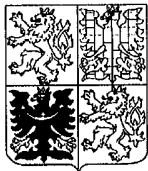


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.09.1999**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.09.1998**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/162622**  
(33) Země priority: **US**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.09.2001**  
(Věstník č. 9/2001)  
(86) PCT číslo: **PCT/US99/22616**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/18783**

(21) Číslo dokumentu:

**2001 - 1025**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 H 21/02**

**C 07 H 21/04**

(71) Přihlašovatel:  
WASHINGTON UNIVERSITY, St. Louis, MO, US;

(72) Původce:  
Watson Mark A., St. Louis, MO, US;  
Fleming Timothy P., St. Louis, MO, US;

(74) Zástupce:  
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,  
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob detekce přítomnosti buněk rakoviny prsu  
a rakoviny dělohy a detekční kit**

(57) Anotace:

Popisuje se izolovaná DNA sekvence a jí kódovaný protein mamaglobin specifický pro tkáň mléčné žlázy. Dále je popsán způsob detekce rakoviny prsu, založený na zvýšené expresi a sekreci mamaglobinu u buněk rakoviny prsu. Způsob detekuje a/nebo kvantifikuje přítomnost mamaglobinu nebo mRNA kódující mamaglobin. Dále je popsána imunoterapie založená na způsobu léčby rakoviny prsu u pacientů s nádorem exprimujícím mamaglobin. Způsob zahrnuje použití mamaglobinu jako antigenu pro indukci humorální a/nebo buněčné imunitní reakce proti nádoru.

CZ 2001 - 1025 A3

## ZPŮSOB DETEKCE PŘÍTOMNOSTI BUNĚK RAKOVINY PRSU A RAKOVINY DĚLOHY A DETEKČNÍ KIT

### OBLAST TECHNIKY

Tato přihláška je pokračováním přihlášky US 08/933 149, podané 18. září 1997, která je pokračováním PCT/US96/08235, podané 31 května 1996 a pokračováním přihlášky US 08/455 896 podané 31 května 1995, nyní patentu US 5 668 267.

Tento vynález byl vypracován za podpory vlády ve formě Public Health Service Grants CA76227, CA76223-01 a CA68458. Vláda se podílí na tomto vynálezu několika právy. Navrhovaný vynález popisuje oblast patogeneze rakoviny prsu a konkrétně pak sekvence cDNA kódující protein specifický pro nádor prsu a jeho použití pro zjišťování a léčbu rakoviny prsu.

### DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Rakovina prsu je jedním z nejběžnějších a nejnebezpečnějších typů rakoviny. Ačkoliv včasná diagnóza a léčba může podstatně snížit úmrtnost způsobenou touto chorobou, pravděpodobnost pozitivního nálezu z mamografie je pouze asi 25 % (Hall et al., N Engl J Med 327:319-328, 1992). Je tedy žádoucí najít nový způsob detekce tohoto typu rakoviny, který bude schopen chorobu odhalit dříve než mamografie a nalézt genetický nebo biochemický znak, který by tímto způsobem zajistil kompletní testování a který by překročil prediktivní schopnosti mamografie (Hayes, Hematol Oncol Clin N Am 8:485, 1994).

Vznik rakoviny prsu je spojen s celou řadou genetických změn (viz přehledný článek Porter-Jordan, Hematol Oncol Clin N Am 8:73, 1994). Tyto změny zahrnují hrubé chromozomální alterace a ztrátu genetických znaků (Devilee et al., Biochim Biophys Acta, 1198:113, 1194, Callahan et al., J Cell Biochem Suppl, 17:167, 1993). Progrese nádoru prsu je také spojena s kvalitativními a kvantitativními změnami v expresi dříve identifikovatelných genů kódujících růstové faktory a jejich receptory (Zajchowski et al., Cancer Res 48:7041, 1988), strukturní proteiny (Trask et al., Proc Natl Acad Sci 87:2319, 1990), proteinů plnicích funkci sekundárních signálních proteinů (Ohuchi et al., Cancer Res 26:2511, 1986), a transkripčních faktorů (Harris, Adv Cancer Res 59:69, 1992). Tyto změny v expresi genů mohou být potenciálně zodpovědné za vznik znaků odpovídajících nádoru prsu, ačkoliv přesná úloha těchto genetických změn v patogenezi rakoviny prsu u vzorků získaných biopsiemi z pacientů není dobře známý. Navíc pro zjištění genetických nebo biochemických znaků rozlišujících rakovinu prsu pro detekci v raném stádiu choroby je také žádoucí znát nádorové znaky, které by napovídaly prognózu



vývoje choroby z důvodů volby vhodné terapie, popř. Využití směřování léčiv. Ačkoliv byla identifikována celá řada znaků, žádný z nich není dostatečně citlivý nebo nádorově specifický, aby byl použitelný pro diagnostiku nebo testování celé populace. Z toho vyplývá, že potřeba identifikace nádorového znaku spojeného s rakovinou prsu, jakým může být například gen a s ním související exprimovaný protein, který by mohl být využitý jako specifický a selektivní znak pro rozeznání vzniku patologického nádoru prsu u pacientů a který by mohl být využitelný pro nádorově specifickou imunoterapii, stále trvá.

Za využití modifikace „Differential display“ PCR (polymerázová řetězcová reakce) byly izolovány odlišně exprimované sekvenční segmenty z nádorových buněk rakoviny prsu a z nich bylo izolováno několik sekvenčních fragmentů, které byly jedinečně exprimovány pouze v neoplastických nádorových buňkách a ne v normální tkáni (Watson and Fleming, Cancer Res 54:5498-4602, 1994). Objev jednoho z těchto sekvenčních segmentů označeného jako DEST002 vedl k objevu a izolaci nové molekuly cDNA a jí kódovaného proteinu, který byl označen jako mamaglobin. Jak molekula cDNA, tak protein jsou zcela nové.

#### PODSTATA VYNÁLEZU

Obecně navrhovaný vynález je zaměřen na identifikaci nových genů, které jsou exprimovány ve zvýšené míře v buňkách rakoviny prsu a na přípravu molekul cDNA z mRNA kódující tyto geny. Z toho vyplývá, že aplikant uspěl při objevování nových molekul cDNA kódujících sekretovaný protein specifický pro rakovinu prsu, mamaglobin. Molekula cDNA je v přečištěné a izolované formě a obsahuje nukleotidovou sekvenci označenou jako sekvence č. 15, která kóduje protein mamaglobin, který v přečištěné a izolované formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvence č. 2.

Ve studii s malým počtem pacientů popisovanou v patentu US 5668267 byla mRNA ve zvýšené míře exprimována v 27 % nádorů prsu ve stádiu I. Navrhovaný vynález popisuje větší spektrum primárních nádorů prsu v různých stádiích a histologických typech, u kterých byla exprese mamaglobinu zjištěna v 80 % testovaných nádorů. Tato data naznačují, že poruchy regulace genu kódujícího mamaglobin jsou patrné a časté již v časných stádiích vzniku rakoviny prsu. Objev mamaglobinu a jeho cDNA tedy dává základ pro vývoj nové techniky a prostředků pro léčbu a detekci vzniku rakoviny prsu u lidí a jiných savců.

Navrhovaný vynález je tedy zaměřen na nové techniky detekce přítomnosti neoplasticky transformovaných nádorových buněk ve vzorku. V jedné variantě navrhovaného vynálezu byla pro detekci mRNA kódující mamaglobin ve vzorku použita polynukleotidová sonda. Tento



způsob zahrnuje kroky: (a) smíchání mRNA izolované ze vzorku s polynukleotidovou sondou specificky hybridizující s mRNA kódující mamaglobin, která obsahuje sekvenci č. 15, nebo její alelickou variantu a (b) detekci hybridizovaného komplexu mRNA ze vzorku se sondou.

Další variantou navrhovaného vynálezu je detekční souprava pro detekci přítomnosti neoplastických buněk rakoviny prsu ve vzorku pomocí hybridizace. Tato souprava obsahuje polynukleotidovou sondu specificky hybridizující s mRNA kódující mamaglobin, která obsahuje sekvenci č. 15, nebo její alelickou variantou, distribuovanou v jednotkovém balení.

Další variantou navrhovaného vynálezu je stanovování exprese mamaglobinu ve vzorku pomocí stanovení přítomnosti v cDNA, která je získána reverzní transkripcí mRNA kódující mamaglobin ze vzorku. Tato technika zahrnuje kroky: (a) produkce cDNA kódující mamaglobin z mRNA za použití techniky reverzní transkripce ve vzorku získaném z pacienta, (b) příprava dvou primerů pro polymerázovou řetězcovou reakci, které odpovídají oligomerům přilehlým nebo ležícím uvnitř cDNA kódující mamaglobin a (c) amplifikace cDNA kódující mamaglobin za použití polymerázové řetězcové reakce. Nejvhodnější primery by měly mít nukleotidovou sekvence popsanou jako sekvence č. 4 a sekvence č. 16.

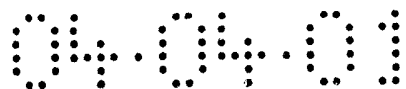
Další variantou navrhovaného vynálezu je popsat detekční sadu na přítomnost nádorových buněk ve vzorku pomocí polymerázové řetězcové reakce. Tato sada obsahuje dva primery pro polymerázovou řetězcovou reakci, které odpovídají oligomerům přilehlým nebo ležícím uvnitř cDNA kódující mamaglobin, zabalené v jednotkovém balení. Nejvhodnější primery by měly mít nukleotidovou sekvence popsanou jako sekvence č. 4 a sekvence č. 16.

Další varianta navrhovaného vynálezu popisuje detekci přítomnosti proteinů mamaglobinu, tvořenému nádorovými buňkami ve vzorku za použití specifických protilátek. Tyto specifické protilátky mohou být jak polyklonální, tak monoklonální.

Navrhovaný vynález také popisuje nové prostředky a způsoby léčby rakoviny prsu za použití antigenů mamaglobinu schopného indukovat protilátkami mediovanou a/nebo buněčnou, tzn. pomocí aktivovaných T buněk, imunitní reakci proti mamaglobinu vytvářenému nádorovými buňkami.

Další varianta navrhovaného vynálezu popisuje B buněčný antigen mamaglobin schopný aktivace B buněk specifických proti mamaglobinu. Tento B buněčný antigen obsahuje mamaglobin specifický B buněčný epitop a  $T_h$  epitop nebo determinantu rozeznávanou pomocnými T buňkami.

V další variantě navrhovaného vynálezu je antigen mamaglobinu antigenem  $T_c$  lymfocytů, a zahrnuje epitop rozeznávaný  $T_c$  buňkami a vazebnou pozici pro molekulu MHC třídy I.



V jiné variantě navrhovaného vynálezu, prostředek obsahuje jak B buněčné, tak T<sub>c</sub> buněčné antigeny.

Způsob léčby pacientů trpících nádorem exprimujícím mamaglobin, může zahrnovat adoptivní imunoterapii, kterou představuje stimulace mamaglobin specifických lymfocytů izolovaných z pacienta, ex vivo antigenem mamaglobinu a následné navrácení aktivovaných lymfocytů pacientovi a in vivo stimulace imunitní reakce proti mamaglobinu, což představuje podání vakcíny obsahující antigen mamaglobinu pacientovi.

Mezi celou řadou poznatků, které přináší navrhovaný vynález, je třeba zdůraznit, popis nukleotidové a následně aminokyselinové sekvence, které mohou být využity jako znaky pro rakovinu prsu, popis techniky včasné detekce přítomnosti neoplastických buněk, popis techniky doplňující a svou citlivostí přesahující mamografii, popis techniky umožňující předpovídat vývoj choroby, popis znaků použitelných jako cílové struktury při směrované terapii a popis prostředků stimulujících jak buněčnou, tak protilátkovou imunitní reakci proti nádoru.

#### PŘEHLED OBRÁZKŮ NA VÝKRESECH

Obr. 1 popisuje strategii použitou pro izolaci cDNA kódující mamaglobin v plné délce, která zahrnuje její „Rapid Amplification cDNA Ends“ (RACE) pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) a její následné vklonování do vektorů pGEM7Z a pCEV27

Obr. 2 ukazuje sekvenci lidské cDNA (sekvence č. 1) (nukleotidy jsou číslovány shora) a aminokyselinovou sekvenci kódovaného proteinu specifického pro nádor prsu, mamaglobinu (sekvence č. 2) (aminokyseliny jsou číslovány zespoda), plná čára označuje 403 bp fragment (sekvence č. 5) izolovaný pomocí RACE PCR techniky a prázdná čára označuje 206 bp DEST002 sekvenci (sekvence č. 6).

Obr. 3 ukazuje aminokyselinovou sekvenci proteinu specifického pro nádor prsu, mamaglobinu (hMAM) (sekvence č. 2) ve srovnání s krysím prostatickým steroidem vázajícím podjednotku C3 (rPSC3) (sekvence č. 7) a lidským 10 kD proteinem z klara buněk (hCC10) (sekvence č. 8), kde jsou identická místa označena tučným písmem a dvojitou čarou a strukturně podobné aminokyseliny jsou spojeny jednoduchou čarou.

Obr. 4 zobrazuje (obr. 4A) analýzu pomocí Northern blotu, hybridizaci lidské cDNA sekvence, kódující protein specifický pro nádor prsu, mamaglobin (hMAM), s mRNA z tkáně získané z



nádoru prsu, z normální zdravé tkáně z prsu a z jiné tkáně dospělého člověka (obr. 4B) pomocí RT/PCR amplifikovaných vzorků z nádoru prsu, z normální zdravé tkáně prsu a z jiných tkání dospělého člověka.

Obr. 5 ukazuje překlad sekvence cDNA specifické pro rakovinu prsu pomocí techniky v in vitro králičím retikulocytovém lyzátu.

Obr. 6. zobrazuje Northern blot, po hybridizaci cDNA kódující protein specifický pro nádor prsu, mamaglobin s mRNA z nádoru 2410, nádorů u tří z osmi pacientů (zvýraznění) a v menší míře v normální tkáni prsu (kurzívou) a srovnání dvou případů (čtyři dráhy na pravé straně) srovnání exprese mRNA pro mamaglobin v nádorové tkáni a v normální tkáni stejného pacienta.

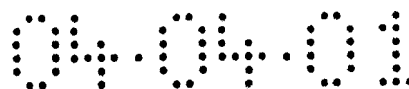
Obr. 7 ukazuje Western blot pomocí polyklonální protilátky proti C-konci mamaglobinu (sekvence č. 14) v médiu (S) a buněčném lyzátu (C) u linie MDA-MB-415 buněk nádoru prsu v přítomnosti (+) nebo nepřítomnosti (-) imunizačního peptidu, a vykazuje detekci prekursoru a sekretorické formy mamaglobinu jak v médiu tak v buněčném lyzátu.

Obr. 8 ukazuje Western blot pomocí polyklonální protilátky proti C-konci mamaglobinu (sekvence č. 14) v médiu (S) a buněčném lyzátu (C) u linie MDA-MB-415 buněk nádoru prsu v přítomnosti (+) nebo nepřítomnosti (-) tunicamycinu, který blokuje glykosilaci, a vykazuje nedetekovatelnost proteinu mamaglobinu v lyzátu nebo médiu v případě, že je blokována N glykosilace.

Obr. 9 ukazuje detekci prekursoru mamaglobinu pomocí Western blotu v médiu a buněčném lyzátu u lidských buněk z nádoru prsu pomocí polyklonální protilátky proti mamaglobinu a kozí anti-králičí protilátky vizualizované pomocí enzymatické chemiluminiscence.

Obr. 10 ukazuje Western blot pomocí polyklonální protilátky proti mamaglobinu v kapalných sekretech z lidského prsu, během těhotenství a po porodu, který dokazuje sekretovaný mamaglobin v proliferujících žlázách prsu.

Obr. 11A ukazuje v barvě parafinem fixované řezy nádorem prsu z pacienta, imunohistochemicky značené pomocí anti-mamaglobin polyklonální protilátky a kozí anti-králičí protilátky



konjugované s křenovou peroxidázou a DAB jako substrátem , což způsobuje hnědé zbarvení buněk exprimujících mamaglobin.

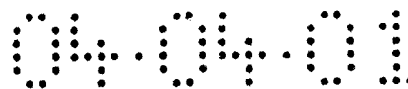
Obr 11B ukazuje černobíle parafinem fixované řezy nádorem prsu z pacienta, imunohistochemicky značené pomocí anti-mamaglobin polyklonální protilátky a kozí anti-králičí protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a DAB jako substrátem , což způsobuje hnědé zbarvení buněk exprimujících mamaglobin.

Obr 12 ukazuje imunoreaktivitu s mamaglobinem v tkáňových řezech na stejných vzorcích (obr. 12A a 12B) z duktálního karcinomu in situ (DCIS), (obr. 12C a 12D) z dobře diferenciovaného duktálního karcinomu, a (obr. 12E a 12F) z málo diferenciovaného duktálního karcinomu, které byly imunohistochemicky značené antisérem proti mamaglobinu (obr. 12A, 12C a 12E), nebo předem imunizovaným antisérem (obr. 12B, 12D a 12F).

Obr. 13 ukazuje fotografii Northern blotu RNA ze vzorků odebraných z lymfatických uzlin obsahujících histologicky potvrzené metastázy z primárních nádorů prsu (řádky 1 až 20, 27), z plochých nádorových buněk z endometriálních nádorů na hlavě a krku (řádek 22), adenokarcinomu tlustého střeva (řádka 25), rakoviny žlučníku (řádka 26) a adenokarcinomu plic (řádka 28) a jako negativní kontrola biopsie z lymfatických uzlin zdravých pacientů (řádky 29-33) a jako pozitivní kontrola vzorek z normální tkáně prsu (řádek 34), které byly hybridizovány s cDNA mamaglobinu (vrchní panel) nebo cDNA kódující keratin (spodní panel).

