의 양은 약 25ng 내지 약 1 μ g, 보다 바람직하게는 약 50ng 내지 약 1 μ g이다. 이와 같은 시험은 통상적으로 매우 소량의 생물학적 샘플을 사용하여 수행될 수 있다.

환자에서 유방암의 유무는 생물학적 샘플내에서(예를 들면, 생검, 유방절제술 및/또는 환자로부터의 혈액 샘플) 본원에 기술한 바와 같이 소정의 컷-오프값에 비례하는 유방암-특이적 폴리펩타이드를 암호화하는

mRNA의 수치를 평가함으로써 결정할 수도 있다. 이와 같은 평가는 예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 동일 반응계내 하이브리드 형성 및 증폭과 같은 당해 기술분야의 보통의 숙련자에게 공지된 임의의 다양한 방법을 사용하여 달성할 수 있다.

예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응은 상기 생물학적 샘플 중의 하나로부터 분리된 RNA로부터 제조된 cDNA에서 서열을 증폭시키는데 사용할 수 있다. 이와 같은 증폭에 사용하기 위한 서열-특이적 프라이머는 서열 1, 11 내지 86 및 142 내지 297 중의 임의의 하나에 제공된 서열을 기본으로 하여 디자인될 수 있고, 구입하거나 합성할 수 있다. B18Ag1의 경우에, 본원에서 주목되는 바와 같이, 하나의 적합한 프라이머쌍은 B18Ag1-3(5'ATG GCT ATT TTC GGG GGC TGA CA)(서열: 126)과 B18Ag1-3(5'CCG GTA TCT CCT CGT GGG TAT T)(서열: 127)이다. 이어서, PCR 반응 생성물을 겔 전기영동에 의해 분리하고 당해 기술분야의 통상의 숙련자에게 널리 공지된 방법에 따라 가시화한다. 증폭은 통상적으로 적합 조직쌍(동일한 개체로부터의 종양 및 비종양 조직) 또는 부적합 조직쌍(상이한 개체로부터의 종양 및 비종양 조직)으로부터 수득된 샘플에서 수행한다. 증폭 반응은 바람직하게는 2배 규모로 확대되는 cDNA 수 배의 희석물로 수행한다. 비종양 샘플의 동일한 희석물에 필적하는 바와 같이 종양 샘플의 수 배의 희석물에서 발현의 2배 이상 증가를 양성으로 간주한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "DNA/RNA 분자에 대한 프라이머/프로브 특이성"은 당해 DNA/RNA 분자에 대하여 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상, 보다 바람직하게는 약 95% 이상 동일성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 본 발명의 진단법에 유용하게 사용될 수 있는 프라이머 및/또는 프로브는 약 10 내지 40% 이상의 뉴클레오타이드를 갖는다. 바람직한 양태에 있어서, 폴리머라제 연쇄 반응 프라이머는 본원에 기재된 폴리펩타이드 중의 하나를 암호화하는 DNA/RNA 분자의 약 10개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 진단법에 사용하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프로브는 본원에 기재된 폴리펩타이드 중의 하나를 암호화하는 DNA/RNA 분자의 약 15개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. PCR 검정법 및 동일 반응계내 하이브리드 형성 검정법 둘다에 대한 기술은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있다.

유전자 특이성을 정의하는데 중요한 반면 아가로오즈와 에티뎀 브로마이드 염색을 사용하는 통상적인 RT-PCR 프로토콜은 이들을 정량화(즉, 포화 구성 및/또는 적정 곡선)하는데 요구되는 시간과 노력 및 이들의 샘플 처리량으로 인해 진단 키트로 개발할 수 없다. 이러한 문제점은 검정법이 단일 튜브에서 수행되도록 하는 실시간 RT-PCR과 같은 공정을 개발함으로써 극복되고, 또한 96-웰 플레이트에서 사용하기 위해 변형할 수 있다. 이와 같은 방법론을 수행하기 위한 기구는 시판되고 있다(제조원: Perkin Elmer/Applied Biosystems Division). 또는, 이와 같은 프로브에 대한 표지된(예: 효소 형광, 방사선) 항체와 함께 표지된 프로브(예: 디곡시게닌)를 사용하는 기타 고 처리량 검정법을 96-웰 플레이트 검정법의 개발에 사용할 수도 있다.

환자에서 유방암의 존재 유무를 측정하기 위한 또 다른 방법에 있어서, 기술되어 있는 하나 이상의 유방암-특이적인 폴리펩타이드를 피부 시험에 사용할 수 있다. 본원에서 사용되는 "피부 시험"은 앞서 언급한 하나 이상의 폴리펩타이드를 경피 주사한 후 지연형 과민증(DTH) 반응(예를 들면, 팽윤, 홍색화 또는 피부염)을 측정함으로써 환자를 대상으로 직접 수행하는 분석법이다. 주사는 폴리펩타이드(들)를 환자의 피부 세포에 접촉시키기에 충분한 모든 적합한 장치, 예를 들면, 튜버쿨린 실린지 또는 1ml 실린지를 사용하여 성취할 수 있다. 바람직하게는, 반응은 주사한지 최소한 48시간 후, 보다 바람직하게는 48 내지 72시간 후에 측정한다.

DTH 반응은 세포-매개된 면역 반응으로서, 이는 이전에 시험 항원(즉, 사용되는 폴리펩타이드의 면역원 또는 이의 변종)에 노출되었던 환자에서 보다 높게 나타난다. 반응은 룰러(ruler)를 사용하여 육안으로 측정할 수 있다. 일반적으로, 직경이 약 0.5cm 이상, 바람직하게는 약 5.0cm 이상인 반응은 양성 반응으로서, 유방암의 지표가 된다.

본원에 기술된 유방암-특이적인 폴리펩타이드는 바람직하게는 피부 시험에 사용하기 위해 하나 이상의 폴리펩타이드 및 생리학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 물, 염수, 알콜 또는 완충제를 함유하는 약제학적 조성물로서 제형화된다. 이러한 조성물은 통상적으로 상기한 하나 이상의 폴리펩타이드를 0.1ml 용량 중에 약 1 내지 100 μ g, 바람직하게는 약 10 내지 50 μ g의 양으로 함유한다. 바람직하게는, 이러한 약제학적 조성물에 사용되는 담체는 적절한 방부제, 예를 들면, 페놀 및/또는 트윈 80TM을 함유하는 염수액이다.

본 발명의 또 다른 양태에서, 유방암 치료의 진행 및/또는 반응은 시간 경과에 따라 상기한 분석법 중의 어느 것을 수행하여 반응도(즉, 폴리펩타이드 또는 mRNA의 검지량 또는 피부 시험의 경우, 검지된 면역 반응도)의 변화를 평가함으로써 모니터링할 수 있다. 예를 들면, 1 내지 2년의 기간 동안 1달에 1번 또는 2달에 1번 분석을 수행할 수 있다. 일반적으로, 유방암은 시간 경과에 따라 반응도가 증가하는 환자에서 진행된다. 이와 반대로, 유방암은 검지되는 신호가 일정하거나 시간 경과에 따라 감소하는 경우에는 진행되지 않는다.

본 발명의 추가의 양태에서, 본원에 기술된 화합물은 유방암의 면역 요법에 사용될 수 있다. 이러한 양태에 있어서, 화합물(폴리펩타이드, 항체 또는 핵산 분자일 수 있음)을 약제학적 조성물 또는 백신에 혼합시키는 것이 바람직하다. 약제학적 조성물은 이러한 하나 이상의 화합물 및 생리학적으로 허용되는 담체를 함유한다. 백신은 하나 이상의 폴리펩타이드 및 면역 반응 증강제, 예를 들면, 보조제 또는 리포좀(여기서, 화합물이 리포좀 내로 혼합된다)을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물 및 백신은 운반 시스템, 예를 들면, 문헌[미국 특허 제4,897,268호 및 제5,075,109호]에 기술되어 있는 생분해성 미소구체를 추가로 함유할 수 있다. 본 발명의 범위 내에 속하는 약제학적 조성물 및 백신은 또한 하나 이상의 단독 폴리펩타이드를 포함하는 다른 화합물을 함유할 수 있다.

대안적으로, 백신은 앞서 언급한 바와 같은 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유할 수 있으며, 이러한 폴리펩타이드는 동일 반응계 내에서 생성된다. 이러한 백신에서, DNA는 당해 기술분야의 통상의 숙련자들에게 공지되어 있는 각종 운반 시스템, 예를 들면, 핵산 발현 시스템, 세균 및 바이러스 발현 시스템 내에 존재할 수 있다. 적절한 핵산 발현 시스템은 환자에서 발현에 요구되는 DNA 서열(예를 들면, 적합한 프로모터 및 종결 신호)을 함유한다. 세균 운반 시스템은 세포 표면에 폴리펩타이드 면역

원을 발현하는 세균(예를 들면, 바실러스-칼레트-게랑)의 투여를 포함한다. 바람직한 양태에서, DNA는 바이러스 발현 시스템(예를 들면, 종두증 또는 두진 바이러스, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스)을 사용하여 도입할 수 있으며, 이는 비-병원성(결손성), 복제 수용능 바이러스의 사용을 포함할 수 있다. DNA를 이러한 발현 시스템에 혼입시키기 위한 당해 기술 분야의 통상의 숙련자들에게 잘 알려져 있다. DNA는 또한 문헌에 기술, 검토된 바와 같이 순수한 것(naked)일 수도 있다[참조: Ulmer et al., Science 259: 1745-1749, 1993; Cohen, Science 259: 1691-1692, 1993]. 순수한 DNA의 흡수는 DNA를 생분해성 비드 상에 피복시켜 세포 내로 효율적으로 운반시킴으로써 증가될 수 있다.

