(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2010-537671

(P2010-537671A)

(43)公表日　平成22年12月9日(2010.12.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4B064
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	4B065
A01K 67/027	(2006.01)	A01K	67/027		4C084
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102	4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 163 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-524202 (P2010-524202)
(86)(22)出願日　平成20年9月5日 (2008.9.5)
(85)翻訳文提出日　平成22年4月27日 (2010.4.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/075488
(87)国際公開番号　WO2009/033094
(87)国際公開日　平成21年3月12日 (2009.3.12)
(31)優先権主張番号　61/190,034
(32)優先日　平成19年9月7日 (2007.9.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2007/077942
(32)優先日　平成19年9月7日 (2007.9.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500553659
アジェンシス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９０４０４，　サンタ　モニカ，　コロラド　ブールバード　２２２５
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】２４Ｐ４Ｃ１２タンパク質に結合する抗体および関連分子

(57)【要約】
24P4C12タンパク質に結合する抗体およびその抗体に由来する分子、ならびにその変異体が記載され、ここで、24P4C12は、正常な成体組織において組織特異的発現を示し、表Iに列挙した癌において異常に発現される。結果として、24P4C12は、癌の診断標的、予後標的、予防標的および/または治療標的を提供する。24P4C12遺伝子もしくはそのフラグメント、あるいはそのコードされているタンパク質、またはその変異体、またはそのフラグメントは、体液性免疫反応または細胞性免疫反応を誘発するために使用することができる。24P4C12と反応性の抗体またはT細胞は、能動免疫または受動免疫において使用することができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
24P4C12 タンパク質(SEQ ID NO:)に特異的に結合する抗原結合部位を含む、抗体またはそのフラグメント(SEQ ID NO:)。
【請求項２】
モノクローナル抗体である、請求項1記載の抗体またはフラグメント。
【請求項３】
A.T.C.C.アクセッション番号:＿＿＿＿＿が割り当てられている、請求項2記載の抗体またはフラグメント。
【請求項４】
A.T.C.C.アクセッション番号:＿＿＿＿＿が割り当てられている、請求項2記載の抗体またはフラグメント。
【請求項５】
モノクローナル抗体がヒト化抗体である、請求項2記載の抗体またはフラグメント。
【請求項６】
フラグメントがFab、$F(ab')_2$、Fv、またはSfvフラグメントである、請求項1記載の抗体またはフラグメント。
【請求項７】
完全ヒト抗体である、請求項1記載の抗体またはフラグメント。
【請求項８】
抗原結合部位がマウス抗原結合ドメインである、請求項1記載の抗体またはフラグメント。
【請求項９】
組換えにより作製された、請求項1記載の抗体またはフラグメント。
【請求項１０】
組換えタンパク質が抗原結合領域を含む、請求項9記載の抗体またはフラグメント。
【請求項１１】
検出可能なマーカー、毒素、治療剤、または化学療法剤にカップリングされている、請求項1記載の抗体またはフラグメント。
【請求項１２】
検出可能なマーカーが、放射性同位体、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物である、請求項11記載の抗体またはフラグメント。
【請求項１３】
放射性同位体が、^{212}Bi、^{131}I、^{131}In、^{90}Y、^{186}Re、^{211}At、^{125}I、^{188}Re、^{153}Sm、^{213}Bi、^{32}P、またはLuを含む、請求項12記載の抗体またはフラグメント。
【請求項１４】
毒素が、リシン、リシンA鎖、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイタンシノイド、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン、ジフテリア毒素、シュードモナス属(Pseudomonas)外毒素(PE)A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、αサルシン、ゲロニン、マイトジェリン、レトストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、キュリシン、クロチン、カリケアマイシン、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、糖質コルチコイド、アウリスタチン、アウロマイシン、イットリウム、ビスマス、コンブレスタチン、デュオカルマイシン、ドロスタチン、cc1065、またはシスプラチンを含む、請求項11に記載の抗体またはフラグメント。
【請求項１５】
抗原結合部位が、図2のタンパク質(SEQ ID NO:)のアミノ酸の中にあるエピトープに特異的に結合する、請求項1記載の抗体またはフラグメント。
【請求項１６】

請求項2記載のモノクローナル抗体を産生する、トランスジェニック動物。
【請求項１７】
請求項2記載のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ。
【請求項１８】
請求項2記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター。
【請求項１９】
重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む単鎖である、請求項18記載のベクター。
【請求項２０】
請求項1記載の抗体またはフラグメントをヒト用単位剤形で含む、薬学的組成物。
【請求項２１】
生物学的サンプル中の24P4C12タンパク質の存在を検出するためのアッセイであって、以下の工程を含むアッセイ:
サンプルと請求項1記載の抗体を接触させる工程、および
サンプル中の24P4C12タンパク質(SEQ ID NO:)の結合を検出する工程。
【請求項２２】
被験体において、24P4C12(SEQ ID NO:)を発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、以下の工程を含む方法:
24P4C12タンパク質(SEQ ID NO:)に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む単鎖モノクローナル抗体をコードするベクターが、単鎖モノクローナル抗体をコードする配列を癌細胞に送達し、かつコードされている単鎖抗体が癌細胞内で発現されるように、ベクターを被験体に投与する工程。
【請求項２３】
細胞傷害薬剤または診断剤を、24P4C12タンパク質(SEQ ID NO:)を発現する細胞に送達する方法であって、以下の工程を含む方法:
請求項1記載の抗体またはフラグメントに結合体化された細胞傷害薬剤または診断剤を提供して、抗体薬剤結合体またはフラグメント薬剤結合体を形成する工程;および
細胞を抗体薬剤結合体またはフラグメント薬剤結合体に曝露する工程。
【請求項２４】
細胞傷害剤または診断剤が、検出可能なマーカー、毒素、および治療剤からなる群より選択される、請求項23記載の方法。
【請求項２５】
検出可能なマーカーが、放射性同位体、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物である、請求項24記載の方法。
【請求項２６】
放射性同位体が、^{212}Bi、^{131}I、^{131}In、^{90}Y、^{186}Re、^{211}At、^{125}I、^{188}Re、^{153}Sm、^{213}Bi、^{32}P、またはLuを含む、請求項25記載の方法。
【請求項２７】
毒素が、リシン、リシンA鎖、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイタンシノイド、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン、ジフテリア毒素、シュードモナス属外毒素(PE)A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、αサルシン、ゲロニン、マイトジェリン、レトストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、キュリシン、クロチン、カリケアマイシン、サパオナリア・オフィシナリスインヒビター、糖質コルチコイド、アウリスタチン、アウロマイシン、イットリウム、ビスマス、コンブレスタチン、デュオカルマイシン、ドロスタチン、cc1065、またはシスプラチンを含む、請求項24記載の方法。
【請求項２８】
生物学的サンプル中の24P4C12タンパク質(SEQ ID NO:)を検出する方法であって、以下の工程を含む方法:
生物学的サンプルおよびコントロールサンプルを提供する工程;

生物学的サンプルおよびコントロールサンプルと、24P4C12タンパク質に特異的に結合する請求項1記載の抗体を接触させる工程;ならびに
生物学的サンプルおよびコントロールサンプル中に存在する24P4C12タンパク質および抗体を含む物質の複合体の量を求める工程。
【請求項２９】
表Iに列挙した癌を有する、または表Iに列挙した癌を有すると疑われる患者から生物学的サンプルおよびコントロールサンプルを採取する工程をさらに含む、請求項28記載の方法。
【請求項３０】
図2に示したタンパク質をコードする核酸またはその部分配列に対応する24P4C12 siRNA(二本鎖RNA)を含む組成物であって、該部分配列は長さが19、20、21、22、23、24、もしくは25個の連続したRNAヌクレオチドであり、かつmRNAコード配列の少なくとも一部に対して相補的な配列および非相補的な配列を含む、組成物。
【請求項３１】
細胞増殖を調節する分子を同定する方法であって、以下の工程を含む方法、
(a)
(i)SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列;
(ii)図3に示したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列;
(iii)図3に示したアミノ酸配列と90%またはそれ以上同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列;および
(iv)(i)、(ii)、または(iii)のヌクレオチド配列のフラグメント
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む系に、核酸を含む分子を導入する工程、あるいは
(i)、(ii)、(iii)、もしくは(iv)のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質を含む系に、試験分子を導入する工程;ならびに
(b)該分子とヌクレオチド配列またはタンパク質との間の相互作用の存在または非存在を確かめる工程であって、該分子とヌクレオチド配列またはタンパク質との間の相互作用が存在することによって、細胞増殖を調節する分子として該分子が同定される、工程。
【請求項３２】
系がインビボである、請求項31記載の方法。
【請求項３３】
系がインビトロである、請求項31記載の方法。
【請求項３４】
分子が、(i)、(ii)、(iii)、または(iv)のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質に特異的に結合する抗体または抗体フラグメントを含む、請求項31記載の方法。
【請求項３５】
分子が、図2に示したタンパク質をコードする核酸またはその部分配列に対応する24P4C12 siRNA(二本鎖RNA)を含む組成物であり、該部分配列は長さが19、20、21、22、23、24、もしくは25個の連続したRNAヌクレオチドであり、かつmRNAコード配列の少なくとも一部に対して相補的な配列および非相補的な配列を含む、請求項31記載の方法。
【請求項３６】
請求項31記載の方法によって同定された分子を、癌と診断された被験体に投与する工程を含み、それにより、該分子は被験体において癌を阻害するか、または遅らせる、被験体において癌を処置する方法。
【請求項３７】
癌が、表Iに示した癌のセットである、請求項36記載の方法。
【請求項３８】
表Iに列挙した癌を処置するための治療剤を同定する方法であって、以下の工程を含む方法、
(a)

(i)SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列;
(ii)図3に示したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列;
(iii)図3に示したアミノ酸配列と90％またはそれ以上同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列;および
(iv)(i)、(ii)、または(iii)のヌクレオチド配列のフラグメント
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸を含む系に、分子を導入する工程、あるいは
(i)、(ii)、(iii)、または(iv)のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質を含む系に、試験分子を導入する工程;ならびに
(b)該分子とヌクレオチド配列またはタンパク質との間の相互作用の存在または非存在を確かめる工程であって、該分子とヌクレオチド配列またはタンパク質との間の相互作用が存在することによって、表Iに列挙した組織の癌を処置するための治療剤として該分子が同定される、工程。

【請求項３９】
系がインビトロである、請求項38記載の方法。

【請求項４０】
系がインビボである、請求項38記載の方法。

【請求項４１】
分子が、(i)、(ii)、(iii)、または(iv)のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質に特異的に結合する抗体または抗体フラグメントを含む、請求項38記載の方法。

【請求項４２】
分子が、図2に示したタンパク質をコードする核酸またはその部分配列に対応する24P4C12 siRNA(二本鎖RNA)を含む組成物であり、該部分配列は長さが19、20、21、22、23、24、もしくは25個の連続したRNAヌクレオチドであり、かつmRNAコード配列の少なくとも一部に対して相補的な配列および非相補的な配列を含む、請求項38記載の方法。

【請求項４３】
請求項38記載の方法によって同定された分子を、癌と診断された被験体に投与する工程を含み、それにより、該分子は被験体において癌を阻害するか、または遅らせる、被験体において癌を処置する方法。

【請求項４４】
癌が、表Iに示した癌のセットである、請求項43記載の方法。

【請求項４５】
有効量の、24P4C12(SEQ ID NO:)に特異的に結合するモノクローナル抗体(SEQ ID NO:)および放射線の組み合わせにより哺乳動物を処置する工程を含む、哺乳動物において腫瘍増殖を低減させる方法。

【請求項４６】
有効量の、24P4C12(SEQ ID NO:)に特異的に結合するモノクローナル抗体(SEQ ID NO:)と化学療法剤との組み合わせにより哺乳動物を処置する工程を含む、哺乳動物において腫瘍増殖を低減させる方法。

【請求項４７】
有効量の、24P4C12(SEQ ID NO:)に特異的に結合するモノクローナル抗体(SEQ ID NO:)と薬物または生物学的に活性な療法との組み合わせにより哺乳動物を処置する工程を含む、哺乳動物において腫瘍増殖を低減させる方法。

【請求項４８】
24P4C12 タンパク質(SEQ ID NO:)低分子パートナーを同定する方法であって、以下の工程を含む方法:
(1)1つまたは複数のタイプの化合物のアレイを提供する工程であって、低分子のアレイは24P4C12タンパク質の生物学的機能を活性化または阻害することができる、工程;
(2)アレイと、関心対象の1つまたは複数の24P4C12タンパク質(SEQ ID NO:)を接触させる工程;および

(3)特定の低分子-24P4C12タンパク質パートナーの相互作用を確かめる工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本願は、2007年9月7日に出願された米国特許仮出願第61/190,034号および2007年9月7日に出願された国際特許出願PCT/US2007/077942の恩典を主張する。本願の内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【０００２】

連邦政府の支援による研究によってなされた発明に対する権利の記載

該当なし

【０００３】

EFS-WEBを介して提出された配列表の記載

本願は、MPEP 1730 II.B.2(a)(A)において認可され、示されているように、USPTO EFS-WEBサーバを介して電子出願されており、この電子出願は、電子的に提出された配列(SEQ ID)表を含む。この配列表の全内容は、全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる。配列表は、以下のように、電子出願されたテキストファイル上で特定される。

ファイル名	作成日	サイズ(バイト)
511582001131seqlist.txt	2008年9月5日	331,767バイト

【０００４】

発明の分野

本明細書に記載の本発明は、24P4C12と称されるタンパク質に結合する抗体、ならびにその結合フラグメントおよびそれから操作された分子に関する。本発明はさらに、24P4C12を発現する癌の処置において有用な、診断方法、予後方法、予防方法および治療方法、ならびに組成物に関する。

【背景技術】

【０００５】

発明の背景

癌は、冠動脈疾患に次いで第2の主要なヒトの死因である。世界中で、毎年何百万人もの人々が癌で亡くなっている。米国癌学会(American Cancer Society)によって報告されるように、米国内のみで、癌は、年間50万人を超える人々の死亡を引き起こし、1年に120万人を超える新規症例が診断されている。心疾患による死亡が大幅に減少している一方で、癌による死亡は概して増加している。次世紀の早い時期には、癌は第1の死因となることが予測される。

【０００６】

世界的に、幾種かの癌が主要な死因として際立っている。特に、肺、前立腺、乳房、結腸、膵臓、卵巣および膀胱の癌腫は、主要な癌死因である。これらおよび実質的に全ての他の癌腫は、共通の致死性の特徴を共有する。ほとんど例外なく、癌腫からの転移疾患は致命的である。さらに、原発性癌から初期段階で生き残った癌患者でさえ共通体験として人生が劇的に変化すると示されている。多くの癌患者は、再発もしくは処置の失敗の可能性の認識によって強い不安が駆り立てられる。多くの癌患者は、処置後の身体的衰弱を経験する。さらに、多くの癌患者は再発を経験する。

【０００７】

世界的に、前立腺癌は、男性において4番目に多い癌である。北米および北欧において、前立腺癌は、男性における圧倒的に最も一般的な癌であり、男性における第2の癌死因である。米国内のみで、年間30,000人を有に超える男性が、この疾患で死亡する。肺癌に次いで第2位である。これらの数値の大きさにもかかわらず、転移性前立腺癌の有効な処置は未だ存在しない。外科的前立腺切除、放射線治療、ホルモン除去(hormone ablation)治療、外科的去勢および化学療法が主要な処置様式であり続けている。残念なことに、こ

れらの処置は多くは有効でなく、しばしば、望ましくない結果を伴う。

【０００８】

診断の最前線において、初期段階の限局性腫瘍を正確に検出することができる前立腺腫瘍マーカーがないことは、依然として、疾患の診断および管理における深刻な制限である。血清前立腺特異的抗原(PSA)アッセイが非常に有用なツールであるが、しかし、その特異性および一般的有用性は、いくつかの重要な点を欠くと広くみなされている。

【０００９】

さらなる前立腺癌特異的マーカーの同定における進歩は、マウスにおいて疾患の異なった段階を再現可能な前立腺癌異種移植片を作製することによって改善されてきた。LAPC(Los Angeles Prostate Cancer)異種移植片は、重症複合型免疫不全(SCID)マウスにおける継代から生き残った前立腺癌異種移植片であり、アンドロゲン依存からアンドロゲン非依存への移行を模倣する能力を示している(Klein, et al., 1997 Nat. Med. 3:402(非特許文献1))。つい最近同定された前立腺癌マーカーには、PCTA-1(Su, et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252(非特許文献2))、前立腺特異的膜抗原(PSMA)(Pinto, et al., Clin. Cancer Res. 1996 Sep 2 (9):1445-1451(非特許文献3))、STEAP(Hubert, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999 Dec 7; 96(25):14523-14528(非特許文献4))、および前立腺幹細胞抗原(PSCA)(Reiter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998 95:1735(非特許文献5))が含まれる。

【００１０】

PSA、PSMA、PCTAおよび24P4C12などの以前に同定されているマーカーは、前立腺癌の診断および処置のための努力を促進してきたが、診断および治療のさらなる改善のために、前立腺癌および関連する癌のさらなるマーカーおよび治療標的の同定が必要とされている。2000年に米国において、推定130,200件の結腸直腸癌が、93,800件の結腸癌および36,400件の直腸癌を含めて発生した。

【００１１】

結腸直腸癌は、男性および女性において3番目によく見られる癌である。発症率は1992～1996年の間に大幅に低下した(年-2.1%)。研究から、これらの低下は、スクリーニングおよびポリープ除去が増加して、ポリープから浸潤癌への進行を防いだことによるものだと示唆されている。2000年には56,300人が死亡したと見積もられ(結腸癌により47,700人、直腸癌により8,600人)、これは、米国での癌死亡の約11%を占めている。

【００１２】

現在、外科手術は、結腸直腸癌および広がっていない癌の最も一般的な治療の形であり、治癒可能なことが多い。化学療法または化学療法＋放射線は、腸壁に深い穴が開いている癌またはリンパ節まで広がっている癌のあるほとんどの患者に対して、外科手術の前または後に行われる。永久的結腸瘻造設(身体廃棄物を排泄するための腹部開口部の作製)が結腸癌では時として必要であり、直腸癌ではめったに必要とされない。結腸直腸癌の有効な診断法および治療法が依然として必要とされている。

【００１３】

米国における癌の全ての新規症例の中で、膀胱癌は男性において約5%に相当し(5番目に多い新生物)、女性において3%に相当する(8番目に多い新生物)。発症率は、老齢人口が増加すると同時に、ゆっくりと増加している。1998年には、男性39,500件および女性15,000件を含めて推定54,500件の症例が存在した。米国における年齢調整した発症率は、男性について100,000人あたり32件、女性において100,000人あたり8件である。過去の男性/女性比は3:1であったが、これは、女性の喫煙傾向に関連して減少しているかもしれない。1998年に、膀胱癌で推定11,000件(7,800人は男性であり、3,900人は女性である)の死亡が存在した。膀胱癌の発症率および死亡率は年齢に伴って急激に増加し、人口がより高齢化するにつれて高まる問題である。

【００１４】

ほとんどの膀胱癌は膀胱において再発する。膀胱癌は、膀胱の経尿道的切除(TUR)と膀胱内の化学療法もしくは免疫治療との組み合わせによって管理される。膀胱癌の多病巣性

かつ再発性の性質はTURの限界を示す。ほとんどの筋肉浸潤癌はTURだけでは治癒しない。根治的膀胱切除および尿路変向は、癌を消滅させる最も有効な手段であるが、排尿機能および性機能に否定できない影響を有する。膀胱癌患者に有益な治療法が依然として極めて必要とされ続けている。

【００１５】

2000年に、肺癌および気管支癌の推定164,100件の新規症例が存在し、米国の全ての癌診断の14％に相当する。肺癌および気管支癌の発症率は、男性において、1984年に100,000人あたり86.5件の高さから、1996年に70.0件と大幅に低下している。1990年代に、女性における増加の速度が遅くなり始めた。1996年には、女性における発症率は100,000人あたり42.3件であった。

【００１６】

肺癌および気管支癌は、2000年に推定156,900件の死亡をもたらし、全ての癌死亡の28％に相当する。1992～1996年の間、肺癌の死亡率は、男性において大幅に低下した(年-1.7％)。一方で、女性の死亡率はなお大幅に増加していた(年0.9％)。1987年から毎年、40年以上にわたって女性の主要な癌死因であった乳癌よりも肺癌によって多くの女性が死亡している。肺癌の発症率および死亡率の減少は、ここ30年間にわたる喫煙率の低下に起因する可能性が最も高い。しかしながら、女性における喫煙傾向の減少は、男性におけるそれよりも大きく劣る。成人の煙草使用の低下は鈍化しているが、若年者における煙草使用が再び増加していることが懸念される。

【００１７】

肺癌および気管支癌についての処置選択肢は、癌のタイプおよび段階によって決定され、外科手術、放射線治療、および化学療法が含まれる。多くの限局性癌について、外科手術は、通常、選り抜きの処置である。疾患は、通常、発見された時までに拡散しているので、放射線治療および化学療法は、しばしば外科手術と組み合わされる必要がある。化学療法のみもしくは放射線と組み合わせた化学療法は、小細胞肺癌の選り抜きの処置である。このレジメンにおいて、患者の多くの割合は寛解を経験し、この寛解は場合によっては長く続く。しかし、肺癌および気管支癌に有効な処置および診断アプローチが必要とされ続けている。

【００１８】

推定182,800件の浸潤性乳癌の新規症例が、2000年に米国内の女性の間で発症したと予測された。さらに、約1,400件の乳癌の新規症例が、2000年に男性において診断されたと予測された。女性における乳癌発症率は、1980年代に年約4％増加した後、1990年代には100,000人あたり約110.6件まで低下した。

【００１９】

米国のみで、2000年に、乳癌に起因する推定41,200件の死亡(40,800件は女性、400件は男性)が存在した。乳癌は、女性における癌死亡の間で2番目のランクである。最も最近のデータによれば、死亡率は、白人および黒人の両方で、1992～1996年の間に大幅に低下しており、若い女性の間で最も大きく低下した。これらの低下は、おそらく、早期検出および処置の改善の結果であった。

【００２０】

医学的状況および患者の好みを考慮して、乳癌の処置は、ランペクトミー(腫瘍の局所的除去)および腕下のリンパ節の除去；乳房切除(乳房の外科的除去)および腕下のリンパ節の除去；放射線治療；化学療法；またはホルモン療法を伴うことがある。しばしば、2つまたは以上の方法が併用される。多くの研究から、初期段階の疾患について、ランペクトミー＋放射線治療の後の長期生存率は、非定型的乳房切除術の後の生存率と類似することが分かっている。再建技術の顕著な進歩は、乳房切除後の乳房再建についてのいくつかの選択肢を提供する。近年、このような再建は、乳房切除と同時になされている。

【００２１】

十分な量の周囲の正常乳房組織を伴う、非浸潤性乳管癌(DCIS)の局所的切除は、DCISの局所的再発を予防することができる。乳房への放射線および/またはタモキシフェンは、

残存する乳房組織におけるDCISの発症の確率を下げることができる。DCISが未処置のままである場合、浸潤性乳癌に発達することがあるので、このことは重要である。それにもかかわらず、これらの処置には、深刻な副作用または続発症が存在する。従って、有効な乳癌処置が必要とされている。

【００２２】

推定23,100件の卵巣癌の新規症例が、2000年に米国において存在した。これは、女性間での全ての癌の4％に相当し、婦人科癌の間で2番目のランクである。1992～1996年の間に、卵巣癌発症率は大幅に低下した。卵巣癌の結果として、2000年に、推定14,000人が死亡した。卵巣癌は、女性生殖系のいかなる他の癌よりも多くの死亡を引き起こす。

【００２３】

外科手術、放射線治療、および化学療法は、卵巣癌の処置の選択肢である。外科手術は、通常、1つもしくは両方の卵巣、ファロピウス管の除去(卵管卵巣摘出)、ならびに子宮の除去(子宮摘出)を含む。いくつかの非常に初期の腫瘍において、特に子供を持つことを望む若い女性においては、関与する卵巣のみを除去する。進行疾患においては、全ての腹内疾患を除去して、化学療法の効果を高める試みが行われる。卵巣癌についての有効な処置選択肢の重要な必要性が、存在し続ける。

【００２４】

2000年に、推定28,300件の新規の膵臓癌の症例が米国において存在した。過去20年間にわたって、膵臓癌の割合は男性において低下している。女性における割合はおよそ一定にとどまっているが、低下し始めているかもしれない。膵臓癌は、2000年に米国内において、推定28,200件の死亡を引き起こした。過去20年にわたって、男性における死亡率はわずかではあるが有意に低下し(年に約-0.9％)、一方、女性の割合はわずかに増加している。

【００２５】

外科手術、放射線治療、および化学療法が膵臓癌についての処置選択肢である。これらの処置選択肢は、多くの患者において生存を延ばすことができる、および/または症状を緩和することができるが、ほとんどの場合、治癒しない可能性が高い。癌のさらなる治療および診断の選択肢がかなり必要とされている。これらの選択肢には、抗体、ワクチンおよび低分子の使用が処置法として含まれる。さらにまた、これらの方法を、診断、検出、モニタリングのための研究用ツール、さらに癌の処置および研究の全ての領域における最新技術として使用することも必要とされる。

【００２６】

モノクローナル抗体(mAb)(G. Kohler and C. Milstein, Nature 256:495-497(1975)(非特許文献6))の治療有用性が認識されている。モノクローナル抗体は、現在、移植術、癌、感染性疾患、心臓血管疾患および炎症における治療として認められている。異なるアイソタイプは、異なるエフェクター機能を有する。このような機能の相違は、種々の免疫グロブリンアイソタイプの異なる3次元構造に反映される(P. M. Alzari, et al., Annual Rev. Immunol.6:555-580(1988)(非特許文献7))。

【００２７】

マウスは免疫化に便利であり、かつ、ほとんどのヒト抗原を外来物質として認識するので、治療可能性のあるヒト標的に対するmAbは、典型的には、マウス起源である。しかし、マウスmAbにはヒト治療薬として固有の欠点がある。マウスmAbは頻繁な投薬を必要とする。なぜなら、ヒトにおけるmAbの循環半減期はヒト抗体よりも短いからである。より重要なことには、マウス抗体をヒト免疫系に繰り返し投与すると、ヒト免疫系がマウスタンパク質を外来物質として認識することによって応答が引き起こされ、ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答が生じる。このようなHAMA応答は、アレルギー反応および系からのマウス抗体の迅速な排出をもたらすことがあり、それによって、マウス抗体による処置を役立たずにしてしまう。このような影響を避けるために、マウス内でヒト免疫系を作り出す試みがなされてきた。

【００２８】

最初の試みは、ヒト配列を有する抗体により抗原に応答可能であるトランスジェニック

マウスを作り出すことをねらっていたが(Bruggemann, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713(1989)(非特許文献8)を参照のこと)、入手可能なクローニングビヒクルによって安定的に維持できるDNAの量に限りがあった。酵母人工染色体(YAC)クローニングベクターの使用が、ヒトIg遺伝子座の大きな生殖系列フラグメントをトランスジェニック動物内に導入する道を開いた。本質的に、ヒトゲノム中で見出される同じ間隔で配置されるヒトのV領域遺伝子、D領域遺伝子、およびJ領域遺伝子の大部分、ならびにヒト定常領域が、YACを用いてマウス内に導入された。このようなトランスジェニックマウス系統の1つがXenoMouse(登録商標)マウスとして公知であり、Amgen Fremont,Inc.(Fremont CA)から市販されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００２９】

【非特許文献１】Klein, et al., 1997 Nat. Med. 3:402
【非特許文献２】Su, et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252
【非特許文献３】Pinto, et al., Clin. Cancer Res. 1996 Sep 2 (9):1445-1451
【非特許文献４】Hubert, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999 Dec 7; 96(25):14523-14528
【非特許文献５】Reiter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998 95:1735
【非特許文献６】G. Kohler and C. Milstein, Nature 256:495-497(1975)
【非特許文献７】P. M. Alzari, et al., Annual Rev. Immunol.6:555-580(1988)
【非特許文献８】Bruggemann, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713(1989)

【発明の概要】

【００３０】

本発明は、24P4C12タンパク質および24P4C12タンパク質のポリペプチドフラグメトに結合する、抗体ならびにその結合フラグメントおよびそれから操作された分子を提供する。本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、マウスおよび他の哺乳動物の抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全ヒト抗体、ならびに検出可能なマーカーもしくは治療剤で標識された抗体を含む。特定の態様において、図3の全核酸配列がコードされないこと、および/または図2の全アミノ酸配列が調製されないという条件が存在する。特定の態様において、図3の全核酸配列がコードされ、および/または図2のアミノ酸配列が調製され、いずれも、それぞれのヒト単位剤形の中にある。

【００３１】

本発明はさらに、生物学的サンプル中の24P4C12ポリヌクレオチドおよびタンパク質の存在および状態を検出する方法、ならびに24P4C12を発現する細胞を同定する方法を提供する。本発明の一態様は、ある形の増殖調節不全、例えば、癌を有するか、または有すると疑われる組織サンプルまたは血液サンプル中の24P4C12遺伝子産物をモニタリングする方法を提供する。

【００３２】

本発明はさらに、24P4C12を発現する癌、例えば、表Iに列挙した組織の癌を処置するための、免疫原性組成物または治療用組成物および戦略を、24P4C12の転写、翻訳、プロセシング、または機能を阻害することを目的とする治療ならびに癌ワクチンを含めて提供する。一局面において、本発明は、ヒト被験体において24P4C12を発現する癌を処置するための組成物、およびその組成物を含む方法を提供する。ここで、組成物は、ヒトへの使用に適切な担体、およびヒト単位用量の、24P4C12の産生もしくは機能を阻害する1種類もしくは1種類より多い薬剤を含む。好ましくは、担体はヒト専用の担体である。本発明の別の局面において、薬剤は、24P4C12タンパク質と免疫反応性である部分である。このような部分の非限定的な例には、抗体(例えば、単鎖抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体)、その機能的等価物(天然もしくは合成)、およびその組み合わせが含まれるが、これに限定されない。抗体は、診断用部分ま

たは治療用部分に結合体化することができる。別の局面において、薬剤は、本明細書に定義されるような低分子である。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１Ａ】24P4C12変異体1(「24P4C12v.1」または「24P4C12変異体1」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列配列が、図1Aに示される。開始メチオニンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸44～2671に及ぶ。

【図１Ｂ】24P4C12変異体2(「24P4C12v.2」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Bに示される。開始メチオニンに対するコドンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸44～2671に及ぶ。

【図１Ｃ】24P4C12変異体3(「24P4C12v.3」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Cに示される。開始メチオニンに対するコドンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸44～2671に及ぶ。

【図１Ｄ】24P4C12変異体4(「24P4C12v.4」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Dに示される。開始メチオニンに対するコドンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸44～2671に及ぶ。

【図１Ｅ】24P4C12変異体5(「24P4C12v.5」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Eに示される。開始メチオニンに対するコドンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸44～2671に及ぶ。

【図１Ｆ】24P4C12変異体6(「24P4C12v.6」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Fに示される。開始メチオニンに対するコドンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸84～2711に及ぶ。

【図１Ｇ】24P4C12変異体7(「24P4C12v.7」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Gに示される。開始メチオニンに対するコドンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸276～2801に及ぶ。

【図１Ｈ】24P4C12変異体8(「24P4C12v.8」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Hに示される。開始メチオニンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2174に及ぶ。

【図１Ｉ】24P4C12変異体9(「24P4C12v.9」とも呼ぶ)のcDNA配列およびアミノ酸配列が、図1Hに示される。開始メチオニンには下線が引いてある。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2144に及ぶ。

【図２Ａ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Aは、Ha5-1(5)1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

【図２Ｂ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Bは、Ha5-1(5)1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列の一部である。

【図２Ｃ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Cは、Ha5-1(5)2.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

【図２Ｄ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Dは、Ha5-1(5)2.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

【図２Ｅ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Eは、Ha5-3(1,4)2.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

【図２Ｆ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Fは、Ha5-3(1,4)2.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列の一部である。

【図２Ｇ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Gは、Ha5-3(1,4)7.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

【図２Ｈ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Hは、Ha5-3(1,4)7.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リ

ーダー配列の一部である。
【図２Ｉ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Iは、Ha5-3(3,5)37.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｊ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Jは、Ha5-3(3,5)37.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２Ｋ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Kは、Ha5-4(2,5)13.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｌ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Lは、Ha5-4(2,5)13.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域である。二重下線は、リーダー配列の一部である。
【図２Ｍ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Mは、Ha5-4(2,5)34.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｎ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Nは、Ha5-4(2,5)34.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２Ｏ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図20は、Ha5-7acd4.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｐ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Pは、Ha5-7acd4.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２Ｑ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Qは、Ha5-7acd20.1.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｒ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Rは、Ha5-7acd20.1.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２Ｓ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Sは、Ha5-7be31.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｔ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Tは、Ha5-7be31.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２Ｕ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Uは、Ha5-7acd10.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｖ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Vは、Ha5-7acd10.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２Ｗ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Wは、Ha5-7acd13.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｘ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Xは、Ha5-7acd13.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２Ｙ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Yは、Ha5-7acd19.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２Ｚ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2Zは、Ha5-7acd19.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２ＡＡ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AAは、Ha5-7be37.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＢ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ABは、Ha5-7be37.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２ＡＣ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ACは、Ha5-7acd16.1 VHのc

DNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＤ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ADは、Ha5-7acd16.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２ＡＥ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AEは、Ha5-7acd7.1.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＦ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AFは、Ha5-7acd7.1.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＧ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AGは、Ha5-7be20.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＨ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AHは、Ha5-7be20.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＩ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AIは、Ha5-7acd5.1.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＪ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AJは、Ha5-7acd5.1.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２ＡＫ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AKは、Ha5-7be34.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＬ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ALは、Ha5-7be34.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２ＡＭ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AMは、Ha5-7acd3.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＮ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ANは、Ha5-7acd3.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＯ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AOは、Ha5-7acd2.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＰ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2APは、Ha5-7acd2.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＱ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AQは、Ha5-8ac4.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＲ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ARは、Ha5-8ac4.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＳ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ASは、Ha5-4(2,5)31.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＴ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2ATは、Ha5-4(2,5)31.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＵ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AUは、Ha5-11a1.1.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＶ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AVは、Ha5-11a1.1.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。
【図２ＡＷ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AWは、Ha5-11b1.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

【図２ＡＸ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AXは、Ha5-11b1.1 VLのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図２ＡＹ】24P4C12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2AYは、Ha5-7be7.1 VHのcDNA配列およびアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ａ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Aは、Ha5-1(5)1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｂ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Bは、Ha5-1(5)1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｃ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Cは、Ha5-1(5)2.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｄ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Dは、Ha5-1(5)2.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｅ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Eは、Ha5-3(1,4)2.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｆ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Fは、Ha5-3(1,4)2.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｇ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Gは、Ha5-3(1,4)7.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｈ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Hは、Ha5-3(1,4)7.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｉ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Iは、Ha5-3(3,5)37.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｊ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Jは、Ha5-3(3,5)37.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｋ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Kは、Ha5-4(2,5)13.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｌ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Lは、Ha5-4(2,5)13.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域である。
【図３Ｍ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Mは、Ha5-4(2,5)34.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｎ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Nは、Ha5-4(2,5)34.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｏ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Oは、Ha5-7acd4.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｐ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Pは、Ha5-7acd4.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｑ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Qは、Ha5-7acd20.1.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｒ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Rは、Ha5-7acd20.1.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｓ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Sは、Ha5-7be31.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｔ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Tは、Ha5-7be31.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｕ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Uは、Ha5-7acd10.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｖ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Vは、Ha5-7acd10.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

【図３Ｗ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Wは、Ha5-7acd13.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｘ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Xは、Ha5-7acd13.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３Ｙ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Yは、Ha5-7acd19.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３Ｚ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3Zは、Ha5-7acd19.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＡ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AAは、Ha5-7be37.1 VHのアミノ酸配列である。
【図３ＡＢ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ABは、Ha5-7be37.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＣ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ACは、Ha5-7acd16.1 VHのアミノ酸配列である。
【図３ＡＤ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ADは、Ha5-7acd16.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＥ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AEは、Ha5-7acd7.1.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＦ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AFは、Ha5-7acd7.1.1 VLのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＧ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AGは、Ha5-7be20.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＨ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AHは、Ha5-7be20.1 VLのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＩ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AIは、Ha5-7acd5.1.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＪ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AJは、Ha5-7acd5.1.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＫ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AKは、Ha5-7be34.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＬ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ALは、Ha5-7be34.1 VLのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＭ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AMは、Ha5-7acd3.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＮ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ANは、Ha5-7acd3.1 VLのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＯ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AOは、Ha5-7acd2.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＰ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3APは、Ha5-7acd2.1 VLのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＱ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AQは、Ha5-8ac4.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＲ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ARは、Ha5-8ac4.1 VLのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＳ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ASは、Ha5-4(2,5)31.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＴ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3ATは、Ha5-4(2,5)31.1 VLのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＵ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AUは、Ha5-11a1.1.1 VHのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

【図３ＡＶ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AVは、Ha5-11a1.1.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＷ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AWは、Ha5-11b1.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＸ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AXは、Ha5-11b1.1 VLのアミノ酸配列である。二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図３ＡＹ】24P4C12抗体のアミノ酸配列。図3AYは、Ha5-7be7.1 VHのアミノ酸配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。
【図４Ａ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Aは、Ha5-1(5)1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｂ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Bは、Ha5-1(5)1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｃ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Cは、Ha5-1(5)2.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｄ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Dは、Ha5-1(5)2.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｅ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Eは、Ha5-3(1,4)2.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｆ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Fは、Ha5-3(1,4)2.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｇ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Gは、Ha5-3(1,4)7.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｈ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Hは、Ha5-3(1,4)7.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｉ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Iは、Ha5-3(3,5)37.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｊ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Jは、Ha5-3(3,5)37.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｋ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Kは、Ha5-4(2,5)13.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｌ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Lは、Ha5-4(2,5)13.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｍ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Mは、Ha5-4(2,5)34.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｎ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Nは、Ha5-4(2,5)34.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｏ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Oは、Ha5-7acd4.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｐ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Pは、Ha5-7acd4.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｑ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Qは、Ha5-7acd20.1.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｒ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Rは、Ha5-7acd20.1.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｓ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Sは、Ha5-7be31.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｔ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Tは、Ha5-7be31.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｕ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Uは、Ha5-7acd10.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。

【図４Ｖ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Vは、Ha5-7acd10.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｗ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Wは、Ha5-7acd13.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｘ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Xは、Ha5-7acd13.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｙ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Yは、Ha5-7acd19.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４Ｚ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Zは、Ha5-7acd19.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＡ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4Aは、Ha5-7be37.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＢ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ABは、Ha5-7be37.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＣ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ACは、Ha5-7acd16.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＤ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ADは、Ha5-7acd16.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＥ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AEは、Ha5-7acd7.1.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＦ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AFは、Ha5-7acd7.1.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＧ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AGは、Ha5-7be20.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＨ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AHは、Ha5-7be20.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＩ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AIは、Ha5-7acd5.1.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＪ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AJは、Ha5-7acd5.1.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＫ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AKは、Ha5-7be34.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＬ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ALは、Ha5-7be34.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＭ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AMは、Ha5-7acd3.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＮ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ANは、Ha5-7acd3.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＯ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AOは、Ha5-7acd2.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＰ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4APは、Ha5-7acd2.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＱ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AQは、Ha5-8acd4.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＲ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ARは、Ha5-8acd4.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＳ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ASは、Ha5-4(2,5)31.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＴ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4ATは、Ha5-4(2,5)31.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。

【図４ＡＵ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AUは、Ha5-11a1.1.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＶ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AVは、Ha5-11a1.1.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＷ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AWは、Ha5-11b1.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＸ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AXは、Ha5-11b1.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図４ＡＹ】24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。図4AYは、Ha5-7be7.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメントである。
【図５Ａ】正常組織および患者標本における24P4C12の発現分析。図5Aは、卵巣癌患者標本における24P4C12の発現である。
【図５Ｂ】正常組織および患者標本における24P4C12の発現分析。図5Bは、乳癌患者標本における24P4C12の発現である。
【図５Ｃ】正常組織および患者標本における24P4C12の発現分析。図5Cは、膵臓癌患者標本における24P4C12の発現である。
【図６】24P4C12 MAbを用いた複数の癌細胞株モデルの表面染色。図6A、6B、6C。複数の癌適応症に相当する、PC3-24P4C12、LNCaP、22RV1、OVCaR-5、HT29、Calu-1、CF-PAC癌細胞株(約100万個の細胞)を、10ug/mlの指示された24P4C12 MAbと4℃で一晩インキュベートした。洗浄後に、細胞を抗ヒトIgG二次Ab-PE結合体とインキュベートし、洗浄し、固定し、FACS分析に供した。24P4C12 MAbとインキュベートした細胞の染色プロフィールのヒストグラム(白抜きの緑色線ヒストグラム)を、無関係のコントロールMAbとインキュベートした細胞の染色プロフィール(塗りつぶした紫色線ヒストグラム)と重ね合わせて示した。コントロールと比較して、24P4C12 MAbヒストグラムの蛍光強度が高いのは、MAbと細胞表面上に存在する24P4C12タンパク質が特異的に結合したことを示している。これらのデータは、24P4C12タンパク質が、前立腺癌、卵巣癌、結腸癌、肺癌、および膵臓癌適応症に由来する細胞株において発現し、MAbによって特異的に認識されることを示している。
【図７】24P4C12タンパク質配列とカニクイザルオルソログとのアラインメント。ヒト24P4C12タンパク質とカニクイザル配列とのアミノ酸アラインメントを示した。98.6%の同一性がある。種間でのアミノ酸の違いは白色(非保存的)および緑色(保存的)で強調した。下線は細胞外配列である。
【図８】24P4C12 MAbと、Rat1細胞において発現させた24P4C12タンパク質カニクイザルオルソログとの表面結合。Rat1細胞には、24P4C12カニクイザルオルソログをコードするレトロウイルスを安定に形質導入した。これらの細胞を10ug/mlの指示されたMAbで4℃で2時間染色した。細胞を洗浄し、次いで、PE-結合体化抗ヒトIgG二次Abとインキュベートし、洗浄し、固定し、FACS分析に供した。24P4C12 MAbとインキュベートしたRat1-カニクイザル24P4C12細胞の染色プロフィールのヒストグラム(白抜きの緑色線ヒストグラム)を、コントロールneo細胞と重ね合わせて示した。コントロールneo細胞と比較して、Rat1-カニクイザル24P4C12細胞ヒストグラムの蛍光強度が高いのは、MAbと細胞表面上に存在するカニクイザル24P4C12タンパク質が特異的に結合したことを示している。
【図９】24P4C12 MAbは、二次Ab-サポリン毒素結合体を介してPC3-24P4C12細胞の死滅を媒介する。24P4C12抗体は、PC3-24P4C12細胞におけるサポリン依存性死滅を媒介する。1日目に、PC3-24P4C12細胞またはPC3-Neo細胞(500細胞/well)を96ウェルプレートに播種した。翌日、指示された2X濃度の一次抗体と、サポリン毒素(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA)と結合体化した2倍過剰の抗ヒト(Hu-Sap)または抗ヤギ(Gt-Sap)ポリクローナル抗体を含有する等量の培地を、各ウェルに添加した。細胞を37℃で5日間インキュベートした。インキュベーション期間の終了時に、Alamar Blueを各ウェルに添加し、インキュベーションをさらに4時間続けた。プレートリーダーにおいて、530nmの励起波長および590nmの発光波長を用いて、各ウェルの蛍光を確かめた。結果から、24P4C12抗体HA5-1(5)1.1、HA5-1(5)2.1およびHA5-acd16.1は、24P4C12を発現するPC3細胞ではサポリン依

存性細胞傷害性を媒介したが、Neo遺伝子だけしか感染していないPC3細胞ではサポリン依存性細胞傷害性を媒介しなかったことが分かる。特異性をさらに証明するために、同じ24P4C12一次抗体を、2倍過剰のサポリン結合体化ヤギポリクローナル抗体とインキュベートした。これらの結果は、適切な抗24P4C12 MAbを用いて、薬物または細胞傷害性タンパク質を 24P4C12発現細胞に選択的に送達できることを示している。

【図１０】24P4C12の膜トポロジーおよびアミノ酸配列。24P4C12の膜トポロジーおよびアミノ酸配列を示した。24P4C12タンパク質およびその変異体は、10個の膜貫通ドメインと5個の細胞外ループからなる推定トポロジーを示す。最初の細胞外ループが最も大きい。潜在的なアスパラギン結合型細胞外グリコシル化部位を紫色で示し、ジスルフィド結合に関与し得る潜在的な細胞外システイン残基を緑色で示した。膜貫通ドメインにある荷電アミノ酸も示した。塩基性アミノ酸であるアルギニン(N)、ヒスチジン(H)、およびリジン(K)を青色で示し、酸性残基グルタミン酸(E)を赤色で示した。どちらのタンパク質の膜貫通ドメインにも酸性アスパラギン酸((D)は存在しなかった。

【図１１】CTL1の膜トポロジーおよびアミノ酸配列。CTL1は、Na+非依存的にコリンを輸送することが報告されているが、CTL1と比較して24P4C12の膜貫通トポロジーならびに前記の荷電アミノ酸の存在および間隔が異なるために、たぶん、24P4C12は、コリン以外の高分子またはイオンの輸送を媒介するだろう。

【図１２】高い細胞外K+濃度は、MDCK-24P4C12細胞において、細胞内pHの低下を示すCMFDA蛍光の減少を媒介する。図12A:極性を有するコンフルエントなMDCK-24P4C12(四角)およびコントロールMDCK-neo細胞に、pH感受性蛍光色素である二酢酸5-クロロメチルフルオレセイン(CMFDA)を37℃で1時間添加した。CMFDA蛍光は、H+濃度が増加する(pHが低下する)と共に減少する。洗浄後、細胞を、標準Krebs-hepes緩衝液(130mM NaCl、4.7mM KCl、1.2mM MgSO4、1.2mM KH2PO4、11.7mM D-グルコース、1.3mM CaCl2、10mM HEPES、pH7.4、黒色の三角および四角)またはNaCl濃度とKCl濃度を交換した高K+Krebs-hepes緩衝液(130mM KClおよび4.7mM NaCl、赤色の三角および四角)の中でインキュベートした。次いで、蛍光を蛍光プレートリーダーにおいて、485nmの励起波長および530nmの発光波長を用いて測定した。20秒間隔で読み取りを行った。図12B:最初に、極性を有するコンフルエントなMDCK-24P4C12(赤色の三角)およびMDCK-neo細胞(黒色の四角)を標準Krebs-hepes緩衝液とインキュベートし、次いで、細胞外K+を100mMまで上げるために、濃いKCl(1M)を添加した(矢印)。

【図１３】プロピオン酸Na+による培地の酸性化は、MDCK-24P4C12細胞において、細胞内pHの低下を示すCMFDA蛍光の減少を媒介する。極性を有するコンフルエントなMDCK-24P4C12およびneo細胞を、図12に記載のようにCMFDAで標識し、標準Krebs-hepes緩衝液の中に入れた。ベースライン蛍光を得、次いで、細胞外培地を酸性化するために、100uMプロピオン酸ナトリウムを、指示された時間(矢印)に細胞に添加した。次いで、蛍光をモニタリングし続けた。MDCK-24P4C12細胞(赤色の三角)は、細胞内pHの低下を示す、蛍光の著しい減少を示したが、neo細胞(黒色の四角)は示さなかった。

【図１４】24P4C12 Mabによるキャッピングおよび内部移行。MAb Ha5-7acd19、Ha5-7be37、およびHa5-3(1,4)7を、製造業者の説明書(Invitrogen, Carlsbad CA)に従って、Alexa Fluor 488蛍光色素で標識した。PC3-24P4C12細胞を標識MAbと4℃で2時間インキュベートした。洗浄後、細胞を4℃に保つか、37℃に2時間移した。次いで、細胞を固定し、蛍光顕微鏡で調べた。MAbとインキュベートし、4℃に保った細胞の蛍光写真を、図14Aに示した。これは、24P4C12タンパク質の細胞表面染色を示している。図14Bは、MAbで染色し、次いで、37℃で2時間インキュベートした細胞の蛍光写真を示す。これらの細胞は、リング状の細胞表面染色および明るい点の外観の消失を示しており、点状の蛍光は、24P4C12タンパク質のMAbを介したキャッピングおよび内部移行を示している。

【図１５】図15A～B。膵臓癌患者標本および卵巣癌患者標本における免疫組織化学による24P4C12タンパク質の検出。組織を膵臓癌患者および卵巣癌患者から入手した。結果から、24P4C12は癌患者組織の腫瘍細胞において発現していることが分かった。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

発明の詳細な説明

節の概要

I.)定義
II.)24P4C12ポリヌクレオチド
II.A.)24P4C12ポリヌクレオチドの使用
II.A.1.)遺伝子異常のモニタリング
II.A.2.)アンチセンス態様
II.A.3.)プライマーおよびプライマー対
II.A.4.)24P4C12コード核酸分子の単離
II.A.5.)組換え核酸分子および宿主-ベクター系
III.)24P4C12関連タンパク質
III.A.)モチーフを有するタンパク質の態様
III.B.)24P4C12関連タンパク質の発現
III.C.)24P4C12関連タンパク質の改変
III.D.)24P4C12関連タンパク質の用途
IV.)24P4C12抗体
V.)24P4C12細胞性免疫応答
VI.)24P4C12トランスジェニック動物
VII.)24P4C12の検出のための方法
VIII.)24P4C12関連遺伝子およびこれらの産物の状態をモニタリングする方法
IX.)24P4C12と相互作用する分子の同定
X.)治療法および組成物
X.A.)抗癌ワクチン
X.B.)抗体ベースの療法の標的としての24P4C12
X.C.)細胞性免疫応答のための標的としての24P4C12
X.C.1. ミニ遺伝子ワクチン
X.C.2. CTLペプチドとヘルパーペプチドとの組み合わせ
X.C.3. CTLペプチドとT細胞抗原刺激剤との組み合わせ
X.C.4. CTLペプチドおよび/またはHTLペプチドが間欠投与(pulse)されたDCを含むワクチン組成物
X.D.)養子免疫療法
X.E.)治療目的または予防目的でのワクチン投与
XI.)24P4C12の診断態様および予後態様
XII.)24P4C12タンパク質機能の阻害
XII.A)細胞内抗体による24P4C12の阻害
XII.B)組み換えタンパク質による24P4C12の阻害
XII.C)24P4C12の転写または翻訳の阻害
XII.D)治療戦略のための一般的な考慮事項
XIII.)24P4C12のモジュレーターの同定、特徴付け、および使用
XIV.)RNAiおよび低分子干渉RNA(siRNA)の治療的使用
XV.)キット/製造物品。

【００３５】

I.)定義

特別の定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術用語、記号、および他の科学用語もしくは専門用語は、本発明の属する当業者によって一般に理解される意味を有することが意図される。場合によっては、一般に理解される意味を有する用語が、明確さのため、および/またはすぐに参照するために本明細書において定義される。本明細書においてこのような定義を含めることは、当技術分野において一般に理解されるとの実質的な差異を示すと解釈しなければならないとは限らない。本明細書において記載または参

照される技術および手順のうちの多くは、当業者によって十分に理解され、当業者によって従来の方法論、例えば、Sambrook, et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd.edition(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Yに記載される広く使用されている分子クローニング方法論を使用して一般的に使用される。適宜、一般的には、市販のキットおよび試薬の使用を含む手順が、特別の記載のない限りは製造業者が規定したプロトコールおよび/またはパラメーターに従って実行される。

【００３６】

「進行型癌」、「局所進行型癌」、「進行型疾患」および「局所進行型疾患」という用語は、関連する組織被膜を突き破って拡大した癌を意味し、この用語は、米泌尿器学会(American Urological Association (AUA))のシステムでステージCの疾患、Whitmore-Jewettのシステムでステージ C1～C2の疾患、およびTNM(腫瘍、結節、転移)システムでステージT3～T4およびN＋の疾患を含むと意図される。一般的に、局所進行型疾患を有する患者に対して、手術は勧められない。これらの患者は、臨床的に限局化した(器官限定的な)癌を有する患者と比較して、実質的に好ましくない結果を有する。

【００３７】

「ネイティブなグリコシル化パターンの変化」とは、ネイティブ配列の24P4C12において見出される1つまたはそれ以上の糖質部分を(基礎となるグリコシル化部位を除去すること、または化学的手段および/もしくは酵素的手段によってグリコシル化を欠失させることのいずれかによって)欠失させること、ならびに/あるいは、そのネイティブ配列の24P4C12中には存在しない1つまたはそれ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することが本明細書における目的のために意図される。さらに、前記の句は、ネイティブタンパク質のグリコシル化の質的変化を、存在する種々の糖質部分の性質および比率の変化を含めて含む。

【００３８】

「アナログ」という用語は、別の分子(例えば、24P4C12関連タンパク質)と構造的に類似する、または類似もしくは対応する属性を共有する、分子を指す。例えば、24P4C12タンパク質のアナログは、24P4C12に特異的に結合する抗体もしくはT細胞に特異的に結合することができる。

【００３９】

「抗体」という用語は、特別の明確な定めがない限りは、その最も広い意味で使用される。従って、「抗体」は天然のものでもよく、従来のハイブリドーマ技術によって生成されたモノクローナル抗体など人工生成されてもよい。抗24P4C12抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの抗体の抗原結合ドメインおよび/または1つまたはそれ以上の相補性決定領域を含むフラグメントを含む。本明細書において使用される「抗体」という用語は、24P4C12に特異的に結合し、かつ/または望ましい生物学的活性を示す、任意の形態の抗体もしくはそのフラグメントを指す。「抗体」という用語は、具体的には、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および抗体フラグメントを、それらが24P4C12に特異的に結合し、かつ/または望ましい生物学的活性を示す限り含む。本明細書において提供される方法および組成物において、任意の特異的抗体を使用することができる。従って、一態様において、「抗体」という用語は、組み合わされると標的抗原の特異的結合部位を形成する、軽鎖免疫グロブリン分子由来の少なくとも1つの可変領域と、重鎖分子由来の少なくとも1つの可変領域とを含む分子を含む。一態様において、抗体は、IgG抗体である。例えば、抗体は、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、またはIgG4抗体である。本方法および組成物において有用な抗体は、細胞培養物、ファージ、またはウシ、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヒツジ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジー、類人猿が含まれるが、これに限定されない種々の動物において作製することができる。従って、一態様において、本発明の抗体は、哺乳動物抗体である。ファージ技術を用いて、最初の抗体を単離するすることができ、または特異性特徴が変化したもしくはアビディティ特徴が変化した変異体を生成することができる。このような技術は日常的で

あり、当技術分野で周知である。一態様において、抗体は、当技術分野で公知である組換え手段によって生成される。例えば、組換え抗体は、宿主細胞を、その抗体をコードするDNA配列を含むベクターでトランスフェクトすることによって生成することができる。少なくとも1つのVL領域および1つのVH領域を発現するDNA配列を宿主細胞においてトランスフェクトするために、1つまたはそれ以上のベクターを使用することができる。抗体作製および抗体生成するための組換え手段の例示的記載には、Delves,ANTIBODY PRODUCTION:ESSENTIAL TECHNIQUES(Wiley,1997)；Shephard, et al.,MONOCLONAL ANTIBODIES(Oxford University Press,2000)；Goding,MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND PRACTICE(Academic Press,1993)；CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(John Wiley & Sons,最新版)が含まれる。本発明の抗体は、望ましい機能の媒介における抗体の効力をさらに高めるように組換え手段によって改変することができる。従って、組換え手段を使用して置換によって抗体を改変できることは本発明の範囲内にある。典型的には、置換は保存的置換である。例えば、抗体の定常領域中の少なくとも1つのアミノ酸を、異なる残基で置換することができる。例えば、米国特許第5,624,821号、米国特許第6,194,551号、出願番号WO9958572；およびAngal, et al.,Mol.Immunol.30:105-08(1993)を参照のこと。アミノ酸における改変には、アミノ酸の欠失、付加、および置換が含まれる。場合によっては、このような変化は、望ましくない活性、例えば、補体依存性細胞傷害性を低減するためになされる。頻繁に、抗体は、検出可能なシグナルを提供する物質を共有結合または非共有結合のいずれかで結合することによって標識される。多種多様な標識および結合体化技術が公知であり、科学文献および特許文献の両方において広範に報告されている。これらの抗体は、正常な24P4C12または欠損型24P4C12に対する結合についてスクリーニングすることができる。例えば、ANTIBODY ENGINEERING:A PRACTICAL APPROACH(Oxford University Press,1996)を参照のこと。望ましい生物学的活性を有する適切な抗体は、以下のインビトロアッセイ、増殖、遊走、接着、軟寒天増殖、脈管形成、細胞間連絡、アポトーシス、輸送、シグナル伝達が含まれるが、これに限定されない、および以下のインビボアッセイ、例えば、腫瘍増殖の阻害において同定することができる。本明細書において提供される抗体はまた診断用途においても有用であり得る。捕捉抗体または非中和抗体として、これらの抗体は、特定の抗原に、その抗原の受容体結合も生物学的活性も阻害することなく結合する能力について、スクリーニングすることができる。中和抗体として、抗体は、競合的結合アッセイにおいて有用であり得る。これらの抗体はまた、24P4C12またはその受容体を定量するために使用することができる。

【００４０】

本明細書で使用する抗体の「抗原結合部分」または「抗体フラグメント」(または単に「抗体部分」)という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する24P4C12抗体の1つまたは複数のフラグメントを意味する(例えば、24P4C12および変異体;図1)。抗体の抗原結合機能は完全長抗体のフラグメントによって働くことが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語の中に含まれる結合フラグメントの例には、(i)Fabフラグメント、V_L、V_H、C_LおよびC_{H1}ドメインからなる一価フラグメント;(ii)$F(ab')_2$フラグメント、2つのFabフラグメントがジスルフィド架橋によってヒンジ領域で連結されている二価フラグメント;(iii)V_HおよびC_{H1}ドメインからなるFdフラグメント;(iv)抗体の1本のアームのV_LおよびV_HドメインからなるFvフラグメント、(v)V_HドメインからなるdAbフラグメント(Ward, et al., (1989) Nature 341:544-546);ならびに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fvフラグメントの2つのドメインであるV_LおよびV_Hは別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を用いると、一価分子(単鎖Fv(scFv)として知られる; 例えば、Bird, et al., (1988) Science 242:423-426;およびHuston, et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)を参照のこと)を形成するように、V_L領域およびV_H領域が対となった1本のタンパク質鎖として作製されるのを可能にする合成リンカーによって接続することができる。このような単鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語の中に含まれることが意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来の技法を用いて得られ、フラグメントは、インタクトな抗体と同様に有用性

についてスクリーニングされる。

【００４１】

本明細書において使用される場合、「抗原」の任意の形態が、24P4C12に特異的な抗体を作製するために使用することができる。従って、惹起抗原は、1つのエピトープであってもよく、複数のエピトープであってもよく、またはタンパク質全体であってもよく、これらは単独であっても、当技術分野で公知の1つまたはそれ以上の免疫原性増強薬剤と組み合わせてもよい。惹起抗原は、単離された全長タンパク質であっても、細胞表面タンパク質(例えば、その抗原の少なくとも一部でトランスフェクトされた細胞で免疫する)であってもよく、可溶性タンパク質(例えば、そのタンパク質の細胞外ドメイン部分のみで免疫する)であってもよい。抗原は、遺伝子組換え細胞において生成することができる。抗原をコードするDNAは、ゲノムDNAであっても、非ゲノムDNA(例えば、cDNA)であってもよく、細胞外ドメインの少なくとも一部をコードする。本明細書において使用される場合、「部分」という用語は、適宜、関心対象の抗原の免疫原性エピトープを構成する最小限の数のアミノ酸または核酸を指す。関心対象の細胞の形質転換のために適切な任意の遺伝子ベクターを使用することができる。遺伝子ベクターには、アデノウイルスベクター、プラスミド、および非ウイルスベクター、例えば、カチオン性脂質が含まれるが、これに限定されない。一態様において、本明細書における方法および組成物の抗体は、関心対象の24P4C12の細胞外ドメインの少なくとも一部に特異的に結合する。

【００４２】

本明細書において提供される、抗体またはその抗原結合フラグメントは、「生物活性薬剤」に結合体化することができる。本明細書において使用される場合、「生物活性薬剤」という用語は、抗原に結合し、かつ/または細胞死滅毒素を増強するために望ましい生物学的効果を増強もしくは媒介する、任意の合成化合物または天然化合物を指す。

【００４３】

一態様において、本発明において有用な結合フラグメントは、生物学的に活性なフラグメントである。本明細書において使用される場合、「生物学的に活性な」という用語は、望ましい抗原性エピトープに結合可能であり、かつ生物学的効果を直接的もしくは間接的に発揮可能である、抗体もしくは抗体フラグメントを指す。直接的効果には、増殖シグナルの調節、刺激、および/もしくは阻害；抗アポトーシスシグナルの調節、刺激、および/もしくは阻害；アポトーシスシグナルもしくは壊死シグナルの調節、刺激、および/もしくは阻害；ADCCカスケードの調節、刺激、および/もしくは阻害；ならびにCDCカスケードの調節、刺激、および/もしくは阻害が含まれるが、これに限定されない。

【００４４】

「二重特異性」抗体もまた本方法および組成物において有用である。本明細書において使用される場合、「二重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる抗原性エピトープに対する結合特異性を有する抗体、典型的には、モノクローナル抗体を指す。一態様において、エピトープは同じ抗原に由来する。別の態様において、エピトープは、2つの異なる抗原に由来する。二重特異性抗体を生成する方法は当技術分野で公知である。例えば、二重特異性抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現を使用して組換え生成することができる。例えば、Milstein, et al.,Nature 305:537-39(1983)を参照のこと。または、二重特異性抗体は、化学的結合を使用して調製することができる。例えば、Brennan, et al.,Science 229:81(1985)を参照のこと。二重特異性抗体は、二重特異性抗体フラグメントを含む。例えば、Hollinger, et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-48(1993),Gruber, et al.,J.Immunol.152:5368(1994)を参照のこと。

【００４５】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体中の対応配列と同一または相同であるが、その鎖の残りが、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体中の対応配列と同一または相同である「キメラ」抗体、ならびにこのような抗体のフラグメントを、それらが標的抗原に特

異的に結合し、かつ/または望ましい生物学的活性を示す限り含む。(米国特許第4,816,567号；およびMorrison, et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

【００４６】

「化学療法剤」という用語は、腫瘍増殖の阻害において有効な全ての化合物を指す。化学療法剤の非限定的例には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン化合物、およびアルキルスルホネート、代謝拮抗物質、例えば、葉酸、プリンアンタゴニストもしくはピリミジンアンタゴニスト；有糸分裂インヒビター、例えば、ビンカアルカロイド、およびポドフィロトキシン誘導体、細胞傷害性抗生物質、DNA発現を損なう、または阻害する化合物、ならびに増殖因子受容体アンタゴニストが含まれる。さらに、化学療法剤には、細胞傷害剤(本明細書に定義のもの)、抗体、生物学的分子および低分子が含まれる。

【００４７】

「コドン最適化配列」という用語は、使用頻度が約20％未満である任意のコドンを置換することによって、特定の宿主種に対して最適化されたヌクレオチド配列を指す。偽のポリアデニル化配列の除去、エキソン/イントロンスプライシングシグナルの除去、トランスポゾン様反復の除去、および/またはGC含量の最適化を、コドン最適化に加えて行うことによって所定の宿主種における発現が最適化されているヌクレオチド配列は、本明細書において「発現増強配列」という。

【００４８】

「コンビナトリアルライブラリー」とは、多数の化学的「基本単位」、例えば、試薬を組み合わせることによって、化学合成または生物学的合成によって生成された多様な化合物の収集物である。例えば、直線状コンビナトリアル化合物ライブラリー、例えば、ポリペプチド(例えば、ムテイン)ライブラリーは、アミノ酸と呼ばれる一組の化学的基本単位を、所定の化合物の長さ(すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数)についての可能なあらゆる様式で組み合わせることによって形成される。多数の化合物が、化学的基本単位のこのようなコンビナトリアル混合を介して合成される(Gallop, et al.,J.Med.Chem.37(9):1233-1251(1994))。

【００４９】

コンビナトリアルライブラリーの調製およびスクリーニングは、当業者にとって周知である。このようなコンビナトリアル化合物ライブラリーには、ペプチドライブラリー(例えば、米国特許第5,010,175号,Furka,Pept.Prot.Res.37:487-493(1991),Houghton, et al.,Nature,354:84-88(1991))、ペプトイドライブラリー(PCT公開番号WO91/19735)、コードペプチドライブラリー(PCT公開番号WO93/20242)、ランダムバイオオリゴマーライブラリー(PCT公開番号WO92/00091)、ベンゾジアゼピンライブラリー(米国特許第5,288,514号)、ダイバーソーマー(diversomer)、例えば、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、およびジペプチドライブラリー(Hobbs, et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 90:6909-6913(1993))、ビニロガス(vinylogous)ポリペプチドライブラリー(Hagihara, et al.,J.Amer.Chem.Soc.114:6568(1992))、β-D-グルコース骨格を有する非ペプチド性ペプチド模倣物ライブラリー(Hirschmann, et al.,J.Amer.Chem.Soc.114:9217-9218(1992))、低分子化合物ライブラリーの類似有機合成ライブラリー(Chen, et al.,J.Amer.Chem.Soc.116:2661(1994))、オリゴカルバメートライブラリー(Cho, et al.,Science 261:1303(1993))、ならびに/またはペプチジルホスホネートライブラリー(Campbell, et al.,J.Org.Chem.59:658(1994))、一般的には、Gordon, et al.,J.Med.Chem.37:1385(1994)を参照のこと；核酸ライブラリー(例えば、Stratagene,Corp.を参照のこと)；ペプチド核酸ライブラリー(例えば、米国特許第5,539,083号を参照のこと)；抗体ライブラリー(例えば、Vaughn, et al.,Nature Biotechnology 14(3):309-314(1996)およびPCT/US96/10287を参照のこと)；糖質ライブラリー(例えば、Liang, et al.,Science 274:1520-1522(1996)、および米国特許第5,593,853号を参照のこと)；ならびに有機低分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン,Baum,C & EN, Jan 18, page 33(1993)；イソプレノイド、米国特許第5,569,588号；チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号；ピロリジン,米国特許第5,525,735号および