Obr. 14 ukazuje fotografii Southern blotu produktů RT-PCR z RNA pacientů s metastatickou rakovinou prsu (CA) nebo normálních dárců (NL) získaná z periferních kmenových buněk značením pomocí značky pro mamaglobin cDNA.

Jeden aspekt navrhovaného vynálezu je založen na identifikaci a sekvenování cDNA označené jako sekvence č. 1, která kóduje sekretovaný protein specifický pro nádor prsu, mamaglobin, označený jako sekvence č. 2 (obr. 2). Jak je popsáno dále, celá délka cDNA pro mamaglobin byla izolována z mRNA z nádorových buněk, která byla pomocí reversní transkripce a amplifikace za použití PCR následně vklonována do expresních vektorů. Dále byl identifikován a charakterizován protein, mamaglobin, kódovaný touto cDNA.

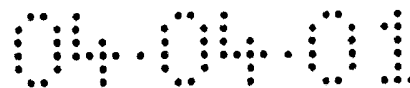


Za použití anonymního sekvenčního tagu, dříve označeného jako DEST002, bylo prokázáno, že odpovídající genový produkt, který byl do té doby neznámý, ale zde je označován jako mamaglobin, je ve značné míře exprimovaný nádorovou linií z rakoviny prsu MDA-MB-415. Pro izolování plné délky cDNA kódující mamaglobin, byla mRNA nejprve pomocí reversní transkripce přepsána na DNA a poté klonována pomocí RACE PCR (Edwards et al. *Nucleic Acids Research* 19:5227-32, 1991). Tato technika je založena na strategii ligace jednořetězcového oligodeoxyribonukleotidu a 3' konce jednořetězcové DNA. Technika pomocí níž byla izolovaná cDNA pro mamaglobin, je schématicky popsána na obr. 1.

Plná délka 503 bp dlouhé sekvence cDNA (sekvence č. 1) byla odvozena od sekvence získané z 403 bp fragmentu (sekvence č. 5) (obr. 2) izolovaného pomocí této techniky, a zároveň od sekvence dříve získané z odpovídajícího DEST fragmentu (DEST002, sekvence č. 6) (obr. 2) v našich dřívějších studiích (Watson a Fleming, viz výše) Uvnitř 503 bp sekvence cDNA je 279 bp dlouhý otevřený čtecí rámec (sekvence č. 15) kódující polypeptid o 93 aminokyselinách (sekvence č. 2) (obr. 2) o předpokládané molekulové hmotnosti 10,5 kD. Počáteční methionin tohoto otevřeného čtecího rámce je uvnitř téměř perfektní Kozakovy sekvence (Kozak, *Cell* 22:7-8, 1980) 60 bp proti směru od této sekvence není žádný další methionin, v tomto čtecím rámci, nebo translační konec. Na 3' konci nepřekládaná sekvence cDNA zabírá 163 bp a obsahuje polyadenylační signál, AATAAA, 12 bp proti směru od primovacího místa pro původní DEST002 sekvenci. Tato data naznačují, že byla izolována cDNA kódující mamaglobin o plné délce. Prvních 19 jednotek kódovaného polypeptidu, naznačuje hydrofóbní peptidovou signální sekvenci a jednotky 53 až 55 a 68 až 70 jsou N-glykosylační místa, což dokazuje, že mamaglobin je sekretovaný glykoprotein.

Hledání sekvence DNA podobné sekvenci získané z cDNA pro mamaglobin, proběhlo v Genbank, pomocí BLAST algoritmu (Benson et al., *Nucl Acid Res* 21:2963-2965, 1993, Altschul et al., *J Mol Biol* 215:403-410, 1990) a nebyly identifikovány žádné známé sekvenční homologie. Z toho vyplývá, že mamaglobin kódující cDNA je zcela nová, neznámá sekvence.

Hledání jiných polypeptidů se sekvencemi podobnými mamaglobinu, prozradilo sekvenční homologii, mezi mamaglobinem a jinými polypeptidy. Mamaglobin vykazuje 42 % aminokyselinovou identitu (58 % včetně konzervativních substitucí) s podjednotkou C3 krysího prostatického proteinu vázajícího steroidy (prostatein) (rPSC3) (obr 3) (sekvence č. 7). Prostatein je hlavní sekretovaný protein z krysí ventrální prostatické žlázy, tvořící tetramerní protein složený z dvou různých dimerních podjednotek, C3/C1 a C3/C2 (Parker et al., *Ann NY Acad Sci* 438:115-124, Parker et al., *J Steroid Biochem* 20:67-71, 1984). Geny C1, C2 a C3 kódují

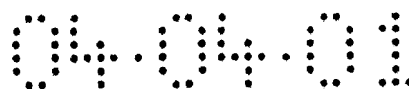


všechny přibližně 6 kD sekretorický protein a je pravděpodobné, že vznikly duplikací genu, neboť C1 a C2 vykazují značnou vzájemnou homologii, zatímco gen pro C3 je podobný méně. Stejně tak, mamaglobin nevykazuje žádnou sekvenční homologii s proteiny C1 a C2.

Jak je uvedeno výše, prostatein je hlavní sekretovaný protein z krysí ventrální prostatické žlázy a jeho exprese je regulována androgenními steroidy C2 (Parker et al., *Ann NY Acad Sci* 438:115-124, Parker et al., *J Steroid Biochem* 20:67-71, 1984). Další protein je lidský estramustin vázající protein (hEMBP) o kterém je známé, že je exprimován v lidské prostatické žláze, u pacientů trpících rakovinou prsu a při maligních melanomech (Bjork et al., *Cancer Res* 42:1935-1942, 1982, Bjork et al., *Anticancer Res* 11:1173-82, 1991). Lidský estramustin vázající protein (hEMBP) je imunohistochemicky podobný krysímu estramustin vazebnému proteinu, o kterém se věří, že je identický s krysím proteinem vázajícím steroid. Jak je uvedeno výše, aminokyselinová sekvence mamaglobinu vykazuje 42 % aminokyselinovou identitu a 58 % homologii pokud se započtou konzervativní substituce s C3 podjednotkou prostateinu. Je tedy možné, že mamaglobin je nějakým způsobem příbuzný s hEMBP. Ačkoliv jak prostatein tak hEMBP jsou detekovatelné v prostatických žlázách, mRNA kódující mamaglobin v nich není přítomná. To znamená, že mamaglobin není ani stejný protein, ani podjednotka hEMBP a navíc sekvence hEMBP nebyla dosud stanovena a tedy není známé, zda existuje nějaká podobnost mezi mamaglobinem a podjednotkou nebo fragmentem hEMBP.

Ačkoliv některé nové publikace ukazují že rPSC3 promotor fúzovaný s SV40 T antigenem indukují jak nádory prsu tak prostaty u transgenních myší (Maroulakou et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11236-11240, 1994, Sandmoller et al *Oncogene* 9:2805-2815, 1994) a skutečná biologická funkce tohoto proteinu je neznámá. Navzdory hypotéze o příbuznosti prostatického proteinu vázajícího steroidy s lidským EMPB, nebyl identifikován lidský polypeptid nebo gen odpovídající rPSC3. Tím pádem mamaglobin a cDNA kódující mamaglobin představují nové sekvence, dříve neznámé.

Při manuální porovnání dalších sekvencí s menší podobností podle výpočtu BLAST pro mamaglobin i rPSC3 protein, byly identifikovány další homologie s lidským 10 kD proteinem z klara buňek (hCC10) (sekvence č. 8) (Peri et al., *J Clin Invest* 92:2099-2109, 1993) (obr.3) a navíc s králíčím a myším uteroglobinem (Miele et al., *Endocrine Rev* 8:474-90, 1987, Cato a Beato, *Anticancer Res* 5:65-72, 1985, Miele et al., *J Endocrinol Invest* 17:679-692, 1994). Tyto homologie, v závislosti na druhu, měly asi 26 % identity, nebo respektive 40 %, pokud byly započteny konzervativní substituce. Konkrétně, počet aminokyselin byl zcela identický u všech proteinů, včetně Cys-3 a Cys-69, které hrají klíčovou roli při tvorbě disulfidických vazeb mezi



podjednotkami uteroglobinu (viz dále). Tyto homologie naznačují, že mamaglobin je nový člen malé rodiny proteinů, sekretovaných epiteliálními buňkami (Miele et al., 1994, viz výše).

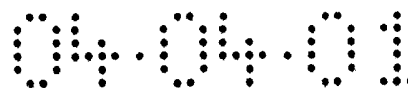
Gen hCC10 je lidským homologem králičího a myšího uteroglobinu (Peri et al., J Clin Invest 92:2099-2109, 1993). Uteroglobin byl původně charakterizován jako sekretovaný protein v děloze králíka, později byl však nalezen i v jiných epiteliálních orgánech, jako jsou plíce, mléčné žlázy a prostata. Narozdíl od krysího prostateinu, uteroglobin je homodimerní protein spojený dvěma disulfidickými vazbami na konzervativních pozicích Cys-2 a Cys 69 (Miele et al., 1994, viz výše). Ačkoliv transkripce genu pro uteroglobin, je regulována steroidními hormony, schopnost proteinu vázat progesteron nebo jiné steroidní hormony je kontroverzní skutečná biologická funkce tohoto proteinu je rovněž neznámá (Miele et al., 1994, viz výše).

Expres mamaglobinu je omezena na mléčnou žlázu. To je opakem pozorování, že rPSC3 je exprimován u potkanů ve ventrální prostatě (Parker et al., Ann NY Acad Sci 438:115-1124, 1984) a hCC10/uteroglobin je exprimován v řadě tkání, jako jsou plíce, pochva, prostata a mléčná žláza (Miele et al., 1987, viz výše, Cat and Beato, viz výše, Miele et al., 1994, viz výše). Díky sekvenční homologii mezi mamaglobinem a těmito proteiny, bylo stanoveno rozmístění tkáňově specifické exprese.

500bp dlouhé molekuly mRNA kódující mamaglobin byly snadno detekovatelné v nádorovém vzorku 2410 (tkáň ze které byl izolován původní sekvenční fragment) a v daleko nižší míře v normální tkáni z prsu (obr. 4A). Molekuly mRNA kódující mamaglobin nebyly detekovány v epiteliální nádorové linii z nádoru prsu B5-589. Expres mamaglobinu byla také nedetekovatelná v lidské děloze a plicích, dvou místech kde je uteroglobin exprimován.

Amplifikace za použití RT/PCR umožnila detekci mRNA kódující mamaglobin jak v normální, tak v nádorové tkáni 2410, ale ne v dalších 15 sledovaných tkáních, včetně tkání normálně exprimujících rPSC3 a uteroglobin (plíce, děloha, prostata), na hormony reagující a steroidogenní tkáně (vaječníky, varlata, placenta) a další sekretorní epitheliální orgány (tlusté střevo) (obr 4B). Z toho vyplývá, že expres mRNA kódující mamaglobin je specifické pro tkáň mléčné žlázy.

Pro jednoznačný důkaz specifity exprese mamaglobinu v tkáni prsu, byla jako sonda použita cDNA kódující mamaglobin v plné délce pro detekci mamaglobin kódující mRNA v širokém panelu molekul mRNA obsahujících polyA z populací dospělých a fetálních tkání lidských tkání jak je popsáno dále v příkladu 2A. Molekuly mRNA kódující mamaglobin nebylo možné detekovat i v jiných příbuzných tkáních apokrinních žláz, jako jsou slinné žlázy a rovněž byly nedetekovatelné v periferních leukocytech, lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Kromě



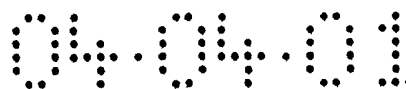
mléčných žláz, mRNA kódující mamaglobin nebyla detekována v žádných jiných tkáních z 43 tkání z dospělých jedinců nebo 7 fetálních tkáních, které byly testovány. To dokazuje, že exprese genu pro mamaglobin je velmi specifickým znakem pro rakovinu prsu.

Z poznatků této studie vyplývá, že mamaglobin je v zásadě protein specifický pro mléčnou žlázu. Další dva geny, o kterých je známo že jsou ve zvýšené míře exprimovány při rakovině prsu, jsou erb-B a cyklin D (Jardines et al., Pathobiology 61:268-282, 1994, Keyomars a Pardee, Proc Natl Acad Sci US 90:1112-1116, 1993). Narozdíl od zvýšené exprese proteinů erb-B a cyklinu D, zvýšená exprese mamaglobinu může konkrétněji odrážet změny v epiteliálních buňkách mléčné žlázy, spíše než zvýšený růst a zrychlenou proliferativní aktivitu. Z toho je zřejmé, že poruchy v regulaci exprese genu pro mamaglobin je daleko specifitějším faktorem pro terapeutickou využitelnost a klinické potlačení nádoru.

Jak je uvedeno v patentu US 5 668 267, zvýšená exprese mRNA kódující mamaglobin byla detekována hybridizací při Northern blotu u nádorového vzorku 2410, stejně jako u 4 z 15 (27 %) nádorů prsu v prvním stádiu o různých histologických typech. Tato četnost odpovídá možnosti přítomnosti jiných genetických alterací, jako je erb\*-b amplifikace a mutace v p53 (Slamon et al., Sci 244:707-712, 1989, Thor et al, J Natl Cancer Inst 84:845-855, 1992). Navíc, jelikož jsme omezili svoje studie na nádory v prvním stádiu, je možné předpokládat, že zvýšení exprese mamaglobinu by mohlo být daleko častější genetickou poruchou pozorovanou u této skupiny nádorů (Alllerd et al., J Natl Cancer Inst 85:200-206, 1993). Tyto údaje naznačují, že zvýšení exprese mamaglobinu není jedinečné pro jeden nádor, ale je ve skutečnosti běžnou poruchou u primárních nádorů prsu. Navíc fakt, že všechny testované nádory byly v prvním stádiu naznačuje že tato porucha je poměrně časnou změnou u nádorových buněk rakoviny prsu.

Expres mamaglobinu není detekovatelná za normální situace v lymfatických uzlinách na úrovni citlivosti jednokrokové RT/PCR techniky. Přesto, jak je dokumentováno dále, mRNA pro mamaglobin byla detekována ve více než 40 % lymfatických uzlin a 60 % vzorků sebraných z periferní krve (PBSCs) od pacientů s metastazující formou rakoviny prsu. Tyto výsledky naznačují, že analýza transkriptů mamaglobinu v periferních lymfatických uzlinách a krevním řečišti, může být použitelná pro detekci metastáz při rakovině prsu, jak bylo dokumentováno pro jiné epitheliálně specifické geny (Schoenfeld et al., Cancer Res 54:2986-2990, 1994).

Pro důkaz, že cDNA kódující mamaglobin kóduje přepisovatelný protein, byla tato cDNA použita pro in vitro translační techniku. Obr. 5 ukazuje proteinový produkt z králičího retikulocytového lyzátu programovaného pomocí cDNA kódující mamaglobin. Za použití cDNA pro mamaglobin byla připraven přibližně 6 kD protein. Tato získaná molekula, je menší než byla



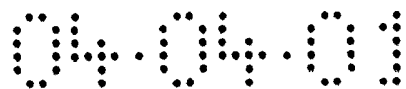
molekula předpokládaná z standartní translace otevřeného čtecího rámce, ale tento výsledek také je běžně pozorovaný s lidským a králičím uteroglobinem.

Pro stanovení míry exprese mamaglobinu při rakovině prsu, byly připraveny králičí polyklonální anti-mamaglobin protilátky proti peptidové sekvenci na C konci, a ty byly použity u 100 primárních nádorů prsu v různých stádiích a s různými histologickými typy pro stanovení exprese mamaglobinu pomocí imunohistochemické analýzy. Jak shrnuje tabulka 1. dále, více než 80 % těchto nádorů bylo silně imunopozitivních na mamaglobin a značení nezáviselo na stádiu nádoru. Tento výsledek naznačuje, že detekce mamaglobinu v klinických vzorcích může být použita jako citlivý a specifický znak pro rakovinu prsu.

Neboť aplikant věří, že mamaglobin je sekretovaný protein, jeho přítomnost je možno předpokládat i v séru pacientů u nichž nádor exprimuje tento protein. Pak by byl mamaglobin natolik klinicky využitelný jako antigen specifický pro prostatu (PSA) a jiné znaky pevných nádorů, pro léčbu pacientů s rakovinou prsu (Tumor markers in diagnostic pathology, Clin Lab Med 10:1-250, 1990).

Identifikace mamaglobinu jako znaku pro rakovinu prsu, přináší základ pro další aspekt navrhovaného vynálezu, který umožňuje detekci přítomnosti rakoviny prsu u pacientů. Termín detekce, jak je zde použit v kontextu detekce rakoviny prsu je zamýšlený aspekt stanovení přítomnosti nádorových buněk u pacientů, rozlišení rakoviny prsu od ostatních chorob, stanovení prognózy a pravděpodobného vývoje choroby a možnosti léčby, monitorování průběhu choroby, stanovení ideálního terapeutického režimu pro pacienta a směrovanou protinádorovou terapii.

Jeden ze způsobů detekce rakoviny prsu zahrnuje hybridizaci polynukleotidů s mRNA z buněk rakoviny prsu. Tento polynukleotid obsahuje sekvenci komplementární k sekvenci č. 15, nebo deriváty komplementární sekvence k sekvenci č. 15. Jak je použito zde, polynukleotidy jsou jak DNA tak RNA a tedy sekvence uvedená ve výpisu sekvencí jako DNA sekvence, zahrnuje také identickou RNA sekvenci, kde je thymin nahrazen uracilem. Deriváty nukleotidové sekvence mají dostatečnou sekvenční identitu se sekvencí od které jsou upraveny tak aby specificky hybridizovaly s mRNA pro mamaglobin izolovanou z buněk rakoviny prsu za stejných podmínek, jako sekvence od kterých jsou odvozené, které specificky hybridizují s mRNA pro mamaglobin z buněk rakoviny prsu. Upravené sekvence nemusí být nezbytně fyzicky modifikované, ale mohou být odvozeny tak, že zahrnují například chemicky syntetizované molekuly, replikovaná DNA, reverzní transkripty nebo transkripty. Nejlépe upravené sekvence jsou fragmenty komplementární sekvence k sekvenci č. 15 a sekvence identické



s komplementární alelickou variantou mamaglobin kódující sekvence uvedené jako sekvence č. 15.