당해 기술분야의 통상의 숙련자들에게 공지되어 있는 모든 적합한 담체를 본 발명의 약제학적 조성물에 사용할 수 있기는 하지만, 담체의 유형은 투여 경로에 따라 좌우된다. 피하내 투여와 같은 비경구 투여의 경우, 담체는 바람직하게는 물, 염수, 알콜, 지방, 왁스 또는 완충제를 포함한다. 경구 투여의 경우에는, 상기한 담체 또는 고체 담체, 예를 들면, 만니톨, 락토오즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로오즈, 글루코오즈, 수크로오즈 및 탄산마그네슘이 사용될 수 있다. 생분해성 미소구체(예를 들면, 폴리아세테이트 폴리글리콜레이트)가 본 발명의 약제학적 조성물용 담체로서 사용될 수 있다.

어떠한 보조제라도 면역 반응을 비특이적으로 증강시키기 위한 본 발명의 백신 제조에 사용될 수 있다. 대부분의 보조제는 신속한 이화작용으로부터 항원을 보호하도록 고안된 물질, 예를 들어, 수산화알루미늄 또는 광유, 및 면역반응 촉진제, 예를 들어, 지질 A, 보르타델라 페르투스스 (*Bordetella pertussis*) 또는 미코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 유도된 단백질을 포함한다. 적합한 보조제는 시판되고 있으며, 예를 들어, 프로인트 불완전 보조제 및 완전 보조제(제조원: Difco Laboratories, Detroit, MI), 머크 보조제 65(제조원: Merck and Company, Inc, Rahway, NJ), 알룸(alum.) 생분해성 미소구체, 모노포스포릴 지질 A 및 퀴(quil) A가 있다. GM-CSF 또는 인터루킨-2, -7 또는 -12와 같은 사이토킨도 보조제로서 사용될 수 있다.

상기한 약제학적 조성물 및 백신은 예를 들어, 환자의 유방암의 치료에 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "환자"는 항온 동물, 바람직하게는 사람을 인용한다. 환자는 유방암에 걸려있거나 걸려있지 않을 수 있다. 따라서, 상기한 약제학적 조성물 및 백신은 유방암의 발병을 억제하거나, 유방암에 걸린 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 유방암의 발병을 억제하기 위해서, 본원에 기술된 하나 이상의 폴리펩타이드를 함유하는 약제학적 조성물 또는 백신을 환자에게 투여할 수 있다. 대안으로는, 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 순수한 DNA 또는 플라스미드 또는 바이러스성 벡터를 투여할 수 있다. 유방암 환자를 치료하기 위해서, 약제학적 조성물 또는 백신은 하나 이상의 폴리펩타이드, 항체, 본원에 기술된 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열(예: 안티센스 RNA 또는 안티센스 데옥시리보뉴클레오타이드 올리고뉴클레오타이드)을 함유할 수 있다.

투여 용량, 경로 및 횟수는 개인마다 다양할 수 있다. 일반적으로, 약제학적 조성물 또는 백신은 주사(예: 피내, 근육내, 정맥내 또는 피하), 비내(예: 흡입) 또는 경구로 투여될 수 있다. 52주의 기간 동안 1 내지 10회 용량을 투여할 수 있다. 바람직하게는, 1개월 동안 6회 용량을 투여할 수 있고, 그후 주기적으로 증강 백신화 처리할 수 있다. 개개의 환자마다 다른 프로토콜이 적합할 수 있다. 적합한 용량은, 상기한 바와 같이 투여될 때, 항종양 면역 반응을 향상시킬 수 있는 화합물의 양이다. 이러한 반응은 환자에서 항종양 항체를 측정하거나, 시험관내에서 환자의 종양 세포를 죽일 수 있는 세포분해 주효 세포의 백신-의존적 생성으로 모니터링 할 수 있다. 이러한 백신은 또한 백신 처리되지 않은 환자와 비교하여 백신 처리된 환자에서 향상된 임상 효과(예: 보다 빠른 차도, 완전하거나 부분적이거나 장기적인 질병이 없는 생존)를 갖는 면역 반응을 나타낼 수 있다. 일반적으로, 하나 이상의 폴리펩타이드를 함유하는 약제학적 조성물 및 백신에 대해, 투여 용량에 존재하는 각각의 폴리펩타이드의 양은 약 100 μ g 내지 5mg의 범위이다. 적합한 용량 범위는 환자에 따라 다르나, 약 0/1mL 내지 약 5mL의 범위가 통상적이다.

하기 실시예는 본 발명을 예증하기 위한 것으로서, 제한하려는 것이 아니다.

실시예

실시예 1

시차 디스플레이(Differential Display) RT-PCR을 사용하는 유방암-특이적인 cDNA의 제조

본 실시예는 시차 디스플레이 스크리닝을 사용하여 유방암-특이적인 폴리펩타이드를 암호화하는 cDNA 분자를 제조하는 것을 설명한다.

A. B18Ag1 cDNA의 제조 및 mRNA 발현의 특성화

조직 샘플은 환자로부터 제거된 후에 병인이 확인되는 유방암 환자의 유방암 및 정상 조직으로부터 제조한다. 샘플로부터 정상 RNA 및 종양 RNA를 추출하고, mRNA를 분리하며, (dT)₁₂AG(서열 130) 고정된 3' 프라이머를 사용하여 cDNA로 전환시킨다. 이어서, 시차 디스플레이 PCR을 무작위로 선택된 프라이머 (CTTCAACCTC)(서열 103)을 사용하여 수행한다. 증폭 조건은 1.5mM MgCl₂, 20pmol dNTP 및 1단위의 Taq DNA 폴리머라제(제조원: Perkin-Elmer, Branchburg, NJ)를 함유하는 표준 완충액이다. 93°C에서 30초 동안의 변성, 42°C에서 1분 동안의 어닐링, 및 72°C에서 30초 동안의 신장을 사용하여 40회 증폭시킨다. RNA 핑거프린트를 함유하는 76개 증폭된 생성물이 수득된다. 유방암 조직의 RNA 핑거프린트가 정상 유방 조직의 것과 98% 이상 동일하였으나, 밴드는 종양의 RNA 핑거프린트 패턴에 특이적인 것으로 반복적으로 관찰되었다. 이 밴드를 은 염색된 겔에서 절단하고, T-벡터(Novagen, Madison, WI)내로 서브 클로닝하여 서열 분석한다.

B18Ag1으로 명명된 cDNA의 서열은 서열 1에서 나타난다. GENBANK 및 EMBL의 데이터베이스 조사 결과, 초기에 클로닝된 B18Ag1 단편은 내인성 사람 레트로바이러스 요소 S71(이는 시미안 육종 바이러스(SSV)와 상동성인 절단된 레트로바이러스 요소이다)과 77% 동일한 것으로 나타났다. S71은 불완전한 gag 유전자, pol 유전자의 부분, 및 3' 말단에 LTR-유사 구조를 함유한다[참조: Werner et al., Virology 174: 225-

238(1990)]. B18Ag1은 P30(gag) 위치에 상응하는 영역에서 SSV와 64% 동일하다. B18Ag1은 포유동물을 감염시키는 레트로바이러스의 다양한 gag 단백질과 상당한 상동성을 공유하는 영역을 포함하는 3개의 별도의 불완전한 리딩 프레임을 함유한다. 또한, S71에 대한 상동성은 gag 유전자만이 아니라, LTR를 포함하는 수 kb의 서열로 확장된다.

B18Ag1-특이적 PCR 프라이머는 컴퓨터 분석 가이드라인을 사용하여 합성한다. RT-PCR 증폭(94°C, 30초; 60°C→42°C, 30초; 72°C, 30초; 40회)으로 확인한 바에 따르면, B18Ag1은 환자의 유방암 조직에서 비교적 높은 수준으로 존재하는 실질적인 mRNA 서열을 나타냈다. 증폭에 사용된 프라이머는 3.5mM 마그네슘 농도 및 pH 8.5에서 B19Ag1-1(CTG CCT GAG CCA CAA ATG)(서열 128) 및 B18Ag1-4(CCG GAG GAG GAA GCT AGA GGA ATA)(서열 129)이었고, 2mM 마그네슘 농도 및 pH 9.5에서 B18Ag1-2(ATG GCT ATT TTC GGG GCC TGA CA)(서열 126) 및 B18Ag1-3(CCG GTA TCT CCT CGT GGG TAT T)(서열 127)이었다. 동일한 실험은 당해 환자의 정상 유방 조직에서 발현 수준이 부재하거나 매우 낮음을 보여준다(도 1 참조). 이어서, RT-PCR 실험을 사용하여, B18Ag1 mRNA가 9개의 상이한 유방암 샘플(브라질 및 미국인 환자)내에 존재하지만 각각의 암 환자에 상응하는 정상 유방 조직내에는 부재하거나 매우 낮음을 보여준다. 또한, RT-PCR 분석은 B18Ag1 전사물이 각종 정상 조직(림프절, 심근 및 간 포함)내에 존재하지 않고 PBMC 및 폐 조직내에 비교적 낮은 수준으로 존재함을 보여준다. 유방암 샘플내의 B18Ag1 mRNA의 존재, 및 정상 유방 조직내에서의 부재는 도 2에 제시된 바와 같이 노던 블롯 분석에 의해 확인되었다.