米国特許第5,519,134号；モルホリノ化合物,米国特許第5,506,337号；ベンゾジアゼピン,米国特許第5,288,514号；などを参照のこと)が含まれるが、これに限定されない。

【００５０】

コンビナトリアルライブラリーの調製のための装置が市販されている(例えば、357 NIPS, 390 NIPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY；Symphony, Rainin, Woburn, MA；433A,Applied Biosystems, Foster City, CA；9050, Plus, Millipore, Bedford, NIAを参照のこと)。多数の周知のロボットシステムも溶液相化学のために開発されている。これらのシステムは、化学者によって実施される手動合成操作を模倣する、自動化ワークステーション、例えば、Takeda Chemical Industries, LTD.(Osaka, Japan)によって開発された自動合成装置、およびロボットアームを使用する多くのロボットシステム(Zymate H, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.；Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.)を含む。前記の装置はいずれも、本発明と共に使用するのに適切である。これらの装置が本明細書において考察されるように作動できるようにする、これらの装置に対する改変の種類および実施は(もしあれば)当業者に明らかであろう。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリーそれ自体が市販されている(例えば、ComGenex, Princeton, NJ；Asinex, Moscow, RU；Tripos, Inc., St.Louis, MO；ChemStar, Ltd, Moscow, RU；3D Pharmaceuticals, Exton, PA；Martek Biosciences, Columbia, MDなどを参照のこと)。

【００５１】

本明細書において使用される場合、「保存的置換」という用語は、当業者にとって公知であるアミノ酸置換を指し、一般的には、生じる分子の生物学的活性を変えることなく行うことができる。当業者であれば、一般的に、ポリペプチドの非必須領域における一アミノ酸置換は、生物学的活性を実質的には変えないことを認識する(例えば、Watson, et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224(4th Edition 1987)を参照のこと)。このような例示的置換は、好ましくは、表III(a-b)に示される置換に従ってなされる。例えば、このような変化には、イソロイシン(I)、バリン(V)、およびロイシン(L)のうちのいずれかを、これらの疎水性アミノ酸のうちの他のいずれかで置換すること；グルタミン酸(E)をアスパラギン酸(D)で置換することおよびその逆；アスパラギン(N)をグルタミン(Q)で置換することおよびその逆；ならびにスレオニン(T)をセリン(S)で置換することおよびその逆が含まれる。他の置換もまた、特定のアミノ酸の環境およびタンパク質の三次構造におけるそのアミノ酸の役割に応じて保存的であると考えられ得る。例えば、グリシン(G)およびアラニン(A)は、頻繁に交換可能である。アラニン(A)およびバリン(V)も同様であり得る。比較的疎水性のメチオニン(M)は、ロイシンおよびイソロイシンと頻繁に交換可能であり、時には、バリンで交換可能である。リジン(K)およびアルギニン(R)は、そのアミノ酸残基の大きな特徴が電荷であり、かつこれらの2つのアミノ酸残基の異なるpKが重要でない位置において、頻繁に交換可能である。なお他の変化が、特定の環境においては「保存的」であると考えられ得る(例えば、本明細書中の表III(a)；第13-15頁「Biochemistry」2nd ED.Lubert Stryer編(Stanford University)；Henikoff, et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919；Lei, et al., J Biol Chem 1995 May19；270(20):11882-6を参照のこと)。他の置換もまた許容可能であり、経験的に、または公知の保存的置換に従って決定することができる。

【００５２】

「細胞傷害剤」という用語は、細胞の発現活性、細胞の機能を阻害もしくは防止し、かつ/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体、化学療法剤、および毒素、例えば、細菌起源、真菌起源、植物起源、または動物起源の低分子毒素もしくは酵素活性毒素を、そのフラグメントおよび/または変異体を含めて、含むことが意図される。細胞傷害剤の例には、アウリスタチン(auristatin)、アウリスタチンe、アウリスタチンf、アウロマイシン(auromycin)、マイタンシノイド、イットリウム、ビスマス、リシン、リシンA鎖、コンブレスタチン(combrestatin)、デュオカルマイシン、ドロスタチン(dolostatin)、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、シスプラチン、cc1065、エチジウムブロミド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン

、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン、ジフテリア毒素、シュードモナス属(Pseudomonas)外毒素(PE)A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、α-サルシン、ゲロニン、マイトジェリン(mitogellin)、レトストリクトシン(retstrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、キュリシン(curicin)、クロチン、カリチアマイシン、サパオナリオア・オフィシナリス(Sapaonaria officinalis)インヒビター、および糖質コルチコイド、ならびに他の化学療法剤、ならびに放射性同位体、例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}またはBi^{213}、P^{32}、およびLu^{177}を含むLuの放射性同位体が含まれるが、これに限定されない。抗体はまた、プロドラッグをその活性形態へと変換可能である抗癌プロドラッグ活性化酵素に結合体化することができる。

【００５３】

本明細書において使用される場合、「ダイアボディ(diabody)」という用語は、2つの抗原結合部位を含む小さい抗体フラグメントを指し、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖中に軽鎖可変ドメイン(V_L)に接続している重鎖可変ドメイン(V_H)を含む(V_H-V_L)。同じ鎖の2つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、それらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合させられ、2つの抗原結合部位を作り出す。ダイアボディは、例えば、EP404,097；WO93/11161；およびHollinger, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-48(1993)において、より完全に記載される。

【００５４】

「遺伝子産物」は、ペプチド/タンパク質またはmRNAを示すために本明細書において使用される。例えば、「本発明の遺伝子産物」は、時には、本明細書において、「癌アミノ酸配列」、「癌タンパク質」、「表Iに列挙した癌のタンパク質」、「癌mRNA」、「表Iに列挙した癌のmRNA」などとも呼ばれる。一態様において、癌タンパク質は、図1の核酸によってコードされる。癌タンパク質は、フラグメント、あるいは図1の核酸によってコードされる全長タンパク質でもよい。一態様において、癌アミノ酸配列は、配列同一性または配列類似性を決定するために使用される。別の態様において、配列は、図1の核酸によってコードされるタンパク質の天然の対立遺伝子変異体である。別の態様において、配列は、本明細書中にさらに記載されるような、配列変異体である。

【００５５】

「ヘテロ結合体」抗体は、本方法および組成物において有用である。本明細書において使用される場合、「ヘテロ結合体抗体」という用語は、共有結合した2つの抗体を指す。このような抗体は、架橋剤の使用を含む合成タンパク質化学における公知方法を使用して調製することができる。例えば、米国特許第4,676,980号を参照のこと。

【００５６】

特定の核酸またはタンパク質産物の存在、非存在、定量、もしくは他の特性についての「ハイスループットスクリーニング」アッセイが、当業者にとって周知である。同様に、結合アッセイおよびレポーター遺伝子アッセイも同様に周知である。従って、例えば、米国特許第5,559,410号は、タンパク質のハイスループットスクリーニング方法を開示する；米国特許第5,585,639号は、核酸結合についての(すなわち、アレイにおける)ハイスループットスクリーニング方法を開示する；一方、米国特許第5,576,220号および米国特許第5,541,061号は、リガンド/抗体結合についてのハイスループットスクリーニング方法を開示する。

【００５７】

さらに、ハイスループットスクリーニングシステムは市販されている(例えば、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ；Zymark Corp., Hopkinton, MA；Air Technical Industries, Mentor, OH；Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA；Precision Systems, Inc., Natick, MAなどを参照のこと)。これらのシステムは、典型的には、全てのサンプルおよび試薬のピペッティング、液体分配、時間の決まったインキュベーション、ならびにアッセイに適した検出器におけるマイクロプレートの最終読み取りを含む、手順全体を自動化する。これらの設定可能なシステムは、ハイスループットおよび迅速な開始ならびに

高度の柔軟性およびカスタマイゼーションを提供する。このようなシステムの製造業者は、種々のハイスループットシステムのための詳細なプロトコールを提供する。従って、例えば、Zymark Corp.は、遺伝子転写の調節、リガンド結合などを検出するためのスクリーニングシステムについて述べた技術報告を提供する。

【００５８】

「ホモログ」という用語は、例えば、対応する位置において同じである、または類似する化学残基の配列を有することによって、別の分子に対して相同性を示す分子を指す。

【００５９】

一態様において、本明細書において提供される抗体は、「ヒト抗体」である。本明細書において使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、相補性決定領域(CDR)を含む、軽鎖配列および重鎖配列の本質的に全ての配列がヒト遺伝子由来である、抗体を指す。一態様において、ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ技術、ヒトB細胞技術(例えば、Kozbor, et al., Immunol.Today 4:72(1983)を参照のこと)、EBV形質転換技術(例えば、Cole, et al.,MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY 77-96(1985)を参照のこと)によって、またはファージディスプレイ(例えば、Marks, et al., J.Mol.Biol.222:581(1991)を参照のこと)によって調製される。特定の態様において、ヒト抗体は、トランスジェニックマウスにおいて産生される。このような部分的または完全なヒトの抗体を作るための技術は当技術分野において公知であり、このような任意の技術を使用することができる。1つの特定の好ましい態様によれば、完全ヒト抗体配列が、ヒト重鎖抗体遺伝子およびヒト軽鎖抗体遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作られる。ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスおよびその子孫を調製することに関する例示的記載は、出願番号WO02/43478および米国特許第6,657,103号(Abgenix)において見出される。次いで、望ましい抗体を産生するトランスジェニックマウス由来のB細胞が、その抗体の連続的産生のためのハイブリドーマ細胞株を作るために融合することができる。例えば、米国特許第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号；および同第5,545,806号；ならびにJakobovits, Adv.Drug Del.Rev.31:33-42(1998)；Green, et al., J.Exp.Med.188:483-95(1998)を参照のこと。

【００６０】

「ヒト白血球抗原」または「HLA」とは、ヒトのクラスIまたはクラスIIの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)タンパク質である(例えば、Stites, et al., IMMUNOLOGY, 8TH ED., Lange Publishing, Los Altos, CA(1994)を参照のこと)。

【００６１】

本明細書において使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト(例えば、マウス)抗体由来の配列ならびにヒト抗体由来の配列を含む、抗体の形態を指す。このような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む、キメラ抗体である。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインのうちの実質的に全てを含み、その超可変ループのうちの全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域のうちの全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンのものを含む。例えば、Cabilly,米国特許第4,816,567号；Queen, et al., (1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033；およびANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH(Oxford University Press 1996)を参照のこと。

【００６２】

「ハイブリダイズする(hybridize)」、「ハイブリダイズしている(hybridizing)」、「ハイブリダイズする(hybridizes)」などという用語は、ポリヌクレオチドの文脈において使用される場合、従来のハイブリダイゼーション条件、好ましくは、例えば、50％ホルムアミド/6XSSC/0.1％ SDS/100μg/ml ssDNA中におけるハイブリダイゼーション、ここで、ハイブリダイゼーションの温度は37℃よりも高く、0.1XSSC/0.1％SDSによる洗浄の温度は55℃よりも高い、を指す。

【００６３】

「単離された」または「生物学的に純粋な」という句は、ある物質のネイティブ状態において見出される、通常はその物質に付随する成分を実質的または本質的に含まない、物質を指す。従って、本発明による単離されたペプチドは、好ましくはそのペプチドのインサイチュ環境においてそのペプチドに通常は付随する物質を含まない。例えば、ポリヌクレオチドは、24P4C12遺伝子以外の遺伝子に対応するかもしくは相補的であるか、またはその24P4C12遺伝子産物以外のポリペプチドもしくはそのフラグメントをコードする、汚染ポリヌクレオチドから実質的に分離されている場合に「単離された」と言われる。当業者であれば、単離された24P4C12ポリヌクレオチドを得るために核酸単離手順を容易に使用することができる。タンパク質は、例えば、24P4C12タンパク質に通常は付随する細胞構成物から24P4C12タンパク質を取り出すために物理的方法、機械的方法、または化学的方法が使用される場合に「単離された」と言われる。当業者であれば、単離された24P4C12タンパク質を得るために、標準的な精製方法を容易に使用することができる。または、単離されたタンパク質は化学的手段によって調製することができる。

【００６４】

適切な「標識」には、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光部分、化学発光部分、磁気粒子などが含まれる。このような標識の使用を開示する特許には、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号；および同第4,366,241号が含まれる。さらに、本明細書において提供される抗体は、フルオロボディ(fluorobody)の抗原結合成分として有用であり得る。例えば、Zeytun, et al., Nat.Biotechnol.21:1473-79(2003)を参照のこと。

【００６５】

「哺乳動物」という用語は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、およびヒトを含む、哺乳動物として分類される任意の生物を指す。本発明の一態様において、哺乳動物はマウスである。本発明の別の態様において、哺乳動物はヒトである。

【００６６】

「転移癌」および「転移疾患」という用語は、局所的リンパ節または遠位部位に広がっている癌を意味し、AUAシステムにおけるステージDの疾患およびTNMシステムにおけるステージTxNxM＋を含むことを意味する。

【００６７】

「モジュレーター」もしくは「試験化合物」もしくは「薬物候補」という用語または文法的等価物は、本明細書において使用される場合、癌の表現型または癌配列、例えば、核酸配列もしくはタンパク質配列の発現または癌配列の効果、例えば、シグナル伝達、遺伝子発現、タンパク質相互作用などを直接的もしくは間接的に変える能力について試験しようとする任意の分子、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、有機低分子、多糖、ポリヌクレオチドなどを指す。一局面において、モジュレーターは、本発明の癌タンパク質の効果を中和する。「中和する」とは、タンパク質の活性が、細胞に対する結果として生じる効果とともに阻害もしくはブロックされることを意味する。別の局面において、モジュレーターは、本発明の遺伝子およびその対応するタンパク質の効果を、そのタンパク質のレベルを規準化することによって中和する。好ましい態様において、モジュレーターは、発現プロフィール、本明細書において提供される核酸またはタンパク質の発現プロフィール、または下流エフェクター経路を変える。一態様において、モジュレーターは、癌の表現型を、例えば、正常な組織フィンガープリントへと抑制する。別の態様において、モジュレーターは、癌の表現型を誘導した。一般的に、複数のアッセイ混合物が、種々の薬剤濃度を用いて並行して実施されて、その種々の濃度に対する応答の差が得られる。典型的には、これらの濃度のうちの1つは、ネガティブコントロール、すなわち、ゼロ濃度または検出レベル未満として役立つ。

【００６８】

モジュレーター、薬物候補、または試験化合物は、多数の化学物質のクラスを含むが、典型的には、これらは、有機分子、好ましくは、100ダルトン超および約2,500ダルトン未満の分子量を有する有機低分子化合物である。好ましい低分子は、2000D未満または1500D

未満または1000D未満または500D未満である。候補薬剤は、タンパク質との構造的相互作用、特に、水素結合のために必要な官能基を含み、典型的には、少なくともアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基を含み、好ましくは、これらの官能化学基のうちの少なくとも2つを含む。この候補因子は、しばしば、前記の官能基のうちの1つまたはそれ以上で置換された環状炭素構造もしくは複素環式構造、および/または芳香環構造もしくは多芳香環構造を含む。モジュレーターはまた、生体分子、例えば、ペプチド、糖、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体、それらの構造アナログ、もしくはそれらの組み合わせを含む。特に好ましいのは、ペプチドである。ある種類のモジュレーターは、ペプチドであり、例えば、約5アミノ酸～約35アミノ酸であり、約5アミノ酸～約20アミノ酸が好ましく、約7アミノ酸～約15アミノ酸が特に好ましい。好ましくは、癌調節タンパク質は可溶性であり、非膜貫通領域を含み、かつ/または溶解性を補助するためのN末端Cysを有する。一態様において、フラグメントのC末端は遊離酸として維持され、そのN末端は、カップリング、すなわち、システインに対するカップリングを補助するための遊離アミンである。一態様において、本発明の癌タンパク質は、本明細書において考察されるような免疫原性薬剤に結合体化される。一態様において、癌タンパク質はBSAに結合体化される。例えば、好ましい長さの本発明のペプチドは、それよりも長いペプチド/タンパク質を作り出すために互いに、または他のアミノ酸に連結することができる。調節ペプチドは、前記で概説されるような天然のタンパク質の消化物、ランダムペプチド、または「偏りのある(biased)」ランダムペプチドでもよい。好ましい態様において、ペプチド/タンパク質ベースのモジュレーターは、本明細書において定義されるような抗体およびそのフラグメントである。

【００６９】

癌のモジュレーターはまた核酸でもよい。核酸調節薬剤は、天然の核酸、ランダム核酸、または「偏りのある」ランダム核酸でもよい。例えば、原核生物または真核生物のゲノム消化物が、タンパク質について前記で概説されたアプローチと同様のアプローチにおいて使用することができる。

【００７０】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体、すなわち、その集団を含む個々の抗体は、微量で存在し得る、起こり得る天然の変異以外は同じである、を指す。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、1つの抗原性エピトープに対する。対照的に、従来の(ポリクローナル)抗体調製物は、典型的には、異なるエピトープに対する(すなわち、それに特異的な)複数の抗体を含む。一態様において、ポリクローナル抗体は、複数の抗原性エピトープを含む1つの抗原との異なるエピトープ特異性、親和性、またはアビディティを有する、複数のモノクローナル抗体を含む。修飾語「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られている抗体の特徴を示し、これは、特定の何らかの方法により抗体を産生することを必要とすると解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるべきモノクローナル抗体は、Kohler, et al., Nature 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作られてもよく、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)によって作られてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson, et al., Nature 352:624-628(1991)およびMarks, et al., J.Mol.Biol.222:581-597(1991)に記載された技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離することができる。これらのモノクローナル抗体は、通常はELISAによって決定される、通常は少なくとも約1μM、より通常は少なくとも約300nM、典型的には少なくとも約30nM、好ましくは少なくとも約10nM、より好ましくは少なくとも約3nM以上のKdで結合する。

【００７１】

24P4C12関連タンパク質の生物学的モチーフのように、「モチーフ」とは、特定の機能(例えば、タンパク質間相互作用、タンパク質-DNA相互作用など)もしくは修飾(例えば、リン酸化、グリコシル化、もしくはアミド化)もしくは局在化(例えば、分泌配列、核局在化配列など)に関連するタンパク質の一次配列のアミノ酸形成部分、または体液性もしくは

細胞性の免疫原性と相関する配列の任意のパターンを指す。モチーフは連続してもよく、特定の機能または特性に一般的に相関する特定の位置に整列されてもよい。HLAモチーフの文脈において、「モチーフ」とは、特定のHLA分子によって認識される、規定された長さのペプチド、通常は、クラスI HLAモチーフについて約8アミノ酸～約13アミノ酸のペプチド、クラスIIHLAモチーフについて約6アミノ酸～約25アミノ酸のペプチドにある残基パターンを指す。HLA結合のためのペプチドモチーフは、典型的には、各ヒトHLA対立遺伝子によってコードされる各タンパク質について異なり、かつ一次アンカー残基および二次アンカー残基のパターンが異なる。頻繁に出現するモチーフを表Vに示した。

【００７２】

「薬学的賦形剤」とは、アジュバント、担体、pH調整剤、および緩衝剤、張性調整剤、湿潤剤、防腐剤などの物質を含む。

【００７３】

「薬学的に許容可能な」とは、ヒトまたは他の哺乳動物と生理学的に適合性である、非毒性および/または不活性の組成を指す。

【００７４】

「ポリヌクレオチド」という用語は、長さが少なくとも10塩基もしくは10塩基対のヌクレオチド、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドのいずれか、またはいずれかの型のヌクレオチドの改変形態のポリマー形態を意味し、これは、一本鎖形態および二本鎖形態のDNAおよび/またはRNAを含む。当技術分野において、この用語は、しばしば、「オリゴヌクレオチド」と同義に用いられる。ポリヌクレオチドは、本明細書において開示される配列を含んでもよく、例えば、図1に示したように、チミジン(T)はまたウラシル(U)でもよい、この定義は、DNAとRNAとの間の化学構造の差、特に、RNAにおける4種の主要な塩基のうちの1つがチミジン(T)の代わりにウラシル(U)であるという観察に関係がある。

【００７５】

「ポリペプチド」という用語は、少なくとも約4アミノ酸、少なくとも約5アミノ酸、少なくとも約6アミノ酸、少なくとも約7アミノ酸、または少なくとも約8アミノ酸のポリマーを意味する。本明細書全体を通して、アミノ酸に関する標準的な3文字または1文字の名称が、使用される。当技術分野において、この用語は、しばしば、「ペプチド」または「タンパク質」と同義である。

【００７６】

HLA「一次アンカー残基」とは、免疫原性ペプチドとHLA分子との間の接触点を提供すると理解される、ペプチド配列に沿った特定の位置にあるアミノ酸である。一般的には、規定された長さのペプチド中にある1～3個、通常は2個の一次アンカー残基が免疫原性ペプチドの「モチーフ」を規定する。これらの残基は、HLA分子のペプチド結合溝と密接に接触して適合すると理解され、その側鎖は、その結合溝の特定のポケット中に埋没している。一態様において、例えば、HLAクラスI分子の一次アンカー残基は、本発明による8残基、9残基、10残基、11残基、または12残基のペプチドエピトープの位置2(アミノ末端位置から)およびカルボキシ末端位置にある。または、別の態様において、HLAクラスII分子に結合するペプチドの一次アンカー残基は、ペプチドの末端に対してではなく互いに対して間隔を空けており、そのペプチドは、一般的には長さが少なくとも9アミノ酸である。各モチーフおよびスーパーモチーフの一次アンカー位置を表IV(a)に示した。例えば、アナログペプチドは、表IVに示した一次アンカー位置および/または二次アンカー位置における特定の残基の存在もしくは不在を変えることによって作り出すことができる。このようなアナログは、特定のHLAモチーフまたはHLAスーパーモチーフを含むペプチドの結合親和性および/または集団範囲を調節するために使用される。

【００７７】

「放射性同位体」には、以下が含まれるが、これに限定されない(非限定的な例示的使用も表IV(I)に示した)。

【００７８】

「ランダム化」または文法的等価物とは、本明細書において核酸およびタンパク質に対して適用される場合、各核酸およびペプチドが、それぞれ、本質的にランダムなヌクレオチドおよびアミノ酸からなることを意味する。これらのランダムなペプチド(または本明細書において考察される核酸)は、任意の位置においてヌクレオチドまたはアミノ酸を組み込んでもよい。その合成プロセスは、ランダム化タンパク質またはランダム化核酸を作製して、その配列の長さにわたって可能な組み合わせのうちの全てまたはほとんどの形成を可能にし、それによってランダム化候補生物活性タンパク質様薬剤のライブラリーを形成するように設計することができる。

【００７９】

一態様において、ライブラリーは「完全にランダム化されており」、どの位置にも、配列の優先性も不変性もない。別の態様において、ライブラリーは「偏りのあるランダム」ライブラリーである。すなわち、その配列中のいくつかの位置が一定のままであるか、または限定数の可能性から選択されるかのいずれかである。例えば、そのヌクレオチドまたはアミノ酸残基は、規定されたクラス、例えば、疎水性アミノ酸、親水性残基、立体的に偏った残基(小さいもしくは大きい)残基の中で、核酸結合ドメインの生成；架橋のためのシステインの生成；SH-3ドメインのためのプロリン；リン酸化部位のためのセリン、スレオニン、チロシン、もしくはヒスチジンなど、またはプリンなどに対してランダム化される。

【００８０】

「組換え」DNA分子またはRNA分子は、インビトロでの分子操作に供された、DNA分子またはRNA分子である。

【００８１】

本明細書において使用される場合、「単鎖Fv」または「scFv」または「単鎖」抗体という用語は、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含む抗体フラグメントを指し、これらのドメインは、一本のポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、Fvポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間に、sFvが抗原結合のための望ましい構造を形成するのを可能にするポリペプチドリンカーをさらに含む。sFvの概説については、Pluckthun, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol.113, RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag, New York, pp.269-315(1994)を参照のこと。

【００８２】

「低分子」の非限定的な例には、24P4C12と結合もしくは相互作用する化合物、24P4C12タンパク質に結合して、好ましくは、その機能を阻害する、ホルモン、神経ペプチド、ケモカイン、臭気物質、リン脂質、アミノ酸、ポリアミン、糖質、ステロイド、無機質、ビタミン、脂肪酸、ヌクレオチド、アルコール、およびその機能的等価物または誘導体を含むリガンドが含まれる。このような非限定的な低分子は、好ましくは、約10kDa未満、より好ましくは約9kDa未満、約8kDa未満、約7kDa未満、約6kDa未満、約5kDa未満、または約4kDa未満の分子量を有する。特定の態様において、24P4C12タンパク質に物理的に会合する、または結合する低分子は、天然の代謝経路において見出されず、かつ/または非水性溶液よりも水溶液によく溶ける。

【００８３】

本明細書において使用される場合、「特異的な」という用語は、標的抗原エピトープに対する抗体の選択的結合を指す。抗体は、所定の条件の組の下で、適切な抗原に対する結合を、無関係の抗原または抗原混合物に対する結合と比較することによって、結合特異性について試験することができる。抗体は、その適切な抗原に対して、無関係の抗原もしくは抗原混合物よりも少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも7倍、好ましくは少なくとも10倍結合する場合に、その抗体は特異的であると考えられる。一態様において、特異的抗体は、24P4C12抗原にのみ結合するが無関係の抗原には結合しない抗体である。別の態様において、特異的抗体は、ヒト24P4C12抗原に結合するが、24P4C12抗原と70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％またはそれ以上のアミノ酸相同性を有する非ヒト24P4C12抗原とは結合しない、抗体である。別の

態様において、特異的抗体は、ヒト24P4C12抗原に結合し、かつマウス24P4C12抗原に結合するが、ヒト抗原に対する結合の程度の方が高い、抗体である。別の態様において、特異的抗体は、ヒト24P4C12抗原に結合しかつ霊長類24P4C12抗原に結合するが、ヒト抗原に対する結合の程度の方が高い、抗体である。別の態様において、特異的抗体は、ヒト24P4C12抗原および任意の非ヒト24P4C12抗原に結合するが、ヒト抗原またはその任意の組み合わせに対する結合の程度の方が高い。

【００８４】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」とは、当業者によって容易に決定可能であり、一般的には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験的計算である。一般的に、長いプローブほど、適切なアニーリングのためには高い温度を必要とし、一方、短いプローブほど低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般的には、相補鎖がその融解温度よりも低い環境において存在する場合に変性核酸配列が再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の望ましい相同性の程度が高い程、使用できる相対温度は高くなる。結果として、高い相対温度ほど、反応条件をよりストリンジェントにする傾向があり、一方、低い温度ほどそうではない傾向があることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーについてのさらなる詳細および説明については、Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【００８５】

「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」とは、本明細書において定義される場合、(1)洗浄のために低いイオン強度および高い温度、例えば、50℃で、0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを使用すること；(2)ハイブリダイゼーションの間に変性剤、例えば、ホルムアミド、例えば、42℃で、50%(v/v)ホルムアミド＋0.1%ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5＋750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを使用すること；または(3)50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハート溶液、超音波処理済みサケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、および10%硫酸デキストランを42℃で使用し、42℃で0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中で洗浄し、55℃で50%ホルムアミド中で洗浄し、その後、EDTAを含む0.1×SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を55℃で行うことによって同定されるが、これに限定されない。「中程度にストリンジェントな条件」とは、Sambrook, et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual, New York:Cold Spring Harbor Press, 1989によって記載されるものが含まれるが、これに限定されず、これには、前記の条件よりも低いストリンジェントである洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度、およびSDS%)が含まれる。中程度にストリンジェントな条件の一例は、1%ウシ血清アルブミン、0.5Mリン酸ナトリウムpH7.5、1.25mM EDTA、および7% SDS、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)を含む溶液における65℃で一晩のインキュベーション、その後の2×SSC/1%SDS、50℃および0.2×SSC/0.1%SDS、50℃におけるフィルターの洗浄である。当業者であれば、温度、イオン強度などを、必要に応じて、プローブ長などの要因に適合するように調整する方法を認識するだろう。

【００８６】

HLA「スーパーモチーフ」は、2つまたはそれ以上のHLA対立遺伝子によってコードされるHLA分子が共有するペプチド結合特異性である。種々の民族集団におけるHLAスーパータイプの全表現型頻度を表IV(f)に示した。種々のスーパータイプの非限定的な構成要素は、以下の通りである:

A2:A＊0201、A＊0202、A＊0203、A＊0204、A＊0205、A＊0206、A＊6802、A＊6901、A＊0207

A3:A3、A11、A31、A＊3301、A＊6801、A＊0301、A＊1101、A＊3101

B7:B7、B＊3501-03、B＊51、B＊5301、B＊5401、B＊5501、B＊5502、B＊5601、B＊6701、

B＊7801、B＊0702、B＊5101、B＊5602
B44:B＊3701、B＊4402、B＊4403、B＊60(B＊4001)、B61(B＊4006)
A1:A＊0102、A＊2604、A＊3601、A＊4301、A＊8001
A24:A＊24、A＊30、A＊2403、A＊2404、A＊3002、A＊3003
B27:B＊1401-02、B＊1503、B＊1509、B＊1510、B＊1518、B＊3801-02、B＊3901、B＊3902、B＊3903-04、B＊4801-02、B＊7301、B＊2701-08
B58:B＊1516、B＊1517、B＊5701、B＊5702、B58
B62:B＊4601、B52、B＊1501(B62)、B＊1502(B75)、B＊1513(B77)
異なるHLAスーパータイプの組み合わせにより生じる集団カバー率(population coverage)の計算値を表IV(g)に示した。

【００８７】
本明細書において使用される場合、「処置するため」または「治療的」および文法的に関連する用語は、疾患の任意の結果についての任意の改善、例えば、生存の延長、罹患率の低下、および/または代替的治療様式の副産物である副作用の減弱を指す。当技術分野において容易に認識されるように、疾患の完全な根絶は、処置行為のための必要要件ではないにも関わらず、好ましい。

【００８８】
「トランスジェニック動物」(例えば、マウスまたはラット)は、トランスジーンを含む細胞を有する動物であり、そのトランスジーンは、出生前、例えば、胚段階に動物またはその動物の祖先に導入されたものである。「トランスジーン」とは、トランスジェニック動物に発生する細胞のゲノム中に組み込まれるDNAである。

【００８９】
本明細書において使用される場合、HLAまたは細胞免疫応答の「ワクチン」は、本発明の1つまたはそれ以上のペプチドを含むまたはコードする組成物である。このようなワクチンの多数の態様、例えば、1つまたはそれ以上の個々のペプチドのカクテル；ポリエピトープペプチドによって含まれる本発明の1つまたはそれ以上のペプチド；または、このような個々のペプチドもしくはポリペプチドをコードする核酸、例えば、ポリエピトープペプチドをコードするミニ遺伝子が、存在する。「1つまたはそれ以上のペプチド」は、本発明の1個～150個またはそれ以上の任意の単位整数全体、例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、105個、110個、115個、120個、125個、130個、135個、140個、145個、または150個もしくはそれ以上のペプチドを含み得る。ペプチドまたはポリペプチドは、任意で、例えば、脂質化、標的化配列もしくは他の配列の付加によって改変することができる。本発明のHLAクラスIペプチドを、HLAクラスIIペプチドと混合もしくは連結して、細胞傷害性Tリンパ球およびヘルパーTリンパ球の両方の活性化を促進することができる。HLAワクチンはまた、ペプチドでパルスした抗原提示細胞、例えば、樹状細胞も含んでもよい。

【００９０】
「変異体」という用語は、記載された型または基準からの変化を示す分子、例えば、具体的に記載されるタンパク質(例えば、図1に示した24P4C12タンパク質)の対応する位置において1つまたはそれ以上の異なるアミノ酸残基を有するタンパク質を指す。アナログは、変異体タンパク質の一例である。スプライスアイソフォームおよび一塩基多型(SNP)が、変異体のさらなる例である。

【００９１】
本発明の「24P4C12関連タンパク質」は、本明細書において具体的に同定されるもの、ならびに本明細書において概説される方法もしくは当技術分野で容易に利用可能な方法に従って過度な実験を行わずに単離/作製および特徴付けすることができる、対立遺伝子変

異体、保存的置換変異体、アナログ、およびホモログを含む。異なる24P4C12タンパク質の部分またはそのフラグメントを合わせた融合タンパク質、ならびに24P4C12タンパク質と異種ポリペプチドとの融合タンパク質もまた包含される。このような24P4C12タンパク質は、総称して、24P4C12関連タンパク質、本発明のタンパク質、または24P4C12と呼ばれる。「24P4C12関連タンパク質」という用語は、4アミノ酸、5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、もしくは25アミノ酸よりも多くの24P4C12タンパク質配列のポリペプチドフラグメント；あるいは少なくとも30アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも45アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも55アミノ酸、少なくとも60アミノ酸、少なくとも65アミノ酸、少なくとも70アミノ酸、少なくとも80アミノ酸、少なくとも85アミノ酸、少なくとも90アミノ酸、少なくとも95アミノ酸、少なくとも100アミノ酸、少なくとも105アミノ酸、少なくとも110アミノ酸、少なくとも115アミノ酸、少なくとも120アミノ酸、少なくとも125アミノ酸、少なくとも130アミノ酸、少なくとも135アミノ酸、少なくとも140アミノ酸、少なくとも145アミノ酸、少なくとも150アミノ酸、少なくとも155アミノ酸、少なくとも160アミノ酸、少なくとも165アミノ酸、少なくとも170アミノ酸、少なくとも175アミノ酸、少なくとも180アミノ酸、少なくとも185アミノ酸、少なくとも190アミノ酸、少なくとも195アミノ酸、少なくとも200アミノ酸、少なくとも225アミノ酸、少なくとも250アミノ酸、少なくとも275アミノ酸、少なくとも300アミノ酸、少なくとも325アミノ酸、少なくとも330アミノ酸、少なくとも335アミノ酸、少なくとも339アミノ酸またはそれ以上の24P4C12タンパク質配列のポリペプチドフラグメントを指す。