Pro detekci přítomnosti mRNA kódující mamaglobin v detekčním systému pro rakovinu prsu je vzorek získáván z pacienta. Vzorkem může být tkáňová biopsie, vzorek krve, plasmy, séra a podobně. Vzorek je ošetřen tak aby byly získány v něm obsažené nukleové kyseliny. Je vhodné, aby výsledný vzorek byl dělen na gelové elektroforéze, nebo jiné separační technice dělící podle velikosti.

Detekce zahrnuje spojení nukleových kyselin a konkrétně pak mRNA ze vzorků s polynukleotidovou sondou do formy hybridizačního duplexu. Termín „sonda“ popisuje strukturu obsahující polynukleotid tvořící hybridní strukturu s cílovou sekvencí, díky komplementaritě sekvence sondy se sekvencí cílové oblasti.

Detekce vzniklého duplexu může být prováděna jakoukoli běžně používanou technikou. Nejobvyklejším způsobem je použití značené sondy. Jinou možností, je použití neznačené sondy, která může být detekována specifickou vazbou s ligandem který je značený, buď přímo nebo nepřímo. Vhodné značky a značící sondy a ligandy jsou dobře známé v současném stavu techniky. Jedná se o například, radioaktivní značky, které mohou být použity pomocí známých technik (např. přepis konců nebo kinázování), biotin, fluorescenční značky, chemiluminiscenční značky (např. dioxethany, konkrétně spouštěcí dioxethany), enzymy, protilátky a podobně.

Při hybridizaci s cDNA pro mamaglobin je třeba použít přísné hybridizační podmínky, aby bylo zabráněno falešným pozitivitám. Při použití próby obsahující sekvenci odvozenou od sekvence komplementární k sekvenci kódující mamaglobin, je možno použít méně přísných podmínek. Přísnost hybridizace je hodnocena podle celé řady faktorů během hybridizace a během promývání, včetně teploty, iontové síly, doby a koncentrace formamidu. Tyto faktory jsou popsány např. v Sambrook et al., (molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., 1989)

Pro zvýšení citlivosti detekce mRNA pro mamaglobin ve vzorku, mohou být použity techniky reverzní PCR pro amplifikaci cDNA přepsané z mRNA kódující mamaglobin. Techniky RT/PCR mohou být použity pro amplifikaci cDNA transkriptů z mRNA kódující mamaglobin. Techniky RT/PCR jsou velmi dobře známé v současném stavu techniky (např. viz Watso a Fleming, viz výše). Oligonukleotidy použitelné jako amplifikační primery obsahují sekvenci č. 3 a sekvenci č. 4. Je vhodné, aby přední primer pro amplifikaci mamaglobinu obsahoval sekvenci 5'- AGCACTGCTACGCAGGCTCT -3' (sekvence č. 16) a reverzní primer pro amplifikaci mamaglobinu by obsahoval 5'- ATAAGAAAGAGAAGGTGTGG -3' (sekvence č. 4)



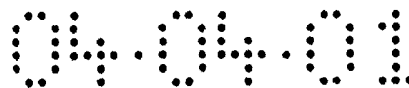
Další možností je že cílová sekvence kódující mamaglobin v reverzně přepsané cDNA může být detekována za použití jiné známé techniky, jako je ligázová řetězová reakce, včetně gap LCR (G-LCR) a její varianty, nebo samostatně podporované sekvenční replikace (3SR) a jejich modifikace. Navíc mamaglobin mRNA může být detekována přímo asymetrickou gap-LCR (AG-LCR). Viz např. Leckie et al., „Infectious disease Testing by Ligase Chain Reactio“ in *Molecular Biology and Biotechnology*, R.A. Myers, ed., pp. 463-466, VHC Publishers, 1995.

V jiné variantě navrhovaného vynálezu, může být cDNA sekvence pro mamaglobin nebo její deriváty použita pro charakteristiku alterací v mamaglobinovém genu (např. přestavení, amplifikaci, delecí) ve vzorku nádorem prsu trpících pacientů. To zajišťuje způsob, kde vzorek z pacienta, nebo vzorky, neobsahující kompletní mRNA, umožní testování změn genové struktury.

V jedné aplikaci navrhované techniky je cDNA kódující mamaglobin nebo její derivát hybridizována s pacientovou genomovou DNA, která byla izolována z pacientova nádoru, normální tkáně nebo lymfocytů a opracována jednou nebo několika restrikčními endonukleázami. Za použití techniky Southern blotu, který je dobře známý v současném stavu techniky, tato technika stanoví, zda pacient, nebo pacientův nádor prsu obsahuje gen pro mamaglobin a zda je deletován, přestavěn nebo amplifikován. Detekce těchto změn přináší důležitou informaci použitelnou pro prognózu choroby a zacházení s pacientem.

V jiné variantě této techniky, jeden nebo více párů oligonukleotidových primerů založených na sekvenci cDNA kódující mamaglobin a komplementární sekvenci, může být použito v polymerázové řetězové reakci pro amplifikaci segmentů genu pro mamaglobin ze vzorků získaných z pacienta. Analýzou výsledných PCR produktů je možno zjistit, zda je příslušný segment genu pro mamaglobin deletován nebo přestavěn. Detekce těchto změn přináší důležitou informaci použitelnou pro prognózu choroby a zacházení s pacientem.

Dalším způsobem detekce rakoviny prsu je detekce přítomnosti prekursoru a/nebo sekretované formy proteinu mamaglobinu ve vzorcích získaných z pacienta. Může být použita jakákoliv technika detekce proteinů, známá v současném stavu techniky. Může se jednat např. o imunodifúzi, imunoelektroforézu, imunochemické techniky, technika ligand-vazebná složka, imunohistochemické techniky, aglutinace a technika využití komplementu (např. *Basic and Clinical Immunology*, Sites and Terr, eds. Appleton & Lange, Norwalk, Conn. Str. 217-262, 1991). Nejvhodnější je technika ligand-vazebná složka, zahrnující reakce protilátek s epitopem nebo epitopy mamaglobinu a kompetitivní náhrada značeným mamaglobinem, nebo jeho derivátem.



Jak je používán zde termín „mamaglobin“ popisuje jak přirozeně se vyskytující mamaglobin, včetně neglykosylované prekurzorové formy a glykosylované sekretované formy, jeho deriváty a fragmenty. Přirozeně se vyskytující znamená polypeptid který je možné izolovat z přirozených zdrojů, např. z normálního nebo nemocného organismu a který není nijak promyšleně pozměněn člověkem. Přirozeně se vyskytující mamaglobin, zde popisovaný, zahrnuje prekurzory obsahující sekvence označené jako sekvence č. 2 a sekretovanou formu obsahující sekvenci č. 17 (aminokyseliny 20-93 ze sekvence č. 2). Alelické varianty sekvence č. 2 jsou rovněž zahrnuty ve smyslu termínu popisujícího přirozeně se vyskytující mamaglobin.

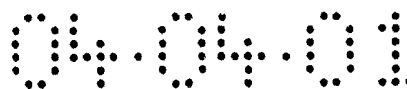
Deriváty mamaglobinu jsou polypeptidy obsahující segment alespoň 10 aminokyselin, které jsou v podstatě identické s částí přirozeně se vyskytujícího mamaglobinu. Je vhodnější aby tato oblast byla identická v alespoň 20 aminokyselinách, lépe pak alespoň v 50 aminokyselinách a nejlépe v alespoň 75 aminokyselinách. Dav polypeptidy jsou v podstatě identické, pokud při optimálním nastavení sekvenční programy jako je BLAST při použití obvyklých nastavení pro porovnávací parametry, naleznou sekvenční shodu alespoň v 80 %, lépe pak 90 %, ještě lépe 95 % a nejlépe v 99 %. Je vhodné, aby pozice, které nejsou identické, byly obsazeny aminokyselinami splňujícími konzervativní substituci.

Konzervativní aminokyselinové substituce popisuje nahrazení jedné aminokyseliny druhou, ale s podobným postranním řetězcem. Například skupina aminokyselin s alifatickým postranním řetězcem jako je glycin, alanin, valin, leucin a izoleucin, skupina aminokyselin s alifatickým postranním řetězcem obsahujícím hydroxyl, jako je threonin a serin, skupina aminokyselin s postranním řetězcem obsahujícím amid, jako je asparagin a glutamin a skupina aminokyselin s aromatickým postranním řetězcem, jako je fenylalanin, tyrozin a tryptofan, skupina aminokyselin se zásaditým postranním řetězcem, jako je lyzin, arginin a histidin, skupina aminokyselin s postranním řetězcem obsahujícím síru, jako je cystein a methionin.

Nejvhodnější konzervativní substituce jsou: valin-leucin-izoleucin, fenylalanin-tyrozin, lyzin-arginin a asparagin-glutamin.

Deriváty mamaglobinu by měly křížově reagovat s protilátkami proti mamaglobinu, monoklonálními nebo polyklonálními, které jsou specifické pro přirozeně se vyskytující mamaglobin nebo jeho fragmenty.

Jak je použit zde, termín „fragment“ a „peptid“ popisují mamaglobin s identickou aminokyselinovou sekvencí odvozenou od cDNA mamaglobinu s plnou délkou (např. sekvence č. 1), ale obsahující delece na amino- nebo karboxy- konci. Typický fragment mamaglobinu, nebo jeho peptid, je alespoň 3 aminokyseliny dlouhý. Vhodnější je aby byl dlouhý alespoň 6



aminokyselin, lépe pak alespoň 12 aminokyselin, ještě lépe alespoň 25 aminokyselin a nejlépe alespoň 50 aminokyselin, nebo delší.

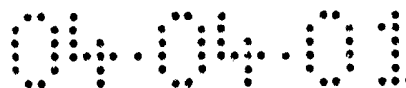
Řada kompetitivních nebo nekompetitivních protein vazebných technik je dobře známá v současném stavu techniky. Protilátky použitelné v této technice mohou být neznačené, např. pro aglutinační testy, nebo značené pro použití v celé škále různých technik. Protilátka může být naznačena např. radionuklidem, enzymem, fluorescenční značkou, chemiluminiscenční značkou, substrátem, kofaktorem, inhibitorem enzymu, částicí, barvivem a podobně pro použití při značení pro RIA (radioimmunoassay), enzymatické techniky, např. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, fluorescenční techniky a podobně.

Polyklonální nebo monoklonální protilátky proti mamaglobinu rozeznávající B buněčný epitop pro imunotechniky mohou být připraveny řadou různých postupů známých v současném stavu techniky. Jak je používán zde, termín „B buněčný epitop“ popisuje antigenní determinantu mamaglobinu. B buněčný epitop může obsahovat 3 aminokyseliny v prostorové konformaci, která je pro tento epitop jedinečná. Obvykle se B buněčný epitop skládá alespoň z 5 aminokyselin. Techniky stanovení prostorové konformace aminokyselin jsou dobře známé v současném stavu techniky a může se jednat například o rentgenovou krystalografii a dvojdimenzionální nukleární magnetickou rezonanci.

Jedním z faktorů při přípravě protilátky, je výběr a příprava aminokyselinové sekvence nebo celého nebo části proteinu, chemická syntéza sekvence a její injikace do vhodného zvířete, obvykle králíka nebo myši.

Způsoby přípravy mamaglobinu mohou být např. chemická syntéza, rekombinantní DNA techniky nebo jejich izolace z biologických vzorků. Chemická syntéza peptidu obsahujícího epitop může být provedena např. pomocí klasické Merrifeldovy techniky, nebo pomocí syntézy v pevné fázi (Merrifeld, J Am Chem Soc 85:2149, 1963) nebo Fmoc strategie pomocí přístroje Rapid Automated Multiple Peptide Synthesis System (DuPont Company, Wilmington, DE)(Caprino and Han, J Org Chem 37:3404, 1972).

Polyklonální protilátky mohou být připraveny imunizací králíků injekcí antigenu do lymfatických uzlin, následovaný druhou dávkou po dvou týdnech, která byla podána intraperitoneálně. Zvířata byla vykrvena a séra byla extrahována pomocí přečištěného mamaglobinu, obvykle pomocí ELISA techniky. Monoklonální protilátky mohou být připraveny pomocí techniky podle Milsteina a Kohlera pomocí fúzování splenocytů z imunizovaných myši s nepřetržitě se dělícími nádorovými buňkami, jako jsou myelomové, nebo lymfomové buňky (Milstain and Kohler Nature 256:495-497, 1975, Gutfre and Milstein, Methods in Enzymology? Immunochemical



techniques 73: 1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981). Takto vytvořené hybridomové buňky, jsou poté klonovány limitním ředěním a supernatanty jsou testovány na přítomnost protilátek pomocí RIA nebo ELISA techniky.

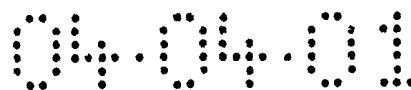
Takto připravené polyklonální nebo monoklonální protilátky proti mamaglobinu mohou být použity pro izolaci a přečištění prekursoru a sekretované formy mamaglobinu z buněk mamaglobin exprimujících. Např. Jak je ukázáno dále, polyklonální protilátky proti 16 C-terminálním aminokyselinám predikovaným z cDNA kódující mamaglobin (Glu-Val-Phe-Met-Glu-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe, sekvence č. 14) se váže na prekursor a sekretovanou formu mamaglobinu, stejně jako na mamaglobin, který byl syntetizován v in vitro translačním systému. Izolace mamaglobinu za použití protilátek proti mamaglobinu může proběhnout podle libovolné techniky, dobře známé v současném stavu techniky, jako je např. afinitní chromatografie.

Jedinečná schopnost protilátek rozeznávat a specificky se vázat na cílový exprimovaný antigen na nádorových buňkách, naznačuje možnost léčby rakoviny (viz např. LoBuglio and Saleh, Am J Med Sci 304:214-224, 1992, Bagshawe, Adv Pharmacol 24:99-121, 1993). Dalším aspektem navrhovaného vynálezu je popsat techniku prevence a léčby rakoviny prsu zvířat, založenou na použití protilátek proti mamaglobinu, který je, jak bylo zjištěno, exprimován ve vyšší míře nádorovými buňkami rakoviny prsu.

Protilátky specifické proti mamaglobinu, jak monoklonální tak polyklonální jsou připraveny pomocí technik dobře známých v současném stavu techniky. Např. myší, nebo lidské monoklonální protilátky mohou být připraveny technikou hybridomů. Další možností je mamaglobin, nebo imunologicky aktivní deriváty nebo jeho fragmenty, nebo anti-idiotypové protilátky, mohou být podány zvířatům tak aby vyvolaly produkci takových protilátek B buňkami, které budou schopné identifikovat buňky exprimující mamaglobin.

Připravené protilátky nebo jejich fragmenty mohou být označeny jednou nebo více onkolytickými substancemi, jako je radionuklid, toxin, cytostatikum a podány pacientům trpícím rakovinou prsu. Vazba značené protilátky na lidský mamaglobin který je exprimován na nádorových buňkách pak vede k jejich smrti.

Pro přípravu takových protilátek, je možno použít celou řadu onkolytických látek známých v současném stavu techniky. Může se jednat např. o imunotoxiny, což jsou rostlinné nebo bakteriální toxiny navázané na protilátku. Mohou to být např. tyto toxiny: ricin, diphtheria toxin, exotoxin A z bakterií *Pseudomonas*. Tento konjugát léčivo-protilátka také může obsahovat chemoterapeutikum navázané na protilátku. Tímto chemoterapeutikem může být např.



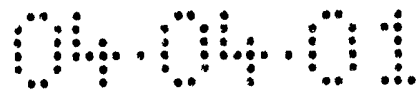
tomoxifen, doxorubicin, methotrexát, chlorambucil, Vinca alkaloidy a mitomycin. Dále je možno použít radioimunokonjugát stabilním navázáním radionuklidu na protilátku. Vhodnými radionuklidy pro přípravu radioimunokonjugátů jsou například  $\beta$ -zářiče jako je  $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  a  $^{47}\text{Sc}$ ,  $\alpha$ -zářiče jako je  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  a  $^{212}\text{Pb}$ , emitory elektronů jako jsou  $^{125}\text{I}$  a  $^{77}\text{Br}$  a rozpadající se nuklidy jako je  $^{10}\text{B}$ .

Zjištění, že podstatná část nádorů prsu exprimuje mamaglobin, je základem dalšího aspektu navrhovaného vynálezu, který zahrnuje aktivaci mamaglobin-specifických B a T lymfocytů ( $T_c$ ) s mamaglobinem jako antigenem. Dále navrhovaný vynález popisuje B-buněčné antigeny a  $T_c$  antigeny, vakcíny obsahující alespoň jeden B-buněčný antigen a/nebo alespoň jeden  $T_c$  mamaglobin antigen pro indukci protilátek a/nebo buňkami mediované imunitní reakce proti mamaglobin exprimujícím nádorům a způsob léčby pacientů s rakovinou prsu exprimující mamaglobin. Jedním způsobem podle navrhovaného vynálezu, je podání aktivovaných, mamaglobin specifických lymfocytů pacientovi. Dalším způsobem je podání mamaglobin specifické vakcíny pacientovi.

Jak je používán zde, termín „antigen mamaglobin“ popisuje přirozeně se vyskytující mamaglobin, jeho deriváty, a fragmenty, které obsahují epitopy rozeznávané mamaglobin specifickými klony B nebo  $T_c$  buněk.