또한, 유방암 조직에서 B18Ag1의 시차 발현은 RNase 보호 분석에 의해 확인되었다. 도 3은 4개의 상이한 RNase 보호 분석물에서 측정된 각종 조직 유형에서 B18Ag1 mRNA의 수준을 보여준다. 레인 1 내지 12는 각종 정상 유방 조직 샘플을 나타내고; 레인 13 내지 25는 각종 유방암 샘플을 나타내며; 레인 26 내지 27은 정상 전립선 샘플을 나타내고; 레인 28 내지 29는 전립선암 샘플을 나타내며, 레인 30 내지 32는 결장암 샘플을 나타내고; 레인 33은 정상 대동맥을 나타내고; 레인 34는 정상 소장을 나타내며; 레인 35는 정상 피부를 나타내고; 레인 36은 정상 림프절을 나타내고; 레인 37은 정상 난소를 나타내며; 레인 38은 정상 간을 나타내고; 레인 39는 정상 골격근을 나타내며; 레인 40은 제1 정상 위장 샘플을 나타내고; 레인 41은 제2 정상 위장 샘플을 나타내며; 레인 42는 정상 폐를 나타내고; 레인 43은 정상 신장을 나타내며; 레인 44는 정상 체장을 나타낸다. 실험간의 비교는 각각의 분석에 공지된 β -액틴 메세지가 풍부한 포지티브 대조군 RNA를 포함시켜 상기 포지티브 대조군에 대해 상이한 분석 결과를 표준화시킴으로써 용이해진다.

RT-PCR 및 서던 블롯팅 분석을 통해, B18Ag1좌가 단일 복사체 내생 레트로바이러스 요소로서 사람 게놈 DNA에 존재한다는 것을 알 수 있다. 약 12 내지 18kb의 게놈 클론을, 프로브로서 초기 B18Ag1 서열을 사용하여 분리한다. 4개의 추가적 서브클론을 XbaI 분해로써 분리한다. 상기 클론(도 4에 도시된 바와 같이 위치)의 XbaI 분해물의 말단으로부터 수득된 추가적 레트로바이러스 서열은 서열 3 내지 서열 10으로 나타나 있으며, 서열 3은 도 4에서 10으로 표지된 서열의 위치를 보여주고, 서열 4는 11 내지 29로 표지된 서열의 위치를 보여주고, 서열 5는 3으로 표지된 서열의 위치를 보여주고, 서열 6은 6으로 표지된 서열의 위치를 보여주고, 서열 7은 12로 표지된 서열의 위치를 보여주고, 서열 8은 13으로 표지된 서열의 위치를 보여주고, 서열 9는 14로 표지된 서열의 위치를 보여주고, 서열 10은 11 내지 22로 표지된 서열의 위치를 보여준다.

후속적인 연구를 통해, 12 내지 18kb 게놈 클론이 도 5A 및 5B에 도시된 바와 같은 약 7.75kb의 레트로바이러스 요소를 함유한다는 것이 입증되었다. 이러한 레트로바이러스 요소의 서열은 서열 141에 보여진다. 도 5A의 상단에 수가 매개된 레인은 레트로바이러스 게놈 클론의 센스-쇄 서열을 나타낸다. 상기 레인 아래의 박스는 선택된 제한 부위의 위치를 보여준다. 화살표는 레트로바이러스 요소의 서열화에 사용되는 상이한 중점 클론을 도시한다. 화살표의 방향은 단일-통과 (single-pass) 서브클론 서열이 센스 또는 안티센스 쇠에 상응하는지를 보여준다. 도 5B는 상기 요소내에 바이러스 유전자의 구성을 도시하는, B18Ag1을 함유하는 레트로바이러스 요소의 대략도이다. 개방 박스는, 상기 요소를 통해 발견되는 메타오닌에서 개시되는 예상 개방 판독 프레임에 상응한다. 6개의 유사한 개방 판독 프레임의 각각이, 박스의 왼편에 나타난 바와 같이 보여지며, 프레임 1 내지 3은 센스 쇠상에서 발견된 것에 상응한다.

프로브로서 서열 1의 cDNA를 사용하여, 서열 141에 나타난 게놈 서열에 비해 뉴클레오타이드 상이점이 적은(1% 미만) 보다 장쇄의 cDNA를 수득한다.

B. 다른 유방암-특이적인 폴리펩타이드를 암호화하는 cDNA 분자의 제조

정상 RNA 및 종양 RNA를 제조하고, mRNA를 분리한 후, 상기한 바와 같이 (dT)₁₂AG-고정된 3' 프라이머를 사용하여 cDNA로 전환시킨다. 이 후, 무작위로 선택된 프라이머 서열 87 내지 125를 사용하여 차별적 디스플레이(differential display) PCR를 수행한다. 증폭 조건은 상기한 바와 같고, 종양의 RNA 핑거프린트 패턴에 특이적인 것으로 관찰된 밴드를 은-염색된 겔로부터 잘라내어, T-벡터(Novagen, Madison, WI) 또는 pCRII 벡터(Invitrogen, San Diego, CA)내로 서브클로닝한 후, 서열분석한다. 서열 11 내지 86이 제공된다. 79개의 서열중, 67개가 신규한 것으로 밝혀졌다(서열 11 내지 26 및 28 내지 77)[도 6 내지 20 참조].

항원 B15Ag1(서열 27에 제공된 본래 동정된 부분 서열)에 대해 연장된 DNA 서열(서열 290)을 추가 연구를 위해 수득한다. 상기한 유전자 बैं크의 것들과 서열 290의 서열의 비교를 통해, 공지된 사람 β -A 액티빈 유전자에 대한 상동성이 밝혀졌다.

후속적인 연구를 통해, 146개의 서열(서열 142 내지 289)이 추가로 동정되었으며, 이중 115개가 신규한 것으로 여겨진다(서열 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291). 일류 발명자의 지식으로도, 지금까지 이전에 동정된 서열의 어떤것도 정상 유방 조직에서 보다는 사람의 유방암 조직에서 더 고수준으로 발현된다는 것이 밝혀지지 않았다.

추가적인 연구에서, 항원 B11Ag1의 6개의 상이한 스플라이스 형을 분리하는데, 이렇게 다양한 스플라이스 형의 각각은 다소 상이한 B11Ag1 암호화 프레임 형을 지닌다. 스플라이싱 연결부 서열은 다양한 패턴 및 배열의 개별적인 엑손을 정의하며, 다양한 스플라이스 형을 형성한다. 프라이머는 하기 기술된 바에 따라 RT-PCR을 사용하는 엑손의 각각의 발현 패턴을 시험하기 위해 고안되었다. 각각의 엑손은 유방암, 전립선 및 고환-특이적인 발현의 고유 B11Ag1으로서 동일한 패턴을 나타내기 위해 발견되었다. 분리된 단백질을 코딩하는 엑손에 대해 결정된 cDNA 서열은 각각 서열번호 292 내지 297내에서 제공된다.

실시예 2

사람 게놈 DNA로부터 B18Ag1 DNA의 제조

본 실시예는 사람 게놈 DNA로부터 증폭에 의한 B18Ag1 DNA의 제조를 설명한다.

하기 증폭 조건을 사용하여 B18Ag1 특이적 프라이머 20pmol, dNTPs 500pmol 및 1단위의 Tag DNA 폴리머라제(Perkin Elmer, Branchburg, NJ)를 사용한 인간 게놈 DNA 250ng로부터 B18Ag1 DNA를 제조할 수 있다: 94°C에서 30초 동안 변성, 매 2 주기마다 2°C씩 증가시키면서 60 내지 42°C에서 30초 동안 터치다운 어닐링 및 72°C에서 30초 동안의 신장시킨다. 마지막 신장(42°C 어닐링 온도)은 25번째 주기가 되게 한다. 컴퓨터 분석을 위한 프라이머를 선택한다. 합성된 프라이머는 B18Ag1-1, B18Ag1-2, B18Ag1-3 ALC B18Ag1-4이다. 프라이머쌍은 1+3, 1+4, 2+3 및 2+4로 사용할 수 있다.

겔 전기영동법에 따라, B18Ag1 DNA에 상응하는 밴드를 절단하고 적당한 벡터로 클로닝한다.