【００９２】

II.)24P4C12ポリヌクレオチド

本発明の一局面は、24P4C12遺伝子、24P4C12 mRNAおよび/または24P4C12コード配列の全てもしくは一部に対応するもしくは相補的なポリヌクレオチド、好ましくは、単離された形態、24P4C12関連タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそのフラグメント、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、および関連分子；24P4C12遺伝子配列もしくは24P4C12 mRNA配列またはその一部に相補的なポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド；24P4C12遺伝子、24P4C12 mRNA、24P4C12コードポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド(総称して「24P4C12ポリヌクレオチド」)を提供する。この節において言及される全ての場合において、図1のTはUの場合がある。

【００９３】

24P4C12ポリヌクレオチドの態様には、図1に示した配列を有する24P4C12ポリヌクレオチド；TがUである図1に示した24P4C12のヌクレオチド配列；図1に示した配列を有するポリヌクレオチドのうちの少なくとも10個連続するヌクレオチド；またはTがUである図1に示した配列を有するポリヌクレオチドのうちの少なくとも10個連続するヌクレオチドが含まれる。

【００９４】

24P4C12タンパク質の比較的長い部分をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明の範囲内にある。例えば、図1もしくは図3に示した24P4C12タンパク質「もしくは変異体」のうちのほぼアミノ酸1(もしくは20もしくは30もしくは40など)～ほぼアミノ酸20(もしくは30もしくは40もしくは50など)をコードするポリヌクレオチドが、当技術分野で周知である種々の技術によって作製することができる。これらのポリヌクレオチドフラグメントは、図1に示した24P4C12配列のうちの任意の部分を含み得る。

【００９５】

II.A.)24P4C12ポリヌクレオチドの用途

II.A.1. 遺伝子異常のモニタリング

前段落のポリヌクレオチドには、多数の異なる具体的な用途がある。ヒト24P4C12遺伝子は、「24P4C12の染色体マッピング」という表題の実施例に示した染色体位置にある。

例えば、24P4C12遺伝子はこの染色体に位置するので、24P4C12タンパク質の異なる領域をコードするポリヌクレオチドが、この染色体位置の細胞遺伝学的異常、例えば、種々の癌に関連すると同定された異常を特徴付けるために使用される。特定の遺伝子において、再配列を含む種々の染色体異常が、多数の異なる癌における頻繁な細胞遺伝学的異常として同定されている(例えば、Krajinovic, et al., Mutat.Res.382(3-4):81-83(1998)；Johansson, et al., Blood 86(10):3905-3914(1995)およびFinger, et al., P.N.A.S.85(23):9158-9162(1988)を参照のこと)。従って、24P4C12タンパク質の特定領域をコードするポリヌクレオチドは、悪性表現型に寄与し得る24P4C12をコードする染色体領域中の細胞遺伝学的異常を、以前に可能であったよりも正確に示すために使用することができる新たなツールを提供する。この文脈において、これらのポリヌクレオチドは、とらえにくく、かつ珍しい染色体異常を同定するために、染色体スクリーニングの感度を広げるための当技術分野における必要性を満たす(例えば、Evans, et al., Am.J.Obstet.Gynecol 171(4):1055-1057(1994)を参照のこと)。

【００９６】

さらに、24P4C12は、前立腺癌および他の癌において高発現されることが示されたので、24P4C12ポリヌクレオチドは、癌性組織に対して正常組織における24P4C12遺伝子産物の状態を評価する方法において使用される。典型的には、24P4C12タンパク質の特定領域をコードするポリヌクレオチドは、その24P4C12遺伝子の特定領域、例えば、1つまたはそれ以上のモチーフを含む領域における混乱(perturbation)(例えば、抗原を無くす、欠失、挿入、点変異、または変化など)を評価するために使用される。例示的アッセイには、RT-PCRアッセイならびに一本鎖高次構造多型(SSCP)分析(例えば、Marrogi, et al., J.Cutan.Pathol.26(8):369-378(1999)を参照のこと)が含まれ、これらは両方とも、あるタンパク質の特定領域をコードするポリヌクレオチドを使用して、タンパク質中のこれらの領域を調べる。

【００９７】

II.A.2. アンチセンス態様

本明細書において開示される本発明の他の具体的に意図される核酸関連態様は、天然供給源由来または合成の、ゲノムDNA、cDNA、リボザイム、およびアンチセンス分子、ならびに代替骨格に基づく核酸分子または代替塩基を含む核酸分子であり、24P4C12のRNAもしくはタンパク質の発現を阻害可能な分子を含む。例えば、アンチセンス分子はRNAでもよく、ペプチド核酸(PNA)または非核酸分子、例えば、塩基対依存的にDNAもしくはRNAに特異的に結合するホスホロチオエート誘導体を含む、他の分子でもよい。当業者であれば、24P4C12ポリヌクレオチドおよび本明細書において開示されるポリヌクレオチド配列を使用して、これらの種類の核酸分子を容易に得ることができる。

【００９８】

アンチセンス技術は、細胞内に位置する標的ポリヌクレオチドに結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与を含む。「アンチセンス」という用語は、このようなオリゴヌクレオチドが、その細胞内標的、例えば、24P4C12に相補的であるという事実を指す。例えば、Jack Cohen, Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989；およびSynthesis 1:1-5(1988)を参照のこと。本発明の24P4C12アンチセンスオリゴヌクレオチドは、誘導体、例えば、S-オリゴヌクレオチド(ホスホロチオエート誘導体もしくはSオリゴ(Jack Cohen(前出)を参照のこと)を含み、これらは強い癌細胞増殖阻害作用を示す。S-オリゴ(ヌクレオシドホスホロチオエート)は、そのリン酸基の非架橋酸素原子がイオウ原子で置換されている、オリゴヌクレオチド(O-オリゴ)の等電性アナログである。本発明のS-オリゴは、対応するO-オリゴを、イオウ転移試薬である3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン-1,1-ジオキシドで処理することによって調製することができる。例えば、Iyer, R.P., et al., J.Org.Chem.55:4693-4698(1990)；およびIyer, R.P., et al., J.Am.Chem.Soc.112:1253-1254(1990)を参照のこと。本発明のさらなる24P4C12アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知であるモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、Partridge, et al., 1996, Antisense & Nucleic Acid Drug Deve

lopment 6:169-175を参照のこと)を含む。

【００９９】

本発明の24P4C12アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、24P4C12ゲノム配列もしくは対応するmRNAの最初の100個の5'コドンもしくは最後の100個の3'コドンに相補的でありかつそれと安定にハイブリダイズする、RNAもしくはDNAでもよい。完全に相補することは必要でないが、高度の相補性が好ましい。この領域に相補的なオリゴヌクレオチドの使用は、プロテインキナーゼの他の調節サブユニットを特定するmRNAではなく24P4C12 mRNAへの選択的ハイブリダイゼーションを可能にする。一態様において、本発明の24P4C12アンチセンスオリゴヌクレオチドは、24P4C12 mRNAにハイブリダイズする配列を有するアンチセンスDNA分子の15マー～30マーフラグメントである。任意で、24P4C12アンチセンスオリゴヌクレオチドは、24P4C12の最初の10個の5'コドンまたは最後の10個の3'コドンにおける領域に対して相補的な30マーオリゴヌクレオチドである。または、アンチセンス分子は、24P4C12発現の阻害においてリボザイムを使用するために改変される。例えば、L.A.Couture & D. T. Stinchcomb; Trends Genet 12:510-515(1996)を参照のこと。

【０１００】

II.A.3. プライマーおよびプライマー対

本発明のこれらのヌクレオチドのさらなる特定の態様には、本発明のポリヌクレオチドもしくはその任意の特定部分の特異的増幅を可能にする、プライマーおよびプライマー対；ならびに本発明の核酸もしくはその任意の部分に対して選択的もしくは特異的にハイブリダイズするプローブが含まれる。プローブは、検出可能なマーカー、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生体発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、または酵素で標識することができる。このようなプローブおよびプライマーは、サンプル中の24P4C12ポリヌクレオチドの存在を検出するために、および24P4C12タンパク質を発現する細胞を検出するための手段として使用される。

【０１０１】

このようなプローブの例には、図1に示したヒト24P4C12 cDNA配列のうちの全てまたは一部を含むポリペプチドが含まれる。24P4C12 mRNAを特異的に増幅可能なプライマー対の例もまた、実施例に記載される。当業者によって理解されるように、非常に多数の異なるプライマーおよびプローブが、本明細書において提供される配列に基づいて調製することができ、24P4C12 mRNAを増幅および/または検出するために有効に使用することができる。

【０１０２】

本発明の24P4C12ポリヌクレオチドは、24P4C12遺伝子、24P4C12 mRNAもしくはそれらのフラグメントの増幅および/もしくは検出のためのプローブおよびプライマーとしての使用；前立腺癌および他の癌の診断および/もしくは予後判定のための試薬としての使用；24P4C12ポリペプチドを発現することができるコード配列としての使用；24P4C12遺伝子の発現および/もしくは24P4C12転写物の翻訳を調節もしくは阻害するためのツールとしての使用；ならびに治療剤としての使用が含まれるが、これに限定されない、種々の目的のために有用である。

【０１０３】

本発明は、天然の供給源、例えば、ヒトまたは他の哺乳動物から24P4C12もしくは24P4C12関連核酸配列を同定および単離するための本明細書において記載される任意のプローブの使用、ならびに使用されるプローブに見られる配列の全てもしくはほとんどを含む、単離された核酸配列それ自体の使用を含む。

【０１０４】

II.A.4. 24P4C12コード核酸分子の単離

本明細書において記載される24P4C12 cDNA配列は、24P4C12遺伝子産物をコードする他のポリヌクレオチドの単離、ならびに24P4C12遺伝子産物ホモログをコードするポリヌクレオチド、24P4C12遺伝子産物の選択的スプライスアイソフォーム、24P4C12遺伝子産物の対立遺伝子変異体、24P4C12遺伝子産物の変異形態、ならびに24P4C12関連タンパク質のア

ナログをコードするポリヌクレオチドの単離を可能にする。24P4C12遺伝子をコードする全長cDNAを単離するために使用することができる種々の分子クローニング方法が周知である(例えば、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989；Current Protocols in Molecular Biology.Ausubel, et al., Eds., Wiley and Sons, 1995を参照のこと)。例えば、λファージクローニング方法論が、市販のクローニングシステム(例えば、Lambda ZAP Express, Stratagene)を用いて簡便に使用することができる。24P4C12遺伝子cDNAを含むファージクローンは、標識された24P4C12 cDNAまたはそのフラグメントでプロービングすることによって同定することができる。例えば、一態様において、24P4C12 cDNA(例えば、図1)またはその一部を合成することができ、24P4C12遺伝子に対応する重複cDNAおよび全長cDNAを回収するためのプローブとして使用することができる。24P4C12遺伝子自体は、ゲノムDNAライブラリー、細菌人工染色体ライブラリー(BAC)、酵母人工染色体ライブラリー(YAC)などを、24P4C12 DNAプローブまたは24P4C12 DNAプライマーを用いてスクリーニングすることによって単離することができる。

【０１０５】

II.A.5. 組換え核酸分子および宿主-ベクター系

本発明はまた、24P4C12ポリヌクレオチド、そのフラグメント、アナログもしくはホモログを含む、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、BAC、ならびに当技術分野で周知である種々のウイルスベクターおよび非ウイルスベクターが含まれるが、これに限定されない、組換えDNA分子もしくは組換えRNA分子、ならびにこのような組換えDNA分子もしくはRNA分子で形質転換もしくはトランスフェクトされた細胞を提供する。このような分子を作製する方法は、周知である(例えば、Sambrook, et al., 1989, (前出)を参照のこと)。

【０１０６】

本発明はさらに、24P4C12ポリヌクレオチド、そのフラグメント、そのアナログもしくはホモログを含む組換えDNA分子を、適切な原核生物宿主細胞もしくは真核生物宿主細胞中に含む、宿主-ベクター系を提供する。適切な真核生物宿主細胞の例には、酵母細胞、植物細胞、または動物細胞、例えば、哺乳動物細胞もしくは昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス感染性細胞、例えば、Sf9細胞もしくはHighFive細胞)が含まれる。適切な哺乳動物細胞の例には、種々の前立腺癌細胞株、例えば、DU145およびTsuPr1、他のトランスフェクト可能な前立腺癌細胞株もしくは形質導入可能な前立腺癌細胞株、初代細胞(PrEC)、ならびに組換えタンパク質の発現のために日常的に使用される多数の哺乳動物細胞(例えば、COS細胞、CHO細胞、293細胞、293T細胞)が含まれる。より具体的には、24P4C12またはそのフラグメント、アナログもしくはホモログのコード配列を含むポリヌクレオチドは、当技術分野で日常的に使用されかつ広範に公知である多数の宿主-ベクター系を使用して、24P4C12タンパク質またはそのフラグメントを生成するために使用することができる。

【０１０７】

24P4C12タンパク質またはそのフラグメントの発現のために適切な広範囲の宿主-ベクター系が利用可能である。例えば、Sambrook, et al., 1989, (前出)；Current Protocols in Molecular Biology, 1995, (前出)を参照のこと。哺乳動物発現のための好ましいベクターには、pcDNA 3.1myc-His-タグ(Invitrogen)およびレトロウイルスベクターpSR tkneo(Muller, et al., 1991, MCB 11:1785)が含まれるが、これに限定されない。これらの発現ベクターを使用して、24P4C12は、例えば、293、293T、rat-1、PC3、NIH 3T3、およびTsuPr1を含む、いくつかの前立腺癌細胞株および非前立腺細胞株において発現することができる。本発明の宿主-ベクター系は、24P4C12タンパク質またはそのフラグメントの生成のために有用である。このような宿主-ベクター系は、24P4C12および24P4C12変異もしくは24P4C12アナログの機能的特性を研究するために使用することができる。

【０１０８】

組換えヒト24P4C12タンパク質、または、そのアナログもしくはホモログもしくはフラ

グメントは、24P4C12関連ヌクレオチドをコードする構築物を用いてトランスフェクトした哺乳動物細胞により産生することができる。例えば、293T細胞は、24P4C12、または、そのフラグメント、アナログもしくはホモログをコードする発現プラスミドを用いてトランスフェクトすることができ、24P4C12関連タンパク質は、この293T細胞において発現され、組換え24P4C12タンパク質は、標準的な精製方法(例えば、抗24P4C12抗体を用いるアフィニティ精製)を用いて単離される。別の態様において、24P4C12コード配列が、レトロウイルスベクターpSRαMSVtkneo内にサブクローニングされ、24P4C12発現細胞株を樹立するために、種々の哺乳動物細胞株、例えば、NIH 3T3、TsuPr1、PC3、 293およびrat-1に感染させるために使用される。当技術分野で周知である種々の他の発現系もまた使用することができる。24P4C12コード配列にインフレームで接続されたリーダーペプチドをコードする発現構築物が、分泌形態の組換え24P4C12タンパク質を作製するために使用することができる。

【０１０９】

本明細書において考察されるように、遺伝暗号における重複(redundancy)が、24P4C12遺伝子配列におけるバリエーションを可能にする。特に、特定の宿主種は、しばしば、特定のコドンの好みを有することが当技術分野で公知であり、従って、所望の宿主に対して好ましいように、開示される配列を適合させることができる。例えば、好ましいアナログコドン配列は、典型的には、稀なコドン(すなわち、所望の宿主の公知配列において約20%未満の使用頻度を有するコドン)が高頻度のコドンに置換される。特定の種についてのコドンの好みは、例えば、インターネット上で、例えば、URL www.kazusa.or.jp/codon/において利用可能なコドン使用頻度表を利用することによって計算される。

【０１１０】

細胞宿主におけるタンパク質発現を増強するさらなる配列の改変が公知である。これらには、偽ポリアデニル化シグナルをコードする配列、エキソン/イントロンスプライス部位シグナルをコードする配列、トランスポゾン様リピートをコードする配列、および/または、遺伝子発現にとって有害である他のこのような十分に特徴付けられた配列を排除することが含まれる。配列のGC含量は、宿主細胞において発現される公知の遺伝子を参照して計算された所定の細胞宿主についての平均的なレベルに調節される。可能である場合、配列は、推定されるヘアピン二次mRNA構造を避けるように改変される。他の有用な改変には、Kozak, Mol.Cell Biol., 9:5073-5080(1989)に記載されたような、オープンリーディングフレームの開始点における翻訳開始コンセンサス配列の付加が含まれる。当業者であれば、真核生物リボソームが5'側に近いAUGコドンでのみ翻訳を開始するという一般ルールは、希な状況下でしか無くならないことを理解する(例えば、Kozak PNAS 92(7):2662-2666, (1995)およびKozak NAR15(20):8125-8148(1987)を参照のこと)。

【０１１１】

III.)24P4C12関連タンパク質

本発明の別の局面は、24P4C12関連タンパク質を提供する。24P4C12タンパク質の特定の態様は、図1、好ましくは、図1Aに示したヒト24P4C12のアミノ酸配列の全体もしくは一部を有するポリペプチドを含む。または、24P4C12タンパク質の態様は、図1に示した24P4C12のアミノ酸配列中に変更を有する、変異体、ホモログまたはアナログのポリペプチドを含む。

【０１１２】

24P4C12ポリペプチドの態様には、以下:図1に示した配列を有する24P4C12ポリペプチド、TがUである、図1に示した24P4C12ポリヌクレオチド配列によりコードされるペプチド;図1に示した配列を有するポリペプチドの少なくとも10個の連続するヌクレオチド;または、TがUである、図1に示した配列を有するポリヌクレオチドによりコードされる少なくとも10個の連続するペプチドが含まれる。

【０１１３】

アミノ酸の略称は表IIに提供される。保存的アミノ酸置換は、タンパク質の立体構造も機能も変更することなく、タンパク質において頻繁に起こり得る。本発明のタンパク質は

、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個の保存的置換を含み得る。

【０１１４】

本明細書において開示される本発明の態様は、広範な種々の、当技術分野で認められた、24P4C12タンパク質の変異体またはアナログ、例えば、アミノ酸の挿入、欠失および置換を有するポリペプチドを含む。24P4C12変異体は、当技術分野で公知の方法、例えば、部位特異的変異誘発、アラニンスキャニングおよびPCR変異誘発を用いて作製することができる。24P4C12変異体DNAを生成するために、クローニングしたDNAに対して、部位特異的変異誘発(Carter, et al., Nucl.Acids Res., 13:4331(1986)；Zoller, et al., Nucl. Acids Res., 10:6487(1987))、カセット変異誘発(Wells, et al., Gene, 34:315(1985))、制限部位選択的変異誘発(restriction selection mutagenesis)(Wells, et al., Philos.Trans.R.Soc.London SerA, 317:415(1986))、または他の公知技術を行うことができる。

【０１１５】

スキャニングアミノ酸分析もまた、連続配列に沿って、特定の生物学的活性、例えば、タンパク質間相互作用に関与する1つまたはそれ以上のアミノ酸を同定するために使用することができる。好ましいスキャニングアミノ酸の中には、比較的小さな中性アミノ酸がある。このようなアミノ酸には、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが含まれる。典型的には、アラニンは、β炭素を超える側鎖を排除し、変異体の主鎖の立体構造を変更する可能性が低いので、アラニンが、この群の中で好ましいスキャニングアミノ酸である。また、典型的には、アラニンは、最も一般的なアミノ酸であるので好ましい。さらに、アラニンは、埋もれた位置および露出された位置の両方において頻繁に見られる(Creighton, The Proteins, (W.H.Freeman & Co., N.Y.)；Chothia, J.Mol.Biol., 150:1(1976))。アラニンの置換が、適切な量の変異体をもたらさない場合、等配電子(isosteric)アミノ酸を使用することができる。

【０１１６】

本明細書において定義されるように、24P4C12変異体、アナログ、またはホモログは、図1のアミノ酸配列を有する24P4C12タンパク質と「交差反応性」である、少なくとも1つのエピトープを有するという顕著な特質を有する。この文において使用される場合、「交差反応性」とは、24P4C12変異体に特異的に結合する抗体またはT細胞は、図1に示したアミノ酸配列を有する24P4C12タンパク質に特異的にも結合することを意味する。ポリペプチドが、出発24P4C12タンパク質に特異的に結合する抗体またはT細胞によって認識することができるエピトープを含まない場合、このポリペプチドは、図1に示したタンパク質の変異体ではなくなる。当業者であれば、タンパク質を認識する抗体は種々のサイズのエピトープに結合し、連続していてもそうでなくても約4個もしくは5個のアミノ酸のオーダーのグループ分けが、最小のエピトープにある代表的なアミノ酸数であるとみなされることを理解する。例えば、Nair, et al., J.Immunol 2000 165(12):6949-6955；Hebbes, et al., Mol Immunol(1989)26(9):865-73；Schwartz, et al., J Immunol(1985)135(4):2598-608を参照のこと。

【０１１７】

24P4C12関連タンパク質変異体の他のクラスは、図1のアミノ酸配列またはそのフラグメントと、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の類似性を共有する。24P4C12タンパク質変異体またはアナログの別の特定のクラスは、本明細書中に記載されるか、または当技術分野において現在公知である、24P4C12の生物学的モチーフの1つまたはそれ以上を含む。従って、本発明により包含されるのは、出発フラグメントと比べて機能的(例えば、免疫学的)特性が変化している24P4C12フラグメントのアナログ(核酸またはアミノ酸)である。現在当技術分野の一部であるか、または、当技術分野の一部となるモチーフは、図1の核酸配列またはアミノ酸配列に適用されることが理解されるべきである。

【０１１８】

本明細書において議論されるように、本発明の態様は、図1に示した24P4C12タンパク質

の全長より少ないアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。例えば、代表的な本発明の態様は、図1に示した24P4C12タンパク質の4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個またはそれ以上の連続するアミノ酸を有するペプチド/タンパク質を含む。

【０１１９】

24P4C12関連タンパク質は、標準的なペプチド合成技術を用いて、または当技術分野で周知である化学的切断法を用いて作製される。または、組換え法を用いて、24P4C12関連タンパク質をコードする核酸分子を作製することができる。一態様において、核酸分子は、24P4C12タンパク質の規定されるフラグメント(または、その変異体、ホモログもしくはアナログ)を作製するための手段を提供する。

【０１２０】

III.A.)モチーフを有するタンパク質の態様

本明細書において開示される、さらなる例示的な本発明の態様は、図1に示した24P4C12ポリペプチド配列内に含まれる1つまたはそれ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む24P4C12ポリペプチドを含む。種々のモチーフが当技術分野において公知であり、および、タンパク質は、多数の公的に利用可能なインターネットサイト、例えば、BIMASによって、このようなモチーフの存在について評価することができる。

【０１２１】

全ての24P4C12変異体タンパク質のモチーフを有する部分配列は、先に開示されている。

【０１２２】

表IV(h)は、いくつかの頻繁に生じるpfam検索に基づくモチーフを示す(URLアドレスpfam.wustl.edu/を参照のこと)。表IV(h)の縦列は、(1)モチーフ名の略称、(2)モチーフファミリーの異なるメンバー間で見られる%同一性、(3)モチーフの名称または説明、および(4)最も一般的な機能を列挙する。モチーフが、位置と関連性がある場合、位置情報も含まれる。

【０１２３】

前記に議論された1つまたはそれ以上の24P4C12モチーフを含むポリペプチドは、前記に議論された24P4C12モチーフが増殖調節不全に関連するという観察を考慮すると、悪性表現型の特定の特徴を解明するのに有用である。なぜならば、24P4C12は特定の癌において過剰発現しているからである(例えば、表Iを参照のこと)。例えば、カゼインキナーゼII、cAMPおよびcamp依存性プロテインキナーゼ、ならびにプロテインキナーゼCは、悪性表現型の発生に関与することが公知の酵素である(例えば、Chen, et al., Lab Invest., 78(2):165-174(1998)；Gaiddon, et al., Endocrinology 136(10):4331-4338(1995)；Hall, et al., Nucleic Acids Research 24(6):1119-1126(1996)；Peterziel, et al., Oncogene 18(46):6322-6329(1999)およびO'Brian, Oncol.Rep.5(2):305-309(1998)を参照のこと)。さらに、グリコシル化およびミリストイル化は両方とも、癌および癌の進行にも関連するタンパク質の改変である(例えば、Dennis, et al., Biochem.Biophys.Acta 1473(1):21-34(1999)；Raju, et al., Exp.Cell Res. 235(1):145-154(1997)を参照のこと)。アミド化は、癌および癌の進行にも関連する別のタンパク質改変である(例えば、Treston, et al., J.Natl.Cancer Inst.Monogr.(13):169-175(1992)を参照のこと)。

【０１２４】

別の態様において、本発明のタンパク質は、当技術分野で認められた方法に従って同定された1つまたはそれ以上の免疫反応性エピトープ、例えば、先に開示されるペプチドを含む。CTLエピトープは、特定のHLA対立遺伝子に最適に結合することができる24P4C12タンパク質内のペプチドを同定するために特定のアルゴリズムを用いて決定することができる(例えば、表IV；Epimatrix(商標)およびEpimer(商標), Brown University, URL brown.edu/Research/TB-HIV _Lab/epimatrix/epimatrix.html、ならびにBIMAS , URL bimas.dcrt.nih.gov/.)。さらに、HLA分子に対する十分な結合親和性を有し、免疫原性エピトープであることと相関しているペプチドを同定するためのプロセスは当技術分野で周知であり

、過度の実験を伴わずに行われる。さらに、免疫原性エピトープであるペプチドを同定するためのプロセスは当技術分野で周知であり、インビトロもしくはインビボのいずれかにおける過度の実験を伴わずに行われる。

【０１２５】

免疫原性を調節するために、このようなエピトープのアナログを作製するための原理も当技術分野で公知である。例えば、CTLモチーフまたはHTLモチーフを有するエピトープから開始する(例えば、表IVのHLAクラスIおよびHLAクラスIIのモチーフ/スーパーモチーフを参照のこと)。このエピトープは、特定の位置のうちの1つにあるアミノ酸を置換し、そのアミノ酸を、その位置について特定された別のアミノ酸で置き換えることによってアナログ化される。例えば、表IVに規定される残基に基づくと、任意の他の残基、例えば、好ましい残基のほうを選んで、有害な残基を置換して除くこと；好ましい残基で、あまり好ましくない残基を置換すること；または、別の好ましい残基で、もともと存在する好ましい残基を置換することができる。置換は、ペプチド内の一次アンカー位置、または他の位置において起こり得る；例えば、表IVを参照のこと。

【０１２６】

種々の参考文献が、関心対象のタンパク質およびそのアナログにおけるエピトープの同定および作製に関する技術を示している。例えば、Chesnut, et al.,に対するWO 97/33602；Sette, Immunogenetics 1999 50(3-4):201-212；Sette, et al., J.Immunol.2001 166(2):1389-1397；Sidney, et al., Hum.Immunol.1997 58(1):12-20；Kondo, et al., Immunogenetics 1997 45(4):249-258；Sidney, et al., J.Immunol.1996 157(8):3480-90；およびFalk, et al., Nature 351:290-6(1991)；Hunt, et al., Science 255:1261-3(1992)；Parker, et al., J.Immunol.149:3580-7(1992)；Parker, et al., J.Immunol.152:163-75(1994))；Kast, et al., 1994 152(8):3904-12；Borras-Cuesta, et al., Hum.Immunol.2000 61(3):266-278；Alexander, et al., J.Immunol.2000 164(3)；164(3):1625-1633；Alexander, et al., PMID:7895164, UI:95202582；O'Sullivan, et al., J.Immunol.1991 147(8):2663-2669；Alexander, et al., Immunity 1994 1(9):751-761ならびにAlexander, et al., Immunol.Res.1998 18(2):79-92を参照のこと。

【０１２７】

関連する本発明の態様は、表IV(a)、表IV(b)、表IV(c)、表IV(d)および表IV(h)に示した異なるモチーフの組み合わせを含むポリペプチド、ならびに/または、先に開示される1つもしくはそれ以上の推定CTLエピトープ、ならびに/または当技術分野で公知の1つもしくはそれ以上のT細胞結合モチーフを含む。好ましい態様は、モチーフ内、または、ポリペプチドの介在配列内のいずれにも、挿入も欠失も置換も含まない。さらに、例えば、モチーフが位置するポリペプチド構造のより多くの部分を含めるためには、これらのモチーフのいずれかの側に、多数のN末端および/またはC末端アミノ酸残基を含む態様が望ましい場合がある。典型的には、モチーフのいずれかの側にあるN末端および/またはC末端のアミノ酸残基の数は、約1アミノ酸残基～約100アミノ酸残基であり、好ましくは、5～約50アミノ酸残基である。

【０１２８】

24P4C12関連タンパク質は、多くの形態、好ましくは、単離された形態で具体化される。精製24P4C12タンパク質分子は、抗体、T細胞または他のリガンドに対する24P4C12の結合を損なう他のタンパク質または分子を実質的に含まない。単離および精製の性質および程度は、意図される用途に依存する。24P4C12関連タンパク質の態様は、精製された24P4C12関連タンパク質、および、機能的な可溶性24P4C12関連タンパク質を含む。一態様において、機能的な可溶性24P4C12タンパク質またはそのフラグメントは、抗体、T細胞または他のリガンドにより結合される能力を保持する。

【０１２９】

本発明はまた、図1に示した24P4C12アミノ酸配列の生物学的に活性なフラグメントを含む24P4C12タンパク質を提供する。このようなタンパク質は、出発24P4C12タンパク質の特性、例えば、出発24P4C12タンパク質に付随するエピトープに特異的に結合する抗体の作

製を誘発する能力；このような抗体により結合される能力；HTLもしくはCTLの活性化を誘発する能力；および/または出発タンパク質にも特異的に結合するHTLもしくはCTLにより認識される能力を示す。

【０１３０】

特に興味のある構造を含む24P4C12関連ポリペプチドは、例えば、Chou-Fasman法、Garnier-Robson法、Kyte-Doolittle法、Eisenberg法、Karplus-Schultz法、もしくはJameson-Wolf分析を含む当技術分野で周知である種々の分析技術を用いて、または免疫原性に基づいて推定および/または同定することができる。このような構造を含むフラグメントは、サブユニット特異的な抗24P4C12抗体もしくはT細胞の作製において、または、24P4C12に結合する細胞因子の同定において特に有用である。例えば、Hopp, T.P. and Woods, K.R. 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:3824-3828の方法を用いて、親水性プロフィールを作製し、免疫原性ペプチドフラグメントを同定することができる。Kyte, J. and Doolittle, R.F.1982, J.Mol.Biol.157:105-132の方法を用いて、ハイドロパシープロフィールを作製し、免疫原性ペプチドフラグメントが同定することができる。Janin J.1979, Nature 277:491-492の方法を用いて、接近可能残基(Accessible Residues)パーセント(%)のプロフィールを作製し、免疫原性ペプチドフラグメントを同定することができる。Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K.1988, Int.J.Pept.Protein Res.32:242-255の方法を用いて、平均可撓性(Average Flexibility)プロフィールを作製し、免疫原性ペプチドフラグメントを同定することができる。Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294の方法を用いて、β-ターンプロフィールを作製し、免疫原性ペプチドフラグメントを同定することができる。

【０１３１】

特定されたHLA対立遺伝子、例えば、BIMASおよびSYFPEITHIへ最適に結合することができる24P4C12タンパク質内のペプチドを同定するために、特定のアルゴリズムを使用して、CTLエピトープを決定することができる。これを例示すると、ヒトMHCクラスI分子、例えば、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11、HLA-A24、HLA-B7およびHLA-B35の状況において提示される24P4C12由来のペプチドエピトープが予測された。具体的には、24P4C12タンパク質の完全アミノ酸配列および他の変異体の関連部分、すなわち、HLAクラスI予測については、点変異またはエキソン接合部のいずれかの側にある9個の隣接する残基、およびHLAクラスII予測については、その変異体に対応する、点変異またはエキソン接合部のいずれかの側にある14個の隣接する残基を、バイオインフォマティクスおよび分子的分析の項において見出されるHLAペプチドモチーフ検索アルゴリズムに入力した。

【０１３２】

このHLAペプチドモチーフ検索アルゴリズムは、HLAクラスI分子、特に、HLA-A2の溝にある特定のペプチド配列の結合に基づいて、Ken Parker博士によって開発された(例えば、Falk et al., Nature 351:290-6(1991)；Hunt et al., Science 255:1261-3(1992)；Parker et al., J.Immunol.149:3580-7(1992)；Parker et al., J.Immunol.152:163-75(1994)を参照のこと)。このアルゴリズムは、HLA-A2ならびに多くの他のHLAクラスI分子への推定される結合について、完全タンパク質配列から8マー、9マー、および10マーのペプチドの位置および順位付けを可能にする。多くのHLAクラスI結合ペプチドは、8マー、9マー、10マーまたは11マーである。例えば、クラスI HLA-A2に関して、このエピトープは、好ましくは、位置2にロイシン(L)もしくはメチオニン(M)を、およびC末端にバリン(V)もしくはロイシン(L)を含む(例えば、Parker et al., J.Immunol.149:3580-7(1992)を参照のこと)。24P4C12の推定される結合ペプチドの選択された結果が示されている。結合スコアは、pH6.5において37℃での、ペプチドを含む複合体の解離の推定半減期に相当する。最高の結合スコアを有するペプチドは、細胞表面上のHLAクラスIに最長時間で最も強く結合すると推定され、従って、T細胞認識に最良の免疫原性標的である。