B-buněčný antigen mamaglobinu musí obsahovat mamaglobin specifický B-buněčný epitop a  $T_H$  epitop. termín „B-buněčný epitop“ popisuje jakýkoliv antigen, haptén, epitop, nebo antigenní determinantu, která je rozeznávaná pomocí imunoglobulinů specifických proti mamaglobinu na B-buňkách a který je schopen indukovat produkci protilátek s příslušnou pomocí  $T_H$  buněk, pokud je podán zvířatům. B-buněčný epitop by měl obsahovat aminokyselinovou sekvenci o délce alespoň 4 aminokyselin. Je vhodné, aby B-buněčný epitop byl dlouhý alespoň 6 až 25 aminokyselin, lépe pak 15 až 22 aminokyselin. Aminokyselinová sekvence B-buněčného epitopu může být identická, nebo v podstatě identická s aminokyselinovou sekvencí přirozeně se v mamaglobinu vyskytující. Jinou možností je, že aminokyselinová sekvence B-buněčného epitopu je identická, nebo v zásadě identická s nesouvislou aminokyselinovou sekvencí, představující topograficky sestavené determinanty mamaglobinu.

Termín „ $T_H$ -buněčný epitop“ popisuje jakoukoliv antigenní determinantu rozeznávanou pomocnými T buňkami prostřednictvím asociace s MHC II molekulou. Aktivace pomocných T buněk vyvolá diferenciaci klidových mamaglobin specifických B-buněk na plasmatické buňky sekretující vysokoafinitní IgG, tzn. indukuje sekundární imunitní reakci. Příprava a použití imunogenních peptidů obsahujících B- a  $T_H$ - buněčné determinanty tak aby bylo možno připravit



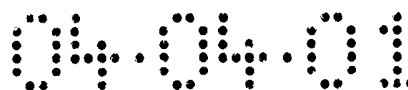
vyšší titry specifických protilátky produkujících B-buněk pomocí  $T_H$  –buněk, je dobře známo v současném stavu techniky (viz např. Cheronis et al., patent US 5 573 916, Denton et al., Cancer Letters 70:143-150 (1993), Borrás-Cuesta et al., Eur J Immunol 17:1213-1215 (1987) a Good et al., Science 235:1059-1062 (1987)).  $T_H$  epitop může obsahovat aminokyselinovou sekvenci z mamaglobinu, nebo zcela heterologního proteinu. Např. Denton et al., popisuje indukci protilátkové odpovědi proti mucinům, což jsou komplexní glykoproteiny exprimované na sekrečních epitelech a asociované s rakovinou prsu, nebo jinými nádory, u myši imunizovaných syntetickým peptidem obsahujícím B-buněčnou determinantu z jádra MUC-1 mucinu, napojenou na sekvenci 111-120 z chřipkového hemaglutininu A/X-31, známé determinanty pomocných T-buněk. Epitop pomocných T-buněk by měl obsahovat aminokyselinovou sekvenci o délce od 6 do 20 aminokyselin, lépe pak mezi 8 až 18 aminokyselinami a nejlépe 9 až 15 aminokyselin.

$T_c$  antigen z mamaglobinu obsahuje  $T_c$  epitop a agretop pro MHC třídy I. Termín „ $T_c$ -buněčný epitop“ popisuje jakýkoliv antigen, epitop nebo antigenní determinantu rozeznávanou mamaglobin specifickými  $T_c$ -buňkami, pokud je prezentován na povrchu antigen prezentujících buněk prostřednictvím správné MHC I molekuly. Termín „MHC I agretop“ popisuje jakoukoliv aminokyselinovou sekvenci rozeznávanou molekulou MHC I, která umožňuje mamaglobinu být prezentován mamaglobin specifickým  $T_c$ -buňkám pomocí molekuly MHC I na povrchu antigen prezentujících buněk (APC).  $T_c$ -buněčný epitop a MHC I agretop jsou obsaženy v jedné aminokyselinové sekvenci o délce 6 až 11 aminokyselin, která je identická, nebo velmi podobná aminokyselinové sekvenci fragmentu přirozeně se vyskytujícího v mamaglobinu. Je vhodné aby tato sekvence byla 8 až 9 aminokyselin dlouhá.

Způsoby identifikace B- a T- buněčných antigenů, jsou dobře známé v současném stavu techniky. Například, kapacita izolovaných mamaglobin specifických B- nebo T- buněk reagujících na syntetické peptidy i sekretovaný mamaglobin mohou být stanoveny standartními imunobiologickými technikami. Peptidy, které byly identifikovány jako antigenní, mohou být modifikovány v jedné nebo více aminokyselinách, tak aby byla optimalizována jejich schopnost stimulovat mamaglobin specifické T- nebo B- buňky.

B-buněčný epitop může být také mapován pomocí komerčně dostupných kitů pro mapování epitopů, které umožňují testování náhodných peptidů navázaných na C konec nosiče, kterým může být „polyethylen multipin support“, např. Cambridge Research Biochemicals.

Další možností, je predikovanou sekvenci mamaglobinu prohledat, aby byly nalezeny známé vazebné motivy MHC I nebo MHC II molekul. Viz např. Hill et al., Nature 360:434 (1992),



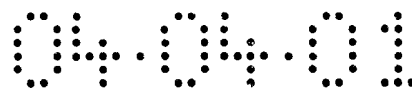
Pamer et al., Nature 360:852 (1992), Hammer et al., J Exp Med 176:1007 (1992) a Falk et al., Nature 351:290-296 (1991). Například, antigenní peptidy rozeznávané CTL specifickými pro rakovinu prsu mohou být identifikovány prohledáním aminokyselinové sekvence mamaglobinu na HLA-A

vazebné peptidy, jak popisuje Peoples et al., Proc Natl Acad Sci 92:432-436 (1995). Výběr HLA-A2 jako antigen prezentující molekuly vyhovuje pokud pacient exprimuje HLA-A2 (přibližně 50 % Evropanů exprimuje HLA-A2). Peptidy o kterých se předpokládá, že se budou vázat na HLA-A2 mohou být syntetizovány a testovány na antigenicitu, navázáním na T2 buněčnou linii, lidský T/B buněčný fúzní produkt obsahující defekt při prezentaci antigenu, takže HLA-A2 molekuly na povrchu T2 buněk mohou být efektivně „naplněny“ exogenním peptidem (Henderson et al., Science 255:1264-1266 (1992)). Dále je použita standární cytotoxická technika, což představuje inkubaci T2 buněk s navázaným syntetickým peptidem se specifickými CTL izolovanými z lymfocytů infiltrujících nádor (TIL) z mamaglobin exprimujícího nádoru (Peoples et al., 432-433 a Toso et al., Cancer Res 56:16-20 (1996)).

Antigenní peptidy mamaglobinu obsahující T<sub>c</sub> epitopy mohou být také identifikovány pomocí kyselého vymývání endogenních peptidů prezentovaných na HLA třídy I na povrchu nádorových buněk (Peoples et al., viz výše). Vymyté peptidy mohou být rozděleny řadou technik známou v současném stavu techniky, včetně dělení pomocí HPLC. Různé frakce peptidů jsou navázány na T2 buňky a T2 buňky s navázaným peptidem jsou inkubovány s specifickými CTL izolovanými z lymfocytů infiltrujících nádor, za použití standárních postupů.

Další použití peptidu podle navrhovaného vynálezu, je při adoptivní imunoterapii. Tato terapie zahrnuje in vitro, za použití mamaglobinu, aktivaci a rozmnožení mamaglobin specifických B-buněk produkujících protilátky a/nebo mamaglobin specifických cytotoxických lymfocytů izolovaných z pacienta trpícího nádorem prsu, který exprimuje mamaglobin. Tato technika může být také provedena s prostředkem obsahujícím jak B- tak T- buněčné antigeny. Aktivované lymfocyty jsou pak navraceny pacientovi.

Mamaglobin jako antigen podle navrhovaného vynálezu, je také použitelný pro přípravu mamaglobin specifické vakcíny. Tato vakcína obsahuje takové množství mamaglobinu, které stimuluje imunitní reakci. Jak je používán zde, termín „imunostimulační množství“ popisuje takové množství antigenu, které je schopné stimulovat požadovanou imunitní reakci u příjemce, pro potlačení, nebo léčbu rakoviny prsu. Toto množství může být stanoveno empiricky pomocí standárních postupů, dobře známých v současném stavu techniky.

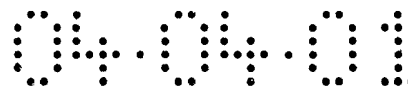


Antigen může být podán v libovolném počtu vakcín a forem, které jsou nezbytné pro vyvolání požadovaného typu imunitní odpovědi, tzn. buněčné nebo humorální reakce. Tyto možnosti jsou známé v současném stavu techniky (viz Lanzavecchia, Science 260:937-944 (1993) a Raychandhuri patent US 5 585 103). Příkladem forem vakcíny, které mohou být použity pro stimulaci imunitní reakce, jsou farmaceuticky přijatelná adjuvans, jako jsou soli hliníku, emulze squalenu nebo squalen a muramyl dipeptid, lipozómy a mohou dále obsahovat stabilizátor, složku tvořící micely a biodegradovatelný a biokompatibilní olej (Raychaudhuri, viz výše).

Mamaglobin specifická vakcína může také obsahovat buňky sloužící jako nosič mamaglobinu. Je vhodné, aby tyto buňky byly připraveny z autologních profesionálních antigen prezentujících buněk (APC), jako jsou makrofágy, dendritické buňky, nebo aktivované B nebo T lymfocyty (viz Lanzavecchia, viz výše). Profesionální APC exprimují ligand B7, který se váže na CD28 nebo CTLA4 na pomocných T buňkách a doručuje na antigenu nezávislý kostimulační signál, známý jako signál 2, který blokuje anergii nebo inaktivaci T-buněk. Vakcína může tedy také obsahovat IL-2 nebo jiný kostimulační signál, blokující navození anergie nebo inaktivace (Lanzavecchia, viz výše).

Další forma mamaglobin specifické vakcíny obsahuje rekombinantní vektor obsahující nukleotidovou sekvenci nezbytnou pro expresi mamaglobinu. Použití infekčních agens pro stimulaci CTL je velmi dobře známé v současném stavu techniky (Raychaudhuri, viz výše). Byly popsány chimérické vektory byly popsány za použití vakcinie, polio-, adeno- a retrovirů, stejně jako bakterie, jako jsou Listerie a BCG. Např., pro virus ptačích neštovic, ALVAC, bylo prokázáno, že je schopen vyvolat silnou imunitní reakci proti vloženému cizorodému proteinu (Taylor et al., Virology 187:321-32(1991)). Navíc, rekombinantní ALVAC exprimující MZ2-E lidský melanomový antigen kódovaný MAGE-1 genem, je schopen stimulovat in vitro MAGE-1 CTL aktivitu v populaci TIL z nádoru exprimujícího MAGE-1 mRNA (Toso et al., viz výše). V jiném případě popsaném v patentu US 5 593 972, od Weiner et al., rekombinantní expresní vektor kódující antigen imunogenního proteinu, může být pro nasměrování přímo podán individuálně jednomu typu buněk in vivo, např. svalovým buňkám, nebo buňkám ex vivo zároveň s látkou která zajistí vstup DNA do buňky.

Každý odborník v oboru může snadno odhadnout, co by měla vakcína obsahovat tak aby bylo dosaženo požadované imunitní reakce. Např. pro indukci produkce protilátek proti mamaglobinu in vivo, by vakcína měla obsahovat alespoň jeden B-buněčný antigen mamaglobinu obsahující B epitop a T<sub>H</sub> epitop. T<sub>H</sub> epitop by se měl shodovat s hlavním MHC II haplotypem příjemce vakcíny. Je také možné použít univerzální T<sub>H</sub> epitop, který je rozeznáván všemi lidskými



molekulami MHC I bez ohledu na haplotyp, který pochází z tetanového toxoidu (Panina – Bordignon et al., Eur J Immunol 19:2237 (1989)) Je vhodné, aby vakcíny obsahovaly celou řadu B-buněčných antigenů z mamaglobinu s  $T_H$  epitopy rozeznávanými MHC II molekulami různých HLA typů.

Další variantou navrhovaného vynálezu, je mamaglobin specifická vakcína indukující buněčnou imunitu a obsahující alespoň jeden  $T_c$  antigen mamaglobinu schopný aktivovat mamaglobin specifické  $T_c$  buňky. Je vhodné, aby tato vakcína obsahovala několik  $T_c$  buněčných antigenů.

Mamaglobin specifická vakcína může být připravena tak, že indukuje jak protilátkovou, tak buněčnou odpověď. V této variantě pak obsahuje jak B- tak T- buněčné antigeny.

Pacient trpící nádorem, který exprimuje mamaglobin může být léčen podáním imunostimulačního množství mamaglobin specifické vakcíny, podle navrhovaného vynálezu. Vakcína může být podána libovolným známým způsobem. Může to být tedy např. intravenózně, intraperitoneálně, intramuskulárně, podkožně nebo intramamárně.

Nejvhodnější varianty navrhovaného vynálezu jsou popsány dále v příkladech. Jiné konkrétní varianty v rámci nároků, jsou zřejmé každému odborníkovi v oboru z popisu a specifikací vynálezu, jak jsou uvedeny. Je zamýšleno, že specifikace, zároveň s příklady, jsou uvedeny pouze pro ilustraci, s rámcem a myšlenkou stanovenou nároky, které následují příklady.

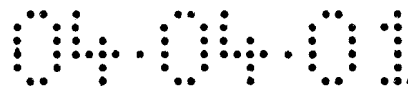
V níže uvedených příkladech jsou buněčné linie získané z ATCC (American Type Culture Collection), jsou ponechány růst v D-MEM mediu doplněném 10 % fetálním sérem. Tkáňové biopsie byly získány z Human Cooperative Tissue Network (LiVolsi et al., Cancer 71:1391-1394, 1993).

#### PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

##### PŘÍKLAD 1. Příklad izolace cDNA kódující mamaglobin

Celková buněčná RNA z buněčné linie MDA-MB415 byla izolována za použití standardní technikou pomocí guanidin izothiokyanátu (Belyavsky et al., viz výše). Tato RNA byla použita pro RACE PCR za využití Amplifinder kitu (Clontech) a následujícího protokolu.

Syntéza prvního řetězce cDNA proběhla standardní reakcí do které vstoupilo 1  $\mu$ g RNA, 10  $\mu$ M specifických primerů pro mamaglobin D2R (5'- ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG -3') (sekvence č. 4), 4  $\mu$ g 5x RT pufru (250 mM TrisCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM  $MgCl_2$ ), 2  $\mu$ l 100 mM DTT, 1  $\mu$ l 10 mM dNTP a 200 jednotek reverzní transkriptázy Superscript<sup>TM</sup> (Gibco/BRL) v reakčním objemu 20  $\mu$ l. Reakce probíhá 1 hodinu při 45 °C a je ukončena 5 minutovou inkubací v 95 °C. RNA byla hydrolyzována pomocí 400  $\mu$ M NaOH při 65 °C po dobu 30 minut a neutralizace byla provedena 400  $\mu$ l kyseliny octové.

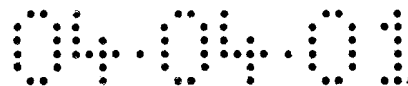


Reakční směs byla poté přidána do 3 objemů 6M NaI a 10  $\mu$ l skleněných zrn. Tato zrna byla promyta třikrát 80 % ethanolem a nukleová kyselina byla vymyta ze zrn 45  $\mu$ l vody. Nukleová kyselina byla poté precipitována a resuspendována v 10  $\mu$ l vody. Přečištěný první řetězec cDNA byl ligován s připraveným kotvícím oligonukleotidem (sekvence č. 9, 5'- CAC GAA TTC ACT ATC GAT TCT GGA ACC TTC AGA GG -3'), za použití T4 RNA ligázy při 27 °C po dobu 20 hodin. Jedna desetina ligační reakce byla použita pro PCR amplifikaci v 50  $\mu$ l reakční směsi obsahující 1  $\mu$ M kotvícího primeru (sekvence č. 10, 5'- CTG GTT CGG CCC ACC TCT GAA GGT TCC AGA ATC GAT AG -3'), 1  $\mu$ M primer specifický pro mamaglobin D2Rb (sekvence č. 11, 5'-AAT CCG TAG TTG GTT TCT CAC C -3'), 200  $\mu$ M dNTP, 5 jednotek Vent<sup>TM</sup> DNA polymerázy a 1x polymerázový pufr (20 mM TrisCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100). Reakční směs byla inkubována při 95 °C 2 minuty, poté při 94 °C 45 sekund, 50 °C 1 minutu a 72 °C 90 sekund, celkem 30 krát.

Dva posměrné mamaglobin specifické oligonukleotidy byly D2R (sekvence č. 4) a D2Rb (sekvence č. 11). Protisměrné mamaglobin specifické oligonukleotidy byly použity podle doporučení výrobce, D2F (5'- CTT TCT GCA AGA CCT TTG GC -3') (sekvence č. 12). Všechny PCR amplifikace byly prováděny pomocí Vent DNA polymerázy (New England Biolabs). Amplifikované RACE produkty byly rozstříženy EcoRI a ligovány do EcoRI a SmaI míst plazmidového vektoru pGEM7Z (Promega, Madison, WI).

Všechna sekvenování probíhala pomocí Taq DNA polymerázového teplotního cyklu sekvenčního kitu, podle protokolu výrobce (Promega). Zjednodušeně, postup byl takový.

10 pmol sekvence specifického oligonukleotidu bylo označeno 10 pmol <sup>32</sup>P- $\gamma$  ATP (3000 Ci/mmol a 10 mCi/ml) za použití T4 polynukleotid kinázy v 10  $\mu$ l reakční směsi po dobu 30 minut v 37 °C. Polymerizační reakce zahrnovala 100 ng templátu plazmidu, 1,5 pmol značeného sekvenčního primeru a 5 jednotek Taq polymerázy o sekvenční čistotě v 17  $\mu$ l sekvenčního pufru dodávaného výrobcem. Reakční směs byla rozdělena do 4 reakčních nádob obsahujících výrobcem dodávanou směs deoxynukleotidů a nebo dideoxy-A, C, G nebo T. Tyto zkumavky byly poté inkubovány při 95 °C 2 minuty, poté při 94 °C 45 sekund, 45 °C 30 sekund a 72 °C 1 minutu, celkem 30 krát. Po ukončení reakce, byly přidány 3  $\mu$ l barviva 80 % formamid/bromfenolová modř do každé zkumavky. Vzorky byly zahřáty na 70 °C po dobu 2 minut a naneseny na 6 % akrylamidový sekvenační gel obsahující 7,5 M močovinou a děleny 2 až 4 hodiny při výkonu 60 W. Gel byl vysušen a exponován na film Kodak XAR5 X-ray po dobu 2 až 24 hodin.