실시예 3

유방암 cDNA로부터 B18Ag1 DNA의 제조

본 실시예는 사람 유방암 cDNA로부터 증폭에 의한 B18Ag1 DNA의 제조를 설명한다.

최종 부피가 30 μ l인 폴리 A+ RNA 500ng, 프라이머(T)₁₂AG(TTT TTT TTT AG)(서열 130) 200pmol, 1X 제 1 쇠 역전사 효소 완충액, DTT 6.mM, dNTPs 500mmol 및 1단위의 AMV 또는 MMLV 역전사 효소(제조원: Gibco-BRL(Grand Island, NY)와 같은 임의의 공급원으로부터 구입)를 함유하는 반응 혼합물에서 사람 유방암으로부터의 RNA로부터 제조된 제1 쇠의 cDNA를 합성한다. 제1 쇠 합성 후에, cDNA를 대략적으로 25 배로 희석시키고, 실시예 2에 기술된 바에 따라 증폭을 위하여 1 μ l를 사용한다. 한편 일부의 프라이머쌍이 이중 집단의 전사체를 초래하는 반면에, 프라이머 B18Ag1-2(5'ATG GCT ATT TTC GGG GGC TGA CA)(서열 126) 및 B18Ag1-3(5'CCG GTA TCT CCT CGT GGG TAT T)(서열 127)는 단일 151 bp의 증폭 생성물을 생성한다.

실시예 4

B18Ag1 B-세포 및 T-세포 에피토프의 동정

본 실시예는 B18Ag1 에피토프의 동정을 설명한다.

B18Ag1 서열은 다양한 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 스크리닝될 수 있다. B-세포 에피토프를 측정하기 위하여, 서열을 문헌[문헌: Hopp, Prog. Clin. Biol. Res. 172B:367-77(1985)]의 방법 또는 선택적으로, 문헌[문헌: Cease et al., J. Exp. Med. 164:1779-84(1986)] 또는 문헌[문헌: Spouge et al., J. Immunol. 138:204-12(1987)]의 방법을 사용하여 소수성 및 친수성 수치에 대하여 스크리닝시킬 수 있다. 추가로 클래스 II MHC(항체 또는 B-세포) 에피토프를 AMPHI[참조: Margalit et al., J. Immunol. 138:2213(1987)] 또는 로트바드 및 테일러(Rothbard and Taylor)[참조: EMBO J. 7:93(1988)]의 방법과 같은 프로그램을 사용하여 예측할 수 있다.

일단 이러한 기술을 사용하여 펩타이드(15 내지 20 아미노산 길이)가 확인되면, 개별적인 펩타이드가 자동 펩타이드 합성기[제조원: 퍼킨 엘머(Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) 등에서 제조된] 및 메리필드(Merrifield) 합성과 같은 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 합성한 다음, 유방 암을 가진 환자가 펩타이드와 반응하는 항체를 소유하는지를 측정하기 위해 일반인 또는 유방암 환자로부터 수집된 혈청을 스크리닝하여 사용할 수 있다. 유방 암 환자 내의 그러한 항체의 존재는 특이한 B-세포 에피토프의 면역원성을 확인한다. 또한 펩타이드는 생체 내에서 면역화한 후, 동물(생쥐, 쥐, 토끼, 침팬지 등)들의 혈청학적 또는 체액 면역을 발생시킬 수 있는 능력에 대해 시험될 수 있다. 펩타이드-특이적인 항혈청의 발생은 추가로 특이성 B-세포 에피토프의 면역원성을 확인하여 그러한 면역화한 후에 따른다.

T-세포를 확인하기 위하여, HLA 클래스 I MHC 분자와 결합할 능력이 있는 B18Ag1 서열을 가진 8 내지 10 개 아미노산 모티프를 확인하는데 유용한 차별적인 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 B18Ag1 서열을 스크리닝할 수 있다[참조: Rammensee et al. Immunogenetics 41:178-228 (1995)]. 합성된 펩타이드는 표준 결합 분석[참조: Seete et al., J. Immunol. 153:5586-92(1994)]을 사용하여 클래스 I MHC에 결합되는 능력을 시험할 수 있으며, 더욱 중요하게는, 문헌[문헌: Bakker et al., Cancer Res. 55:5330-34(1995); Visseren et al., J. Immunol. 154:3991-98 (1995); Kawakami et al., J. Immunol. 154:3961-68 (1995); 및 Kart et al., J. Immunol. 152:3904-12 (1994)]의 방법을 사용하여 환자 또는 일반인의 말초 단핵 세포를 시험관에서 자극시켜 항원과 반응하는 세포독성 T-세포를 발생시키는 능력을 시험할 수 있다. 자가(동일한 클래스 I MHC 분자로부터 생성되는) 면역 세포를 죽일 수 있는 T-세포를 시험관 내에서 성공적으로 생성시켜, B18Ag1 항원의 면역원성을 추가로 확인한다. 추가로, 그러한 펩타이드는 특이적인 사람 MHC 클래스 I 반수체형[참조: Vitiello et al., J. Exp. Med. 173:1007-15(1991)]을 발현시키기 위해 형질전환된 쥐에서 생체내 면역화 후, 쥐 펩타이드 및 B18Ag1과 반응하는 세포독성 T-세포를 생성시키는데 사용된다.

예견되는 HLA 클래스 I MHC 결합 항원에 따라 분류된, 예견되는 B18Ag1 B-세포 및 T-세포 에피토프의 대표적인 리스트는 하기에 나타낸다.

예견되는 Th 모티프(B-세포 에피토프)(서열 131 내지 133)

SSGGRTFDDFHRYLLVGI

QGAAQKPI NLSKXIEVVQGHDE

SPGVFLEHLQEAYRIYTPFDLSA

예견되는 HLA A2.1 모티프(T-세포 에피토프)(서열 134 내지 140)

YLLVGIQGA

GAAQKPINL

NLSKXIEVV

EVVQGHDES

HLQEAYRIY

NLAFVAQAA

FVAQAAPDS

실시예 5

시차 디스플레이 PCR에 의해 발견된 유방암 유전자의 특성

시차 디스플레이 PCR에 의해 발견된 유방암 유전자의 특이성 및 감도는 RT-PCR을 사용하여 측정한다. 이 방법은 RNA를 다량으로 사용하지 않고 반정량적으로 유방암 유전자 mRNA 발현을 빠르게 측정할 수 있다. 유전자 특이적 프라이머를 사용하여, 시험된 다양한 조직 중의 mRNA 발현 수치는 8 유방암, 5 일반 유방, 2 전립선 종양, 2 결장 종양, 1 폐 종양 및 일반 전립선, 결장, 간, 신장, 폐, 난소, 췌장, 골격근, 피부, 위 및 고환 등을 포함하는 14개의 기타 성인 조직을 포함한다.

RT-PCR의 반정량적 성질을 확인하기 위해, β -액틴을 시험되는 각각의 조직에 대한 내부 대조군으로 사용한다. 일련의 cDNA들의 제1쇄 희석액을 제조하고 β -액틴 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR 분석을 수행한다. 이어서 β -액틴 주형의 점진적인 증폭이 가능한 희석액이 선택되며, 그것은 개시 복사수의 상이함을 반영하기에 충분히 민감하다. 이 조건을 사용하여, 각각의 조직으로부터 각각의 역전사 반응에 대한 β -액틴 수치를 측정한다. DNA의 오염도는 DNase 처리 및 역전사 효소 부가없이 제조된 제1쇄 cDNA를 사용한 경우에 나타나는 네가티브를 확인하여 최소화시킨다.

유전자 특이적인 프라이머를 사용하여, 다양한 조직의 mRNA 발현 수치를 측정한다. 현재까지, RT-PCR에 의해 38 유전자가 성공적으로 시험되었으며, 5개가 유방암에 대해 양호한 특이성 및 감도를 나타냈다(B15AG-1, B32GA1b, B38GA2a, B11A1a 및 B18AG1a). 도 21A 및 21B는 이들 유전자들 중에서 3개의 결과를 나타낸다[B15AG-1(서열 27), B31GA1b(서열 148) 및 B38GA2a(서열 157)]. 표 1은 일반 유방 조직 및 유방암, 그리고 기타 조직 중의 시험된 모든 유전자의 발현 수치를 요약한다.

[표 1]

다양한 조직에서 발현된 유방암-항원의 백분율

유방 조직	유방암의 과발현	84 %
	정상 및 종양에서 동일하게 발현	16 %
기타 조직	유방암에서는 과발현되지만 정상 조직에서는 발현되지 않음	9%
	유방암에서는 과발현되지만 정상 조직에서는 일부 발현	30 %
	유방암 및 정상 조직에서 동등하게 과발현	61 %

상기로부터, 비록 본 발명의 특이한 양태가 예증의 목적으로 기술되었지만, 본 발명의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않고 다양한 변형이 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열;

(b) 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 항원 특성 및/또는 면역원 특성이 유지되도록 20% 이하의 뉴클레오타이드 위치에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 결실, 삽입 및/또는 변형을

함유하는 상기 뉴클레오타이드 서열의 변이체 또는

(c) 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자.

청구항 2

(a) 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 엄격한 조건하에 하이브리드화되고;

(b) 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 서열과 80% 이상이 동일한 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 에피토프를 암호화하는 분리된 DNA 분자.