【０１３３】

HLA対立遺伝子へのペプチドの実際の結合は、抗原プロセシング欠損細胞株T2上のHLA発現の安定化によって評価することができる(例えば、Xue et al., Prostate 30:73-8(1997

)およびPeshwa et al., Prostate 36:129-38(1998)を参照のこと)。特定のペプチドの免疫原性は、抗原提示細胞、例えば、樹状細胞の存在下でのCD8＋細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の刺激によってインビトロで評価することができる。

【０１３４】

BIMASサイト、Epimer(商標)サイトおよびEpimatrix(商標)サイトによって推定されるか、または当技術分野で利用可能なHLAクラスIモチーフもしくはHLAクラスIIモチーフによって特定されるか、または当技術の一部、例えば、表IVに記載のものになっている全てのエピトープは、本発明に従って、24P4C12タンパク質に「適用」されると認識されよう。この状況において使用される場合、「適用」されるとは、関連分野の当業者によって認識されるように、例えば、視覚的にもしくはコンピューターベースのパターン発見法によって、24P4C12タンパク質が評価されることを意味する。HLAクラスIモチーフを有する、8アミノ酸残基、9アミノ酸残基、10アミノ酸残基、または11アミノ酸残基からなる24P4C12タンパク質の全ての部分配列、またはHLAクラスIIモチーフを有する9個またはそれ以上のアミノ酸残基からなる部分配列は、本発明の範囲内である。

【０１３５】

III.B.)24P4C12関連タンパク質の発現

以下の実施例に記載の態様において、24P4C12は、市販の発現ベクター、例えば、C末端の6XHisおよびMYCタグを有する24P4C12をコードするCMV駆動発現ベクター(pcDNA3.1/mycHIS, InvitrogenまたはTag5, GenHunter Corporation, Nashville TN)でトランスフェクトされた細胞(例えば、293T細胞)において都合よく発現させることができる。このTag5ベクターは、トランスフェクト細胞において分泌型24P4C12タンパク質の産生を促進するために使用することができるIgGK分泌シグナルを提供する。培地中の分泌型HISタグ化24P4C12は、例えば、標準技術を用いるニッケルカラムを使用して精製することができる。

【０１３６】

III.C.)24P4C12関連タンパク質の改変

24P4C12関連タンパク質の改変、例えば、共有結合改変は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合改変の1つの型は、24P4C12ポリペプチドの標的アミノ酸残基と、有機性誘導体化剤とを反応させることを含む。有機性誘導体化剤は、選択された側鎖または24P4C12タンパク質のN末端残基もしくはC末端残基と反応することができる。本発明の範囲内に含まれる24P4C12ポリペプチドの共有結合改変の別の型は、本発明のタンパク質のネイティブグリコシル化パターンを変更することを含む。24P4C12の共有結合改変の別の型は、24P4C12ポリペプチドを、種々の非タンパク質ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンのうちの1つに、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,179,337号に記載される様式で連結することを含む。

【０１３７】

本発明の24P4C12関連タンパク質はまた、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合された24P4C12を含むキメラ分子を形成するように改変することができる。このようなキメラ分子は化学的に合成されてもよいし、組換え的に合成されてもよい。キメラ分子は、別の腫瘍関連抗原またはそのフラグメントに融合された本発明のタンパク質を有してもよい。または、本発明によるタンパク質は、24P4C12配列(アミノ酸または核酸)のフラグメントの融合物を含んでもよい。その結果、長さにわたって、図1に示したアミノ酸配列または核酸配列に直接に相同的でない分子が作られる。このようなキメラ分子は、24P4C12の同じ複数の部分配列を含んでもよい。キメラ分子は、24P4C12関連タンパク質とポリヒスチジンエピトープタグとの融合物を含んでもよい。このポリヒスチジンエピトープタグは、固定化ニッケルが、サイトカインまたは増殖因子に選択的に結合し得るエピトープを提供する。このエピトープタグは、一般的に、24P4C12タンパク質のアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。別の態様において、このキメラ分子は、24P4C12関連タンパク質と免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合物を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン(immunoadhesin)」ともいわれる)に関して

、このような融合物は、IgG分子のFc領域に対するものであり得る。このIg融合物は、好ましくは、Ig分子内の少なくとも1つの可変領域の代わりに、24P4C12ポリペプチドの可溶型(膜貫通ドメインが欠失されている、または不活性化されている)を置換することを含む。好ましい態様において、この免疫グロブリン融合物は、IgGI分子のヒンジ領域とCH2領域とCH3領域、またはヒンジ領域とCH1領域とCH2領域とCH3領域を含む。免疫グロブリン融合物の作製については、例えば、1995年6月27日に発行された米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【０１３８】

III.D.)24P4C12関連タンパク質の用途

本発明のタンパク質には、多くの種々の具体的な用途がある。24P4C12は、前立腺癌および他の癌において高発現しているので、24P4C12関連タンパク質は、正常組織対癌組織における24P4C12遺伝子産物の状態(status)を評価し、それによって、悪性表現型を解明する方法において使用される。典型的には、24P4C12タンパク質の特定の領域に由来するポリペプチドは、これらの領域(例えば、1つまたはそれ以上のモチーフを含む領域)における混乱(例えば、欠失、挿入、点変異など)の存在を評価するために使用される。例示的アッセイは、正常組織対癌組織におけるこの領域の特性を評価するため、またはこのエピトープに対する免疫応答を誘発させるために、24P4C12ポリペプチド配列内に含まれる生物学的モチーフのうちの1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を含む24P4C12関連タンパク質を標的とする、抗体またはT細胞を利用する。または、24P4C12タンパク質中の生物学的モチーフのうちの1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を含む24P4C12関連タンパク質は、24P4C12のその領域と相互作用する因子をスクリーニングするために使用される。

【０１３９】

24P4C12タンパク質フラグメント/部分配列は、24P4C12またはその特定の構造ドメインに結合する薬剤または細胞因子を同定するために、ドメイン特異的抗体(例えば、24P4C12タンパク質の細胞外エピトープまたは細胞内エピトープを認識する抗体)を作製および特徴付けすることにおいて、ならびに診断アッセイ、癌ワクチンおよびこのようなワクチンを調製する方法が含まれるが、これに限定されない、種々の治療および診断の状況において特に有用である。

【０１４０】

24P4C12遺伝子、またはそのアナログ、ホモログもしくはフラグメントによってコードされるタンパク質は、抗体の作製、ならびに24P4C12遺伝子産物に結合するリガンドおよび他の薬剤および細胞構成成分を同定する方法が含まれるが、これに限定されない、種々の用途を有する。24P4C12タンパク質またはそのフラグメントに対して産生された抗体は、診断アッセイおよび予後アッセイにおいて、ならびに24P4C12タンパク質の発現によって特徴付けられるヒトの癌、例えば、表Iに列挙した癌の管理における画像化方法論において有用である。このような抗体は細胞内で発現され、このような癌を有する患者を処置する方法において使用することができる。24P4C12関連核酸または24P4C12関連タンパク質はまた、HTL応答またはCTL応答を発生させることにおいて使用される。

【０１４１】

24P4C12タンパク質の検出のために有用な種々の免疫学的アッセイが使用される。これらのアッセイには、種々の型のラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫測定法(ELISA)、酵素結合免疫蛍光測定法(ELIFA)、免疫細胞化学法などが含まれるが、これに限定されない。抗体は標識され、(例えば、ラジオシンチグラフィー画像化法において)24P4C12発現細胞を検出することができる免疫学的画像化試薬として使用することができる。24P4C12タンパク質はまた、本明細書でさらに記載のように、癌ワクチンを作製することにおいて特に有用である。

【０１４２】

IV.)24P4C12抗体

本発明の別の局面は、24P4C12関連タンパク質(図1を参照のこと)に結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、生理的条件下で、24P4C12関連タンパク質に特異的に結合しかつ2

4P4C12関連タンパク質でないペプチドまたはタンパク質に結合しない(または弱く結合する)。この状況において、生理学的条件の例には、以下:1)リン酸緩衝食塩水；2) 25mM Trisおよび150mM NaClを含む、Tris緩衝食塩水；3)生理食塩水(0.9%NaCl)；4)動物血清、例えば、ヒト血清；または5)1)～4)のいずれかの組み合わせが含まれる。これらの反応は、好ましくは、pH7.5で生じるか、またはpH7.0～8.0の範囲で、またはpH6.5～8.5の範囲で生じる。また、これらの反応は4℃～37℃の温度で生じる。例えば、24P4C12を結合する抗体は、24P4C12関連タンパク質、例えば、24P4C12変異体およびそのホモログもしくはアナログを結合することができる。

【０１４３】

本発明の24P4C12抗体は、特に、癌(例えば、表Iを参照のこと)の診断アッセイおよび予後アッセイ、ならびに画像化方法論において有用である。同様に、このような抗体は、結腸癌および他の癌の処置、診断、および/または予後において、24P4C12がこれらの他の癌においても発現または過剰発現している程度まで有用である。さらに、細胞内で発現される抗体(例えば、単鎖抗体)は、24P4C12の発現が関係する癌、例えば、進行したもしくは転移性の結腸癌または他の進行癌もしくは転移癌を処置することにおいて治療上有用である。

【０１４４】

本発明はまた、24P4C12および変異24P4C12関連タンパク質の検出および定量に有用な種々の免疫学的アッセイを提供する。このようなアッセイは、適宜、24P4C12関連タンパク質を認識および結合することが可能な1つまたはそれ以上の24P4C12抗体を含む。これらのアッセイは、種々の型のラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫測定法(ELISA)、酵素結合免疫蛍光測定法(ELIFA)などを含むが、これに限定されない、当技術分野で周知の種々の免疫学的アッセイ形式の範囲内で行われる。

【０１４５】

本発明の免疫学的非抗体アッセイはまた、T細胞免疫原性アッセイ(阻害性または刺激性)ならびに主要組織適合遺伝子複合体(MHC)結合アッセイを含む。

【０１４６】

さらに、24P4C12を発現する前立腺癌または結腸癌および他の癌を検出することができる免疫学的画像化法もまた本発明によって提供され、これらの方法には、標識24P4C12 MAbを使用するラジオシンチグラフィー画像化法が含まれるが、これに限定されない。このようなアッセイは、結腸癌などの24P4C12発現癌の検出、モニタリング、および予後において臨床上有用である。

【０１４７】

24P4C12抗体はまた、24P4C12関連タンパク質を精製する方法、ならびに24P4C12ホモログおよび関連分子を単離する方法において使用される。例えば、24P4C12関連タンパク質を精製する方法は、固体マトリクスにカップリングされた24P4C12抗体を、24P4C12抗体が24P4C12関連タンパク質に結合するような条件下で、24P4C12関連タンパク質を含む溶解産物または他の溶液とともにインキュベートする工程；この固体マトリクスを洗浄して、不純物を排除する工程；ならびに24P4C12関連タンパク質を、カップリングされている抗体から溶出する工程を含む。本発明による24P4C12抗体の他の用途は、24P4C12タンパク質を模倣する抗イディオタイプ抗体を作製することを含む。

【０１４８】

抗体を調製するための種々の方法が当技術分野で周知である。例えば、抗体は、単離されたまたは免疫結合体の形をした24P4C12関連タンパク質、ペプチド、またはフラグメントを使用して、適切な哺乳動物宿主を免疫することによって調製することができる(Antibodies:A Laboratory Manual, CSH Press編, Harlow and Lane(1988)；Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY(1989))。さらに、24P4C12 GST-融合タンパク質などの24P4C12融合タンパク質も使用することができる。特定の態様において、図1のアミノ酸配列の全てまたは大部分を含むGST融合タンパク質が作製され、次いで、適切な抗体を生成するために、免疫原として使用される。別の態様において、24P4C12関連タンパク質が合

成され、免疫原として使用される。

【０１４９】

さらに、当技術分野で公知の裸のDNAでの免疫技術が、コードされる免疫原に対する免疫応答を発生させるために、(精製24P4C12関連タンパク質または24P4C12発現細胞ありまたはなしで)使用される(総説に関しては、Donnelly et al., 1997, Ann.Rev.Immunol.15:617-648を参照のこと)。

【０１５０】

図1に示した24P4C12タンパク質のアミノ酸配列は、抗体を作製するための24P4C12タンパク質の特定の領域を選択するために分析することができる。例えば、24P4C12アミノ酸配列の疎水性および親水性分析は、24P4C12構造における親水性領域を同定するために使用される。免疫原性構造を示す24P4C12タンパク質の領域、ならびに他の領域およびドメインは、当技術分野で公知の種々の他の方法、例えば、Chou-Fasman分析、Garnier-Robson分析、Kyte-Doolittle分析、Eisenberg分析、Karplus-Schultz分析またはJameson-Wolf分析を使用して容易に同定することができる。親水性プロフィールは、Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:3824-3828の方法を使用して作製することができる。ハイドロパシープロフィールは、Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J.Mol.Biol.157:105-132の方法を使用して作製することができる。パーセント(%)接近可能残基プロフィールは、Janin J., 1979, Nature 277:491-492の方法を用いて作製することができる。平均可撓性プロフィールは、Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int.J.Pept.Protein Res.32:242-255の方法を使用して作製することができる。β-ターンプロフィールは、Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294の方法を使用して作製することができる。従って、これらのプログラムまたは方法のいずれかによって同定される各領域は本発明の範囲内である。24P4C12抗体の作製のための好ましい方法は、本明細書で提供される実施例によってさらに例示される。免疫原として使用するためのタンパク質またはポリペプチドを調製する方法は、当技術分野で周知である。タンパク質と、担体、例えば、BSA、KLHまたは他の担体タンパク質との免疫原性結合体を調製する方法もまた、当技術分野で周知である。ある状況では、例えば、カルボジイミド試薬を用いた直接結合が使用される。他の場合において、連結試薬、例えば、Pierce Chemical Co., Rockford, ILによって供給されるものが有効である。24P4C12免疫原の投与は、当技術分野で理解されるように、しばしば、適切なアジュバントの使用とともに、適切な期間にわたる注射によって行われる。免疫化スケジュールの間に、抗体形成の妥当性を確かめるために、抗体力価を調べることができる。

【０１５１】

24P4C12モノクローナル抗体は、当技術分野で周知の種々の手段によって生成することができる。例えば、望ましいモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、一般に知られるように、KohlerおよびMilsteinの標準的ハイブリドーマ技術または抗体産生B細胞を不死化する改変法を使用して調製される。望ましい抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原が24P4C12関連タンパク質であるイムノアッセイによってスクリーニングされる。適切な不死化細胞培養物が同定された場合、その細胞を増殖させ、インビトロ培養物または腹水のいずれかから抗体を生成することができる。

【０１５２】

本発明の抗体またはフラグメントはまた、組換え手段によって生成することができる。キメラ領域または相補性決定領域(CDR)が接ぎ合わされた複数種由来の抗体の状況において、24P4C12タンパク質の望ましい領域に特異的に結合する領域も生成することができる。ヒト化またはヒトの24P4C12抗体も生成することができ、治療状況における使用に好ましい。非ヒト抗体CDRの1つまたは複数を対応するヒト抗体配列で置換することによって、マウスおよび他の非ヒト抗体をヒト化する方法は周知である(例えば、Jones et al., 1986, Nature 321:522-525；Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327；Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536を参照のこと)。Carter et al., 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285およびSims et al., 1993, J.Immunol.151:2296もまた参照のこと。

【０１５３】
好ましい態様において、本発明の抗体は、完全ヒト24P4C12抗体(24P4C12 MAb)を含む。当技術分野における種々の方法は、完全ヒト24P4C12 MAbを生成する手段を提供する。例えば、好ましい態様は、XenoMouse(Amgen Fremont, Inc.)と呼ばれる、抗体産生が不活性化され、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座を用いて操作されたトランスジェニックマウスを使用した技法を提供する。ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスを作る例示的記載は、米国特許第6,657,103号に見られる。米国特許第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号;および同第5,545,806号;ならびにMendez, et. al., Nature Genetics 15:146-156(1998); Kellerman, S. A. & Green, L. L., Curr. Opin. Biotechnol.13:593-597(2002)も参照されたい。

【０１５４】
さらに、本発明のヒト抗体は、再編成されいないヒト重鎖(μおよびγ)ならびにκ軽鎖免疫グロブリン配列と、内因性μ鎖およびκ鎖遺伝子座を不活性化する標的化変異をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座(miniloci)を含有するHuMAbマウス(Medarex,Inc.)を使用して作製することができる(例えば、Lonberg, et al. (1994)Nature 368(6474):856-859を参照のこと)。

【０１５５】
別の態様において、本発明の完全ヒト抗体は、トランスジーンおよびトランスクロモソーム(transchomosome)上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウス、例えば、ヒト重鎖トランスジーンおよびヒト軽鎖トランスクロモソームを有するマウスを用いて産生することができる。このようなマウスは本明細書において「KM マウス」と呼ばれ、Tomizuka, et al. (2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727およびTomizukaらへのPCT公報WO02/43478に記載されている。

【０１５６】
本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためにファージディスプレイ法を使用して調製することができる。ヒト抗体単離用の、このようなファージディスプレイ法は、当技術分野において確立されている。例えば、Ladner, et al.への米国特許第5,223,409号;同第5,403,484号;および同第5,571,698号;Dower, et al.への米国特許第5,427,908号および同第5,580,717号;McCafferty, et al.への米国特許第5,969,108号および同第6,172,197号;ならびにGriffiths, et al.への米国特許第5,885,793号;同第6,521,404号;同第6,544,731号;同第6,555,313号;同第6,582,915号および同第6,593,081号を参照のこと。

【０１５７】
本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫化の際にヒト抗体応答が発生するように、ヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを使用して作ることもできる。このようなマウスは、例えば、Wilson, et al.への米国特許第5,476,996号および5,698,767号に記載されている。

【０１５８】
さらに別の態様において、本発明の24P4C12 MAbは、本明細書に記載の好ましい抗体のアミノ酸配列とアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む(図3を参照のこと)。ここで、抗体は、本発明の24P4C12 MAbの望ましい機能特性を保持している。

【０１５９】
例えば、本発明は、単離されたモノクローナル抗体、または重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、その抗原結合部分を提供する：
(a)重鎖可変領域は、図3に示したアミノ酸配列と少なくとも80％相同のアミノ酸配列を含む。
(b)軽鎖可変領域は、図3に示したアミノ酸配列と少なくとも80％相同のアミノ酸配列を含む。

【０１６０】

他の態様において、V_Hおよび/またはV_Lアミノ酸配列は、図3に示した配列と85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％または99％相同でもよい。

【０１６１】

本発明の操作された抗体には、(例えば、抗体の特性を改善するために)V_Hおよび/またはV_Lの中のフレームワーク残基が改変されているものが含まれる。典型的に、このようなフレームワークの改変は、抗体の免疫原性を下げるためになされる。例えば、1つのアプローチは、1つまたは複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰突然変異(backmutate)」させることである。より具体的には、体細胞変異を経ている抗体は、抗体の元となった生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有することがある。このような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体の元となった生殖系列配列と比較することによって同定することができる。フレームワーク領域配列をその生殖系列配置に戻すために、例えば、部位特異的変異誘発またはPCRを介した変異誘発によって、体細胞変異を生殖系列配列に「復帰突然変異」させることができる(例えば、ロイシンをメチオニンに「復帰突然変異」させる)。このような「復帰突然変異」抗体もまた本発明に含まれると意図される。

【０１６２】

別の型のフレームワーク改変は、T細胞エピトープを取り除くために、フレームワーク領域の中の1つまたは複数の残基、または1つまたは複数のCDR領域の中の1つまたは複数の残基さえも変異させて、抗体の潜在的な免疫原性を少なくすることを伴う。このアプローチは、「脱免疫化(deimmunization)」とも呼ばれ、Carr, et al.による米国特許公開公報第2003/0153043号にさらに詳しく説明される。

【０１６３】

フレームワークまたはCDR領域の中になされる改変に加えて、またはその代わりとして、本発明の抗体は、典型的には、抗体の1つまたは複数の機能特性、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原依存性細胞傷害性を変えるために、Fc領域内の改変を含むように操作されてもよい。さらに、本発明の24P4C12 MAbは化学的に改変されてもよく(例えば、1つまたは複数の化学的部分が抗体に取り付けられてもよく)、グリコシル化を変えるように改変されてもよく、また、MAbの1つまたは複数の機能特性を変えるように改変されてもよい。これらの態様はそれぞれ以下でさらに詳しく説明される。

【０１６４】

一態様において、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変化、例えば、増加または減少するように、CH1のヒンジ領域が改変される。このアプローチは、Bodmer, et al.への米国特許第5,677,425号にさらに説明されている。CH1のヒンジ領域内のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の組み立てを容易にするために、または24P4C12 MAbの安定性を上げる、もしくは下げるために変えられる。

【０１６５】

別の態様において、抗体のFcヒンジ領域は、24P4C12 MAbの生物学的半減期を短くするように変異される。より具体的には、抗体のスタフィロコッカス(Staphylococcyl)プロテインA(SpA)結合がネイティブなFc-ヒンジドメインSpA結合と比べて低下するように、1つまたは複数のアミノ酸変異が、Fc-ヒンジフラグメントのCH_2-CH_3ドメイン界面領域に導入される。このアプローチは、Ward, et al.による米国特許第6,165,745号にさらに詳しく説明されている。

【０１６６】

別の態様において、生物学的半減期が長くなるように、24P4C12 MAbが改変される。様々なアプローチが可能である。例えば、Wardへの米国特許第6,277,375号に記載のように変異を導入することができる。または、生物学的半減期を長くするために、Presta, et al.による米国特許第5,869,046号および同第6,121,022号に記載のように、IgGのFc領域のCH_2ドメインの2つのループから取られたサルベージ(salvage)受容体結合エピトープを含有

するように、抗体のCH1領域内またはCL領域内を変えることができる。

【０１６７】

さらに他の態様では、Fc領域は、24P4C12 MAbのエフェクター機能を変えるために、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することによって変えられる。例えば、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性が変化しているが、親抗体の抗原結合能を保持しているように、アミノ酸特異的残基より選択される1つまたは複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基で置換することができる。親和性が変えられるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分でもよい。このアプローチは、Winter, et al.による米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号にさらに詳しく説明されている。

【０１６８】

24P4C12抗体と24P4C12関連タンパク質との反応性は、適宜、24P4C12関連タンパク質、24P4C12発現細胞またはその抽出物を用いて、ウエスタンブロット、免疫沈降、ELISA、およびFACS分析を含む多くの周知の手段によって確立することができる。24P4C12抗体またはそのフラグメントは、検出可能なマーカーで標識されてもよく、第2の分子に結合体化されてもよい。適切な検出可能なマーカーには、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が含まれるが、これに限定されない。さらに、2つまたはそれ以上の24P4C12エピトープに特異的な二重特異性抗体は、当技術分野で一般に公知の方法を使用して作製される。ホモ二量体抗体もまた、当技術分野で公知の架橋技術(例えば、Wolff et al.,Cancer Res.53:2560-2565)によって作製することができる。

【０１６９】

Ha5-1(5)1、Ha5-1(5)2.1、Ha5-3(1,4)7.1、Ha5-7acd10.1、Ha5-7acd16.1、およびHa5-11b1.1と名付けられた抗体は、2007年8月8日に、(Federal Expressを介して)American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108に送られ、それぞれ、アクセッション番号 PTA-____、PTA-____、PTA-____、PTA-____、PTA-____、PTA-____が割り当てられた。

【０１７０】

IV.A.)24P4C12細胞性免疫応答

T細胞が抗原を認識する機構は詳述されている。本発明の有効なペプチドエピトープワクチン組成物は、世界人口の非常に広範囲のセグメントにおいて、治療的免疫応答または予防的免疫応答を誘導する。細胞性免疫応答を誘導する本発明の組成物の価値および有効性の理解のために、免疫学関連技術の簡単な総説を提供する。

【０１７１】

HLA分子とペプチド抗原との複合体は、HLA拘束T細胞によって認識されるリガンドとして作用する(Buus, S. et al., Cell 47:1071, 1986；Babbitt, B.P. et al., Nature 317:359, 1985；Townsend, A. and Bodmer, H., Annu.Rev.Immunol.7:601, 1989；Germain, R.N., Annu.Rev.Immunol.11:403, 1993)。1個のアミノ酸で置換された抗原アナログの研究、ならびに内因的に結合し、天然にプロセシングされたペプチドの配列決定を通じて、HLA抗原分子への特異的結合に必要なモチーフに対応する重要な残基が同定された。この残基を表IVに示した(例えば、Southwood et al., J.Immunol.160:3363, 1998；Rammensee et al., Immunogenetics 41:178, 1995；Rammensee et al., SYFPEITHI、ワールドワイドウェブURL(134.2.96.221/scripts.hlaserver.dll/home.htm)を介してアクセスする；Sette, A. and Sidney, J.Curr.Opin.Immunol.10:478, 1998；Engelhard, V.H., Curr.Opin.Immunol.6:13, 1994；Sette, A. and Grey, H.M., Curr.Opin.Immunol.4:79, 1992；Sinigaglia, F. and Hammer, J.Curr.Biol.6:52, 1994；Ruppert et al., Cell 74:929-937, 1993；Kondo et al., J.Immunol.155:4307-4312, 1995；Sidney et al., J.Immunol.157:3480-3490, 1996；Sidney et al., Human Immunol.45:79-93, 1996；Sette, A. and Sidney, J.Immunogenetics 1999 Nov；50(3-4):201-12, 総説もまた参照のこと)。

【０１７２】

さらに、HLA-ペプチド複合体のx線結晶解析によって、ペプチドリガンドが有する残基を対立遺伝子特異的に収容する、HLA分子のペプチド結合裂/溝内のポケットが明らかになった。次に、これらの残基は、これらの残基が存在するペプチドのHLA結合能を決定する(例えば、Madden, D.R.Annu.Rev.Immunol.13:587, 1995；Smith et al., Immunity 4:203, 1996；Fremont et al., Immunity 8:305, 1998；Stern et al., Structure 2:245, 1994；Jones, E.Y.Curr.Opin.Immunol.9:75, 1997；Brown, J.H. et al., Nature 364:33, 1993；Guo, H.C. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8053, 1993；Guo, H.C. et al., Nature 360:364, 1992；Silver, M.L. et al., Nature 360:367, 1992；Matsumura, M. et al., Science 257:927, 1992；Madden et al., Cell 70:1035, 1992；Fremont, D.H. et al., Science 257:919, 1992；Saper, M.A., Bjorkman, P.J. and Wiley, D.C., J.Mol.Biol.219:277, 1991を参照のこと)。

【０１７３】

従って、クラスIおよびクラスIIの対立遺伝子特異的HLA結合モチーフ、またはクラスIもしくはクラスIIのスーパーモチーフが規定されると、特定のHLA抗原への結合と相関するタンパク質内の領域の同定が可能になる。

【０１７４】

従って、HLAモチーフ同定のプロセスによって、エピトープベースワクチンの候補が同定された。このような候補は、結合親和性ならびに/またはエピトープおよびその対応するHLA分子の会合の期間を決定するために、HLAペプチド結合アッセイによってさらに評価することができる。これらのワクチン候補の中で、集団カバー率および/または免疫原性の点で好ましい特徴を有するエピトープを選択するために、さらなる確認作業を行うことができる。

【０１７５】

種々の戦略が、細胞免疫原性を評価するために利用することができる。これらの戦略には、以下が含まれる:

1)正常個体からの初代T細胞培養物の評価(例えば、Wentworth, P.A. et al., Mol.Immunol.32:603, 1995；Celis, E. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:2105, 1994；Tsai, V. et al., J.Immunol.158:1796, 1997；Kawashima, I. et al., Human Immunol.59:1, 1998を参照のこと)。この手順は、抗原提示細胞の存在下で、試験ペプチドで正常被験体からの末梢血リンパ球(PBL)をインビトロで数週間にわたって刺激することを含む。このペプチドに特異的なT細胞は、この時間の間に活性状態になり、例えば、ペプチドで感作した標的細胞を伴うリンホカイン放出アッセイまたは^{51}Cr放出アッセイを使用して検出される。

2)HLAトランスジェニックマウスの免疫化(例えば、Wentworth, P.A. et al., J.Immunol.26:97, 1996；Wentworth, P.A. et al., Int.Immunol.8:651, 1996；Alexander, J. et al., J.Immunol.159:4753, 1997を参照のこと)。例えば、このような方法において、不完全フロイントアジュバントに溶解したペプチドが、HLAトランスジェニックマウスへ皮下投与される。免疫して数週間後、脾細胞が取り出され、試験ペプチドの存在下で約1週間にわたってインビトロで培養される。例えば、ペプチドで感作した標的細胞および内因的に生成された抗原を発現する標的細胞を伴う^{51}Cr放出アッセイを使用して、ペプチド特異的T細胞が検出される。

3)有効にワクチン接種された免疫個体からおよび/または慢性疾患の患者からのT細胞応答の復活(recall)の実証(例えば、Rehermann, B. et al., J.Exp.Med.181:1047, 1995；Doolan, D.L. et al., Immunity 7:97, 1997；Bertoni, R. et al., J.Clin.Invest.100:503, 1997；Threlkeld, S.C. et al., J.Immunol.159:1648, 1997；Diepolder, H.M. et al., J.Virol.71:6011, 1997を参照のこと)。従って、惹起応答は、疾患による抗原に曝露され、従って、「天然に」免疫応答を発生させた被験体に由来するか、または抗原に対するワクチンを接種した患者に由来するPBLを培養することによって検出される。被験体に由来するPBLは、「ナイーブ」T細胞と比較して、「記憶」T細胞の活性化を可能にするために試験ペプチドと抗原提示細胞(APC)との存在下で、インビトロで1～2週間培養される。

培養期間の終了時に、ペプチド感作標的を伴う^{51}Cr放出、T細胞増殖、またはリンホカイン放出を含むアッセイを用いて、T細胞活性を検出する。

【０１７６】

V.)24P4C12トランスジェニック動物

24P4C12関連タンパク質をコードする核酸はまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを作製するために使用することができる。次に、これら動物は、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。確立された技術に従って、24P4C12をコードするcDNAは、24P4C12をコードするゲノムDNAをクローニングするために使用することができる。次いで、このクローニングされたゲノム配列は、24P4C12をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウスまたはラットのような動物を生成する方法は、当技術分野においては従来通りであり、例えば、1988年4月12日に発行された米国特許第4,736,866号、および1989年9月26日に発行された同第4,870,009号に記載される。典型的には、特定の細胞が、24P4C12トランスジーンと組織特異的エンハンサーの組み込みの標的となる。

【０１７７】

24P4C12をコードするトランスジーンのコピーを含むトランスジェニック動物は、24P4C12をコードするDNAの増大した発現の効果を調べるために使用することができる。このような動物は、例えば、その過剰発現と関連する病的状態からの防御を付与すると考えられた試薬のための試験動物として使用することができる。本発明のこの局面に従って、動物は試薬で処置され、このトランスジーンを有する未処置動物と比較した場合、病的状態の発生率の低下は、この病的状態への潜在的な治療的介入を示す。

【０１７８】

または、内因性の24P4C12をコードする遺伝子と、動物の胚細胞に導入された変化した24P4C12をコードするゲノムDNAが相同組換えした結果として、24P4C12コード遺伝子が欠損または変化した24P4C12「ノックアウト」動物を構築するために、24P4C12の非ヒトホモログを使用することができる。例えば、24P4C12をコードするcDNAは、確立された技術に従って、24P4C12をコードするゲノムDNAをクローニングするために使用することができる。24P4C12をコードするゲノムDNAの一部分は欠失されてもよく、別の遺伝子、例えば、組み込みをモニタリングするために使用することができる選択マーカーをコードする遺伝子で置換されてもよい。典型的には、数キロベースの変化していない隣接DNA(5'末端および3'末端)が、ベクター中に含まれる(例えば、相同組換えベクターの説明については、Thomas and Capecchi,Cell,51:503(1987)を参照のこと)。このベクターは、(例えば、エレクトロポレーションによって)胚性幹細胞株に導入され、導入されたDNAが内因性DNAと相同組換えした細胞が選択される(例えば、Li et al.,Cell,69:915(1992)を参照のこと)。次いで、この選択された細胞は、動物(例えば、マウスまたはラット)の胚盤胞に注射され、凝集キメラを形成する(例えば、Bradley,Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach,E.J.Robertson,編(IRL,Oxford,1987),pp.113-152を参照のこと)。キメラ胚は、適切な偽妊娠メス仮親動物に移植することができ、次いで、胚から「ノックアウト」動物を作り出すことができる。それらの生殖細胞において相同組換えされたDNAを有する子孫を標準的な技術によって同定し、その動物の全ての細胞に、相同組換えされたDNAが含まれる動物を繁殖させるために使用することができる。ノックアウト動物は、例えば、特定の病的状態に対して防御する能力について、または24P4C12ポリペプチドがないことに起因する病的状態の発生について特徴付けることができる。