Takto získané sekvence byly tedy 403 bp fragment (sekvence č. 5) jak ukazuje na obr. 2 plná čára. Dříve byla izolována DEST002 Tag sekvence (Watson a Fleming, viz výše). Jednalo se o 206 bp dlouhý fragment (sekvence č. 6) jak ukazuje na obr. 2 prázdná čára. Kombinací informací z těchto dvou sekvencí umožnilo odvodit plnou délku sekvence o 503 bp kódující mamaglobin (obr. 2).

**PŘÍKLAD 2.** Demontrace restrikce exprese mamaglobinu na nádorové buňky rakoviny prsu a v menší míře na normální mléčnou žlázu.

Byla izolována celková buněčná RNA ze vzorků za použití standartní technikou pomocí guanidin izothiokyanátu a inkubována s DNázou bez RNáz (Promega). Pro RT/PCR analýzu, byl 1 µg celkové RNA reverzně transkribován s dT<sub>21</sub> (sekvence č. 13) a Superscript II reverzní transkriptázou (Gibco/BRL) podle protokolu výrobce. 200 ng oligo dT<sub>21</sub> (sekvence č. 13) a 1 µg celkové RNA bylo inkubováno při 65 °C 5 minut v 10 µl objemu. Vzorky byly ochlazeny v ledu a bylo k nim přidáno 4 µl 5x RT pufru (250 mM TrisCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP a 200 jednotek reverzní transkriptázy Superscript<sup>TM</sup> II (Gibco/BRL) v reakčním objemu 20 µl. Reakce probíhá 1 hodinu při 45 °C a je ukončena 5 minutovou inkubací v 95 °C.

Desetina z každé RT/PCR reakce byla podrobena PCR analýze za použití mamaglobin specifických primerů D2R (5'- ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG -3') (sekvence č. 4) a d2102 (5'- CAG CGG CTT CCT TGA TCT TTG -3') (sekvence č. 3) při standartních reakčních podmínkách, 40 cyklů při 94 °C x 30 sekund / 55 °C x 1 minuta / 72 °C x 1 minuta.

Northern blotem bylo analyzováno 20 µg celkové RNA jak bylo popsáno dříve (Watson a Fleming, viz. výše) za použití sondy celé délky cDNA pro mamaglobin. Integrita a rovnoměrné nanesení vzorků RNA bylo ověřeno značením ethidium bromidem.

Jak ukazuje obr. 4A, je 500 bp dlouhá mRNA pro mamaglobin byla dobře detekovatelná v nádorovém vzorku 2410 ( tkáň ze které byly izolovány původní DEST sekvence) a v daleko menší míře v normální tkáni mléčné žlázy, ale ne v nádorově transformovaných epitheliálních buňkách z prsu B5-589, nebo v lidských plicích, placentě, děloze a vaječnicích (obr. 4A). Po amplifikace RT/PCR, nebyla exprese mamaglobinu v 15 tkáních (obr. 4B). Detekce mRNA pro glyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenázu (GAPDH) (obr. 4B) a EGF receptor (není uvedeno) v těchto reakcích dokazují že nepřítomnost mRNA pro mamaglobin nebyla dána degradací RNA nebo jinými chybami. Z toho vyplývá, že exprese mamaglobinu je specifická pro tkáň mléčné žlázy.



### PŘÍKLAD 2A. Důkaz specifity exprese mamaglobinu pro mléčnou žlázu, v normální tkáni

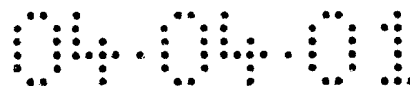
Sonda cDNA pro mamaglobin použitá v příkladu 2, byla hybridizována s komerčně připravenými dot-blot normalizovanými polyA obsahujícími molekulami RNA izolovanými z smíchané populace normálních lidských tkání (Maste Blot<sup>TM</sup>, Clontech, Palo Alto, CA). Dot-blot obsahoval RNA z následujících tkání: mozek, mandle, ocasaté jádro, mozeček, mozková kůra, čelní lalok, hippocampus, prodloužená mícha, týlní lalok, bazální jádro, substantia nigra, spánkový lalok, thalamus, mícha, srdce, aorta, kosterní sval, tlusté střevo, krev, děloha, prostata, žaludek, varlata, vaječník, pankreas, hypofýza, nadledvinky, štítná žláza, slinná žláza, mléčná žláza, ledviny, játra, tenké střevo, slezina, brzlík, periferní leukocyty, lymfatická uzlina, kostní dřev, slepé střevo, plíce, průdušnice, placenta, fetální mozek, fetální srdce, fetální ledviny, fetální játra, fetální slezina, fetální brzlík a fetální plíce.

Molekuly cDNA kódující mamaglobin byly označeny <sup>32</sup>P- $\alpha$ -dCTP (10 mCi/ml, > 3000 Ci/mmol) a Redprime značícím kitem (Amersham, Arlington Heights, IL) podle protokolu výrobce. Dot-blot byl hybridizován s  $1 \times 10^6$  CPM/ml cDNA sondy pro mamaglobin při 60 °C po dobu 16 hodin za použití Rapid-Hyb hybridizačního pufru (Amersham, Arlington Heights, IL). Filtry byly poté dvakrát promyty při pokojové teplotě po dobu 15 minut v 2x SSC / 0,1 % SDS a dvakrát při 60 °C po dobu 1 hodiny byly omývány 0,2 x SSC / 0,1 % SDS. Promyté filtry byly exponovány na XAR5 filmy (Eastman-Kodak, Rochester, NY) s deskou zvyšující emisi fosforu po dobu 72 hodin.

Mamaglobin kódující mRNA byla detekována pouze v RNA z mléčné žlázy (není zobrazeno). Nepřítomnost mRNA pro mamaglobin v normální slinné žláze a prostatě naznačuje, že exprese mamaglobinu není spojena s apokrinním fenotypem, jak tomu je u GCDP15, který je používán jako znak specifický pro mléčnou žlázu (Wick et al., Hum Pathol 20:281-287, 1989, Raab et al., Am J Clin Pathol 100:27-35, 1993). Tyto výsledky ukazují možnost využití mamaglobinu jako vysoce specifického znaku pro rakovinu prsu.

### PŘÍKLAD 3. Důkaz, že cDNA pro mamaglobin kóduje translatovatelnou nukleotidovou sekvenci, vedoucí k proteinu o předvídatelné molekulové hmotnosti.

Byla provedena in vitro translace pomocí TNT<sup>TM</sup> králičího retikulocytového translačního kitu s T7 RNA polymerázou (Promega) a <sup>35</sup>S-methioninem (>1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham) podle protokolu výrobce.



K 25  $\mu\text{l}$  TNT<sup>TM</sup> králíčího retikulocytového lyzátu bylo přidáno 2  $\mu\text{l}$  výrobcem připraveného reakčního pufru, T7 RNA polymerázy, 20  $\mu\text{M}$  aminokyselinové směsi bez methioninu, 40  $\mu\text{Ci}$  <sup>35</sup>S-methioninu (1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 40 jednotek inhibitoru ribonukleáz, 1  $\mu\text{g}$  mamaglobin / pGEM7 plazmidu a dostatečné množství vody opračované DEPC, tak aby výsledný objem byl 50  $\mu\text{l}$ . Reakce probíhala 60 minut při 30 °C. 5  $\mu\text{l}$  reakční směsi bylo potom přeneseno do 20  $\mu\text{l}$  SDS gelového pufru, 2 minuty vařeno a nanášeno na 17,5 % SDS-polyakrylamidový gel.

Králíčí retikulocytový lyzát s cDNA kódující mamaglobin dal vzniknout 6 kD proteinu, zatímco lyzát bez cDNA nevytvořil žádný protein.

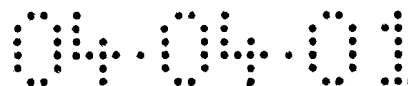
#### PŘÍKLAD 4. Rozšíření zvýšené exprese mamaglobinu u primárních nádorů prsu

Pro stanovení frekvence výskytu zvýšené exprese mamaglobinu u nádorů prsu, byl vyhodnocen panel patnácti různých nádorů prsu v prvním stádiu, o různých histologických typech, pomocí hybridizace na Northern blotu se sondou pro mamaglobin cDNA. Pro kontrolu byly přidány dva vzorky ze zdravých tkání prsu (obr. 6) 500 bp dlouhá mRNA pro mamaglobin byla detekována v normální tkáni a nádoru 2410 a v dalších třech nádorech, z nichž dva vykazovali malou nebo žádnou expresi v normální tkáni pacienta (BO15 - BO16 a BO22 - BO23) (obr. 6). Ve všech, 4 z 15 (27 %) byla zjištěna zvýšená exprese mamaglobinu.

Tyto údaje naznačují, že zvýšená exprese mamaglobinu není vázaná na jeden vzorek nádoru a je u nádorů prsu poměrně běžná. Fakt, že všechny testované nádory byly ve fázi 1, naznačuje, že k této poruše dochází poměrně časně při progresi nádoru prsu.

#### PŘÍKLAD 5. Detekce mamaglobinu pomocí specifické protilátky

Specifická protilátka proti mamaglobinu byla připravena navázáním peptidu odpovídajícího 16 aminokyselinám na C-terminálním konci odvozených z cDNA sekvence pro mamaglobin (Glu-Val-Phe-Met-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe, sekvence č. 14) na hemocyanin z přílipky přílivové a injikována králíkům spolu s Freundovým adjuvans. Sekundární dávka byla podána za tři týdny a 12 týden byli králíci vykrveni a séra byla testována na svoji schopnost detekovat mamaglobin za bezsérových podmínek, ze supernatantů z kultur nádorových linií rakoviny prsu MDA-MB-415 a MCF-7. Linie MDA-MB-415 byla identifikována dříve jako buněčná linie exprimující mamaglobin, zatímco u linie MCF-7 nebyla



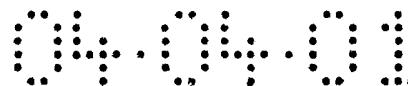
prokázána žádná tvorba mRNA. Kultivační média byla sebrána po 24 hodinách z kultury a dělena na 12 % akrylamidovém gelu za redukujících podmínek (tzn. vzorky byly vařeny v pufru obsahujícím DTT a 2-merkapt ethanol (BME) aby byly redukovány disulfidické vazby), blotována na Nytran filtr a analyzována standartním Western blotem pomocí výše popsané protilátky proti C-terminálnímu peptidu jako primární protilátky v této technice. Po navázání primární protilátky byl blot promyt a byla přidána sekundární protilátka (kozí proti králičí). Komplexy mamaglobinu s protilátkami byly zviditelněny pomocí enzymatické chemiluminiscence (ECL Western Blotting Detecting Reagent, Amersham, Arlington Heights, IL).

Polyklonální protilátky proti mamaglobinu byly detekovány v pruhu odpovídajícímu velikosti asi 21 kD v upraveném médiu MDA-MB-415 buněk (není zobrazeno). Žádnou přítomnost nebylo možno prokázat v médiu MCF-7 buněk (není zobrazeno). To potvrdilo data získaná při testování mRNA pro mamaglobin, že MDA-MB-415 buňky tvoří mamaglobin a MCF-7 nikoliv. Molekulová váha mamaglobinu sekretovaného MDA-MB-415 buňkami do média je vyšší než 10,5 kDa, což je odvozeno od předpokládané aminokyselinové sekvence č. 2. Neboť v podstatě všechny sekretované proteiny jsou glykosylované, cytoplazma MDA-MB-415 buněk byla testována pomocí polyklonálních protilátek proti mamaglobinu aby bylo možno detekovat prekursor sekretované formy.

MDA-MB-415 buňky byly kultivovány 24 hodin v bezsérovém médiu, to bylo poté sebráno. Navázané buňky byly promyty fosfátovým pufr (PBS) a lyzovány 1x Laemmli pufr (2 % SDS, 10 % glycerol, 100 mM DTT, 60 mM Tris, pH 6,8, 0,001 % bromfenolová modř). Lyzovaná směs byla 5 minut vařena a poté centrifugována 10 000 g 5 minut tak aby byla odstraněna drť. Buněčný lyzát byl přenesen do nové zkumavky a použit pro analýzu na Western blotu, jak je popsána dále.

Supernatant i buněčný lyzát byly děleny na 12 % SDS akrylamidovém gelu za redukujících podmínek (vzorky byly povařeny v pufru obsahujícím DTT a BME) a přebloťovány na PVDF membránu za použití standartních technik. Blot byl poté testován pomocí polyklonální protilátky proti C-konci v přítomnosti a v nepřítomnosti kompetitivního peptidu, použitého pro přípravu protilátky.

Vizualizace komplexů protilátka – mamaglobin je popsána dále. Jak ukazuje obr. 7, v nepřítomnosti kompetitivního peptidu (-) je v médiu (S) přítomný 21 kD proužek představující 21 kD sekretovaný mamaglobin. Buněčný lyzát (C) vykazuje hlavní band o velikosti přibližně 14 kD a několik proužků o vyšších molekulových hmotnostech, včetně jednoho o přibližně 21 kD.



Pokud je Western blot prováděn v přítomnosti kompetitivního peptidu (+), sekretovaná forma ani intracelulární forma mamaglobinu není vizualizována, což dokazuje, že protein obsahuje peptid proti kterému byla zaměřena protilátka.

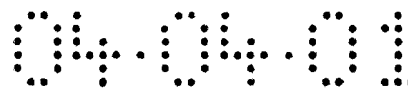
14 kD proužek detekovatelný pouze v buněčném lyzátu pravděpodobně představuje prekurzor nebo nezpracovanou formu mamaglobinu. Neboť predikovaná aminokyselinová sekvence mamaglobinu obsahuje konsenzus N-glykosilační místa, Asn-X-Thr umístěné v poloze 53 až 55 a 68 až 70 sekvence č. 2, 21 kD forma pravděpodobně představuje glykosylovanou formu proteinu.

Tato hypotéza byla testována kultivací MDA-MB-415 buněk v přítomnosti nebo nepřítomnosti tunicamycinu, látky která blokuje N-glykosilaci u eukaryotických proteinů. Tunicamycin, 1 µg/ml je přidán do jedné nebo dvou identických kultur a ty byly inkubovány přes noc. Kultivační média a buněčný lyzáat z opracovaných buněk byl připraven a analyzován Western blotem, jak je popsáno výše.

Jak ukazuje obr. 8, média z kultury (S) inkubované s tunicamycinem (+) vykazují absenci sekretovaného mamaglobinu, což dokazuje, že sekretovaný mamaglobin je glykosylovaný. Překvapivě, cytoplazmatická membrána mamaglobinu (14 kD) rovněž není detekovatelná v buněčných lyzátech z MDA-MB-415 buněk inkubovaných s tunicamycinem (pravá krajní dráha). Předpokládáme, že zablokování časných kroků glykosylace tunicamycinem, vede k nestabilitě a degradaci prekurzorů mamaglobinu a tím ztrátě možnosti detekovat 14 kD proteinu v cytoplazmě buněk inkubovaných s tunicamycinem.

Polyklonální protilátka proti C-konci mamaglobinu také detekuje 14 kD prekurzor mamaglobinu v buněčném lyzátu u vzorků z primárních nádorů prsu. Jak je vidět na obr. 9, prekurzorová forma mamaglobinu je přítomná na nádorovém vzorku BO23, ale není detekovatelná v normální tkáni ze stejného pacienta (BO22). Je zajímavé, že některé nádorové vzorky exprimující mamaglobinový transkript (tj. 087R, 014, 75A a 2410) neobsahují detekovatelné množství proteinu mamaglobinu, jak bylo zjištěno pomocí Western blotu. Jednou hypotézou vysvětlující tato data je, že exprese mamaglobinu je diferenciatně regulována na úrovni transkripce a translace a že tato diferenciatní regulace určuje stádium rozvoje nádoru.

Polyklonální protilátky proti mamaglobinu jsou také použitelné pro stanovení sekretovaného mamaglobinu v sekretech mléčné žlázy z proliferující mléčné žlázy. Kolostrum nebo zralé mateřské mléko (500 µl vzorku) bylo odebráno z těhotných žen během prvního a třetího trimestru, při narození a v dny 1, 14 a 21 po porodu. Vzorky byly naředěny odpovídajícím množstvím 2 x Laemli pufru (4 % SDS, 20 % glycerol, 200 mM DTT, 120 mM Tris, pH 6,8, 0,002



% bromfenolová modř). Naředěné vzorky byly vařeny 5 minut a poté centrifugovány 5 minut při 10 000 g při 4 °C, aby byla odstraněna drť. Denaturované vzorky byly přeneseny do nové zkumavky a skladovány v –20 °C před analýzou na Western blotu, jak je popsána výše.

Jak ukazuje obr. 10, protilátkami detekovaný 21 kD sekretovaný mamaglobin v sekretech mléčné žlázy během těhotenství, období silné proliferace epiteliálních buněk. Počátek laktace, stádium diferenciacie epiteliálních buněk, hladina mamaglobinu podstatně klesne již 3 dny po porodu a není detekovatelný již 14 dní po porodu. Tyto výsledky dokazují, že sekretovaný mamaglobin je asociovaný s proliferací epiteliálních buněk v prsu, což souhlasí s pozorováním sekretovaného mamaglobinu při rakovině prsu.