청구항 3

(a) 서열 141의 서열로부터 전사된 뉴클레오타이드 서열 또는

(b) 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 항원 특성 및/또는 면역원 특성이 유지되도록 20% 이하의 뉴클레오타이드 위치에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 결실, 삽입 및/또는 변형을 함유하는 상기 뉴클레오타이드 서열의 변이체에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 에피토프를 암호화하는 분리된 DNA 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 따르는 DNA 분자에 대해 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 DNA 또는 RNA 분자.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 따르는 DNA 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 6

제5항에 따른 발현 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 따른 DNA 분자에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 8

제7항에 있어서, 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열의 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 9

제7항에 따르는 폴리펩타이드에 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 10

생물학적 샘플내에서 제7항에 따르는 하나 이상의 폴리펩타이드를 검출하고, 이로부터 환자에게서 유방암의 존재를 결정함을 포함하여, 환자에게서 유방암의 존재를 결정하는 방법.

청구항 11

생물학적 샘플내에서 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에서 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 하나 이상의 폴리펩타이드를 검출함을 포함하여, 환자에게서 유방암의 존재를 결정하는 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 생물학적 샘플이 유방암의 부분인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 검출 단계가 생물학적 샘플을 제9항에 따르는 모노클로날 항체와 접촉시킴을 포함하는

방법.

청구항 14

제11항 있어서, 검출 단계가 생물학적 샘플을 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에서 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드에 결합하는 모노클로날 항체와 접촉시킴을 포함하는 방법.

청구항 15

생물학적 샘플내에서 제7항에 따르는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA 분자를 검출하고, 이로부터 환자에게서 유방암의 존재를 결정함을 포함하여, 환자에게서 유방암의 존재를 결정하는 방법.

청구항 16

생물학적 샘플내에서 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에서 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 RNA 분자를 검출하고, 이로부터 환자에게서 유방암의 존재를 결정함을 포함하여, 환자에게서 유방암의 존재를 결정하는 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 생물학적 샘플이 유방암의 부분인 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 검출 단계가

- (a) 생물학적 샘플내에서 RNA 분자로부터 cDNA를 제조하고,
- (b) 제7항에 따르는 폴리펩타이드의 적어도 한 부분을 암호화할 수 있는 cDNA 분자를 특이적으로 증폭시키고 이로부터 환자에게서 유방암의 존재를 결정함을 포함하는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 검출 단계가

- (a) 생물학적 샘플내에서 RNA 분자로부터 cDNA를 제조하고,
- (b) 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에서 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 적어도 한 부분을 암호화할 수 있는 cDNA 분자를 특이적으로 증폭시키고 이로부터 환자에게서 유방암의 존재를 결정함을 포함하는 방법.

청구항 20

- (a) 생물학적 샘플내에서 제7항에 따르는 하나 이상의 폴리펩타이드의 양을 제1 시간점에서 검출하는 단계,
- (b) 연속된 시간점에서 단계 (a)를 반복하는 단계 및
- (c) 단계 (a) 및 (b)에서 검출된 폴리펩타이드의 양을 비교하고 이로부터 환자에게서 유방암의 진행을 모니터링하는 단계를 포함하여, 환자에게서 유방암의 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 21

- (a) 제1 시간점에서 생물학적 샘플내에서 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에서 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 하나 이상의 폴리펩타이드의 양을 검출하는 단계,
- (b) 연속된 시간점에서 단계 (a)를 반복하는 단계 및
- (c) 단계 (a) 및 (b)에서 검출된 폴리펩타이드의 양을 비교하고 이로부터 환자에게서 유방암의 진행을 모니터링하는 단계를 포함하여, 환자에게서 유방암의 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 생물학적 샘플이 유방암의 부분인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 검출 단계가 생물학적 샘플의 부분을 제9항에 따른 모노클로날 항체와 접촉시킴을 포함하는 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 검출 단계가 생물학적 샘플을 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199,

205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드에 결합하는 모노클로날 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, 폴리펩타이드가 서열 1, 3 내지 26, 28 내지 77, 142, 143, 146 내지 152, 154 내지 166, 168 내지 176, 178 내지 192, 194 내지 198, 200 내지 204, 206, 207, 209 내지 214, 216, 218, 219, 221 내지 240, 243 내지 245, 247, 250, 251, 253, 255, 257 내지 266, 268, 269, 271 내지 273, 275, 276, 278, 280, 281, 284, 288 및 291 내지 297로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열의 에피토프를 포함하는 방법.

청구항 26

(a) 생물학적 샘플내에서 제7항에 따르는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 RNA 분자의 양을 제1 시간점에서 검출하는 단계;

(b) 연속된 시간점에서 단계 (a)를 반복하는 단계; 및

(c) 단계 (a) 및 (b)에서 검출되는 RNA 분자의 양을 비교하고 이로부터 환자에게서 유방암의 진행을 모니터링하는 단계를 포함하는, 환자에게서 유방암 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 검출 단계가

(a) 생물학적 샘플내 RNA 분자로부터 cDNA를 제조하는 단계; 및

(b) 제7항에 따르는 폴리펩타이드의 적어도 일부를 암호화할 수 있는 cDNA 분자를 특이적으로 증폭시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 28

(a) 생물학적 샘플내에서 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 RNA 분자의 양을 제1 시간점에서 검출하는 단계;

(b) 연속 시간점에서 단계 (a)를 반복하는 단계; 및

(c) 단계 (a) 및 (b)에서 검출되는 RNA 분자의 양을 비교하고 이로부터 환자에게서 유방암의 진행을 모니터링하는 단계를 포함하는, 환자에게서 유방암 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 29

제7항에 따르는 폴리펩타이드 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 억제학적 조성물.

청구항 30

서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 유방암의 발달을 억제하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 31

제7항에 따르는 폴리펩타이드 및 면역 반응 인핸서를 포함하는 백신.

청구항 32

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 따르는 DNA 분자를 포함하는 백신.

청구항 33

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 따르는 DNA 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 포함하는 백신.

청구항 34

서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290 및 엄격한 조건하에 이들과 하이브리드화되는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드 및 면역 반응 인핸서를 포함하는, 유방암의 발달을 억제하기 위한 백신.

청구항 35

제29항 또는 제30항에 있어서, 환자에게 투여함을 포함하여 환자에게서의 유방암의 발달 억제용 약제의 제조시 사용하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 36

제31항 내지 제34항 중의 어느 한 항에 있어서, 환자에게서의 유방암의 발달 억제용 약제의 제조시 사용하기 위한 백신.

청구항 37

- (a) 제9항에 따르는 하나 이상의 모노클로날 항체; 및
- (b) 검출 시약을 포함하는 진단용 키트.

청구항 38

- (a) 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289, 290으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드에 결합하는 하나 이상의 모노클로날 항체; 및
- (b) 검출 시약을 포함하는 진단용 키트.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 모노클로날 항체(들)가 고상 지지체상에 고정되는 키트.

청구항 40

2개의 폴리머라제 연쇄 반응 프라이머를 포함하며, 이 중 하나 이상의 프라이머가 제4항에 따르는 RNA 분자에 대해 특이적인 진단용 키트.

청구항 41

제40항에 있어서, 하나 이상의 폴리머라제 연쇄 반응 프라이머가 제4항에 따르는 RNA 분자의 약 10개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 키트.

청구항 42

2개의 폴리머라제 연쇄 반응 프라이머를 포함하며, 이 중 하나 이상의 프라이머가 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289 및 290으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA 분자에 대해 특이적인 진단용 키트.

청구항 43

제42항에 있어서, 하나 이상의 폴리머라제 연쇄 반응 프라이머가 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289 및 290으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA 분자의 약 10개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 키트.

청구항 44

제4항에 따르는 DNA 분자의 약 15개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 함유하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 진단용 키트.

청구항 45

서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289 및 290으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 DNA 서열의 약 15개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 진단용 키트.

청구항 46

제4항에 따르는 DNA 분자에 대해 특이적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 진단용 키트.

청구항 47

제46항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 프로브가 제4항에 따르는 DNA 분자의 약 15개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 키트.

청구항 48

서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285 내지 287, 289 및 290으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 DNA 서열에 대해 특이적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 진단용 키트.