【０１７９】

VI.)24P4C12の検出のための方法

本発明の別の局面は、24P4C12ポリヌクレオチドおよび24P4C12関連タンパク質を検出する方法、ならびに24P4C12を発現する細胞を同定する方法に関する。24P4C12の発現プロフィールによって、24P4C12は転移疾患の診断マーカーとなる。従って、24P4C12遺伝子産物の状態は、進行した段階の疾患への易罹患性、進行の速度、および/または腫瘍の悪性度

を含む種々の要因を推定するために有用な情報を提供する。本明細書で詳細に議論されるように、患者サンプルにおける24P4C12遺伝子産物の状態は、免疫組織化学分析、インサイチュハイブリダイゼーションを含む種々のノザンブロッティング技術、RT-PCR分析(例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションが行われたサンプル上でのRT-PCR分析)、ウエスタンブロット分析および組織アレイ分析を含む、当技術分野で周知の種々のプロトコールによって分析することができる。

【０１８０】

より具体的には、本発明は、生物学的サンプル、例えば、血清、骨、前立腺、および他の組織、尿、精液、細胞調製物などにおける24P4C12ポリヌクレオチドの検出のためのアッセイを提供する。検出可能な24P4C12ポリヌクレオチドには、例えば、24P4C12遺伝子またはそのフラグメント、24P4C12 mRNA、選択的スプライス変異体24P4C12 mRNA、および24P4C12ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子もしくは組換えRNA分子が含まれる。24P4C12ポリヌクレオチドの存在を増幅および/または検出するための多くの方法が当技術分野で周知であり、かつ本発明のこの局面の実施において使用することができる。

【０１８１】

一態様において、生物学的サンプルにおいて24P4C12 mRNAを検出する方法は、少なくとも1つのプライマーを用いて、逆転写によりサンプルからcDNAを生成する工程；センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして24P4C12ポリヌクレオチドを使用して、このように生成されたcDNAを増幅して、その中の24P4C12 cDNAを増幅する工程；ならびにこの増幅された24P4C12 cDNAの存在を検出する工程を含む。任意で、この増幅された24P4C12 cDNAの配列を決定することができる。

【０１８２】

別の態様において、生物学的サンプルにおいて24P4C12遺伝子を検出する方法は、まず、ゲノムDNAをサンプルから単離する工程；この単離されたゲノムDNAを、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしての24P4C12ポリヌクレオチドを用いて増幅する工程；ならびにこの増幅された24P4C12遺伝子の存在を検出する工程を含む。任意の数の適切なセンスプローブおよびアンチセンスプローブの組み合わせを、24P4C12ヌクレオチド配列から設計することができ(例えば、図1を参照のこと)、この目的に使用することができる。

【０１８３】

本発明はまた、組織または他の生物学的サンプル、例えば、血清、精液、骨、前立腺、尿、細胞調製物などにおける24P4C12タンパク質の存在を検出するためのアッセイを提供する。24P4C12関連タンパク質を検出する方法はまた周知であり、これらの方法には、例えば、免疫沈降、免疫組織化学分析、ウエスタンブロット分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFAなどが含まれる。例えば、生物学的サンプルにおいて24P4C12関連タンパク質の存在を検出する方法は、まず、このサンプルと、24P4C12抗体、その24P4C12反応性フラグメント、または24P4C12抗体の抗原結合領域を含む組換えタンパク質とを接触させる工程；次いで、サンプル中の24P4C12関連タンパク質の結合を検出する工程を含む。

【０１８４】

24P4C12を発現する細胞を同定する方法も本発明の範囲内である。一態様において、24P4C12遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、細胞における24P4C12 mRNAの存在を検出する工程を含む。細胞において特定のmRNAを検出する方法は周知であり、この方法には、例えば、相補的DNAプローブを用いるハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、標識24P4C12リボプローブを用いるインサイチュハイブリダイゼーション、ノザンブロットおよび関連技術)ならびに種々の核酸増幅アッセイ(例えば、24P4C12に特異的な相補的プライマーを用いるRT-PCR)、ならびに他の増幅型検出法、例えば、分岐DNA、SISBA、TMAなどが含まれる。または、24P4C12遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、細胞中のまたは細胞によって分泌される24P4C12関連タンパク質の存在を検出する工程を含む。タンパク質の検出のための種々の方法は当技術分野で周知であり、24P4C12関連タンパク質および24P4C12関連タンパク質を発現する細胞の検出のために使用される。

【０１８５】
24P4C12発現分析はまた、24P4C12遺伝子発現を調節する薬剤を同定および評価するためのツールとして有用である。例えば、24P4C12発現は卵巣癌ではかなり無秩序であり、表Iに列挙した組織の癌において発現している。癌細胞における24P4C12発現または24P4C12過剰発現を阻害する分子または生物学的薬剤の同定は、治療上、価値がある。例えば、このような薬剤は、RT-PCR、核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体結合によって、24P4C12発現を定量するスクリーンを使用することによって同定することができる。
【０１８６】
VII.)24P4C12関連遺伝子およびこれらの産物の状態をモニタリングする方法
腫瘍形成は、細胞増殖が徐々に無秩序になり、細胞が正常な生理学的状態から前癌性状態、次いで、癌状態へと進行する多段階プロセスであることが公知である(例えば、Alers et al., Lab Invest.77(5):437-438(1997)およびIsaacs et al., Cancer Surv.23:19-32(1995)を参照のこと)。この状況において、無秩序になった細胞増殖の証拠(例えば、癌における異常な24P4C12発現)に関して、生物学的サンプルを試験することは、病的状態、例えば、癌が、治療選択肢がより制限される段階もしくは予後がより悪化する段階へと進行してしまう前に、このような異常な生理状態の早期検出を可能にする。このような試験において、関心対象の生物学的サンプルにおける24P4C12の状態は、例えば、対応する正常サンプル(例えば、その病的状態(pathology)に罹患していないその個体由来のサンプルまたはその病状に罹患していない別の個体由来のサンプル)における24P4C12の状態と比較することができる。生物学的サンプルにおける24P4C12の状態における(正常サンプルと比較した場合の)変化は、細胞増殖の調節不全の証拠を提供する。正常サンプルとしての、病状に罹患していない生物学的サンプルを使用することに加えて、サンプルにおいて24P4C12状態を比較するために、所定の基準値(例えば、所定の正常レベルのmRNA発現)がまた使用することができる(例えば、Grever et al., J.Comp.Neurol.1996 Dec 9；376(2):306-14および米国特許第5,837,501号を参照のこと)。
【０１８７】
この文脈における「状態(status)」という用語は、その分野に受け入れられている意味に従って使用され、遺伝子およびその産物の様子(condition)または状況(state)をいう。典型的には、当業者であれば、遺伝子およびその産物の様子または状況を評価するために多くのパラメーターを使用する。これらには、発現された遺伝子産物の位置(24P4C12発現細胞の位置を含む)、ならびに発現された遺伝子産物(例えば、24P4C12 mRNA、24P4C12ポリヌクレオチドおよび24P4C12ポリペプチド)のレベルおよび生物学的活性が含まれるが、これに限定されない。典型的には、24P4C12の状態の変化は、24P4C12および/または24P4C12発現細胞の位置の変化、ならびに/あるいは24P4C12 mRNAおよび/または24P4C12タンパク質の発現の増大を含む。
【０１８８】
サンプルにおける24P4C12の状態は、免疫組織化学分析、インサイチュハイブリダイゼーション、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションが行われたサンプル上でのRT-PCR分析、ウエスタンブロット分析、および組織アレイ分析を含まれるが、これに限定されない、当技術分野で周知の多くの手段によって分析することができる。24P4C12遺伝子および遺伝子産物の状態を評価するための代表的なプロトコールは、例えば、Ausubel et al.編, 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2(ノザンブロッティング)、4(サザンブロッティング)、15(イムノブロッティング)および18(PCR分析)において見出される。従って、生物学的サンプルにおける24P4C12の状態は、ゲノムサザン分析(例えば、24P4C12遺伝子における混乱を試験する)、24P4C12 mRNAのノザン分析および/またはPCR分析(例えば、24P4C12 mRNAのポリヌクレオチド配列または発現レベルにおける変化を調べる)、ならびにウエスタン分析および/または免疫組織化学分析(例えば、ポリペプチド配列の変化、サンプル内のポリペプチド局在の変化、24P4C12タンパク質の発現レベルの変化、および/または24P4C12タンパク質とポリペプチド結合パートナーとの会合を調べる)を含むが、これに限定されない当業者が利用する種々の方法によって評価される。検

出可能な24P4C12ポリヌクレオチドには、例えば、24P4C12遺伝子またはそのフラグメント、24P4C12 mRNA、選択的スプライス変異体、24P4C12 mRNA、および24P4C12ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子もしくは組換えRNA分子が含まれる。

【０１８９】

24P4C12の発現プロフィールによって、24P4C12は局所疾患および/もしくは転移疾患の診断マーカーとなり、生物学的サンプルの増殖または腫瘍形成能に関する情報を提供する。特に、24P4C12の状態は、特定の疾患段階に対する易罹患性、進行、および/または腫瘍の悪性度を推定するために有用な情報を提供する。本発明は、24P4C12状態を決定する方法およびアッセイ、ならびに24P4C12を発現する癌、例えば、表Iに列挙した組織の癌を診断する方法およびアッセイを提供する。例えば、24P4C12 mRNAは、正常腎臓組織と比較して、腎臓癌および他の癌において非常に高く発現しているので、生物学的サンプル中の24P4C12 mRNA転写物もしくは24P4C12タンパク質のレベルを評価するアッセイは、24P4C12調節不全と関連する疾患を診断するために使用することができ、適切な治療選択肢を決めることにおいて有用な予後情報を提供することができる。

【０１９０】

24P4C12の発現状態は、形成異常細胞、前癌細胞および癌細胞の存在、段階および位置を含む、疾患の種々の段階に対する易罹患性の推定、ならびに/または腫瘍の悪性度を判断するための情報を提供する。さらに、発現プロフィールのために、これは転移疾患の画像化試薬として有用である。結果として、本発明の局面は、生物学的サンプル、例えば、細胞増殖の調節不全によって特徴付けられる病的状態、例えば、癌に罹患している個体またはこれに罹患していると疑われる個体に由来するサンプルにおける24P4C12の状態を試験するための、種々の分子的予後方法および診断方法に関する。

【０１９１】

前記のように、生物学的サンプルにおける24P4C12の状態は、当技術分野で周知の多くの手順によって調べることができる。例えば、身体の特定の位置から採取した生物学的サンプルにおける24P4C12の状態は、24P4C12発現細胞(例えば、24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質を発現する細胞)の存在または非存在についてサンプルを評価することによって調べることができる。この調査は、例えば、24P4C12発現細胞がこのような細胞を通常含まない生物学的サンプル(例えば、リンパ節)において見出された時に、細胞増殖の調節不全の証拠を提供することができる。なぜなら、生物学的サンプルにおける24P4C12の状態のこのような変化は、しばしば、細胞増殖の調節不全と関連するからである。具体的には、細胞増殖の調節不全の1つの指標は、元の器官(例えば、前立腺)から身体の異なる身体領域(例えば、リンパ節)への癌細胞の転移である。この状況において、細胞増殖の調節不全の証拠は重要である。なぜなら、不顕性のリンパ節転移が、前立腺癌を有する患者のかなりの割合において検出され、かつこのような転移が疾患進行の既知の予測因子(predictor)と関連するからである(例えば、Murphy et al., Prostate42(4):315-317(2000)；Su et al., Semin.Surg.Oncol.18(1):17-28(2000)およびFreeman et al., JUrol 1995 Aug 154(2 Pt 1):474-8)を参照のこと。

【０１９２】

一局面において、本発明は、細胞増殖の調節不全(例えば、過形成または癌)と関連した疾患を有すると疑われる個体に由来する細胞によって発現される24P4C12遺伝子産物の状態を確かめ、次いで、このように決定された状態を、対応する正常サンプルにおいて24P4C12遺伝子産物の状態と比較することによって、24P4C12遺伝子産物をモニタリングする方法を提供する。正常サンプルと比較した、試験サンプルにおける異常な24P4C12遺伝子産物の存在は、その個体の細胞内での細胞増殖の調節不全の存在を示す。

【０１９３】

別の局面において、本発明は、個体における癌の存在の確認において有用なアッセイを提供し、このアッセイは、対応する正常細胞または正常組織における発現レベルと比較した、試験細胞または組織サンプルにおける24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質の発現の有意な増加を検出する工程を含む。24P4C12 mRNAの存在は、例えば、表Iに列挙した組

織を含むが、これに限定されない組織において評価することができる。これらの組織におけるいずれかにおける有意な24P4C12発現の存在は、癌の出現、存在および/または重篤度を示すために有用である。なぜなら、対応する正常組織は、24P4C12 mRNAを発現しないか、またはより低いレベルでこれを発現するからである。

【０１９４】

関連する態様において、24P4C12の状態は、核酸レベルではなくタンパク質レベルで確かめられる。例えば、このような方法は、試験組織サンプルにおける細胞によって発現される24P4C12タンパク質のレベルを確かめる工程、およびこのように決定されたレベルを、対応する正常サンプルにおいて発現される24P4C12のレベルと比較する工程を含む。一態様において、例えば、免疫組織化学法を用いて24P4C12タンパク質の存在が評価される。24P4C12抗体または24P4C12タンパク質発現を検出することができる結合パートナーは、この目的で、当技術分野で周知の種々のアッセイ形式において使用される。

【０１９５】

さらなる態様において、生物学的サンプルにおける24P4C12ヌクレオチド配列および24P4C12アミノ酸配列の状態が、これらの分子の構造における混乱を同定するために評価することができる。これらの混乱は、挿入、欠失、置換などを含んでもよい。このような評価は、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における混乱が、増殖調節不全表現型と関連する多数のタンパク質において観察されるので有用である(例えば、Marrogi et al., 1999, J.Cutan.Pathol.26(8):369-378を参照のこと)。例えば、24P4C12配列の変異は、腫瘍の存在または促進を示し得る。従って、このようなアッセイには、24P4C12における変異が潜在的な機能喪失または腫瘍増殖の増大を示す場合に診断上および予測上の価値がある。

【０１９６】

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における混乱を観察するための広範な種々のアッセイは当技術分野で周知である。例えば、24P4C12遺伝子産物の核酸配列またはアミノ酸配列の大きさおよび構造は、本明細書で議論されるノザンプロトコール、サザンプロトコール、ウエスタンプロトコール、PCRプロトコールおよびDNA配列決定プロトコールによって観察される。さらに、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における混乱を観察する他の方法、例えば、一本鎖高次構造多型分析が当技術分野で周知である(例えば、1999年9月7日に発行された米国特許第5,382,510号および1995年1月17日に発行された同第5,952,170号を参照のこと)。

【０１９７】

さらに、生物学的サンプルにおける24P4C12遺伝子のメチル化状態を試験することができる。遺伝子の5'調節領域におけるCpG島の異常な脱メチル化および/または過剰メチル化は、しばしば、不死化細胞および形質転換細胞で起こり、種々の遺伝子の発現変化を生じ得る。例えば、πクラスのグルタチオンS-トランスフェラーゼ(正常前立腺において発現するが、前立腺癌腫の90％超では発現しないタンパク質)のプロモーター過剰メチル化は、この遺伝子の転写を永久にサイレントにするようであり、これは、前立腺癌腫において最も頻繁に検出されるゲノム変化である(DeMarzo et al., Am.J.Pathol.155(6):1985-1992(1999))。さらに、この変化は、高悪性度の前立腺上皮内新生物(PIN)の症例の少なくとも70％において存在する(Brooks et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536)。別の例において、LAGE-I腫瘍特異的遺伝子(これは正常前立腺において発現しないが、前立腺癌のうちの25～50％において発現する)の発現は、リンパ芽球様細胞において、デオキシ-アザシチジンによって誘導される。このことは、腫瘍発現が脱メチル化に起因していることを示唆する(Lethe et al., Int.J.Cancer 76(6):903-908(1998))。遺伝子のメチル化状態を調べるための種々のアッセイは当技術分野で周知である。例えば、サザンハイブリダイゼーションアプローチでは、CpG島のメチル化状態を評価するために、メチル化CpG部位を含む配列を切断できないメチル化感受性制限酵素を利用することができる。さらに、MSP(メチル化特異的PCR)は、所定の遺伝子のCpG島に存在するCpG部位全てのメチル化状態を迅速にプロファイリングすることができる。この手順は、最初に、亜硫酸水素ナトリウムによりDNAを改変し(全ての非メチル化シトシンをウラシルに変換す

る)、続いて、非メチル化DNAに対して、メチル化に特異的なプライマーを使用して増幅することを伴う。メチル化妨害を伴うプロトコールは、例えば、Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M.Ausubel et al.編, 1995において見出すことができる。

【０１９８】

遺伝子増幅は、24P4C12状態を評価するためのさらなる方法である。遺伝子増幅は、例えば、本明細書で提供される配列に基づく適切に標識されたプローブを使用して、mRNAの転写物を定量する、従来のサザンブロッティングまたはノザンブロッティング(Thomas, 1980, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77:5201 5205)、ドットブロッティング(DNA分析)、またはインサイチュハイブリダイゼーションによって、サンプルにおいて直接測定される。または、DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNAとRNAのハイブリッド二重鎖またはDNAとタンパク質の二重鎖を含む、特定の二重鎖を認識する抗体が使用される。その後、この抗体は標識され、表面上で二重鎖が形成されたら、この二重鎖に結合した抗体の存在を検出できるように、二重鎖が表面に結合されるアッセイが行われる。

【０１９９】

生検で得られた組織または末梢血は、24P4C12発現を検出するために、例えば、ノザンブロット、ドットブロット、またはRT-PCR分析を用いて、癌細胞の存在について都合よくアッセイすることができる。RT-PCRで増幅可能な24P4C12 mRNAの存在は、癌の存在を示す。RT-PCRアッセイは当技術分野で周知である。末梢血における腫瘍細胞についてのRT-PCR検出アッセイは、現在、多くのヒト固形腫瘍の診断および管理における使用について評価されている最中である。前立腺癌の分野において、これらは、PSAおよびPSMを発現する細胞の検出のためのRT-PCRアッセイを含む(Verkaik et al., 1997, Urol.Res.25:373-384；Ghossein et al., 1995, J.Clin.Oncol.13:1195-2000；Heston et al., 1995, Clin.Chem.41:1687-1688)。

【０２００】

本発明のさらなる局面は、ある個体が癌を発生する易罹患性の評価である。一態様において、癌の易罹患性を推定する方法は、組織サンプルにおいて24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質を検出する工程を含み、24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質の存在は、癌の易罹患性を示し、ここで24P4C12 mRNA発現の程度は、その易罹患性の程度と相関する。特定の態様において、前立腺または他の組織における24P4C12の存在が調べられ、このサンプル中の24P4C12の存在は、前立腺癌の易罹患性(または前立腺腫瘍の出現または存在)を示す。同様に、これらの分子の構造における混乱、例えば、挿入、欠失、置換などを同定するために、生物学的サンプル中の24P4C12ヌクレオチド配列および24P4C12アミノ酸配列の完全性を評価することができる。サンプル中の24P4C12遺伝子産物の混乱が1つまたはそれ以上存在することは、癌の易罹患性(または腫瘍の出現または存在)の指標である。

【０２０１】

本発明はまた、腫瘍の悪性度を測定する方法を含む。一態様において、腫瘍の悪性度を測定する方法は、腫瘍細胞によって発現された24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質のレベルを確かめる工程、このように決定されたレベルと、同じ個体から採取された対応する正常組織または正常組織参照サンプルにおいて発現していた24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質のレベルとを比較する工程を含む。ここで正常サンプルと比較した、腫瘍サンプルにおける24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質の発現の程度は、悪性度の程度を示す。特定の態様において、腫瘍の悪性度は、24P4C12が腫瘍細胞において発現していた程度を確かめることによって評価され、高い発現レベルは悪性度の高い腫瘍を示す。別の態様は、これらの分子の構造における混乱、例えば、挿入、欠失、置換などを同定するために、生物学的サンプルにおいて24P4C12ヌクレオチド配列および24P4C12アミノ酸配列の完全性を評価することである。1つまたはそれ以上の混乱の存在は悪性度の高い腫瘍を示す。

【０２０２】

本発明の別の態様は、個体における悪性疾患の進行を経時的に観察する方法に関する。

一態様において、個体における悪性疾患の進行を経時的に観察する方法は、腫瘍のサンプルにおいて、細胞によって発現される24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質のレベルを確かめる工程、このように決定されたレベルと、異なる時に同じ個体から採取された等価な組織サンプルにおいて発現していた24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質のレベルと比較する工程を含み、ここで、経時的な、腫瘍サンプルにおける24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質の発現の程度は、癌の進行に関する情報を提供する。特定の態様において、癌の進行は、腫瘍細胞における24P4C12発現を経時的に確かめることによって評価される。ここで、経時的な発現増大は癌の進行を示す。また、これらの分子の構造における混乱、例えば、挿入、欠失、置換などを同定するために、生物学的サンプルにおいて24P4C12ヌクレオチド配列および24P4C12アミノ酸配列の完全性を評価することができる。ここで、1つまたはそれ以上の混乱の存在は癌の進行を示す。

【０２０３】

前記の診断アプローチは、当技術分野で公知の広範な種々の予後プロトコールおよび診断プロトコールのうちのいずれか1つと組み合わせることができる。例えば、本発明の別の態様は、組織サンプルの状態を診断および予後予測(prognosticate)のための手段として、24P4C12遺伝子および24P4C12遺伝子産物の発現(または24P4C12遺伝子および24P4C12遺伝子産物における混乱)と、悪性疾患と関連する要因の一致を観察する方法に関する。悪性疾患と関連する遺伝子の発現ならびに肉眼による細胞学的観察などの、悪性疾患と関連する広範な種々要因を利用することができる(例えば、Bocking et al., 1984, Anal.Quant.Cytol.6(2):74-88；Epstein, 1995, Hum.Pathol.26(2):223-9；Thorson et al., 1998, Mod.Pathol.11(6):543-51；Baisden et al., 1999, Am.J.Surg.Pathol.23(8):918-24を参照のこと))。24P4C12遺伝子および24P4C12遺伝子産物の発現(または24P4C12遺伝子および24P4C12遺伝子産物における混乱)と、悪性疾患と関連する別の要因の一致を観察する方法は有用である。なぜなら、例えば、疾患と一致する1セットの特定の要因の存在は、組織サンプルの状態を診断および予後予測するために重要な情報を提供するからである。

【０２０４】

24P4C12 mRNAまたは24P4C12タンパク質の発現を検出および定量する方法は本明細書に記載されており、標準的な核酸およびタンパク質の検出および定量の技術は当技術分野で周知である。24P4C12 mRNAの検出および定量のための標準的な方法には、標識24P4C12リボプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、24P4C12ポリヌクレオチドプローブを使用するノザンブロットおよび関連技術、24P4C12に特異的なプライマーを使用するRT-PCR分析、ならびに他の増幅型検出法、例えば、分岐DNA、SISBA、TMAなどが含まれる。特定の態様において、24P4C12 mRNA発現を検出および定量するために半定量的RT-PCRが使用される。本明細書で具体的に記載される種々のプライマーのセットを含むが、これに限定されない、24P4C12を増幅することができる任意の数のプライマーがこの目的に使用することができる。特定の態様において、野生型24P4C12タンパク質と特異的に反応性のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を、生検により得られた組織の免疫組織化学アッセイにおいて使用することができる。

【０２０５】

VIII.)24P4C12と相互作用する分子の同定

本明細書で開示される24P4C12タンパク質配列および24P4C12核酸配列を用いると、当業者であれば、当技術分野で認められた種々のプロトコールのうちのいずれか1つを介して、24P4C12と相互作用するタンパク質、低分子および他の因子、ならびに24P4C12によって活性化される経路を同定することができる。例えば、いわゆる相互作用トラップシステム(「ツーハイブリッドアッセイ」ともいわれる)のうちの1つを利用することができる。いくつかのシステムにおいて、分子は、レポーター遺伝子の発現を指向する転写因子と相互作用し、これを再構成し、その際に、レポーター遺伝子の発現がアッセイされる。他のシステムは、真核生物転写活性化因子の再構成を介して、インビボでタンパク質間相互作用を同定する。例えば、1999年9月21日に発行された米国特許第5,955,280号、1999年7月20日に発行された同第5,925,523号、1998年12月8日に発行された同第5,846,722号、および1

999年12月21日に発行された同第6,004,746号を参照のこと。ゲノムベースのタンパク質機能予測のためのアルゴリズムも当技術分野で利用可能である(例えば、Marcotte et al., Nature 402:4 November 1999, 83-86を参照のこと)。

【０２０６】

または、24P4C12タンパク質配列と相互作用する分子を同定するために、ペプチドライブラリーをスクリーニングすることができる。このような方法において、24P4C12に結合するペプチドは、アミノ酸のランダムな集合および制御された集合をコードするライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。このライブラリーによってコードされるペプチドは、バクテリオファージコートタンパク質の融合タンパク質として発現され、このバクテリオファージ粒子は、次いで、24P4C12タンパク質に対してスクリーニングされる。

【０２０７】

従って、広範な種々の用途、例えば、治療用試薬または予後用試薬または診断用試薬を有するペプチドは、予想されたリガンドまたは受容体分子の構造に関する事前の情報が何らなくとも、同定される。24P4C12タンパク質配列と相互作用する分子を同定するために使用することができる代表的なペプチドライブラリーおよびスクリーニング法は、例えば、1998年3月3日に発行された米国特許第5,723,286号および1998年3月31日に発行された同第5,733,731号に開示されている。

【０２０８】

または、24P4C12を発現する細胞株が、24P4C12によって媒介されるタンパク質間相互作用を同定するために使用される。このような相互作用は、免疫沈降技術を用いて試験することができる(例えば、Hamilton B.J., et al. Biochem.Biophys.Res.Commun.1999, 261:646-51を参照のこと)。24P4C12タンパク質は、抗24P4C12抗体を用いて24P4C12発現細胞株から免疫沈降することができる。または、His-タグに対する抗体が、24P4C12およびHis-タグ(前記のベクター)の融合物を発現するように操作された細胞株において使用することができる。この免疫沈降された複合体は、ウエスタンブロッティング、タンパク質の^{35}S-メチオニン標識、タンパク質微小配列決定、銀染色および二次元電気泳動法のような手順によってタンパク質会合について調べることができる。

【０２０９】

24P4C12と相互作用する低分子およびリガンドは、このようなスクリーニングアッセイの関連する態様を通じて同定することができる。例えば、タンパク質機能を妨害する低分子を同定することができ、これらの分子には、24P4C12がリン酸化および脱リン酸、細胞周期調節の指標としてのDNA分子もしくはRNA分子との相互作用、二次メッセンジャーシグナル伝達または腫瘍発生を媒介する能力を妨害する分子が含まれる。同様に、24P4C12関連イオンチャネル、トランスポーター、タンパク質ポンプ、または細胞連絡機能を調節する低分子が同定され、24P4C12を発現する癌を有する患者を処置するために使用される(例えば、Hille, B., Ionic Channels of Excitable Membranes 第2版, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992を参照のこと)。さらに、24P4C12機能を調節するリガンドは、これらが24P4C12を結合してレポーター構築物を活性化する能力に基づいて同定することができる。代表的な方法は、例えば、1999年7月27日に発行された米国特許第5,928,868号において議論されており、この方法には、少なくとも1種のリガンドが低分子であるハイブリッドリガンドを形成する方法が含まれる。例示的態様において、ハイブリッドリガンド/低分子の融合タンパク質およびcDNAライブラリー転写活性化因子タンパク質を同時発現させるために、24P4C12とDNA結合タンパク質の融合タンパク質を発現するように操作された細胞が使用される。この細胞はさらに、レポーター遺伝子を含み、その発現は、第1の融合タンパク質および第2の融合タンパク質が互いに近接することに左右され、この現象は、ハイブリッドリガンドが両方のハイブリッドタンパク質上の標的部位に結合する場合にのみ生じる。レポーター遺伝子を発現する細胞が選択され、未知の低分子または未知のリガンドが同定される。この方法は、24P4C12を活性化する、または阻害するモジュレーターを同定する手段を提供する。

【０２１０】
本発明の一態様は、図1に示した24P4C12アミノ酸配列と相互作用する分子をスクリーニングする方法を含み、この方法は、分子集団と、24P4C12アミノ酸配列とを接触させる工程、この分子集団および24P4C12アミノ酸配列を、相互作用を促進する条件下で相互作用させる工程、24P4C12アミノ酸配列と相互作用する分子の存在を確かめる工程、次いで、24P4C12アミノ酸配列と相互作用しない分子と、24P4C12アミノ酸配列と相互作用する分子とを分離する工程を含む。特定の態様において、この方法は、24P4C12アミノ酸配列と相互作用する分子を精製し、特徴付け、同定する工程をさらに含む。この同定された分子は、24P4C12によって発揮される機能を調節するために使用することができる。好ましい態様において、この24P4C12アミノ酸配列はペプチドライブラリーと接触される。

【０２１１】
IX.)治療法および治療用組成物
限られたセットの組織において通常発現するが、表Iに列挙した癌のような癌においても発現するタンパク質として24P4C12を同定されたことは、このような癌の処置に対する多くの治療アプローチを切り開く。

【０２１２】
注目すべきは、標的とされた抗腫瘍治療は、標的とされたタンパク質が正常組織で、さらに生命維持に必要な(vital)正常器官組織で発現する場合でも有用であったことである。生命維持に必要な器官は、生命を維持するために必要な器官、例えば、心臓または結腸である。生命維持に必要ではない器官は除去されても、個体がなお生存することができる器官である。生命維持に必要ではない器官の例は、卵巣、乳房、および前立腺である。

【０２１３】
例えば、Herceptin(登録商標)は、HER2、HER2/neu、およびerb-b-2として種々に知られるタンパク質と免疫反応性の抗体からなる、FDAにより認可された医用薬剤である。これは、Genentechによって市販されており、商業的に成功した抗腫瘍剤であった。Herceptin(登録商標)の売上高は、2002年には、ほぼ4億ドルにも達した。Herceptin(登録商標)は、HER2陽性の転移性乳癌に関する処置法である。しかし、HER2の発現は、このような腫瘍に限定されていない。多くの正常組織において同じタンパク質が発現している。特に、HER2/neuは、正常腎臓および心臓に存在することが知られており、従って、これらの組織は、Herceptinの全てのヒトレシピエントに存在する。正常腎臓においてHER2/neuが存在することはまた、Latif, Z. et al., B.J.U.International(2002)89:5-9によって確認されている。(腎細胞癌が、Herceptinのような抗HER2抗体の好ましい適応症であるかどうかを評価した)この文献において示されているように、タンパク質およびmRNAの両方が、良性腎組織において産生されている。注目すべきことには、HER2/neuタンパク質は良性腎組織において強く過剰発現されていた。

【０２１４】
HER2/neuが、このような生命維持に必要な組織、例えば、心臓および腎臓において発現しているという事実にもかかわらず、Herceptinは、非常に有用な、FDAにより認可された、商業的に成功した薬物である。心臓組織に対するHerceptinの効果、すなわち「心臓毒性」は、処置に対する副作用に過ぎなかった。患者が、Herceptin単独で処置された場合、有意な心臓毒性が、非常に低い割合の患者で起こった。心臓毒性を最小限にするために、HER2/neuでの処置に関するより厳密な参加要件が存在する。心臓状態に対する素因のような要因が、処置を行う前に評価される。

【０２１５】
特に注目すべきは、腎臓組織が、おそらく心臓組織よりさらに高い発現でも、正常発現を示すことが指摘されているが、腎臓には、はっきりと分かるHerceptin副作用が全く無い。さらに、HER2が発現する正常組織の多様なアレイのうち、いかなる副作用もほとんど存在しない。心臓組織しか、はっきりと分かる副作用を発現しなかった。腎臓のような組織はHER2/neu発現が特に顕著であるが、いかなる副作用の根拠とならなかった。

【０２１６】

さらに、有利な治療上の効果は、上皮増殖因子受容体(EGFR)を標的とする抗腫瘍治療；Erbitux(ImClone)に関して見出された。EGFRは多くの正常組織でも発現する。抗EGFR治療の使用後に、正常組織において非常に限られた副作用が存在した。EGFR処置で生じる全身副作用は、重篤な皮膚の発疹である。これは、処置を受けている患者の100％において観察された。

【０２１７】

従って、正常組織における、さらに生命維持に必要な正常組織における標的タンパク質の発現は、標的タンパク質が過剰発現する特定の腫瘍の治療剤としての標的タンパク質に対する標的化薬剤の有用性を無効にしない。例えば、生命維持に必要な器官における発現は、それ自体ではかつそのものは有害ではない。さらに、前立腺および卵巣のような重要でないと考えられる器官は、死亡率に影響を及ぼすことなく除去することができる。最後に、いくつかの生命維持に必要な器官は、免疫寛容(immunoprivilege)のために正常器官発現の影響を受けない。免疫寛容器官は、血液-器官関門によって血液から保護されている器官であり、従って、免疫療法の手が届かない。免疫寛容器官の例は脳および精巣である。

【０２１８】

従って、24P4C12タンパク質の活性を阻害する治療アプローチは、24P4C12を発現する癌に罹患している患者に有用である。これらの治療アプローチは、一般的に、3つのクラスに分けられる。第1のクラスは、腫瘍細胞増殖に関する24P4C12機能を調節して、腫瘍細胞増殖の阻害もしくは遅延をもたらす、または腫瘍細胞の死滅を誘導する。第2のクラスは、24P4C12タンパク質と24P4C12タンパク質の結合パートナーもしくは他のタンパク質との結合または会合を阻害するための種々の方法を含む。第3のクラスは、24P4C12遺伝子の転写または24P4C12 mRNAの翻訳を阻害するための種々の方法を含む。