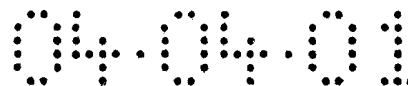
Reaktivita protilátky s peptidem mamaglobinu může být také prokázána na nádorových buňkách rakoviny prsu pomocí imunohistochemického značení v parafinem fixovaných řezech u vzorků z pacientů trpících rakovinou prsu (obr. 11). Imunohistochemické značení bylo provedeno pomocí protilátky proti mamaglobinu, jako primární protilátky a poté detekcí komplexu mamaglobin – protilátka za použití sekundární protilátky kozí proti králičí, která je konjugována s křenovou peroxidázou a 3,3'-diaminobenzentetrahydrochloridu (DAB) jako substrátu. Buňky exprimující mamaglobin jsou pak označeny hnědě.

Z těchto závěrů vyplývá, že mamaglobin je syntetizován ve formě prekurzoru a post-translačně modifikován, např. N-glykosylací, která zvýší jeho molekulovou hmotnost před sekrecí, že stabilita prekurzoru pro mamaglobin je závislá na N-glykosilaci a že mamaglobin je sekretován proliferujícími buňkami rakoviny prsu.

**Příklad 6.** Detekce mamaglobinu v nádoru prsu pomocí imunohistochemické analýzy za použití polyklonálních protilátek proti mamaglobinu popsanych v příkladu 5.

Sto náhodných vzorků z nádorů mléčné žlázy bylo vybráno náhodně z Vanderbilt University Department of Pathology a z Washington University Cancer Centre Tumor Repository. Formalímem fixované, parafinem zpevněné tkáňové vzorky byly nařezány na tloušťku 5 µm, přeneseny na sklíčko a vysušeny.

Pro imunohistochemické značení byly vzorky zbaveny parafinu a rehydratovány v roztocích se stoupajícím poměrem vody k ethanolu. Tkáň byla nejprve předinkubována normálním kozím sérem (Vector Laboratories, Burlingame, CA) na ředění 1:100 v 3 % hovězím sérovém albuminu (BSA) ve fosfátovém pufru (PBS) a poté s králičí polyklonální protilátkou proti mamaglobinu v ředění 1:1000 po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po několika promytích v PBS byly řezy inkubovány v normálním kozím séru (1:1000), 3 % BSA a 6 µg/kg biotinylované kozí protilátky



proti králičímu IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) v PBS po dobu 1 hodiny. Sekundární protilátka byla promyta čtyřikrát PBS a tkáňové řezy byly poté inkubovány s 1:1000 naředěným konjugátem streptavidinu s peroxidázou (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) také v roztoku 3 % BSA / PBS. Po 30 minutách inkubace byly řezy opět promyty čtyřikrát PBS a byl přidán barvicí roztok obsahující 1 mg/ml 3,3'-diaminbenzidintetrachlorid (Dako, Carpinteria, CA) a 0,02 % peroxid vodíku po dobu 3 minut. 5ezy jsou poté opláchnuty lehce deionizovanou vodou, označeny Harisovým hemototylinem a zality pod sklíčka.

Pro negativní kontrolu proběhl stejný postup, pouze 1:500 ředěné pre-imunního králičí sérum nahradilo sérum specifické proti mamaglobinu. Další možností je , použít peptidovou kompetici a antisérum nejprve inkubovat s 16 objemy mamaglobinu v koncentraci 100 µg/ml v 3 % BSA/PBS po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a poté ho přidat na tkáňové řezy.

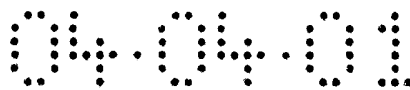
Imunopozitivita byla označena jako 0: bez značení, 1: slabé nebo sporadické značení u méně než 50 % nádorových buněk, 3: silné rozptýlené cytoplazmatické značení u méně než 50 % nádorových buněk, 4: silné rozptýlené cytoplazmatické značení u více než 50 % nádorových buněk. Pouze oblasti které dosáhly hodnoty 3 nebo 4 byly označeny jako pozitivní. Výsledky jsou uvedeny v tabulce I, dále představují značící patern pro tři typy nádorů, které ukazuje obr. 12.

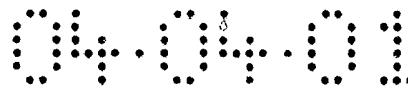
Tabulka 1. Imunoreaktivní značení lidských nádorů prsu proti mamaglobinu

Typ nádoru <sup>1</sup>	stupeň imunopozitivity <sup>2</sup>					celkem
	4	3	2	1	0	
lobulární	0	1 (33 %)	1 (33 %)	0	1 (33 %)	3
dobře diferenciovány	11 (78 %)	0	1 (7 %)	0	2 (14 %)	14
středně diferenciovány	28 (67 %)	5 (12 %)	3 (7 %)	2 (5 %)	4 (10 %)	42
slabě diferenciovány	24 (63 %)	9 (24 %)	2 (5 %)	0	3 (8 %)	38
DCIS	1 (33 %)	2 (67 %)	0	0	0	3
Celkem	64	17	7	2	10	100

<sup>1</sup> Kromě lobulárního a duktálního karcinomu in situ (DCIS) byly všechnu nádory invazivní duktální nádory.

<sup>2</sup> Imunopozitivita značení pomocí protilátky proti mamaglobinu byla označena jako 0: bez značení, 1: slabé nebo sporadické značení u méně než 50 % nádorových buněk, 3: silné rozptýlené cytoplazmatické značení u méně než 50 % nádorových buněk, 4: silné rozptýlené cytoplazmatické značení u více než 50 % nádorových buněk. Pouze oblasti které dosáhly hodnoty 3 nebo 4 byly označeny jako pozitivní.





Shrnuta, 80 % ductálních karcinomů vykazuje silné globální nebo fokální značení proti mamaglobinu. Co je zajímavé, že značení bylo přibližně stejně silné u dobře diferenciováných nádorů (78 %), středně diferenciováných (67 %) a slabě diferenciováných nádorů (63 %) (tabulka 1, obr. 12). Silné značení bylo pozorovatelné také u 3/3 případů čistě ductálních karcinomů in situ (DCIS) (obr. 12A). Buněčný patern značení byl převážně difúzní a cytoplazmatický, ačkoliv některé buňky vykazovaly značení přilehlé na membránu. V normální nádorové tkáni, bylo značení mamaglobinu pozorováno pouze v ojedinělých buňkách uvnitř malého kanálku a lalůčku.

Přesto, jak bylo pozorováno u jiných sekretovaných proteinů, zvýšená exprese mamaglobinu souvisí s projevem apokrinní metaplázie. U benigních tkání prsu s metaplastickým apokrinním epitelem, byla imunoreaktivita na mamaglobin prokazatelná jak uvnitř epithelia, tak v tekutině apokrinní cysty. Specifita tohoto paternu pozitivního značení byla dokázána ztrátou signálu z identických vzorků inkubovaných buď se sérem z předem imunizovaných králíků (obr. 12B, 12D, 12F) nebo se sérem proti mamaglobinu předem inkubovaným s kompetujícím peptidem z C-konce mamaglobinu (není zobrazeno).

Expres mamaglobinu nebyla detekována v jiných apokrinních tkáních, jako je prostata nebo slinná žláza. Nádory prsu s jak apokrinními tak i neapokrinními charakteristikami exprimují mamaglobin s přibližně stejnou intenzitou i frekvencí. Není také patrná žádná korelace mezi expresí mamaglobinu a typem nádoru. Je tedy možné, že exprese mamaglobinu je jedinečný znak nádorů prsu je jedinečný fenotypový znak nádorů prsu a může být použitelný ve spojení s jinými znaky pro lepší definici nádorů prsu na molekulární úrovni.

Výsledky popsané v příkladu 5 a 6 naznačují, že detekce mamaglobinu, může být použita pro diagnostiku nádorového onemocnění jako typický znak rakoviny prsu, při kontrole relapsu tohoto nádoru, při kontrole autologních transplantací kostní dřeně a kmenových buněk na přítomnost nádorových buněk a při směřované terapii při rakovině prsu pomocí protilátkami směřovaných komplexů. Přečištěný a izolovaný mamaglobin je použitelný pro přípravu protilátek proti rakovině prsu a při navrhování imunoterapeutických protokolů při jiných druzích rakoviny.

#### PŘÍKLAD 7: Detekce mRNA pro mamaglobin v lymfatických uzlinách

Expres mamaglobinu ve velkém procentu primárních nádorů prsu a jeho absence v lymfoidní tkáni naznačují, že by se mohlo jednat o citlivý a specifický znak pro detekci metastázujících



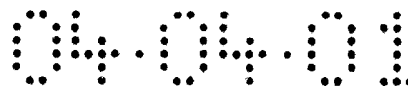
nádorů prsu v lymfatických uzlinách. Pro prověření této možnosti, byla testována přítomnost mRNA kódující mamaglobin v lymfatických uzlinách obsahujících buď histologicky dokumentované metastázy nádoru prsu nebo metastázy jiných nádorů. Expres mamaglobinu byla také porovnána s expresí keratinu 19, znaku, specifického pro epiteliální buňky, tak aby bylo možno porovnat intenzitu signálu vzhledem k počtu nádorových buněk přítomných v každém vzorku lymfatické uzliny.

Anonymní vzorky z lymfatických uzlin obsahující metastatické léze byly získány z Cooperative Human Tissue Network (LiVolsi et al., Cancer 71:1891-1894, 1993) a Washington University Cancer Center Tumor Repository. Tkáňové vzorky byly rozmělněny a homogenizovány v Trizolu (Life Technologies, Rockville, MD) v koncentraci 100 mg tkáně na ml reagens. Izolace RNA proběhla podle protokolu výrobce a výsledná RNA byla rozpuštěna ve vodě bez RNáz na koncentraci 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . 20  $\mu\text{g}$  každé RNA bylo děleno elektroforeticky na formaldehydovém agarózovém gelu a přeneseno na membrány Nytran Plus (Schleicher & Schuell, Keene, NM) za použití 10 x SSC pufru a standardní techniky.

Pro přípravu hybridizační sondy, byla cDNA pro mamaglobin použitá v příkladu 2 označena  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dCTP (10 mCi/ml, > 3000 Ci/mmol) a Redprime značícím kitem (Amersham, Arlington Heights, IL) podle protokolu výrobce.

Hybridizační sonda pro keratin 19 byla připravena následovně. Přední (5'-CGCGGATCCAGGATTGTCCTGCAGAT-3') (sekvence č. 18) a zadní (5'-CCGGAATTCCATCCCTCTACCCAGA-3') (SEKVENCE Č. 19) specifický primer pro keratin 19 byly použity pro standardní PCR amplifikaci normální lidské cDNA z prsu pro přípravu k19 cDNA fragmentu zahrnujícího kódující oblast od nukleotidu 477 až do nukleotidu 1298 (Stasiak, P.C. and Lane, E.B., Nucleic Acid Res 15:10058, 1987). Tento fragment byl naštěpen tak aby vznikly EcoRI a BamHI konce a vklonován na odpovídající místo pGEM3Z vektoru (Promega, Madison) a sekvenován aby byla potvrzena jeho sekvence. Klonované 821 bp k19 cDNA fragmenty byly radioaktivně označené, jak bylo popsáno výše.

Filtry pro Northern blot byly nejprve hybridizovány s  $1 \times 10^6$  CPM/ml mamaglobin hybridizační sondy při 60 °C po dobu 16 hodin, za použití Rapid-Hyb hybridizačního pufru (Amersham, Arlington Heights, IL). Filtry byly poté dvakrát promyty při pokojové teplotě 15 minut 2 x SSC / 0,1 % SDS a dvakrát promyty 1 hodinu při 60 °C v 0,2 x SSC / 0,1 % SDS. Promyté filtry byly poté exponovány na XAR5 film (Eastman Kodak, Rochester, NY) se zesilovací membránou po dobu 72 hodin. Filtry byly ponechány několik poločasů rozpadu, aby vymizel fosfor a opět hybridizovány s  $1 \times 10^6$  CPM / ml hybridizační sondy pro keratin 19, bez předchozího ošetření

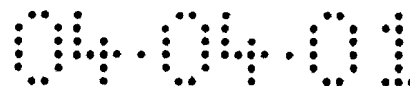


filtrů. Vždy byla použita odpovídající množství a specifické aktivity sond pro keratin 19 a mamaglobin a obě expozice na film probíhaly za stejných podmínek.

Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na obr. 13. Z 21 případů histologicky dokumentovaných případů přítomnosti metastázy v lymfatické uzlině (řádky 1-20 a 27), bylo možno mamaglobin detekovat v 9 případech (43 %) řádky 1, 2, 7, 9, 11, 12, 17, 18 a 27). Bohužel v 6 případech z 21 nebylo možno detekovat ani mamaglobin ani keratin 19 (3, 5, 6, 10, 13, 14, 16, 19 a 20), což může být vysvětleno tím, že uzlina obsahuje příliš málo nádorových buněk na to aby mohly být detekovány touto technikou. Pokud tedy těchto 6 případů odečteme, 60 % (9/15) vzorků obsahuje mRNA pro mamaglobin. V alespoň jednom případě, byla exprese mamaglobinu detekována v nepřítomnosti exprese mRNA pro keratin 19 (řádka 27), což naznačuje, že mamaglobin může být silnějším znakem na některém nádoru. Navíc keratin 19 je často exprimován na mnoha metastázách jiného typu, než rakovina prsu, např. v lymfatických uzlinách obsahujících metastázy při rakovině hrtanu nebo žlučníku (řádky 21 až 26), zatímco mamaglobin byl detekován pouze v jednom případě metastázy nepocházející z rakoviny mléčné žlázy (řádka 22). Jedná se o případ, kdy inkvinální lymfatická uzlina obsahuje málo diferenciovaný adenokarcinom neznámého původu. Neboť v tomto případě byla dokumentována předchozí endometriální rakovina, předpokládá se, že tato metastáza představovala návrat této choroby. Podařilo se nám detekovat expresi mamaglobinu v několika primárních endometriálních nádorech (není uvedeno) a můžeme se proto domnívat, že ačkoliv mamaglobin není normálně exprimován v tkáni zdravého endometria, může být exprimován na některých nádorech vycházejících z endometria a z mléčné žlázy. Ve všech případech lymfatických uzlin bez metastáz (řádky 29 až 33) byla exprese mamaglobinu keratinu 19 nedetekovatelná. Jak se dalo předpokládat, exprese mamaglobinu byla detekována v RNA izolované z normální tkáně prsu (řádka 34).

**PŘÍKLAD 8.** Detekce mRNA pro mamaglobin v kmenových buňkách z periferní krve, jako způsob detekce cirkulujících buněk nádoru prsu

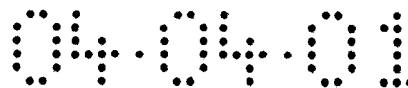
$1 \times 10^6$  periferních leukocytů bylo izolováno pomocí leukoporézy z 15 pacientů, kteří podstoupili léčbu silnou dávkou chemoterapie a autologní transplantaci kostní dřeně při metastatické formě rakoviny prsu. Jako pozitivní kontrola, bylo smícháno  $10^1$  MDA-MB175 lidských buněk rakoviny prsu exprimujících mamaglobin (Watson et al., Cancer Res 56:860-865, 1996) bylo smícháno s  $10^6$  lidskými melanomy OM431 tak aby byly buňky rakoviny prsu naředěny  $1:10^5$ . Čistá populace buněk OM431 byla použita jako negativní kontrola. Zmrzlé buněčné alikvoty byly



lyzovány v 1 ml Trizolu (Life Technologies, Rockville, MD) a celková RNA byla připravena podle protokolu výrobce. Integrita RNA a její koncentrace byla stanovena pomocí agarózové elektroforézy.

Přibližně jeden  $\mu\text{g}$  celkové RNA byl přepsán na první řetězec cDNA za použití T<sub>11-17</sub> primeru a SuperscriptII amplifikačního systému (Life Technologies, Rockville, MD) podle protokolu průvodce. Po inkubaci a inaktivaci RNázy H, byly vzorky naředěny dvojnásobkem vody bez nukleáz a skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro zajištění integrity syntetizované cDNA, bylo 10 % cDNA vystaveno 50  $\mu\text{l}$  PCR reakční směsi obsahující konečnou koncentraci 1 x Taq DNA polymerázového pufru, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu\text{M}$  dNTP, 0,6  $\mu\text{M}$  glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) přední amplifikační primer (5'- CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3') (SEKVENCE Č. 20), 0,6  $\mu\text{M}$  GAPDH reverzního amplifikačního primeru (5'- TCTA GACGGCAGGTCAGGTCCACC -3') (sekvence č. 21), a 2,5 jednotek Taq DNA polymerázy (Life Technologies, Rockville, MD). Reakční směs byla zahřáta na  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 minuty a poté 30 cyklů  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 30 sekund a  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 60 sekund a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 45 sekund. PCR produkty byly analyzovány na 2 % agarózovém gelu a jediný intenzivní proužek dokazuje že syntéza cDNA byla úspěšná. Dalších 10 % cDNA bylo přidáno do druhé 50  $\mu\text{M}$  PCR reakce obsahující 1 x Taq DNA polymerázového pufru, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu\text{M}$  dNTP, 0,6  $\mu\text{M}$  mamaglobin předního amplifikačního primeru (5'- AGCACTGCTACGCAGGCTCT-3') (sekvence Č. 16), 0,6  $\mu\text{M}$  mamaglobin reverzního amplifikačního primeru (5'- ATAAGAAAGAGAAGGTGTGG-3') (sekvence č. 4), a 2,5 jednotek Taq DNA polymerázy (Life Technologies, Rockville, MD). Reakční směs byla zahřáta na  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 minuty a poté 45 cyklů  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 30 sekund a  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 60 sekund a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 45 sekund. Produkty amplifikace byly rozděleny pomocí elektroforézy na 2 % agarózovém gelu a pomocí Southern blotu kontrolovány za použití Nytran Plus membrán, podle protokolu výrobce pro neutrální přenos (Schleicher and Schuell, Keene, NH). Výsledný filtr byl hybridizován s  $1 \times 10^6$  CPM / ml sondy cDNA pro mamaglobin a promyt, jak bylo popsáno výše.