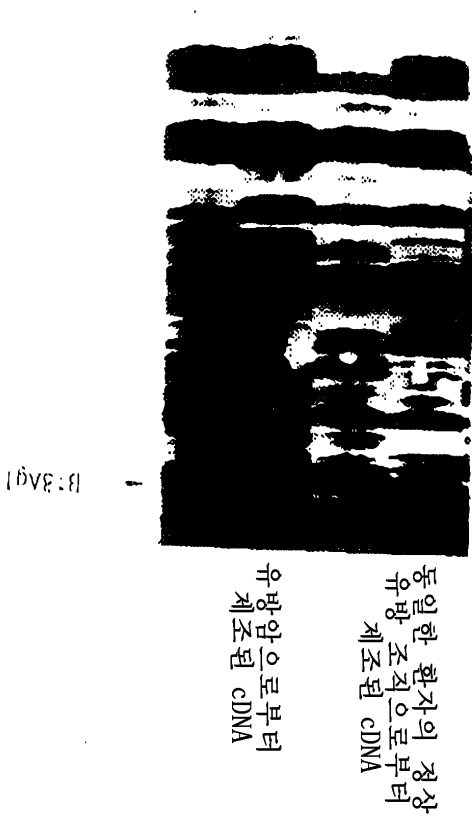
청구항 49

제48항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 프로브가 서열 78 내지 86, 144, 145, 153, 167, 177, 193, 199, 205, 208, 215, 217, 220, 241, 242, 246, 248, 249, 252, 256, 267, 270, 274, 277, 279, 282, 283, 285

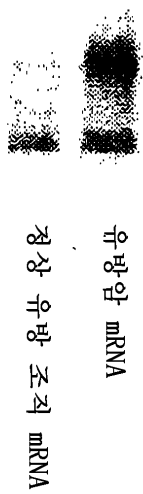
내지 287, 289 및 290으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 DNA 서열의 약 15개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 키트.