【０２１９】

IX.A.)抗癌ワクチン

本発明は、24P4C12関連タンパク質または24P4C12関連核酸を含む癌ワクチンを提供する。24P4C12の発現を考慮すると、癌ワクチンは、非標的組織に対して最小限の影響しか伴わないか、または何ら影響を及ぼさずに、24P4C12を発現する癌を妨げ、かつ/または24P4C12を発現する癌を処置する。抗癌治療として、細胞性体液性免疫応答を発生させるワクチンにおいて腫瘍抗原を使用することは当技術分野で周知であり、ヒトPSMA免疫原および齧歯類PAP免疫原を使用して前立腺癌において使用されている(Hodge et al., 1995, Int. J.Cancer 63:231-237；Fong et al., 1997, J.Immunol.159:3113-3117)。

【０２２０】

このような方法は、24P4C12関連タンパク質、または24P4C12コード核酸分子および24P4C12免疫原(これは、典型的には、多くのT細胞エピトープまたは抗体を含む)を発現および提示することができる組換えベクターを使用することによって容易に実施することができる。当業者であれば、免疫反応性エピトープの送達のための広範な種々のワクチンシステムが当技術分野で公知であることを理解している(例えば、Heryln et al., Ann Med 1999 Feb 31(1):66-78；Maruyama et al., Cancer Immunol Immunother 2000 Jun 49(3):123-32))。簡単に述べると、哺乳動物において免疫応答(例えば、細胞性および/または体液性)を発生させるこのような方法は、以下の工程:哺乳動物が免疫反応性エピトープに特異的な免疫応答を発生させる(例えば、免疫反応性エピトープを特異的に認識する抗体を発生させる)ように、哺乳動物の免疫系を免疫反応性エピトープ(例えば、図1に示した24P4C12タンパク質に存在するエピトープまたはそのアナログもしくはホモログ)に曝露する工程を含む。

【０２２１】

24P4C12タンパク質全体、その免疫原性領域または免疫原性エピトープは、種々の手段によって組み合わされ、送達することができる。このようなワクチン組成物には、例えば、リポペプチド(例えば、Vitiello, A. et al., J.Clin.Invest.95:341, 1995)、ポリ(DL-ラクチド-co-グリコリド)(「PLG」)ミクロスフェアに包まれたペプチド組成物(例えば、

Eldridge et al., Molec.Immunol.28:287-294, 1991:Alonso et al., Vaccine 12:299-306, 1994；Jones et al., Vaccine 13:675-681, 1995を参照のこと)、免疫刺激複合体(ISCOMS)中に含まれるペプチド組成物(例えば、Takahashi et al., Nature 344:873-875, 1990；Hu et al., Clin ExpImmunol.113:235-243, 1998を参照のこと)、多重抗原ペプチドシステム(MAP)(例えば、Tam, J.P., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:5409-5413, 1988；Tam, J.P., J.Immunol.Methods 196:17-32, 1996を参照のこと)、多価ペプチドとして処方されたペプチド；衝撃送達システム(ballistic delivery system)において使用するためのペプチド、典型的には、結晶化ペプチド、ウイルス送達ベクター(Perkus, M.E. et al., Concepts in vaccine development, Kaufmann, S.H.E.編, p.379, 1996；Chakrabarti, S. et al., Nature 320:535, 1986；Hu, S.L. et al., Nature 320:537, 1986；Kieny, M.-P. et al., AIDS Bio/Technology 4:790, 1986；Top, F.H. et al., J.Infect.Dis.124:148, 1971；Chanda, P.K. et al., Virology 175:535, 1990)、ウイルス起源もしくは合成起源の粒子(例えば、Kofler, N. et al., J.Immunol.Methods.192:25, 1996；Eldridge, J.H. et al., Sem.Hematol.30:16, 1993；Falo, L.D., Jr. et al., Nature Med.7:649, 1995)、アジュバント(Warren, H.S., Vogel, F.R., and Chedid, L.A.Annu.Rev.Immunol.4:369, 1986；Gupta, R.K. et al., Vaccine 11:293, 1993)、リポソーム(Reddy, R. et al., J.Immunol.148:1585, 1992；Rock, K.L., Immunol.Today 17:131, 1996)、または裸のcDNAもしくは粒子吸着cDNA(Ulmer, J.B. et al., Science 259:1745, 1993；Robinson, H.L., Hunt, L.A., and Webster, R.G., Vaccine 11:957, 1993；Shiver, J.W. et al., Concepts in vaccine development, Kaufmann, S.H.E.編, p.423, 1996；Cease, K.B., and Berzofsky, J.A., Annu.Rev.Immunol.12:923, 1994ならびにEldridge, J.H. et al., Sem.Hematol.30:16, 1993)が含まれ得る。Avant Immunotherapeutics, Inc.(Needham, Massachusetts)のような、受容体媒介性標的化とも知られる毒素標的化送達技術も使用することができる。

【０２２２】

24P4C12関連癌を有する患者において、本発明のワクチンおよび抗体組成物はまた、免疫アジュバント、例えば、IL-2、IL-12、GM-CSFなどとの併用を含めて、癌に使用される他の処置、例えば、外科手術、化学療法、薬物療法、放射線療法などと併用することができる。

【０２２３】

細胞ワクチン:

CTLエピトープは、対応するHLA対立遺伝子を結合する24P4C12タンパク質内ペプチドを同定するために、特定のアルゴリズムを用いて決定することができる(例えば、Brown University、BIMAS、およびSYFPEITHI)。好ましい態様において、24P4C12免疫原は、当技術分野で周知の技術を用いて同定される1つまたはそれ以上のアミノ酸配列、例えば、先に開示された表に示した配列あるいはHLAクラスIモチーフ/スーパーモチーフによって特定される8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸もしくは11アミノ酸のペプチド(例えば、表IV(A)、表IV(D)、もしくは表IV(E))および/またはHLAクラスIIモチーフ/スーパーモチーフを含む少なくとも9アミノ酸のペプチド(例えば、表IV(B)または表IV(C))を含む。当技術分野で認識されているように、このHLAクラスI結合溝は、特定のサイズ範囲のみのペプチドが溝に嵌って結合できるように本質的に拡張不可能であり(closed-ended)、一般的に、HLAクラスIエピトープは、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、または11アミノ酸長である。対照的に、このHLAクラスII結合溝は本質的に拡張可能である(open-ended)。従って、約9つまたはそれ以上のアミノ酸のペプチドが、HLAクラスII分子に結合することができる。HLAクラスIの結合溝とHLAクラスIIの結合溝に違いがあるために、HLAクラスIモチーフは長さ特異的(length specific)である。すなわち、クラスIモチーフの位置2はペプチドのアミノからカルボキシ方向で2番目のアミノ酸である。クラスIIモチーフにおけるアミノ酸位置は、ペプチド全体ではなく、互いに対してのみ相対的なものである。すなわち、さらなるアミノ酸が、モチーフ保有配列のアミノ末端および/またはカルボキシル末端に付加することができる。HLAクラスIIエピトープは、しばしば、9アミノ酸長、10ア

ミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、22アミノ酸長、23アミノ酸長、24アミノ酸、もしくは25アミノ酸長であるか、または25アミノ酸より長い。

【０２２４】

哺乳動物において免疫応答を発生させる広範な種々の方法が当技術分野で公知である(例えば、ハイブリドーマの生成における第一の工程として)。哺乳動物において免疫応答を発生させる方法は、免疫応答が発生するように、哺乳動物の免疫系をタンパク質(例えば、24P4C12タンパク質)上の免疫原性エピトープに曝露する工程を含む。代表的態様は、宿主を、十分な量の少なくとも1つの24P4C12B細胞または細胞傷害性T細胞エピトープもしくはそのアナログと接触させ；少なくとも1つの周期間隔の後、宿主と、24P4C12B細胞または細胞傷害性T細胞エピトープもしくはそのアナログと再び接触させることによって、宿主において24P4C12に対する免疫応答を生成する方法からなる。特定の態様は、24P4C12関連タンパク質または人工の複数エピトープペプチドに対して免疫応答を発生させる方法からなり、この方法は、ワクチン調製物中の24P4C12免疫原(例えば、24P4C12タンパク質またはそのペプチドフラグメント、24P4C12融合タンパク質もしくはアナログなど)を、ヒトまたは別の哺乳動物に投与する工程を含む。典型的には、このようなワクチン調製物は、適切なアジュバント(例えば、米国特許第6,146,635号を参照のこと)またはユニバーサルヘルパーエピトープ(universal helper epitope) をさらに含む(例えば、PADRE(商標)ペプチド(Epimmune Inc., San Diego, CA；例えば、Alexander et al., J.Immunol.2000 164(3)；164(3):1625-1633；Alexander et al., Immunity 1994 1(9):751-761およびAlexander et al., Immunol.Res.1998 18(2):79-92を参照のこと)。代替法は、個体の身体の筋肉または皮膚にインビボで、24P4C12免疫原をコードするDNA配列を含むDNA分子を投与する工程であって、このDNA配列は、このDNA配列の発現を制御する調節配列に機能的に連結されてあり、このDNA分子は細胞に取り込まれ、このDNA配列は細胞において発現され、免疫原に対して免疫応答が発生する工程によって、24P4C12免疫原に対して、個体において免疫応答を発生させる工程を含む(例えば、米国特許第5,962,428号を参照のこと)。任意で、遺伝子ワクチン促進因子(facilitator)、例えば、陰イオン性脂質；サポニン；レクチン；エストロゲン様化合物；ヒドロキシル化低級アルキル；ジメチルスルホキシド；および尿素も投与される。さらに、標的抗原に対する応答を発生させるために、24P4C12を模倣する抗イディオタイプ抗体を投与することができる。

【０２２５】

核酸ワクチン:

本発明のワクチン組成物は核酸媒介様式を含む。本発明のタンパク質をコードするDNAまたはRNAを患者に投与することができる。遺伝子免疫化法は、24P4C12を発現する癌細胞に対する、予防的または治療的な体液性免疫応答および細胞性免疫応答を発生させるために使用することができる。24P4C12関連タンパク質/免疫原および適切な調節配列をコードするDNAを含む構築物は、筋肉または皮膚の細胞がこの構築物を取り込み、そのコードされた24P4C12タンパク質/免疫原を発現するように、個体の筋肉または皮膚に直接注射することができる。または、ワクチンは、24P4C12関連タンパク質を含む。24P4C12関連タンパク質免疫原の発現は、24P4C12タンパク質を有する細胞に対する予防的または治療的な体液性免疫および細胞性免疫を発生させる。当技術分野で公知の種々の予防的および治療的な遺伝子免疫化技術を使用することができる。核酸ベースの送達は、例えば、Wolff et al., Science 247:1465(1990)、ならびに米国特許第5,580,859号；同第5,589,466号；同第5,804,566号；同第5,739,118号；同第5,736,524号；同第5,679,647号；WO98/04720に記載される。DNAベースの送達技術の例には、「裸のDNA」、促進された(ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性)送達、陽イオン性脂質複合体、および粒子媒介性(「遺伝子銃」)または圧力媒介性送達(例えば、米国特許第5,922,687号を参照のこと)が含まれる。

【０２２６】

治療的または予防的な免疫化の目的で、本発明のタンパク質は、ウイルスベクターまた

は細菌ベクターを介して発現することができる。本発明の実施において使用することができる種々のウイルス遺伝子送達系には、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘瘡ウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルス(例えば、Restifo, 1996, Curr.Opin.Immunol.8:658-663；Tsang et al., J.Natl.Cancer Inst.87:982-990(1995)を参照のこと)が含まれるが、これに限定されない。非ウイルス送達系はまた、24P4C12関連タンパク質をコードする裸のDNAを、患者に(例えば、筋肉内または皮内で)導入して、抗腫瘍応答を誘導することによって使用することができる。

【０２２７】

ワクシニアウイルスは、例えば、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するベクターとして使用される。宿主へ導入されると、この組換えワクシニアウイルスは、タンパク質である免疫原性ペプチドを発現し、それによって、宿主免疫応答を誘発する。ワクシニアベクターおよび免疫化プロトコールにおいて有用な方法は、例えば、米国特許第4,722,848号に記載される。別のベクターは、BCG(カルメット・ゲラン桿菌)である。BCGベクターは、Stover et al., Nature 351:456-460(1991)において記載される。本発明のペプチドの治療的投与または免疫化のために有用な、広範な種々の他のベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌(Salmonella typhi)ベクター、解毒した炭疽毒素ベクターなどは、本明細書の記載から当業者に明らかである。

【０２２８】

従って、24P4C12関連核酸分子を送達するために遺伝子送達系が使用される。一態様において、全長ヒト24P4C12 cDNAが使用される。別の態様において、特定の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)エピトープおよび/または抗体エピトープをコードする24P4C12核酸分子が使用される。

【０２２９】

エクスビボワクチン

種々のエクスビボ戦略がまた、免疫応答を発生させるために使用することができる。1つのアプローチは、24P4C12抗原を患者の免疫系に提示するために、抗原提示細胞(APC)、例えば、樹状細胞(DC)の使用を含む。樹状細胞は、MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子、B7補助刺激因子、ならびにIL-12を発現し、よって、高度に専門化された抗原提示細胞である。前立腺癌において、前立腺特異的膜抗原(PSMA)のペプチドを間欠投与した自己由来の樹状細胞は、前立腺癌患者の免疫系を刺激するために、フェーズI臨床試験において使用されている(Tjoa et al., 1996, Prostate 28:65-69；Murphy et al., 1996, Prostate 29:371-380)。従って、樹状細胞は、MHCクラスI分子またはMHCクラスII分子の状況においてT細胞に24P4C12ペプチドを提示するために使用することができる。一態様において、自己由来の樹状細胞には、MHCクラスI分子および/またはMHCクラスII分子に結合することができる24P4C12ペプチドが間欠投与される。別の態様において、樹状細胞には、完全24P4C12タンパク質が間欠投与される。なお別の態様は、当技術分野で公知の種々の実行ベクター(implementing vector)、例えば、アデノウイルス(Arthur et al., 1997, Cancer Gene Ther.4:17-25)、レトロウイルス(Henderson et al., 1996, Cancer Res.56:3763-3770)、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、DNAトランスフェクション(Ribas et al., 1997, Cancer Res.57:2865-2869)、または腫瘍由来RNAトランスフェクション(Ashley et al., 1997, J.Exp.Med.186:1177-1182)を用いて樹状細胞における24P4C12遺伝子の過剰発現を操作する工程を伴う。24P4C12を発現する細胞はまた、免疫モジュレーター(例えば、GM-CSF)を発現するように操作することができ、免疫化薬剤として使用することができる。

【０２３０】

IX.B.)抗体ベースの治療の標的としての24P4C12

24P4C12は、抗体ベースの治療戦略の魅力的な標的である。細胞外分子および細胞内分子の両方について多くの抗体の戦略が当技術分野で公知である(例えば、補体およびADCC

媒介死滅ならびにイントラボディ(intrabody)の使用を参照のこと)。24P4C12は、対応する正常細胞に対して種々の系統の癌細胞において発現するので、非標的器官および非標的組織に免疫反応性組成物が結合することによって引き起こされる毒性の、非特異的なかつ/または非標的な影響を及ぼすことなく優れた感受性を示す、24P4C12免疫反応性組成物の全身投与が準備される。24P4C12のドメインと特異的に反応する抗体は、毒素もしくは治療剤との結合体として、または細胞増殖もしくは細胞機能を阻害することができる裸の抗体として24P4C12発現癌を全身処置するために有用である。

【０２３１】

24P4C12抗体は、24P4C12に結合し、機能、例えば、結合パートナーとの相互作用を調節し、結果として腫瘍細胞の破壊を媒介し、かつ/または腫瘍細胞の増殖を阻害するように患者に導入することができる。このような抗体が治療効果を発揮する機構には、補体媒介性細胞溶解、抗体依存性細胞傷害性、24P4C12の生理学的機能の調節、リガンド結合もしくはシグナル伝達経路の阻害、腫瘍細胞分化の調節、腫瘍新脈管形成因子プロフィールの変化、および/またはアポトーシスが含まれ得る。

【０２３２】

当業者であれば、免疫原性分子(例えば、図1に示した24P4C12配列の免疫原性領域)を特異的に標的化し、かつ結合するために抗体を使用できることを理解する。さらに、当業者であれば、抗体を細胞傷害剤に結合体化することは日常的であることを理解する(例えば、Slevers et al., Blood 93:11 3678-3684(June 1, 1999)を参照のこと)。細胞傷害剤および/または治療剤が、この細胞に、例えば、これら薬剤を、その細胞が発現する分子(例えば、24P4C12)に特異的な抗体に結合体化することによって直接送達される場合、細胞傷害剤は、その細胞に対して既知の生物学的効果(すなわち、細胞傷害性)を発揮する。

【０２３３】

細胞を死滅させるために抗体-細胞傷害剤結合体を使用する広範な種々の組成物および方法が当技術分野で公知である。癌の状況において、代表的な方法は、腫瘍を有する動物に、発現　細胞表面に利用可能な、または局在に利用可能な発現マーカー(例えば、24P4C12)に結合する標的化薬剤(例えば、抗24P4C12抗体)に連結された、選択された細胞傷害剤および/または治療剤を含む、生物学的に有効な量の結合体を投与する工程を含む。代表的な態様は、細胞傷害剤および/または治療剤を、24P4C12を発現する細胞に送達する方法であり、この方法は、細胞傷害剤を、24P4C12エピトープに免疫特異的に結合する抗体に結合体化する工程、およびこの細胞を、抗体-薬剤結合体に曝露する工程を含む。別の例示的態様は、転移癌を罹患していると疑われる個体を処置する方法であり、この方法は、この個体に、細胞傷害剤および/または治療剤に結合体化した、治療的有効量の抗体を含む薬学的組成物を非経口投与する工程を含む。

【０２３４】

抗24P4C12抗体を使用する癌免疫療法は、他の型の癌の処置において首尾よく使用されてきた種々のアプローチに従って行うことができる(結腸癌(Arlen et al., 1998, Crit.Rev.Immunol.18:133-138)、多発性骨髄腫(Ozaki et al., 1997, Blood 90:3179-3186、Tsunenari et al., 1997, Blood 90:2437-2444)、胃癌(Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res.52:2771-2776)、B細胞リンパ腫(Funakoshi et al., 1996, J.Immunother.Emphasis Tumor Immunol.19:93-101)、白血病(Zhong et al., 1996, Leuk.Res.20:581-589)、結腸直腸癌(Moun et al., 1994, Cancer Res.54:6160-6166；Velders et al., 1995, Cancer Res.55:4398-4403)、および乳癌(Shepard et al., 1991, J.Clin.Immunol.11:117-127)が含まれるが、これに限定されない)。治療アプローチの中には、毒素または放射性同位体への裸の抗体の結合体化(例えば、抗CD20抗体へのY^{91}もしくはI^{131}の結合体化(例えば、Zevalin(商標)、IDEC Pharmaceuticals Corp.またはBexxar(商標)、Coulter Pharmaceuticals)を伴うものもあれば、抗体および他の治療剤、例えば、Herceptin(商標)(trastuzu MAb)とパクリタキセル(Genentech, Inc.)の同時投与を伴うものもある。抗体は、治療剤に結合体化することができる。例えば、前立腺癌を処置するために、24P4C12抗体は、放射線、化学療法またはホルモン除去とともに投与することができる。また、抗体は、毒素、例

えば、カリケアマイシンと結合体化されてもよく(例えば、Mylotarg(商標), Wyeth-Ayerst, Madison, NJ)、抗腫瘍抗生物質カリケアマイシンに結合体化された組換えヒト化IgG_4κ抗体)、メイタンシノイドと結合体化されてもよく(例えば、タキサンベースの腫瘍活性化プロドラッグ、TAP、プラットフォーム、ImmunoGen, Cambridge, MA、例えば、米国特許第5,416,064号もまた参照のこと)、オーリスタチン(Auristatin)Eと結合体化されてもよい(Nat Biotechnol.2003 Jul；21(7):778-84(Seattle Genetics))。

【０２３５】

24P4C12抗体療法は癌の全ての段階に有用であるが、抗体療法は、進行癌または転移癌において特に適切であり得る。本発明の抗体療法による処置は、1回またはそれ以上の化学療法を受けたことがある患者に適応がある。または、本発明の抗体療法は、化学療法による処置を受けたことがない患者のために化学療法レジメンまたは放射線レジメンと組み合わされる。さらに、抗体療法は、特に、化学療法剤の毒性にあまり耐えられない患者にとって、低用量の併用化学療法の使用を可能にし得る。Fan et al.(Cancer Res.53:4637-4642,1993)、Prewett et al.(International J. of Onco.9:217-224,1996)、およびHancock et al.(Cancer Res.51:4575-4580,1991)は、化学療法剤と一緒に種々の抗体を使用することを記載している。

【０２３６】

24P4C12抗体療法は癌の全ての段階に有用であるが、抗体療法は、進行癌または転移癌において特に適切であり得る。本発明の抗体療法による処置は、1回またはそれ以上の化学療法を受けたことがある患者に関して指示される。または、本発明の抗体療法は、化学療法による処置を受けたことがない患者のために化学療法レジメンまたは放射線レジメンと組み合わされる。さらに、抗体療法は、特に、化学療法剤の毒性にあまり耐えられない患者にとって、低用量の併用化学療法の使用を可能にし得る。

【０２３７】

癌患者は、24P4C12発現の存在およびレベルについて、好ましくは、腫瘍組織の免疫組織化学的評価、定量的24P4C12画像化、または24P4C12発現の存在および程度を確実に示す他の技術を用いて評価することができる。腫瘍生検または外科手術標本の免疫組織化学分析は、この目的に好ましい。腫瘍組織の免疫組織化学分析のための方法は、当技術分野で周知である。

【０２３８】

前立腺および他の癌を処置する抗24P4C12モノクローナル抗体は、腫瘍に対して強力な免疫応答を起こす抗体または直接細胞傷害性である抗体を含む。この点に関して、抗24P4C12モノクローナル抗体(MAb)は、補体媒介性細胞傷害機構または抗体依存性細胞傷害(ADCC)機構のいずれかによって腫瘍細胞溶解を誘発することができる。これらの機構はともに、補体タンパク質上のエフェクター細胞Fc受容体部位との相互作用のために、免疫グロブリン分子のインタクトなFc部分を要する。さらに、腫瘍増殖に対して直接的な生物学的効果を発揮する抗24P4C12 MAbは、24P4C12を発現する癌を処置するために有用である。細胞傷害性MAbが直接的に作用する機構には、以下が含まれる:細胞増殖の阻害、細胞分化の調節、腫瘍新脈管形成因子プロフィールの調節、およびアポトーシスの誘導。特定の抗24P4C12 MAbが抗腫瘍効果を発揮する機構は、ADCC、ADMMC、補体媒介性細胞溶解などのような、細胞死を評価する当技術分野で一般に公知の任意の数のインビトロアッセイを用いて評価される。

【０２３９】

一部の患者では、マウスおよび他の非ヒトモノクローナル抗体、またはヒト/マウスキメラMAbを使用すると、非ヒト抗体に対する中程度から強い免疫応答が誘導されることがある。このことは、循環からの抗体のクリアランスおよび効力の低下を生じ得る。最も重篤な症例においては、このような免疫応答は、潜在的に、腎不全を引き起こし得る、免疫複合体の大規模な形成につながることがある。従って、本発明の治療法において使用される好ましいモノクローナル抗体は、標的24P4C12抗原を高親和性で特異的に結合するが、患者において低い抗原性しか示さない、または全く抗原性を示さない、完全ヒト抗体また

はヒト化抗体のいずれかである。

【０２４０】

本発明の治療法は、単一の抗24P4C12 MAb、および異なるMAb(すなわち、24P4C12 MAbまたは他のタンパク質に結合するMAb)の組み合わせ、すなわち、カクテルの投与を意図する。このようなMAbカクテルは、これらカクテルが、異なるエピトープを標的とするMAbを含むか、異なるエフェクター機構を利用するか、または免疫エフェクター機能に依存するMAbと細胞傷害性MAbを直接組み合わせる限りは、特定の利点を有し得る。このような組み合わされたMAbは相乗的治療効果を示し得る。さらに、24P4C12 MAbは、種々の化学療法剤および生物学的薬剤、アンドロゲンブロッカー、免疫モジュレーター(例えば、IL-2、GM-CSF)、外科手術または放射線を含むが、これに限定されない、他の治療様式と同時に投与することができる。この24P4C12 MAbは、それらの「裸の」形態または結合体化されていない形態で投与されるか、あるいは治療剤をこれらのMabに結合体化することができる。

【０２４１】

24P4C12 Mab製剤は、腫瘍細胞に抗体を送達することができる任意の経路を介して投与される。投与経路には、静脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内などが含まれるが、これに限定されない。一般的に、処置は、典型的には約0.1mg/kg体重、0.2mg/kg体重、0.3mg/kg体重、0.4mg/kg体重、0.5mg/kg体重、0.6mg/kg体重、0.7mg/kg体重、0.8mg/kg体重、0.9mg/kg体重、1mg/kg体重、2mg/kg体重、3mg/kg体重、4mg/kg体重、5mg/kg体重、6mg/kg体重、7mg/kg体重、8mg/kg体重、9mg/kg体重、10mg/kg体重、15mg/kg体重、20mg/kg体重、または25mg/kg体重の範囲の用量での、許容可能な投与経路、例えば、静脈内注射(IV))を介した24P4C12 Mab調製物の反復投与を含む。一般的に、1週間あたり、10～1000mg MAbの範囲の用量が有効かつ十分に許容される。

【０２４２】

転移性乳癌の処置におけるHerceptin(登録商標)(トラスツズマブ(Trastuzumab))での臨床経験に基づくと、約4mg/kg患者体重のIVの初回負荷投与量、続いて、約2mg/kg IVの毎週投与量のMAb調製物が、許容可能な投与レジメンを示す。好ましくは、この初回負荷投与量は、90分間以上の注入として投与される。定期的な維持用量が、初期投与量が十分許容されたことを条件として、30分間以上の注入として投与される。当業者により認識されるように、種々の要因が、特定の症例における理想的な投与レジメンに影響を及ぼし得る。このような要因には、例えば、使用されるMAbの結合親和性および半減期、患者における24P4C12発現の程度、循環中の分離した24P4C12抗原の程度、望ましい定常状態の抗原濃度レベル、処置頻度、ならびに本発明の方法と組み合わせて使用される化学療法剤もしくは他の薬剤の影響、ならびに特定の患者の健康状態が含まれる。

【０２４３】

任意で、最も有効な投与レジメンなどの決定を助けるために、所定のサンプル中の24P4C12レベル(例えば、循環する24P4C12抗原および/または24P4C12発現細胞のレベル)について患者を評価すべきである。このような評価はまた、治療の間にわたってモニタリング目的で使用され、他のパラメーター(例えば、膀胱癌治療における尿細胞診および/またはImmunoCytレベル、あるいは類似性、前立腺癌治療における血清PSAレベル)の評価と組み合わせて、治療的成功を測定するために有用である。

【０２４４】

抗イディオタイプ抗24P4C12抗体はまた、24P4C12関連タンパク質を発現する細胞に対する免疫応答を誘導するためのワクチンとして、抗癌治療において使用することができる。特に、抗イディオタイプ抗体の作製は当技術分野で周知である。この方法論は、24P4C12関連タンパク質上のエピトープを模倣する抗イディオタイプ抗24P4C12抗体を作製するために容易に適合することができる(例えば、Wagner et al., 1997, Hybridoma 16:33-40；Foon et al., 1995, J.Clin.Invest.96:334-342；Herlyn et al., 1996, Cancer Immunol.Immunother.43:65-76を参照のこと)。このような抗イディオタイプ抗体は癌ワクチン戦略において使用することができる。

【０２４５】

本発明の目的は、24P4C12を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する、または遅らせる24P4C12 Mabを提供することである。本発明のさらなる目的は、新脈管形成および他の生物学的機能を阻害する方法を提供し、それによって、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、このような24P4C12 MAbを用いて、特に、Avastin(登録商標)(ベバシズマブ)、Sutent(登録商標)(リンゴ酸スニチニブ)、Nexavar(登録商標)(ソラフィニブトシレート)、Taxotere(登録商標)(ドセタキセル)、インターロイキン-2(別名Proleukin(登録商標)、IL-2またはアルデスロイキン)、あるいはインターフェロンα(インターフェロン-α-2a、またはインターフェロン-α-2b)、Paraplatin(登録商標)(カルボプラチン)、またはGemzar(登録商標)(ゲムシタビン)、ならびに異なる癌を処置するために当技術分野で公知の他のものを含むが、これに限定されない、他の薬物または免疫学的に活性な処置と、このような24P4C12 MAbを併用して、腫瘍増殖を低減させることである。

【０２４６】

一態様において、ヒト腫瘍を含む腫瘍が、化学療法剤または放射線またはこれらの組み合わせとともに24P4C12抗体で処置される場合、相乗効果がある。言い換えると、24P4C12抗体による腫瘍増殖の阻害は、化学療法剤または放射線またはこれらの組み合わせと組み合わされる場合、予想よりも強くなる。相乗効果は、例えば、24P4C12抗体のみの処置または24P4C12抗体および化学療法剤または放射線による処置の相加効果から予想されるよりも大きな、組み合わせ処置による腫瘍増殖阻害により示され得る。好ましくは、相乗効果は、寛解が、裸の24P4C12抗体による処置または24P4C12抗体および化学療法剤もしくは放射線の付加的組み合わせによる処置から予想されない場合に、癌の寛解によって実証される。

【０２４７】

24P4C12抗体および化学療法もしくは放射線の組み合わせ、またはその両方を使用して腫瘍細胞の増殖を阻害する方法は、化学療法もしくは放射線療法、およびこれらの組み合わせを始める前、その間またはその後に(すなわち、化学療法および/もしくは放射線療法を始める前とその間か、始める前と後か、その間と後か、もしくは始める前と間と後)、24P4C12抗体を投与する工程を含む。例えば、24P4C12抗体は、典型的には、放射線療法および/または化学療法を開始する1日間～60日間前、好ましくは、3日間～40日間前、より好ましくは、5日間～12日間前に投与される。しかしながら、処置プロトコールおよび特定の患者の要求に応じて、この方法は最も有効な処置を提供し、最終的には、患者の寿命を延ばす様式において行われる。

【０２４８】

化学療法剤の投与は、非経口経路および腸経路による全身投与を含め、種々の方法で達成することができる。一態様において、24P4C12抗体および化学療法剤は別々の分子として投与される。別の態様において、24P4C12抗体は、例えば、化学療法剤への結合体化によって取り付けられる(「24P4C12 Mabの使用を介したヒト癌腫の処置および診断のためのヒト臨床試験」という表題の実施例を参照のこと)。化学療法剤または化学療法の特定の例には、シスプラチン、ダカルバジン(DTIC)、ダクチノマイシン、メクロレタミン(ナイトロジェンマスタード)、ストレプトゾトシン、シクロホスファミド、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、パクリタキセル(タキソール)、トセタキセル(タキソテール)、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クラドリビン、ダカルバジン、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、インターフェロンα、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、プリカマイシン、ミトーテン、ペグアスパルガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、プリカマイシン、ストレプトゾトシン、タモキシフェン、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、タキソールおよびこれらの組み合わせが含まれる。

【０２４９】

24P4C12 Mabと組み合わせて使用される放射線源は、処置される患者に対して外部にある、または内部にあるかのいずれかであり得る。この放射線源が患者に対して外部にある場合、この療法は、外部ビーム放射線療法(EBRT)として公知である。放射線源が患者に対して内部にある場合、この処置は、近接放射線療法(BT)といわれる。

【０２５０】

前記の治療レジメンはさらに、さらなる癌治療剤および/またはレジメン、例えば、さらなる化学療法、癌ワクチン、シグナル伝達インヒビター、異常な細胞増殖もしくは癌を処置するのに有用な薬剤、IGF-1Rに結合することによって腫瘍増殖を阻害する抗体(例えば、WO/2005/092380(Pfizer)に記載されるような抗CTLA-4抗体)または他のリガンド、ならびにサイトカインと組み合わせることができる。

【０２５１】

哺乳動物がさらなる化学療法に供される場合、前記の化学療法剤を使用することができる。さらに、増殖因子インヒビター、生物学的応答調節物質、抗ホルモン治療、選択的エストロゲン受容体調節因子(SERM)、新脈管形成インヒビター、および抗アンドロゲンを使用することができる。例えば、抗ホルモン、例えば、抗エストロゲン、例えば、Nolvadex(タモキシフェン)または抗アンドロゲン、例えば、Casodex(4'-シアノ-3-(4-フルオロフェニルスルホニル)-2-ヒドロキシ-2-メチル-3'-(トリフルオロメチル)プロピオンアニリド)を使用することができる。