Výsledky této techniky jsou zobrazeny na obr. 14. Z 15 pacientů s rakovinou prsu (CA) bylo u 9 pacientů (60 %) detekováno významné množství mRNA pro mamaglobin z jejich PBSC, což naznačuje, že izolované lymfocyty jsou kontaminované nádorovými buňkami. V ostatních šesti případech nebylo známo, zda primární nádor exprimuje mamaglobin, není možné říci, zda nepřítomnost pozitivního signálu je dána tím že nádor mamaglobin neexprimuje, nebo zda je možné říci, že lymfocyty nebyly kontaminovány nebo zda signál byl příliš slabý pro tento způsob detekce. V žádném případě, kdy byly vzorky sebrány ze zdravých pacientů, nebylo možno



mamaglobin detekovat. Podle síly detekovaného signálu pozitivní kontroly (+) obsahující  $1:10^5$  nádorových buněk, lze usoudit, že spodní hranice citlivosti této techniky je asi nižší než  $1:10^6$  nádorových buněk. Frekvence detekce a vysoká specifita této techniky naznačují, že by mohla být použitelná pro stanovování prognózy choroby, nebo pro stanovování cirkulujících nádorových buněk. Expres mamaglobinu může být použitelná pro stanovení kontaminace nádoru v kmenových buňkách periferní krve po přípravě pacienta cytokiny (Passos-Coelho et al., J Clin Oncol 14:2569-2575, 1996) nebo při kontrole purgingu (Passos-Coelho et al., Cancer Res 54:2366-2371, 1994).

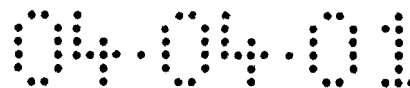
V souvislosti s uvedeným je třeba říci, že navrhovaný vynález popisuje řadu výhod.

U výše uvedených technik a postupů je možné použít řadu variant a kombinací, aniž by byl překročen rámec navrhovaného vynálezu a je třeba mít na paměti, že výše uvedené postupy a kresby jsou uvedeny pouze pro ilustraci a není je možno brát jako limit.

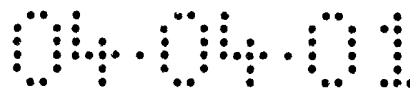
Všechny uvedené citace jsou zde uvedeny jako reference. Diskutované reference jsou uváděny pro shrnutí a zvýraznění výhod které přináší navrhovaný vynález proti současnému stavu techniky. Aplikant si vyhrazuje právo zpochybnit přesnost a věcnost uvedených referencí.

**PATENTOVÉ NÁROKY**

1. Způsob detekce přítomnosti buněk rakoviny prsu u pacientů, vyznačující se tím, že zahrnuje detekci přítomnosti mRNA kódující polypeptid mamaglobin ve vzorku z pacientů, kde mRNA specificky hybridizuje se sekvencí č.15 nebo sekvencí komplementární k sekvenci č. 15 a kde zvýšená koncentrace této mRNA vzhledem ke koncentraci u zdravých jedinců je známkou přítomnosti buněk rakoviny prsu.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že dále zahrnuje:
  - (a) přípravu polynukleotidu, který specificky hybridizuje s sekvencí č. 15,
  - (b) inkubaci polynukleotidu se vzorkem za podmínek kdy tento polynukleotid může specificky hybridizovat s mRNA z buněk rakoviny prsu,
  - (c) detekci přítomnosti hybridizovaného komplexu polynukleotid - mRNA.
3. Způsob podle nároku 2, vyznačující se tím, že polynukleotid obsahuje sekvenci komplementární k sekvenci č. 15 nebo její fragment.
4. Způsob podle nároku 3, vyznačující se tím, že polynukleotid je cDNA kódující polypeptid mamaglobin obsahující aminokyselinovou sekvenci č. 2.
5. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že vzorky obsahují tkáň z lymfatických uzlin.
6. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že detekční postup dále zahrnuje:
  - (a) přípravu cDNA kódující polypeptid mamaglobin z mRNA za použití techniky zpětného přepisu,
  - (b) přípravu dvou oligonukleotidů, které specificky hybridizují s cDNA v definované oblasti cDNA, která má být amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí, přičemž jeden oligonukleotid hybridizuje za přísných podmínek se sekvencí č. 1 a druhý oligonukleotid hybridizuje za přísných podmínek se sekvencí komplementární k sekvenci č. 1,
  - (c) amplifikaci části cDNA pomocí polymerázové řetězové reakce, za použití těchto dvou oligonukleotidů jako primerů,
  - (d) detekce přítomnosti amplifikované oblasti cDNA.
7. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že jeden z těchto dvou oligonukleotidů obsahuje sekvenci č. 4 a druhý oligonukleotid obsahuje sekvenci č. 16.



8. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že vzorek obsahuje leukocyty z periferní krve.
9. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že detekční postup dále zahrnuje:
  - (a) amplifikaci cílové oblasti mRNA kódující mamaglobin pomocí ligázové řetězové reakce s asymetrickými přerušeními
  - (b) detekce přítomnost amplifikované cílové oblasti.
10. Kit pro detekci buněk rakoviny prsu ve vzorku, vyznačující se tím, že obsahuje dva nukleotidy jako primery pro polymerázovou řetězovou reakci zabalené v nádobách, kde tyto oligonukleotidy specificky hybridizují s cDNA kódující sekvenci č. 2, tak že vymezují region, který má být amplifikován.
11. Kit podle nároku 10, vyznačující se tím, že tyto oligonukleotidy obsahují sekvenci č. 4 a druhý obsahuje sekvenci č. 16.
12. Způsob detekce přítomnosti rakoviny prsu u pacienta, vyznačující se tím, že zahrnuje detekci přítomnosti polypeptidu mamaglobinu ve vzorku z pacienta, kde zvýšená koncentrace peptidu mamaglobinu vzhledem ke koncentraci u zdravých jedinců je známkou přítomnosti rakoviny prsu.
13. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že detekční postup dále zahrnuje reakci polypeptidu mamaglobinu s přečištěnou protilátkou a detekci vazby polypeptidu mamaglobinu s touto protilátkou, přičemž tato protilátka je specifická pro epitop mamaglobinu obsahující alespoň 5 aminokyselin ze sekvence č. 17.
14. Způsob podle nároku 13, vyznačující se tím, že polypeptid mamaglobin obsahuje sekvenci č. 17.
15. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že přečištěná protilátka je polyklonální protilátka a epitop mamaglobinu obsahuje sekvenci č. 14.
16. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že přečištěná protilátka je monoklonální protilátka a epitop mamaglobinu obsahuje sekvenci č. 14.
17. Způsob podle nároku 13, vyznačující se tím, že vzorek obsahuje tkáň z nádoru prsu.
18. Kit pro detekci buněk rakoviny prsu ve vzorku, vyznačující se tím, že obsahuje přečištěnou protilátka zabalenou v nádobě, kdy tato protilátka je specifická pro epitop



mamaglobinu obsahující alespoň 5 aminokyselin ze sekvence č. 2 a kde tato protilátka reaguje s polypeptidem mamaglobinem obsahujícím sekvenci č. 17 nebo její alelickou variantu.

19. Kit podle nároku 18, vyznačující se tím, že epitop mamaglobinu obsahuje sekvenci č. 14.
20. Způsob detekce přítomnosti rakoviny dělohy u pacientů, vyznačující se tím, že zahrnuje detekci exprese mamaglobinu ve vzorku tkáně dělohy z pacienta.
21. Způsob detekce buněk rakoviny dělohy u pacientů, vyznačující se tím, že zahrnuje detekci přítomnosti mRNA kódující polypeptid mamaglobin ve vzorku tkáně z dělohy nebo asociované lymfoidní tkáně z pacienta, kde zvýšená koncentrace této mRNA vzhledem ke koncentraci u zdravých jedinců je známkou přítomnosti buněk rakoviny dělohy.
22. Způsob detekce buněk rakoviny dělohy u pacientů, kteří mají nebo měli rakovinu dělohy vyznačující se tím, že zahrnuje detekci přítomnosti mRNA kódující polypeptid mamaglobin ve vzorku tkáně z pacienta, kde zvýšená koncentrace této mRNA, vzhledem ke koncentraci u zdravých jedinců, je známkou přítomnosti buněk rakoviny dělohy.
23. Způsob detekce buněk rakoviny dělohy u pacientů, vyznačující se tím, že zahrnuje detekci přítomnosti polypeptidu mamaglobinu ve vzorku tkáně z dělohy nebo asociované lymfoidní tkáně z pacienta, kde zvýšená koncentrace polypeptidu mamaglobinu vzhledem ke koncentraci u zdravých jedinců je známkou přítomnosti rakoviny dělohy.
24. Způsob detekce buněk rakoviny dělohy u pacientů, kteří mají nebo měli rakovinu dělohy vyznačující se tím, že zahrnuje detekci přítomnosti polypeptidu mamaglobinu ve vzorku tkáně z pacienta, kde zvýšená koncentrace polypeptidu mamaglobinu, vzhledem ke koncentraci u zdravých jedinců, je známkou přítomnosti rakoviny dělohy.
25. Způsob detekce buněk rakoviny prsu u pacientů, vyznačující se tím, že zahrnuje detekci přítomnosti mRNA kódující polypeptid mamaglobin ve vzorku tkáně z pacienta, kde zvýšená koncentrace této mRNA vzhledem ke koncentraci u zdravých jedinců je známkou přítomnosti buněk rakoviny dělohy a kde tento způsob umožňuje detekci přítomnosti zvýšené koncentrace této mRNA v alespoň 43 % vzorků z pacientů majících rakovinu prsu.
26. Způsob podle nároku 25, vyznačující se tím, že umožňuje detekci přítomnosti zvýšené koncentrace této mRNA v alespoň 60 % vzorků z pacientů majících rakovinu prsu.

VÝPIS SEKVENCÍ

<110> WATSON, MARK A  
FLEMING, TIMOTHY P

<120> Způsob detekce přítomnosti rakoviny prsu a detekční kit

<130> 6029-5134

<140>

<141>

<150> 08/933,149

<151> 1997-09-18

<150> PCT/US96/08235

<151> 1996-05-31

<150> 08/455,896

<151> 1995-05-31

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 503

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1  
gacagcggct tccttgatcc ttgccaccgg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc 60  
atgaagttgc tgatggctcc catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct 120  
ggctgcccct tattggagaa tgtgattcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact 180  
gaatacaaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat 240  
gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtggtt 300  
atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg 360  
gctcacagaa ctgcagggta tggtgagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt 420  
ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg 480  
tttatttttaa taaattgatg gca 503

<210> 2

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Lys	Leu	Leu	Met	Val	Leu	Met	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Gln	His	Cys
1				5					10					15	
Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Cys	Pro	Leu	Leu	Glu	Asn	Val	Ile	Ser	Lys	Thr
		20						25					30		
Ile	Asn	Pro	Gln	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Tyr	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Glu
		35					40					45			
Phe	Ile	Asp	Asp	Asn	Ala	Thr	Thr	Asn	Ala	Ile	Asp	Glu	Leu	Lys	Glu
	50					55					60				
Cys	Phe	Leu	Asn	Gln	Thr	Asp	Glu	Thr	Leu	Ser	Asn	Val	Glu	Val	Phe
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu	Cys	Asp	Leu	Phe			
				85						90					



<210> 3  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 3  
 cagcggcttc cttgacccct g 21

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 4  
 ataagaaaga gaaggtgtgg 20

<210> 5  
 <211> 403  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 gacagcggct tccttgatcc ttgccaccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc 60  
 atgaagttgc tgatggctcct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct 120  
 ggctgcccct tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact 180  
 gaatacaaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat 240  
 gaattgaagg aatgttttct taaccaaagc gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtgttt 300  
 atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg 360  
 gctcacagaa ctgcagggta tggtagaaaa ccaactacgg att 403

<210> 6  
 <211> 206  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 tttatgcaat taatatatga cagcagtctt tgtgatttat tttactttc tgcaagacct 60  
 ttggctcaca gaactgcagg gtatggtagg aaaccaacta cggattgctg caaaccacac 120  
 cttctctttc ttatgtcttt ttactacaaa ctacaagaca attggtgaaa cctgctatac 180  
 atgtttattt taataaattg atggca 206

<210> 7  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 Met Lys Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Val Thr Ile Pro Ile Cys Cys  
 1 5 10 15  
 Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Cys Ser Ile Leu Asp Glu Val Ile Arg Gly  
 20 25 30  
 Thr Ile Asn Ser Thr Val Thr Leu His Asp Tyr Met Lys Leu Val Lys  
 35 40 45  
 Pro Tyr Val Gln Asp His Phe Thr Glu Lys Ala Val Lys Gln Phe Lys  
 50 55 60



Gln Cys Phe Leu Asp Gln Thr Asp Lys Thr Leu Glu Asn Val Gly Val  
65 70 75 80

Met Met Glu Ala Ile Phe Asn Ser Glu Ser Cys Gln Gln Pro Ser  
85 90 95

<210> 8  
<211> 91  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Met Lys Leu Ala Val Thr Leu Thr Leu Val Thr Leu Ala Leu Cys Cys  
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Ala Glu Ile Cys Pro Ser Phe Gln Arg Val Ile Glu  
20 25 30

Thr Leu Leu Met Asp Thr Pro Ser Ser Tyr Glu Ala Ala Met Glu Leu  
35 40 45

Phe Ser Pro Asp Gln Asp Met Arg Glu Ala Gly Ala Gln Leu Lys Lys  
50 55 60

Leu Val Asp Thr Leu Pro Gln Lys Pro Arg Glu Ser Ile Ile Lys Leu  
65 70 75 80

Met Glu Lys Ile Ala Gln Ser Ser Leu Cys Asn  
85 90

<210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Umělá sekvence

<220>  
<223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 9  
cacgaattca ctatcgattc tggaaccttc agagg 35

<210> 10  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Umělá sekvence

<220>  
<223> Popis umělé sekvence: syntetická

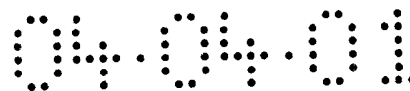
<400> 10  
ctgggtcggc ccacctctga aggttccaga atcगतag 38

<210> 11  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Umělá sekvence

<220>  
<223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 11  
aatccgtagt tggtttctca cc 22

<210> 12



<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 12  
 ctttctgcaa gacctttggc 20

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 13  
 tttttttttt tttttttttt t 21

<210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 14  
 Glu Val Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe  
 1 5 10 15

<210> 15  
 <211> 279  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 15  
 atgaagttgc t gatggctct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct 60  
 ggctgcccct tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact 120  
 gaatacaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat 180  
 gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgagggtgtt 240  
 atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gattttatt 279

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

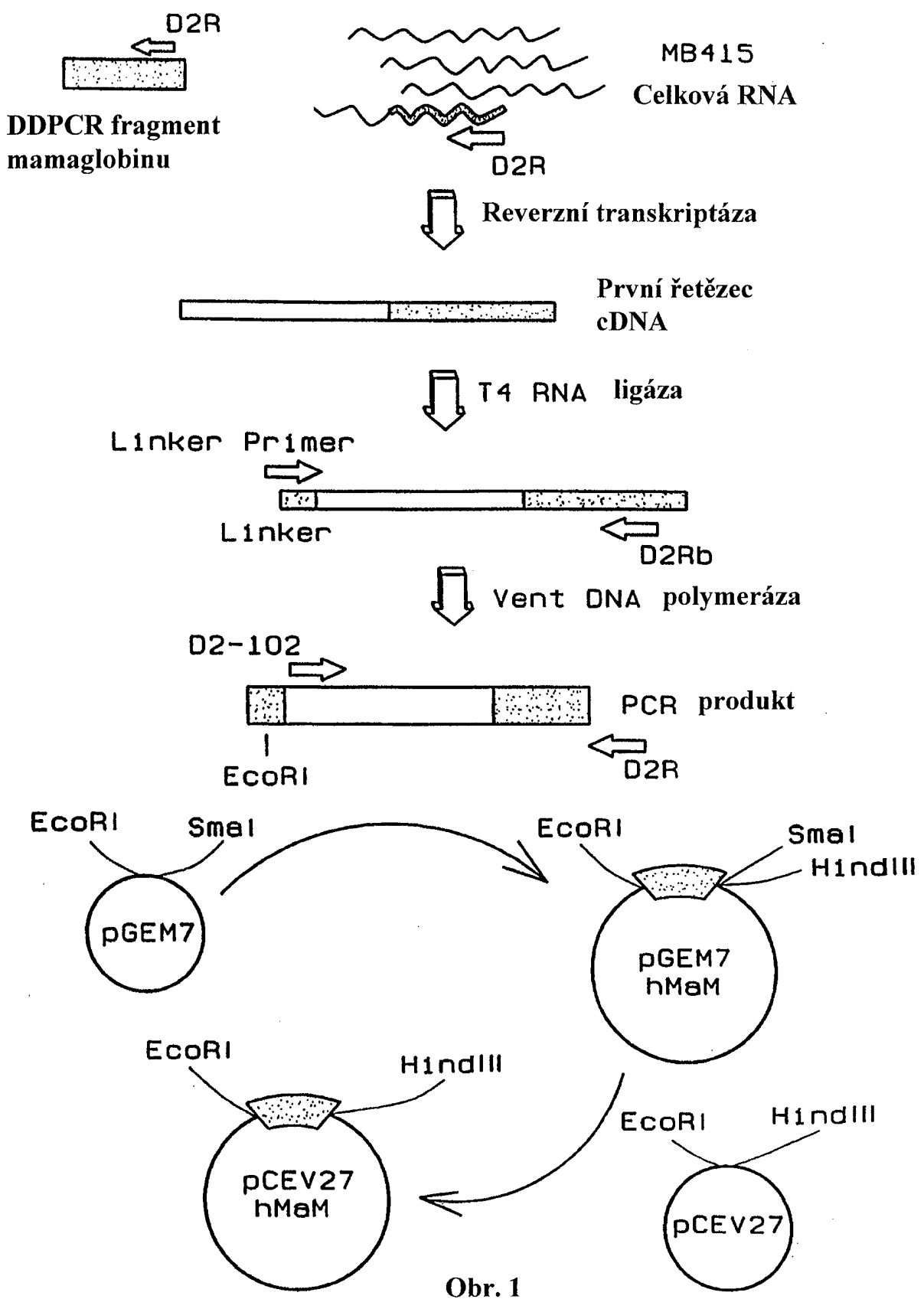
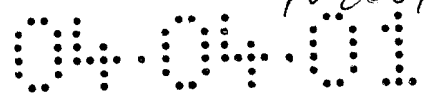
<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: syntetická