도면

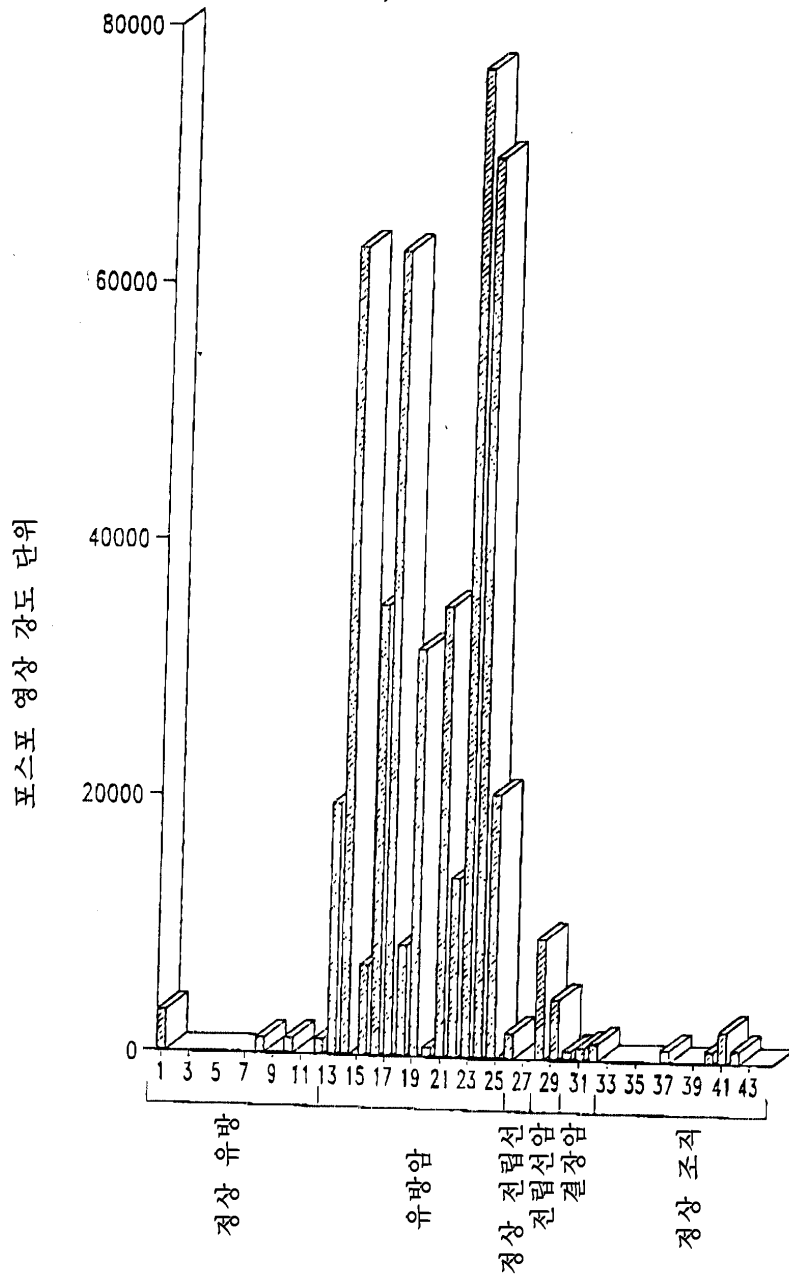
도면1



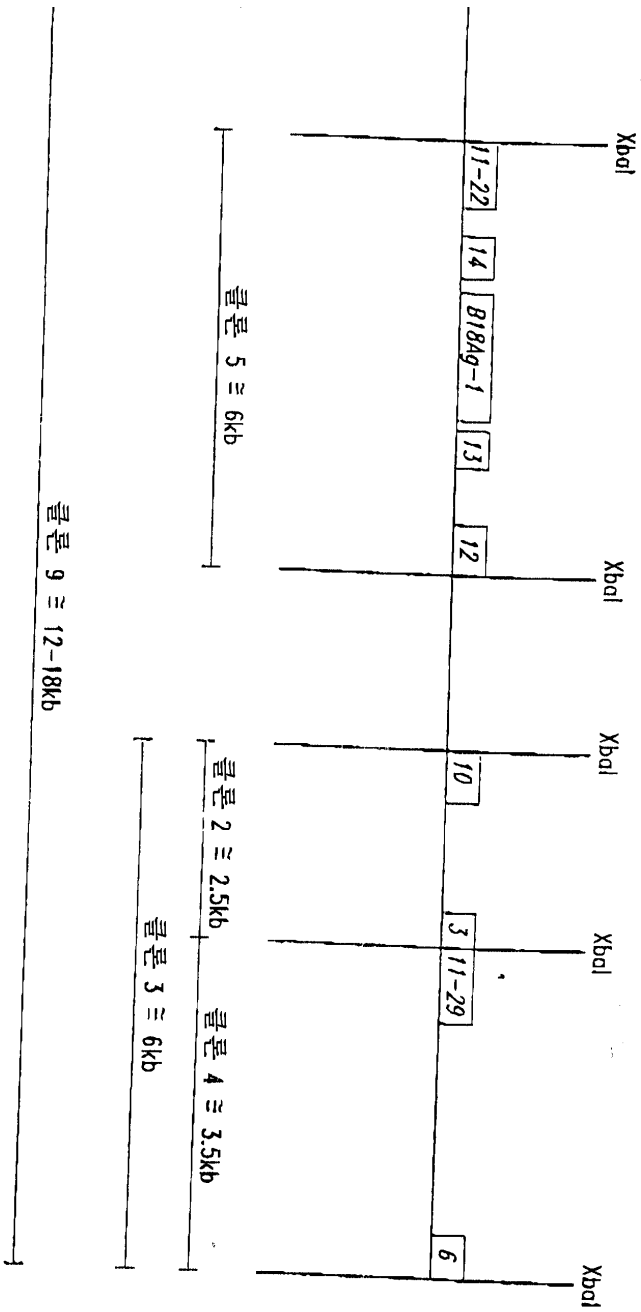
도면2



도면3

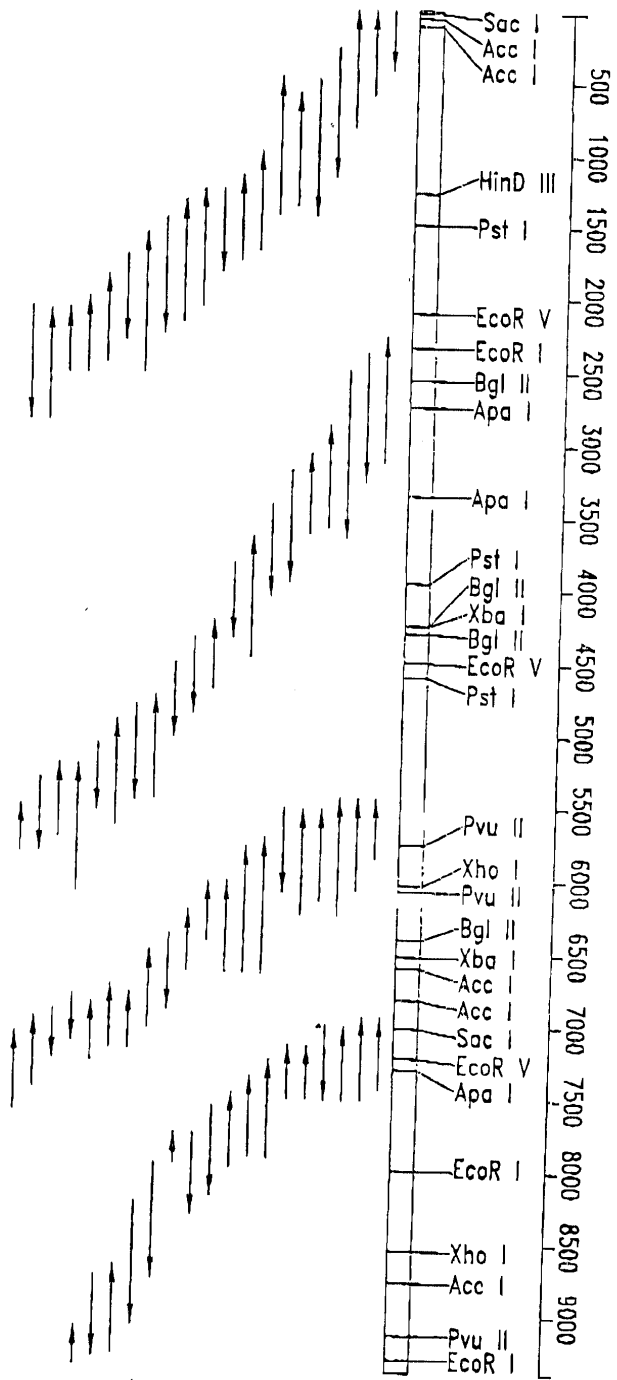


계놈 클론 지도



도면4

도면5a



도면5b



도면6

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B18Ag1의
뉴클레오타이드 서열

TTA GAG ACC CAA TTG GGA CCT AAT TGG GAC CCA AAT TTC TCA AGT GGA	48
Leu Glu Thr Gln Leu Gly Pro Asn Trp Asp Pro Asn Phe Ser Ser Gly	
1 5 10 15	
GGG AGA ACT TTT GAC GAT TTC CAC CGG TAT CTC CTC GTG GGT ATT CAG	96
Gly Arg Thr Phe Asp Asp Phe His Arg Tyr Leu Leu Val Gly Ile Gln	
20 25 30	
GGA GCT GCC CAG AAA CCT ATA AAC TTG TCT AAG GCG ATT GAA GTC GTC	144
Gly Ala Ala Gln Lys Pro Ile Asn Leu Ser Lys Ala Ile Glu Val Val	
35 40 45	
CAG GGG CAT GAT GAG TCA CCA GGA GTG TTT TTA GAG CAC CTC CAG GAG	192
Gln Gly His Asp Glu Ser Pro Gly Val Phe Leu Glu His Leu Gln Glu	
50 55 60	
GCT TAT CGG ATT TAC ACC CCT TTT GAC CTG GCA GCC CCC GAA AAT AGC	240
Ala Tyr Arg Ile Tyr Thr Pro Phe Asp Leu Ala Ala Pro Glu Asn Ser	
65 70 75 80	
CAT GCT CTT AAT TTG GCA TTT GTG GCT CAG GCA GCC CCA GAT AGT AAA	288
His Ala Leu Asn Leu Ala Phe Val Ala Gln Ala Ala Pro Asp Ser Lys	
85 90 95	
AGG AAA CTC CAA AAA CTA GAG GGA TTT TGC TGG AAT GAA TAC CAG TCA	336
Arg Lys Leu Gln Lys Leu Glu Gly Phe Cys Trp Asn Glu Tyr Gln Ser	
100 105 110	
GCT TTT AGA GAT AGC CTA AAA GGT TTT	363
Ala Phe Arg Asp Ser Leu Lys Gly Phe	
115 120	

도면7

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B17Ag1의
뉴클레오타이드 서열

GC TGGGCACAGT GGCTCATACC TGTAACTCTG ACCGTTTCAG AGGCTCAGGT	60
CG CTTGAGCCCA AGATTTCAAG ACTAGTCTGG GTAACATAGT GAGACCCTAT	120
AA AAATAAAAAA ATGAGCCTGG TGTAGTGGCA CACACCAGCT GAGGAGGGAG	180
CT AGGAGA	196

도면8

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B17Ag2의
뉴클레오타이드 서열

GC TTGGGGGCTC TGACTAGAAA TTCAAGGAAC CTGGGATTCA AGTCCAAC TG	60
AC TTACACTGTG GNCTCCAATA AACTGCTTCT TTCCTATTCC CTCTCTATTA	120
AA GGAAAACGAT GTCTGTGTAT AGCCAAGTCA GNTATCCTAA AAGGAGATAC	180
AT TAAATATCAG AATGTAAAAC CTGGGAACCA GGTTCACAGC CTGGGATTAA	240
CA AGAAGACTGA ACAGTACTAC TGTGAAAAGC CCGAAGNGGC AATATGTTCA	300
TT GAAGGATGGC TGGGAGAATG AATGCTCTGT CCCCAGTCC CAAGCTCACT	360
CT CCTTTATAGC CTAGGAGA	388

도면9

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B13Ag2a의
뉴클레오타이드 서열

GC CTATAATCAT GTTTCTCATT ATTTTCACAT TTTATTAACC AATTTCTGTT	60
AA AATATGAGGG AAATATATGA AACAGGGAGG CAATGTTTCCAG ATAATTGATC	120
TG ATTTCTACAT CAGATGCTCT TTCCTTTCCT GTTTATTTCC TTTTATTTTC	180
GG TCGAATGTAA TAGCTTTGTT TCAAGAGAGA GTTTTGGCAG TTTCTGTAGC	240
CT GCTCATGTCT CCAGGCATCT ATTTGCACTT TAGGAGGTGT CGTGGGAGAC	300
CT ATTTTTTCCA TATTTGGGCA ACTACTA	337

도면 10

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B13Ag1b의
뉴클레오타이드 서열

GC CATACAGTGC CTTTCCATTT ATTTAACCCC CACCTGAACG GCATAAACTG	60
GC TGGTGTTTTT TACTGTAAAC AATAAGGAGA CTTTGCTCTT CATTTAAACC	120
AT TTCATATTTT ACGCTCGAGG GTTTTTACCG GTTCCTTTTT ACACTCCTTA	180
TT TAAGTCGTTT GGAACAAGAT ATTTTTTCTT TCCTGGCAGC TTTAACATT	240
TT TGTGTCTGGG GGACTGCTGG TCACTGTTTC TCACAGTTGC AAATCAAGGC	300
CC AAGAAAAAAA AATTTTTTTG TTTTATTTGA AACTGGACCG GATAAACGGT	360
CG GCTGCTGTAT ATAGTTTTAA ATGGTTTATT GCACCTCCTT AAGTTGCACT	420
GG GGGGNTTTTG NATAGAAAGT NTTANTCAC ANAGTCACAG GGACTTTTNT	480
NA CTGAGCTAAA AAGGGCTGNT TTTCGGGTGG GGGCAGATGA AGGCTCACAG	540
TC TCTTAGAGGG GGGAACNCT A	571

도면11

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B13Ag1a의
뉴클레오타이드 서열

TA ATAACTTAAA TATATTTTGA TCACCCACTG GGGTGATAAG ACAATAGATA	60
TT TCCAAAAGC ATAAAACCAA AGTATCATAC CAAACCAAAT TCATACTGCT	120
CC GCACTGAAAC TTCACCTTCT AACTGTCTAC CTAACCAAAT TCTACCCTTC	180
GG TGGGTGCTCA CTA CTCTCTTTT TTTTTTTTTT TTTNTTTTGG AGATGGAGTC	240
CA GCCCAGGGGT GGA GTACAAT GGCACAACCT CAGCTCACTG NAACCTCCGC	300
TT CATGAGATTC TCCTGNTTCA GCCTTCCCAG TAGCTGGGAC TACAGGTGTG	360
TG CCTGGNTAAT CTTTTTTNGT TTTNGGGTAG AGATGGGGGT TTTACATGTT	420
TG GTNTCGAACT CCTGACCTCA AGTGATCCAC CCACCTCAGG CTCCCAAAGT	480
TA CAGACATGAG CCACTGNGCC CAGNCCTGGT GCATGCTCAC TTCTCTAGGC	540
	548

도면 12

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B11Ag1의
뉴클레오타이드 서열

TG CACATGCAGA ATATTCTATC GGTACTTCAG CTATTACTCA TTTTGATGGC	60
AG CCTATCCTCA AGATGAGTAT TTAGAAAGAA TTGATTTAGC GATAGACCAA	120
GC ACTCTGACTA CACGAAATTG TTCAGATGTG ATGGATTTAT GACAGTTGAT	180
GA GATTATTAAG TGATTATTTT AAAGGGAATC CATTAAATCC AGAATATCTT	240
TC AAGATGATAT AGAAATAGAA CAGAAAGAGA CTACAAATGA AGATGTATCA	300
TA TTGAAGAGCC TATAGTAGAA AATGAATTAG CTGCATTTAT TAGCCTTACA	360
TT TTCCTGATGA ATCTTATATT CAGCCATCGA CATAGCATTG CCTGATGGGC	420
GA ATAATAGAAA CTGGGTGCGG GGCTATTGAT GAATTCATCC NCAGTAAATT	480
AC AAAATATAAC TCGATTGCAT TTGGATGATG GAATACTAAA TCTGGCAAAA	540
GG AGCTACTAGT AACCTCTCTT TTTGAGATGC AAAATTTTCT TTTAGGGTTT	600
CT ACTTTACGGA TATTGGAGCA TAACGGGA	638