<400> 16  
 agcactgcta cgcaggctct 20

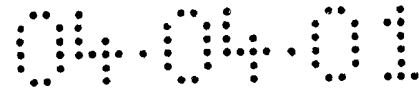
<210> 17  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17  
 Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr Ile Asn Pro  
 1 5 10 15





Obr. 1



	9	18	27	36	45	54												
5'	GAC	AGC	GGC	TTC	CTT	GAT	CCT	TGC	CAC	CCG	CGA	CTG	AAC	ACC	GAC	AGC	AGC	
	63	72	81	90	99	108												
	CTC	ACC	ATG	AAG	TTG	CTG	ATG	GTC	CTC	ATG	CTG	GCG	GCC	CTC	TCC	CAG	CAC	TGC
	Met	Lys	Leu	Leu	Met	Val	Leu	Met	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Gln	His	Cys		
	1									10								
	117	126	135	144	153	162												
	TAC	GCA	GGC	TCT	GGC	TGC	CCC	TTA	TTG	GAG	AAT	GTG	ATT	TCC	AAG	ACA	ATC	AAT
	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Cys	Pro	Leu	Leu	Glu	Asn	Val	Ile	Ser	Lys	Thr	Ile	Asn
			20										30					
	171	180	189	198	207	216												
	CCA	CAA	GTG	TCT	AAG	ACT	GAA	TAC	AAA	GAA	CTT	CTT	CAA	GAG	TTC	ATA	GAC	GAC
	Pro	Gln	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Tyr	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asp	Asp
					40											50		
	225	234	243	252	261	270												
	AAT	GCC	ACT	ACA	AAT	GCC	ATA	GAT	GAA	TTG	AAG	GAA	TGT	TTT	CTT	AAC	CAA	ACG
	Asn	Ala	Thr	Thr	Asn	Ala	Ile	Asp	Glu	Leu	Lys	Glu	Cys	Phe	Leu	Asn	Gln	Thr
							60											70
	279	288	297	306	315	324												
	GAT	GAA	ACT	CTG	AGC	AAT	GTT	GAG	GTG	TTT	ATG	CAA	TTA	ATA	TAT	GAC	AGC	AGT
	Asp	Glu	Thr	Leu	Ser	Asn	Val	Glu	Val	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ser	Ser
										80								
	333	342	351	360	369	378												
	CTT	TGT	GAT	TTA	TTT	TAA	CTT	TCT	GCA	AGA	CCT	TTG	GCT	CAC	AGA	ACT	GCA	GGG
	Leu	Cys	Asp	Leu	Phe	***												
	90																	
	387	396	405	414	423	432												
	TAT	GGT	GAG	AAA	CCA	ACT	ACG	GAT	TGC	TGC	AAA	CCA	CAC	CTT	CTC	TTT	CTT	ATG
	441	450	459	468	477	486												
	TCT	TTT	TAC	TAC	AAA	CTA	CAA	GAC	AAT	TGT	TGA	AAC	CTG	CTA	TAC	ATG	TTT	ATT
	495																	
	TTA	ATA	AAT	TGA	TGG	CA	3'											

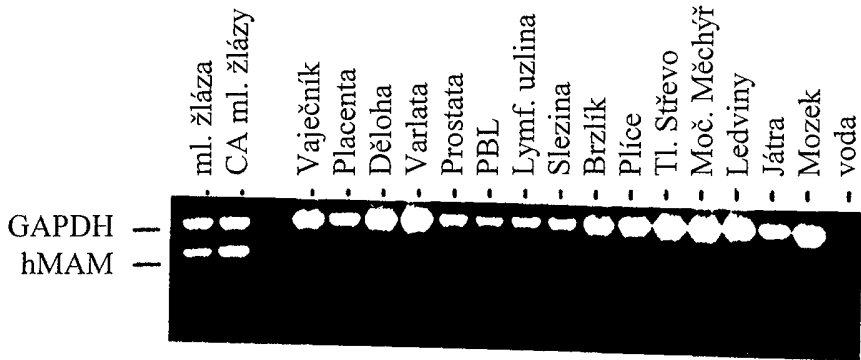


Obr. 4A

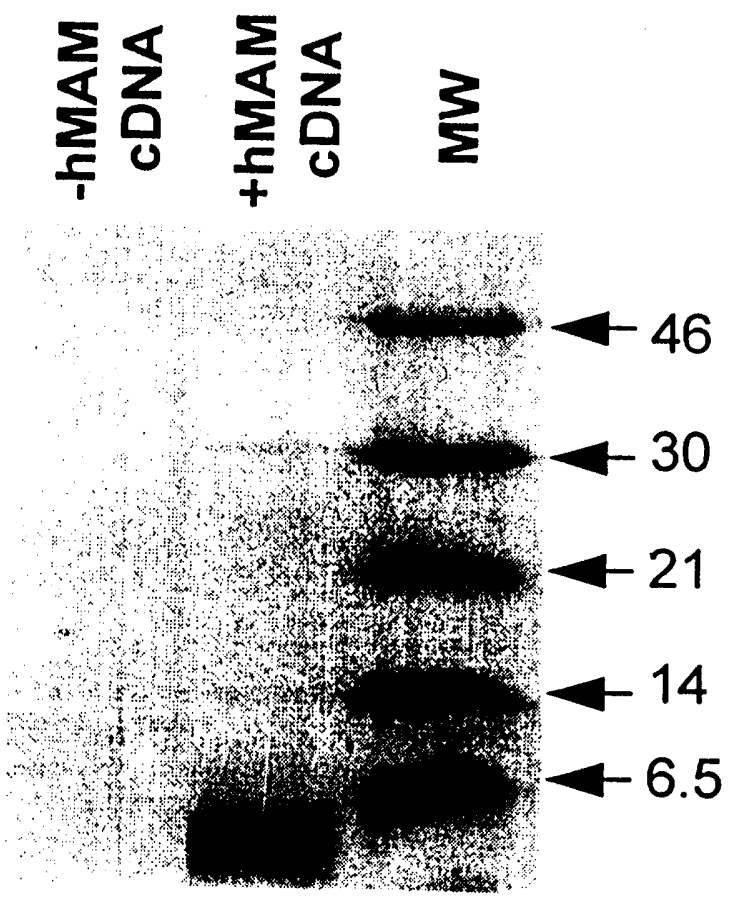
- Vaječník
- Děloha
- Placenta
- Plíce
- B5-589
- ml. žláza
- CA ml. žlázy



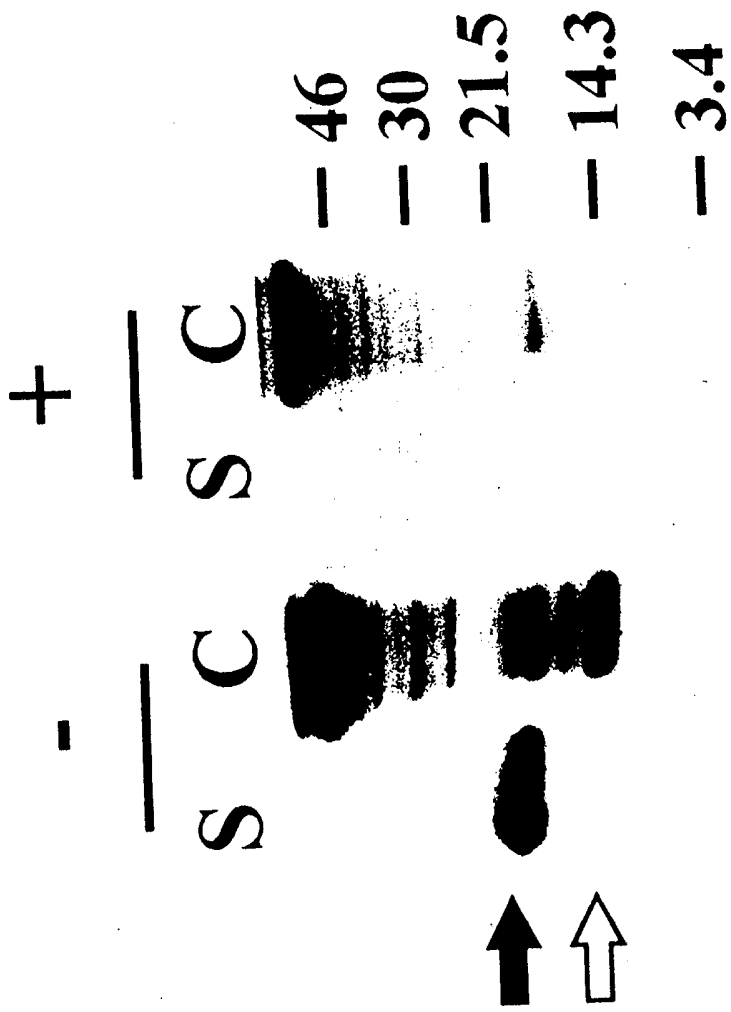
Obr. 4B



04.04.01

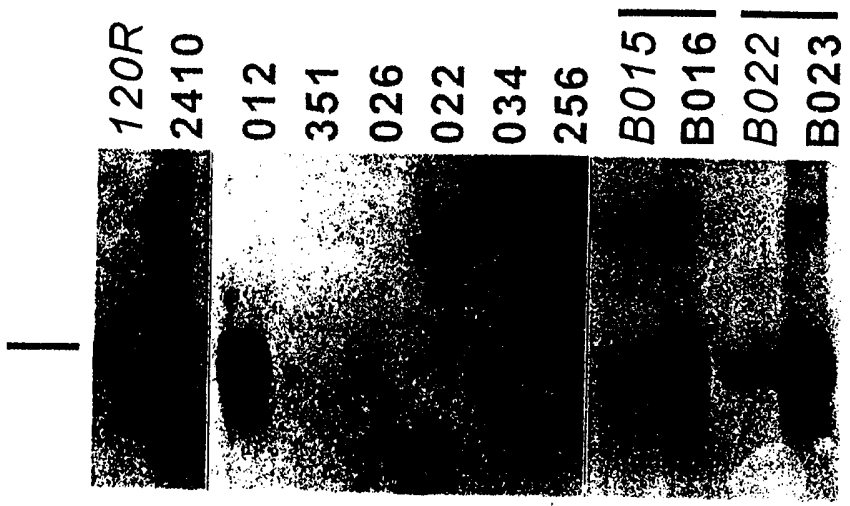


Obr. 5



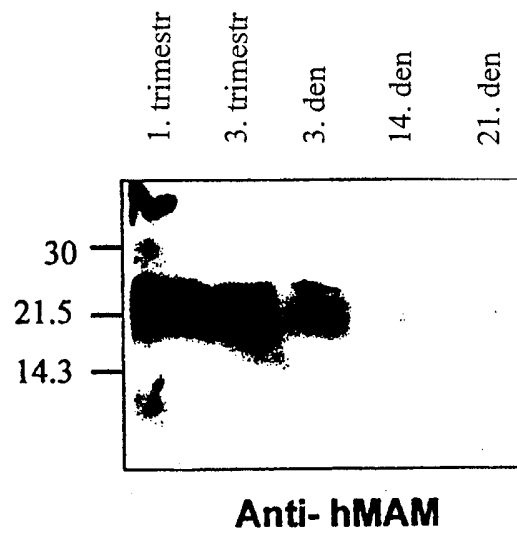
Obr. 7

04.04.01



Obr. 6

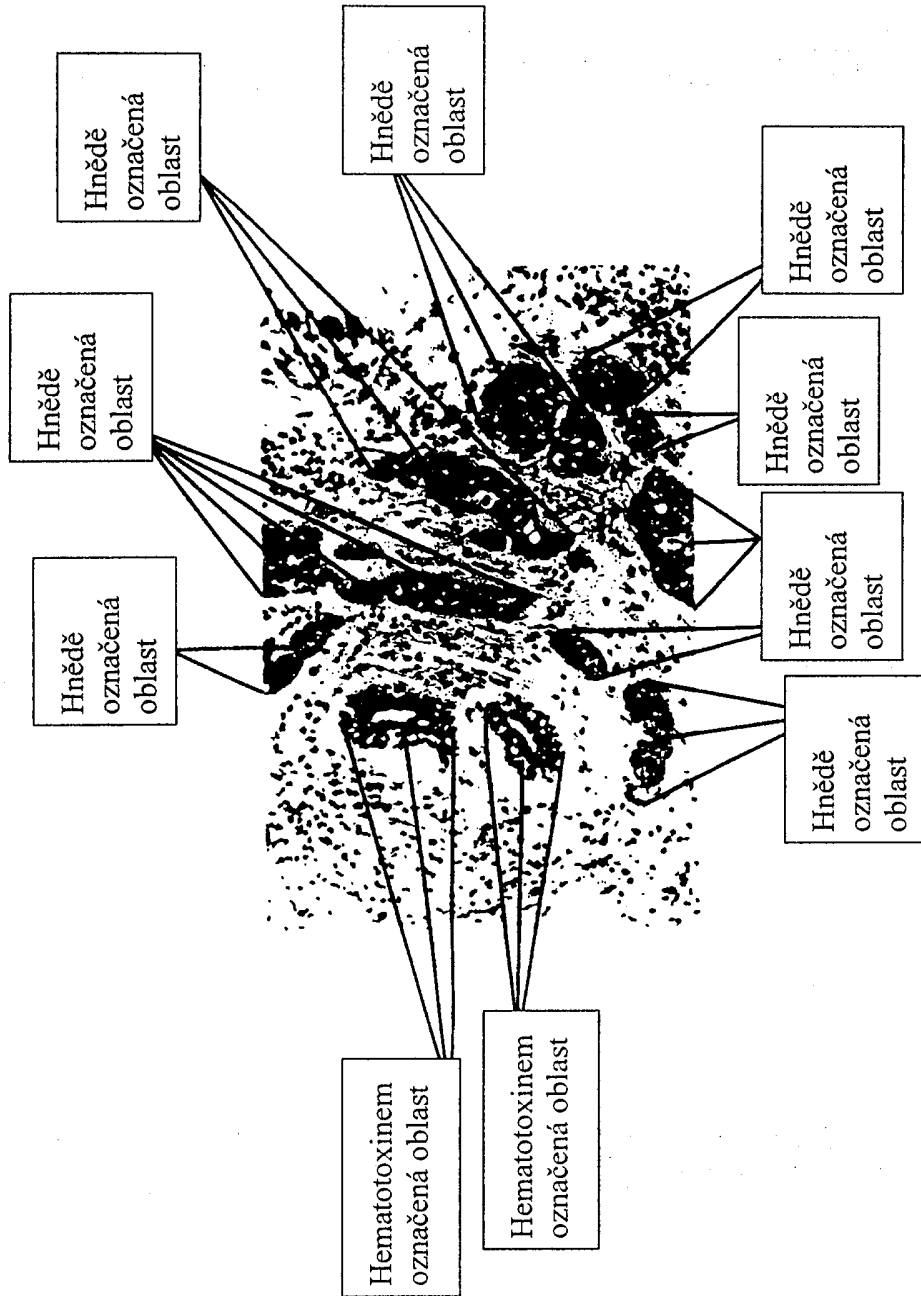
**Mamaglobin je sekretovaný buňkami  
proliferující mléčné žlázy**



**Obr. 10**



Obr. 11A



Obr. 11B



Obr. 12A

b



Obr. 12B



Obr. 12D

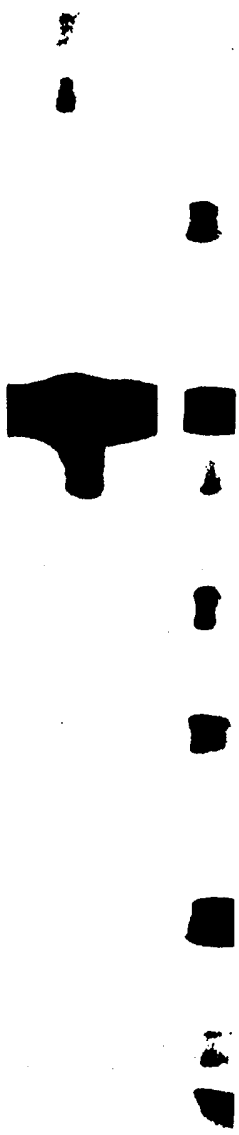


Obr. 12E

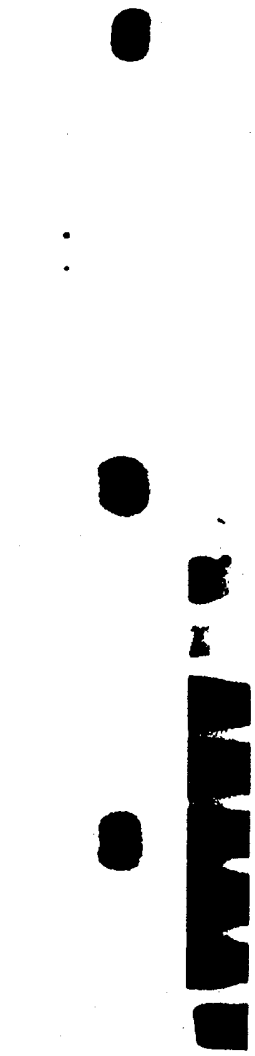


Obr. 12F

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34



Obr. 13