도면 13

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B3CA3c의
뉴클레오타이드 서열

ACTGATGGAT GTCGCCGGAG GCGAGGGGCC TTATCTGATG CTCGGCTGCC TGTTCGTGAT	60
GTGCGCGGCG ATTGGGCTGT TTATCTCAAA CACCGCCACG GCGGTGCTGA TGGCGCCTAT	120
TGCCTTAGCG GCGGCGAAGT CAATGGGCGT CTCACCCTAT CCTTTTGCCA TGGTGGTGGC	180
GATGGCGGCT TCGGCGGCGT TTATGACCCC GGTCTCCTCG CCGGTTAACA CCCTGGTGCT	240
TGGCCCTGGC AAGTACTCAT TTAGCGATTT TGTCAAATA GCGGTG	286

도면14

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B9CG1의
뉴클레오타이드 서열

AG CAGCCCCTTC TTCTCAATTT CATCTGTCAC TACCCTGGTG TAGTATCTCA	60
CA TTTTATAGC CTCCTCCCTG GTCTGTCTTT TGATTTTCCT GCCTGTAATC	120
AC ATAACTGCAA GTAAACATTT CTAAGTGTG GTTATGCTCA TGCACTCCT	180
AA ATAGTTTCCA TTACCGTCTT AATAAAATTC GGATTTGTTC TTTNCTATTN	240
CA CCTATGACCG AA	262

도면15

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B9CG3의
뉴클레오타이드 서열

AG CAAAGCCAGT GGTTTGAGCT CTCTACTGTG TAAACTCCTA AACCAAGGCC	60
TA AATGGTGGCA GGATTTTAT TATAAACATG TACCCATGCA AATTCCTAT	120
GA TATATTCTTC TACATTTAAA CAATAAAAAT AATCTATTTT TAAAAGCCTA	180
AG TTAGGTAAGA GTGTTAATG AGAGGGTATA AGGTATAAAT CACCAGTCAA	240
TG CCTATGACCG A	261

도면16

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B2CA2의
뉴클레오타이드 서열

GG GCATGGACGC AGACGCCTGA CGTTTGGCTG AAAATCTTTC ATTGATTCGT	60
AT AGGAAAATTC CCÁAAGAGGG AATGTCCTGT TGCTCGCCAG TTTTNTGTT	120
GG ANAAGGCAAN GAGCTCTTCA GACTATTGGN ATTNTCGTTC GGTCTTCTGC	180
CG NCTTGCNANG ATCTTCAT	208

도면17

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B3CA1의
뉴클레오타이드 서열

GG GCATGGACGC AGACGCCTGA CGTTTGGCTG AAAATCTTTC ATTGATTCGT	60
AT AGGAAAATTC CCAAAGAGGG AATGTCCTGT TGCTCGCCAG TTTTNTGTT	120
GG ANAAGGCAAN GAGCTCTTCA GACTATTGGN ATTNTCGTTC GGTCTTCTGC	180
CG NCTTGCNANG ATCTTCAT	208

도면18

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B3CA2의
뉴클레오타이드 서열

GG GCATGGACGC AGACGCCTGA CGTTTGGCTG AAAATCTTTC ATTGATTCGT	60
AT AGGAAAATTC CCAAAGAGGG AATGTCCTGT TGCTCGCCAG TTTTNTGTT	120
GG ANAAGGCAAN GAGCTCTTCA GACTATTGGN ATTNTCGTTC GGTCTTCTGC	180
CG NCTTGCNANG ATCTTCAT	208

도면19

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B3CA3의
뉴클레오타이드 서열

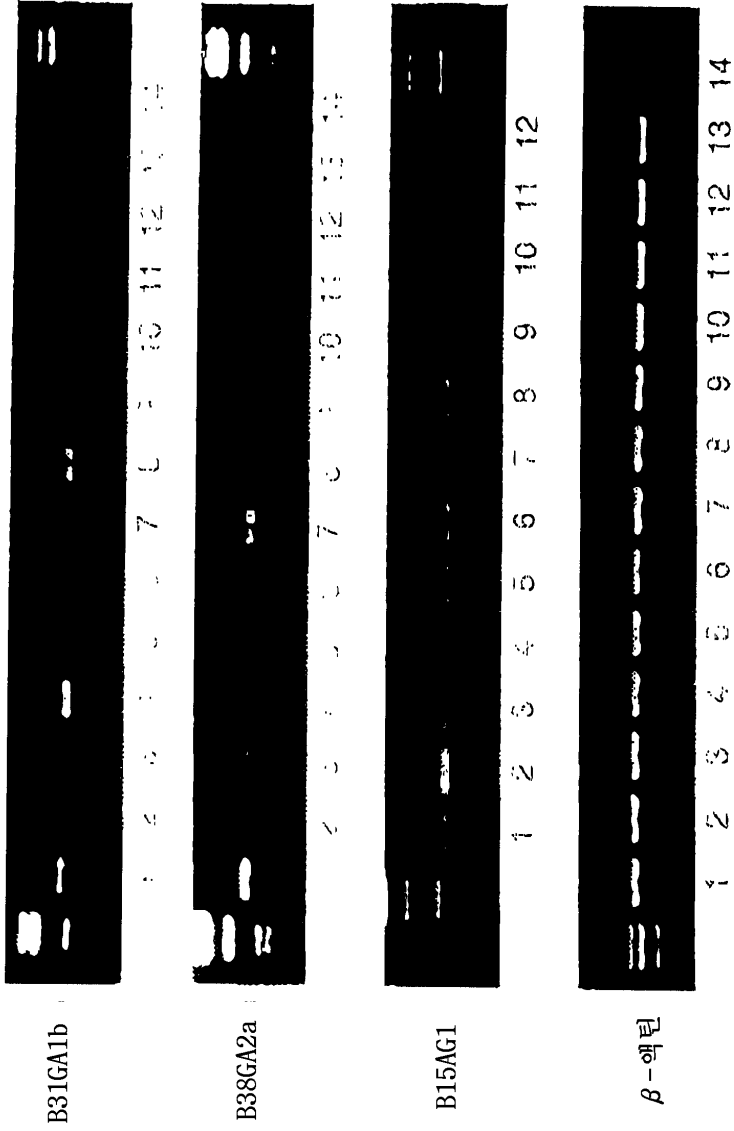
AG GGAGCAAGGA GAAGGCATGG AGAGGCTCAN GCTGGTCCTG GCCTACGACT	60
CT GTCGCCGGGG ATGGTGGAGA ACTGAAGCGG GACCTCCTCG AGGTCTCCG	120
TC NCCGTCCAGG AGGAGGGTCT TTCCGTGGTC TNGGAGGAGC GGGGGGAGAA	180
TC ATGGTCNACA TCCC	204

도면20

대표적인 유방암 특이적인 cDNA B4CA1의
뉴클레오타이드 서열

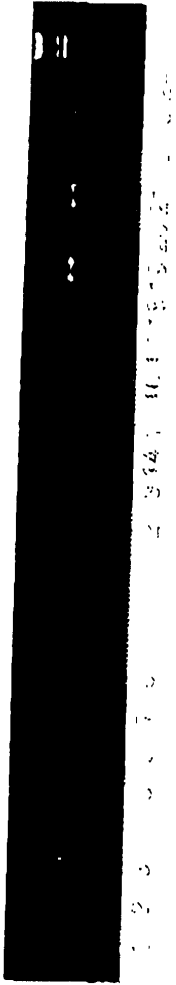
TC AGGAGCGGGT AGAGTGGCAC CATTGAGGGG ATATTCAAAA ATATTATTTT	60
TG ATAGTTGCTG AGTTTTTCTT TGACCCATGA GTTATATTGG AGTTTATTTT	120
CC AATCGCATGG ACATGTTAGA CTTATTTTCT GTTAATGATT NCTATTTTTA	180
GA TTTGAGAAAT TGGTTNTTAT TATATCAATT TTTGGTATTT GTTGAGTTTG	240
GC TTAGTATGTG ACCA	264

도면21a

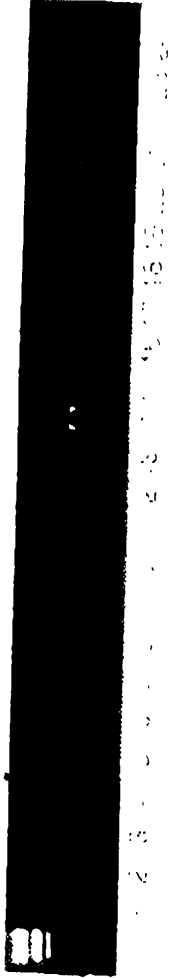


도면21b

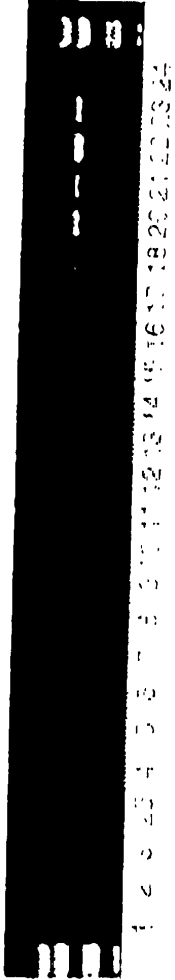
B31GA1b



B38GA2a



B15AG1



β-액틴