【０２５２】

本発明の特定の態様において、前記方法は、癌ワクチンと組み合わせられる。有用なワクチンは、癌関連抗原(例えば、BAGE、癌胎児性抗原(CEA)、EBV、GAGE、gp100(特に、gp100:209-217およびgp100:280-288を含む)、HBV、HER-2/neu、HPV、HCV、MAGE、マンマグロビン、MART-1/Melan-A、Mucin-1、NY-ESO-1、プロテイナーゼ-3、PSA、RAGE、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ(例えば、チロシナーゼ:368-376)、WT-1)、GM-CSF DNAおよび細胞ベースのワクチン、樹状細胞ワクチン、組換えウイルス(例えば、ワクシニアウイルス)ワクチン、ならびに熱ショックタンパク質(HSP)ワクチンから構成されてもよいが、これに限定されない。有用なワクチンはまた、腫瘍ワクチン、例えば、黒色腫細胞から形成されたワクチンを含み、自己由来または同種であり得る。ワクチンは、例えば、ペプチド、DNAまたは細胞ベースであり得る。これらの種々の薬剤は、特に、gp100ペプチド、チロシナーゼおよびMART-1を含む組み合わせを抗体とともに投与できるように組み合わせることができる。

【０２５３】

ワクチンは、幹細胞移植の前または幹細胞移植の後に投与することができ、化学療法がレジメンの一部である場合、ワクチンは化学療法の前に投与することができる。特定の態様において、本発明の抗体も化学療法の前に投与することができる。ワクチンはまた幹細胞移植の後に投与することができ、特定の態様においては、抗体と同時に投与することができる。

【０２５４】

前記の処置はまた、シグナル伝達インヒビター、例えば、EGFR(上皮細胞増殖因子受容体)応答を阻害することができる薬剤、例えば、EGFR抗体、EGF抗体およびEGFRインヒビターである分子；VEGF(血管内皮増殖因子)インヒビター、例えば、VEGF受容体およびVEGFを阻害し得る分子；ならびにerbB2受容体インヒビター、例えば、erbB2受容体に結合する有機分子または抗体とともに使用することができる。

【０２５５】

EGFRインヒビターは、例えば、WO95/19970(1995年7月27日公開)、WO98/14451(1998年4月9日公開)、WO98/02434(1998年1月22日公開)および米国特許第5,747,498号(1998年5月5日発行)に記載され、このような物質は本明細書に記載のように本発明で使用することができる。EGFRを阻害する薬剤には、モノクローナル抗体ERBITUX(ImClone Systems Incorporated(New York, N.Y.))およびVECTIBIX(AMGEN Fremont Inc.(Fremont, Calif.))、化合物ZD-1839(AstraZeneca)、BIBX-1382(Boehringer Ingelheim)、MDX-447(Medarex Inc.(An

nandale, New.Jersey))、およびOLX-103(Merck & Co.(Whitehouse Station, N.J.))、VRC TC-310(Ventech Research)ならびにEGF融合毒素(Seragen Inc.(Hopkinton, Mass.))が含まれるが、これに限定されない。これらおよび他のEGFRを阻害する薬剤を本発明で使用することができる。

【０２５６】

VEGFインヒビター、例えば、SU-5416およびSU-6668(Sugen Inc.(South SanFrancisco, Calif.))もまた抗体と併用することができる。VEGFインヒビターは、例えば、WO99/24440(1999年5月20日公開)、PCT国際出願PCT/IB99/00797(1999年5月3日出願)、WO95/21613(1995年8月17日公開)、WO99/61422(1999年12月2日公開)、米国特許第5,834,504号(1998年11月10日発行)、WO98/50356(1998年11月12日公開)、米国特許第5,883,113号(1999年3月16日発行)、米国特許第5,886,020号(1999年3月23日発行)、米国特許第5,792,783号(1998年8月11日発行)、WO99/10349(1999年3月4日公開)、WO97/32856(1997年9月12日公開)、WO97/22596(1997年6月26日公開)、WO98/54093(1998年12月3日公開)、WO98/02438(1998年1月22日公開)、WO99/16755(1999年4月8日公開)、およびWO98/02437(1998年1月22日公開)に記載される。本発明において有用ないくつかの特定のVEGFインヒビターの他の例は、IM862(Cytran Inc.(Kirkland,Wash))；IMC-1C11 Imclone抗体およびアンギオザイム(angiozyme)、Ribozyme(Boulder,Colo.)およびChiron(Emeryville,Calif.)製の合成リボザイムである。

【０２５７】

さらに、erbB2受容体インヒビター、例えば、GW-282974(Glaxo Wellcome)ならびにモノクローナル抗体AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc.(The Woodlands,Tex.))および2B-1(Chiron) を抗体と組み合わせることができる(例えば、WO98/02434(1998年1月22日公開)、WO99/35146(1999年7月15日公開)、WO99/35132(1999年7月15日公開)、WO98/02437(1998年1月22日公開)、WO97/13760(1997年4月17日公開)、WO95/19970(1995年7月27日公開)、米国特許第5,587,458号(1996年12月24日発行)および米国特許第5,877,305号(1999年3月2日発行)に記載のもの)。本発明において有用なerbB2受容体インヒビターはまた、EP1029853(2000年8月23日公開)、およびWO00/44728(2000年8月3日公開)に記載される。前記のPCT出願、米国特許、および米国仮特許出願に記載されるerbB2受容体インヒビター化合物および物質、ならびにerbB2受容体を阻害する他の化合物および物質は、本発明に従って抗体と併用することができる。

【０２５８】

本発明の処置レジメンはまた、IGF-1R(インスリン様増殖因子1受容体)に結合することによって腫瘍増殖を阻害する抗体または他のリガンドと組み合わせることができる。本発明で使用することができる特定の抗IGF-1R抗体には、2001年12月20日に出願され、WO02/053596として公開されたPCT出願PCT/US01/51113に記載されるものが含まれる。

【０２５９】

本明細書に記載の処置レジメンは、抗新脈管形成剤、例えば、MMP-2(マトリックスメタロプロテイナーゼ2)インヒビター、MMP-9(マトリックスメタロプロテイナーゼ9)インヒビター、およびCOX-II(シクロオキシゲナーゼII)インヒビターと組み合わされてもよく、これらは、本発明の方法において抗体と併用することができる。有用なCOX-IIインヒビターの例には、CELEBREX(セレコキシブ)、バルデコキシブ、およびロフェコキシブが含まれる。

【０２６０】

IX.C.)細胞性免疫応答の標的としての24P4C12

本明細書で記載される免疫原的有効量の1つまたはそれ以上のHLA結合ペプチドを含むワクチンおよびワクチンを調製する方法は、本発明のさらなる態様である。さらに、本発明によるワクチンは、本ペプチドの1つまたはそれ以上の組成物を含む。ペプチドは、個々にワクチン中に存在してもよい。または、ペプチドは、同じペプチドの複数のコピーを含むホモポリマーとして、または種々のペプチドのヘテロポリマーとして存在してもよい。ポリマーは、免疫学的反応が大きいという利点を有し、ポリマーを構成するために異なるペプチドエピトープが使用される場合、免疫応答の標的となった病原性生物または腫瘍関

連ペプチドの異なる抗原決定基と反応する抗体および/またはCTLを誘導するさらなる能力を有する。この組成物は天然の抗原領域でもよく、または、例えば、組換えによって調製されてもよく、化学合成によって調製されてもよい。

【０２６１】

本発明のワクチンとともに使用することができる担体は当技術分野で周知であり、例えば、サイログロブリン、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン、破傷風トキソイド、ポリアミノ酸、例えば、ポリL-リジン、ポリL-グルタミン酸)、インフルエンザタンパク質、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などを含む。ワクチンは、生理学的に許容される(すなわち許容可能な)希釈剤、例えば、水、または食塩水、好ましくは、リン酸緩衝食塩水を含んでもよい。ワクチンはまた、典型的には、アジュバントを含む。アジュバント、例えば、不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバンが、当技術分野で周知の物質の例である。さらに、本明細書で開示されるように、CTL応答は、本発明のペプチドを、脂質、例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン(P_3CSS)に結合体化することによって刺激することができる。しかし、合成シトシンホスホロチオレートグアニン含有(CpG)オリゴヌクレオチドのようなアジュバントが、CTL応答を10～100倍高めることが分かっている(例えば、Davila and Celis,J.Immunol.165:539-547(2000)を参照のこと)。

【０２６２】

注射経路、エアロゾル経路、経口経路、経皮経路、経粘膜経路、胸膜腔内経路、くも膜下腔内経路、または他の適切な経路を介して、本発明によるペプチド組成物を用いて免疫化を行うと、宿主の免疫系は、所望の抗原に特異的な多量のCTLおよび/またはヘルパーTリンパ球(HTL)を生成することによってワクチンに応答する。結果として、宿主は、24P4C12抗原を発現または過剰発現する細胞の後の発生に対して少なくとも部分的に免疫を獲得することになるか、または抗原が腫瘍関連抗原であった場合に、少なくともいくらかの治療的利益を導く。

【０２６３】

いくつかの態様では、クラスIペプチド成分と、標的抗原に対する中和抗体および/またはヘルパーT細胞応答を誘導または促進する成分とを組み合わせることが望ましい場合がある。このような組成物の好ましい態様は、本発明によるクラスIエピトープおよびクラスIIエピトープを含む。このような組成物の代替的態様は、本発明によるクラスIエピトープおよび/またはクラスIIエピトープと、交差反応性HTLエピトープ、例えば、PADRE(商標)(Epimmune, San Diego,CA)分子(例えば、米国特許第5,736,142号において記載される)を含む。

【０２６４】

本発明のワクチンはまた、本発明のペプチドを提示するためのビヒクルとして、抗原提示細胞(APC)、例えば、樹状細胞(DC)を含んでもよい。ワクチン組成物は、樹状細胞の動員および採取の後にインビトロで作製することができ、それによって、樹状細胞の負荷はインビトロで行われる。例えば、樹状細胞は、例えば、本発明によるミニ遺伝子でトランスフェクトされるか、またはペプチドが間欠投与される。次いで、その樹状細胞は、インビボで免疫応答を誘発するために、患者に投与することができる。DNAベースまたはペプチドベースのワクチン組成物はまた、樹状細胞の動員と組み合わせてインビボで投与することができ、それによって、樹状細胞の負荷はインビボで行われる。

【０２６５】

好ましくは、以下の原理は、ワクチン用のポリエピトープ組成物に含めるための一連のエピトープを選択する場合に、またはワクチンに含められるおよび/もしくはミニ遺伝子のような核酸によってコードされる別個のエピトープを選択する場合に利用される。以下の原理はそれぞれ、選択を行うためにバランスをとることが好ましい。所定のワクチン組成物中に組み込まれる複数のエピトープは、エピトープが得られたネイティブ抗原において配列が連続してもよいが、そうである必要はない。

【０２６６】

1.)投与した際に、腫瘍クリアランスと相関することが観察されている免疫応答を模倣するエピトープが選択される。HLAクラスIについては、これは、少なくとも1つの腫瘍関連抗原(TAA)に由来する3～4個のエピトープを含む。HLAクラスIIについては、類似の原理が使用される。これもまた、3～4個のエピトープが少なくとも1つのTAAから選択される(例えば、Rosenberg et al., Science 278:1447-1450を参照のこと)。1つのTAAに由来するエピトープは、頻繁に発現するTAAの様々な発現パターンを有する腫瘍を標的とするワクチンを作製するために、1個またはそれ以上のさらなるTAAに由来するエピトープと組み合わせて使用することができる。

【０２６７】

2.)免疫原性と相関することが確認された必須の結合親和性を有するエピトープが選択される:HLAクラスIについては、500nMまたはそれ以下、しばしば200nMまたはそれ以下のIC_{50}；およびクラスIIについては、1000nMまたはそれ以下のIC_{50}。

【０２６８】

3.) 広い集団カバー率を得るように、十分なスーパーモチーフ保有ペプチドまたは十分な一連の対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドが選択される。例えば、少なくとも80％の集団カバー率を有することが好ましい。当技術分野で公知の統計的評価法であるモンテカルロ分析を用いて、集団カバー率の幅または重複(redundancy)を評価することができる。

【０２６９】

4.)癌関連抗原に由来するエピトープを選択する場合、患者は、ネイティブエピトープに対する寛容を発生している場合があるので、アナログを選択することがしばしば有用である。

【０２７０】

5.)「ネスト化(nested)エピトープ」といわれるエピトープが、特に関連している。ネスト化エピトープは、少なくとも2個のエピトープが、所定のペプチド配列中に重複している場合に存在する。ネスト化ペプチド配列は、B細胞エピトープ、HLAクラスIエピトープおよび/またはHLAクラスIIエピトープを含んでもよい。ネスト化エピトープを提供する場合、一般的な目的は、1配列につき最大数のエピトープを提供することである。従って、局面は、そのペプチドにおけるアミノ末端エピトープのアミノ末端およびカルボキシル末端エピトープのカルボキシル末端より長いペプチドを提供することは避けることである。複数エピトープ配列、例えば、ネスト化エピトープを含む配列を提供する場合、病的特性または他の有害な生物学的特性を有さないことを保証するために、その配列をスクリーニングすることが一般的に重要である。

【０２７１】

6.)ポリエピトープタンパク質が作製される場合、またはミニ遺伝子を作製する場合、目的は、関心対象のエピトープを含む最小のペプチドを作製することである。この原理は、ネスト化エピトープを含むペプチドを選択する場合に採用されたものとは同じでない場合、類似である。しかしながら、人工ポリエピトープペプチドを使用すると、大きさを最小にする目的は、ポリエピトープタンパク質中のエピトープ間に任意のスペーサー配列を組み込む必要性に対してバランスがとられる。スペーサーアミノ酸残基は、例えば、接合部エピトープ(免疫系によって認識されるが、標的抗原中に存在しない、エピトープを並置することによってのみ人工的に作製されるエピトープ)を避けるために、またはエピトープ間の切断を促進し、それによってエピトープ提示を高めるために導入することができる。接合部エピトープは、一般的に、レシピエントがその非ネイティブエピトープに対する免疫応答を発生する場合があるので回避すべきである。「優性エピトープ」である接合部エピトープが特に考慮される。優性エピトープは、他のエピトープに対する免疫応答が減少または抑制する、このような熱烈な(zealous)応答につながり得る。

【０２７２】

7.)同じ標的タンパク質の複数の変異体の配列が存在する場合、潜在的なペプチドエピトープはまた、それらの保存性に基づいて選択することができる。例えば、保存性に関す

る基準は、HLAクラスI結合ペプチド配列全体またはクラスII結合ペプチドの9マーコア全体が、特定のタンパク質抗原に対して評価された配列の指定された割合が保存されていると規定し得る。

【０２７３】

IX.C.1. ミニ遺伝子ワクチン

複数のエピトープの同時送達を可能にする多くの異なるアプローチが利用可能である。本発明のペプチドをコードする核酸は、本発明の特に有用な態様である。ミニ遺伝子中に含めるためのエピトープは、好ましくは、前節において示された基準に従って選択される。本発明のペプチドをコードする核酸を投与する好ましい手段は、本発明の1つまたは複数のエピトープを含むペプチドをコードするミニ遺伝子構築物を利用する。

【０２７４】

複数エピトープミニ遺伝子の使用は、以下に、ならびにIshioka et al., J.Immunol.162:3915-3925, 1999；An, L. and Whitton, J.L., J.Virol.71:2292, 1997；Thomson, S.A. et al., J.Immunol.157:822, 1996；Whitton, J.L. et al., J. Virol.67:348, 1993；Hanke, R. et al., Vaccine 16:426, 1998に記載される。例えば、24P4C12由来のスーパーモチーフ保有エピトープおよび/またはモチーフ保有エピトープ、PADRE(商標) ユニバーサルヘルパーT細胞エピトープまたは24P4C12由来の複数HTLエピトープ、ならびに小胞体移動シグナル配列をコードする複数エピトープDNAプラスミドを操作することができる。ワクチンはまた、他のTAAに由来するエピトープを含んでもよい。

【０２７５】

複数エピトープのミニ遺伝子の免疫原性は、試験されるエピトープに対するCTL誘導応答の大きさを評価するトランスジェニックマウスにおいて確認することができる。さらに、DNAコードエピトープのインビボでの免疫原性は、DNAプラスミドでトランスフェクトされた標的細胞に対する特定のCTL株のインビトロ応答と相関し得る。従って、これらの実験から、このミニ遺伝子は、1.)CTL応答を発生させるように働き、かつ2.) 誘導されたCTLが、コードされているエピトープを発現する細胞を認識することが分かる。

【０２７６】

例えば、ヒト細胞における発現のために選択されたエピトープをコードするDNA配列(ミニ遺伝子)を作製するために、エピトープのアミノ酸配列を逆翻訳することができる。各アミノ酸についてのコドン選択を指導するために、ヒトコドン使用頻度表を使用することができる。これらのエピトープをコードするDNA配列は、翻訳された時に、連続ポリペプチド配列が作製されるように直ぐ隣にあってもよい。発現および/または免疫原性を最適化するために、さらなる要素がミニ遺伝子設計中に組み込まれてもよい。逆翻訳し、かつミニ遺伝子配列に含めることができるアミノ酸配列の例には、HLAクラスIエピトープ、HLAクラスIIエピトープ、抗体エピトープ、ユビキチン化シグナル配列、および/または小胞体標的化シグナルが含まれる。さらに、CTLエピトープおよびHTLエピトープのHLA提示は、CTLエピトープもしくはHTLエピトープの隣に、合成(例えば、ポリ-アラニン)または天然の隣接配列を含めることによって改善することができる。エピトープを含むこれらの大きなペプチドは本発明の範囲内である。

【０２７７】

このミニ遺伝子配列は、ミニ遺伝子のプラス鎖およびマイナス鎖をコードするオリゴヌクレオチドを組み立てることによって、DNAに変換することができる。重複するオリゴヌクレオチド(30～100塩基長)を合成し、リン酸化し、精製し、周知の技術を用いて適切な条件下でアニールすることができる。このオリゴヌクレオチドの末端は、例えば、T4 DNAリガーゼを用いて連結することができる。その後、エピトープポリペプチドをコードするこの合成ミニ遺伝子は、望ましい発現ベクターにクローニングすることができる。

【０２７８】

標的細胞における発現を確実にするために、好ましくは、当業者に周知の標準的な調節配列がベクターに含まれる。いくつかのベクター要素が、望ましい:ミニ遺伝子挿入のための下流のクローニング部位を有するプロモーター；効率的な転写終結のためのポリアデ

ニル化シグナル；大腸菌(E.coli)複製起点；および大腸菌選択マーカー(例えば、アンピシリン耐性またはカナマイシン耐性)。多くのプロモーターが、この目的に使用することができる、例えば、ヒトサイトメガロウイルス(hCMV)プロモーター。他の適切なプロモーター配列については、例えば、米国特許第5,580,859号および同第5,589,466号を参照のこと。

【０２７９】

ミニ遺伝子発現および免疫原性を最適化するために、さらなるベクターの改変が望ましい場合がある。場合によっては、イントロンは、効率的な遺伝子発現に必要とされ、1つまたはそれ以上の合成イントロンまたは天然のイントロンが、ミニ遺伝子の転写領域に組み込まれ得る。mRNA安定化配列および哺乳動物細胞における複製のための配列を含めることもまた、ミニ遺伝子発現を増大させるために考慮され得る。

【０２８０】

発現ベクターが選択されたら、ミニ遺伝子はプロモーターの下流にあるポリリンカー領域にクローニングされる。このプラスミドにより、適切な大腸菌株が形質転換され、標準的技術を用いてDNAが調製される。ミニ遺伝子の方向およびDNA配列、ならびにこのベクターに含まれる全ての他の要素は、制限酵素マッピングおよびDNA配列分析を用いて確認される。正確なプラスミドを有する細菌細胞は、マスター細胞バンクおよび作業用細胞バンクとして保存することができる。

【０２８１】

さらに、免疫刺激配列(ISSまたはCpG)は、DNAワクチンの免疫原性において役割を果たすようである。これらの配列は、免疫原性を増強することが望まれる場合、ミニ遺伝子コード配列の外側において、ベクター中に含まれ得る。

【０２８２】

いくつかの態様では、ミニ遺伝子がコードするエピトープおよび(免疫原性を上げる、または下げるために含まれる)第2のタンパク質の両方の生成を可能にするバイシストロン発現ベクターを使用することができる。同時発現されたら、免疫応答を有利に高めることができるタンパク質またはポリペプチドの例には、サイトカイン(例えば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サイトカイン誘導分子(例えば、LeIF)、補助刺激分子、またはHTL応答に関しては、pan-DR結合タンパク質(PADRE(商標), Epimmune, San Diego, CA)が含まれる。ヘルパー(HTL)エピトープは、細胞内標的化シグナルに連結し、発現されるCTLエピトープとは別個に発現することができる。このことは、HTLエピトープが、CTLエピトープのものとは異なる細胞区画を指向すること可能にする。所望であれば、これは、HTLエピトープのHLAクラスII経路へのより効率的な進入を促進することができ、それによって、HTL誘導を改善する。HTL誘導またはCTL誘導とは対照的に、免疫抑制分子(例えば、TGF-β)の同時発現により免疫応答を特異的に減少させることは、特定の疾患において有益であり得る。

【０２８３】

治療量のプラスミドDNAは、例えば、大腸菌における醗酵、その後の精製によって生成することができる。作業用細胞バンクからのアリコートを用いて、周知の技術に従って増殖培地に接種し、振盪フラスコもしくはバイオリアクター中で飽和するまで増殖させる。プラスミドDNAは、QIAGEN, Inc.(Valencia, California)によって供給される固相陰イオン交換樹脂のような標準的な生物分離技術を使用して精製することができる。必要であれば、ゲル電気泳動法または他の方法を用いて、開環状の形態および直線状の形態からスーパーコイルDNAを単離することができる。

【０２８４】

精製プラスミドDNAは、種々の製剤を用いた注射のために調製することができる。これらの中で最も単純なものは、滅菌リン酸緩衝食塩水(PBS)での凍結乾燥DNAの再構成である。このアプローチは「裸のDNA」として公知であり、現在、臨床試験において筋肉内(IM)投与に関して使用されている。ミニ遺伝子DNAワクチンの免疫療法的効果を最大限にするために、精製プラスミドDNAを処方するための代替法が望ましい場合がある。種々の方法が記載されてきており、新たな技術が利用可能になっている可能性がある。陽イオン性脂

質、糖脂質、および融合性リポソームも製剤において使用することができる(例えば、WO 93/24640；Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques6(7):682(1988)；米国特許第5,279,833号；WO 91/06309；およびFelgner, et al., Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 84:7413(1987)によって記載されるものを参照のこと)。さらに、総称して、防御的相互作用性非凝集化合物(protective, interactive, non-condensing compound)(PINC)といわれるペプチドおよび化合物もまた、精製プラスミドDNAと複合体を形成して、安定性、筋肉内分散、または特定の器官もしくは細胞型への輸送のような変数に影響を及ぼし得る。

【０２８５】

標的細胞感作は、ミニ遺伝子によってコードされるCTLエピトープの発現およびHLAクラスI提示の機能的アッセイとして使用することができる。例えば、このプラスミドDNAは、標準的なCTLクロム放出アッセイの標的として適切な哺乳動物細胞株に導入される。使用されるトランスフェクション法は、最終的な製剤に左右される。「裸の」DNAにはエレクトロポレーションを使用できるのに対して、陽イオン性脂質を用いるとインビトロでのトランスフェクションが可能になる。蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いてトランスフェクトされた細胞を濃縮するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するプラスミドを同時にトランスフェクトすることができる。次いで、これらの細胞は、クロム-51(^{51}Cr)標識され、エピトープ特異的CTL株の標的細胞として使用される。^{51}Cr放出によって検出される細胞溶解は、ミニ遺伝子によってコードされるCTLエピトープの生成およびHLA提示の両方を示す。HTLエピトープの発現は、HTL活性を評価するアッセイを使用して同様に評価することができる。

【０２８６】

インビボでの免疫原性は、ミニ遺伝子DNA製剤の機能試験に関する第2のアプローチである。適切なヒトHLAタンパク質を発現するトランスジェニックマウスが、DNA生成物で免疫される。用量および投与経路は製剤に左右される(例えば、PBS中のDNAに関してはIM、脂質複合体化DNAに関しては腹腔内(i.p.))。免疫して21日後、脾細胞を採取し、試験されている各エピトープをコードするペプチドの存在下で1週間にわたって再刺激する。その後、CTLエフェクター細胞に関して、標準的技術を用いて、ペプチドを負荷した^{51}Cr-標識標的細胞の細胞溶解のアッセイを行う。ミニ遺伝子によってコードされるエピトープに対応するペプチドエピトープを負荷したHLAによって感作した標的細胞の溶解は、DNAワクチンによるCTLのインビボ誘導機能を実証する。HTLエピトープの免疫原性は、同様に、トランスジェニックマウスにおいて確認される。

【０２８７】

または、この核酸は、例えば、米国特許第5,204,253号に記載のように、衝撃送達を使用して投与することができる。この技術を使用して、DNAのみから構成される粒子が投与される。さらなる代替的態様において、DNAを、粒子、例えば、金粒子に付着することができる。

【０２８８】

ミニ遺伝子はまた、当技術分野で周知の他の細菌またはウイルスによる送達系を用いて送達することができる。例えば、本発明のエピトープをコードする発現構築物を、ウイルスベクター、例えば、ワクシニアに組み込むことができる。

【０２８９】

IX.C.2. CTLペプチドとヘルパーペプチドとの組み合わせ

本発明のCTLペプチドを含むワクチン組成物は、望ましい属性、例えば、血清半減期の改善、集団カバー率の拡大、または免疫原性の増強)を提供するように改変することができる、例えば、アナログ化することができる。

【０２９０】

例えば、ペプチドがCTL活性を誘導する能力は、Tヘルパー細胞応答を誘導できる少なくとも1つのエピトープを含む配列に、ペプチドを連結することによって増強することができる。CTLペプチドはTヘルパーペプチドに直接連結することができるが、しばしば、CTLエピトープ/HTLエピトープ結合体は、スペーサー分子によって連結される。このスペーサ

ーは、典型的には、生理学的条件下で実質的に荷電していない比較的小さな中性分子、例えば、アミノ酸またはアミノ酸模倣物から構成される。このスペーサーは、典型的には、例えば、Ala、Gly、または非極性アミノ酸または中性極性アミノ酸からなる他の中性スペーサーから選択される。任意で、存在するスペーサーが同じ残基から構成される必要はなく、従って、ヘテロオリゴマーまたはホモオリゴマーであってもよいことが理解されるだろう。スペーサーが存在する場合、通常、少なくとも1つまたは2つの残基、より通常は、3～6個の残基、時として、10個またはそれ以上の残基である。このCTLペプチドエピトープは、Tヘルパーペプチドエピトープに、直接に、またはCTLペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端にあるスペーサーを介して連結することができる。免疫原性ペプチドのアミノ末端またはTヘルパーペプチドのアミノ末端はアセチル化することができる。

【０２９１】

HTLペプチドエピトープはまた、その生物学的特性を変えるように改変することができる。例えば、HTLペプチドエピトープは、そのプロテアーゼ耐性を上げるように、従って、その血清半減期を延ばすように、D-アミノ酸を含むように改変されてもよく、その生物学的活性を高めるように、他の分子、例えば、脂質、タンパク質、炭水化物などに結合体化されてもよい。例えば、Tヘルパーペプチドは、アミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにおいて1個またはそれ以上のパルミチン酸鎖に結合体化することができる。

【０２９２】

IX.C.3. CTLペプチドとT細胞抗原刺激剤との組み合わせ

いくつかの態様では、Bリンパ球またはTリンパ球を抗原刺激する少なくとも1つの成分を、本発明の薬学的組成物に含めることが望ましい場合がある。脂質は、CTLをインビボで抗原刺激することができる薬剤であると同定されている。例えば、パルミチン酸残基は、リジン残基のε-アミノ基およびα-アミノ基に取り付けることができ、次いで、例えば、1つまたはそれ以上の連結残基、例えば、Gly、Gly-Gly-、Ser、Ser-Serなどを介して免疫原性ペプチドに連結することができる。この脂質化ペプチドは、次いで、ミセルもしくは粒子に入れて、リポソームに組み込んで、アジュバント、例えば、不完全フロイントアジュバントで乳化して、直接投与されてもよい。好ましい態様において、特に有効な免疫原性組成物は、Lysのε-アミノ基およびα-アミノ基に取り付けられたパルミチン酸を含み、これは、連結、例えば、Ser-Serを介して、免疫原性ペプチドのアミノ末端に取り付けられる。

【０２９３】

CTL応答の脂質抗原刺激の別の例として、大腸菌リポタンパク質、例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン(P_3CSS)が、適切なペプチドに共有結合された場合、ウイルス特異的CTLを抗原刺激するために使用することができる(例えば、Deres et al., Nature 342:561,1989を参照のこと)。本発明のペプチドは、例えば、P3CSSにカップリングすることができ、リポペプチドは、標的抗原に対する免疫応答を特異的に抗原刺激するために個体に投与することができる。さらに、中和抗体の誘導もまたP3CSS結合体化エピトープで抗原刺激することができるので、体液性応答および細胞性応答の両方をより効率的に誘発するために、このような2つの組成物を組み合わすることができる。

【０２９４】

IX.C.4. CTLペプチドおよび/またはHTLペプチドが間欠投与されたDCを含むワクチン組成物

本発明によるワクチン組成物の一態様は、エピトープ保有ペプチドのカクテルを患者の血液に由来するPBMCまたはPBMCから単離されたDCにエクスビボで投与することを含む。DCを採取することを容易にするための医用薬剤、例えば、Progenipoietin(商標)(Pharmacia-Monsanto, St.Louis, MO)またはGM-CSF/IL-4を使用することができる。DCにペプチドを間欠投与した後でかつ患者に再度注入する前に、このDCは、結合していないペプチドを除去するために洗浄される。この態様において、ワクチンは、ペプチドが間欠投与されたDCを含み、このDCは、その表面上のHLA分子と複合体化した、間欠投与されたペプチドエピ

トープを提示する。

【０２９５】

このDCには、ペプチドのカクテルをエクスビボで間欠投与することができ、このペプチドのいくつかは、24P4C12に対するCTL応答を刺激する。任意で、CTL応答を促進するために、ヘルパーT細胞(HTL)ペプチド、例えば、天然または人工の緩く拘束されたHLAクラスIIペプチドを含めることができる。従って、本発明によるワクチンは、24P4C12を発現または過剰発現する癌を処置するために使用される。

【０２９６】

IX.D.)養子免疫療法

抗原性24P4C12関連ペプチドもまたエクスビボでCTL応答および/またはHTL応答を誘起するために使用される。得られたCTL細胞またはHTL細胞は、他の従来の型の治療に応答しないか、または本発明による治療用ワクチンペプチドもしくは核酸に対して応答しない患者における腫瘍を処置するために使用することができる。特定の抗原に対するエクスビボでのCTL応答またはHTL応答は、この患者の、または遺伝的に適合性のCTL前駆細胞もしくはHTL前駆細胞を、組織培養において、抗原提示細胞(APC)、例えば、樹状細胞の供給源、および適切な免疫原性ペプチドと一緒にインキュベートすることによって誘導される。前駆細胞が活性化されかつエフェクター細胞に発展される適切なインキュベーション期間(典型的には、約7～28日間)の後、この細胞を患者に注入して戻すと、これらの細胞は、それらの特異的標的細胞(例えば、腫瘍細胞)を破壊する(CTL)、またはその破壊を促進する(HTL)。トランスフェクトされた樹状細胞はまた、抗原提示細胞として使用することができる。

【０２９７】

IX.E.)治療目的または予防目的でのワクチン投与

本発明の薬学的組成物およびワクチン組成物は、典型的には、24P4C12を発現または過剰発現する癌を処置および/または予防するために使用される。治療適用において、ペプチド組成物および/または核酸組成物は、抗原に対する有効なB細胞、CTLおよび/またはHTL応答を誘発し、かつ症状および/もしくは合併症を治癒または少なくとも部分的に停止もしくは遅延させるために十分な量で、患者に投与される。このことを達成するために十分な量は、「治療的に有効な用量」と定義される。この用途に有効な量は、例えば、投与される特定の組成物、投与様式、処置される疾患の段階および重篤度、患者の体重および全身の健康状態、ならびに処方を行っている医師の判断に依存する。

【０２９８】

薬学的組成物に関して、本発明の免疫原性ペプチド、またはこれをコードするDNAは、一般的に、24P4C12を発現する腫瘍を既に有する個体に投与される。このペプチドまたはこれをコードするDNAは、個々に、または1つまたはそれ以上のペプチド配列の融合物として投与することができる。患者は、免疫原性ペプチドで別個に、または適宜、外科手術のような他の処置とともに処置することができる。

【０２９９】

治療的用途に関して、投与は、一般的に、24P4C12関連癌の最初の診断において開始すべきである。この後に、少なくとも症状が実質的に寛解するまで、かつその一定期間にわたって、追加免疫投与が行われる。患者に送達されるワクチン組成物のこの態様(すなわち、ペプチドカクテル、ポリエピトープポリペプチド、ミニ遺伝子、またはTAA特異的CTLもしくは間欠投与された樹状細胞のような態様を含むが、これに限定されない)は、疾患の段階または患者の健康状態に従って変動し得る。例えば、24P4C12を発現する腫瘍を有する患者において、24P4C12特異的CTLを含むワクチンは、代替的態様より進行した疾患を有する患者において腫瘍細胞を死滅させることにおいてより有効であり得る。

【０３００】

一般的に、細胞傷害性T細胞応答を効率的に刺激するのに十分な投与様式によって送達されるペプチドエピトープの量を提供することが十分である。ヘルパーT細胞応答を刺激する組成物もまた本発明のこの態様に従って与えることができる。

【０３０１】
最初の治療的免疫のための投与量は、一般的に、低い方の値が、約1μg、5μg、50μg、500μg、または1,000μgであり、高い方の値が、約10,000μg；20,000μg；30,000μg；または50,000μgである単位投与量範囲において見出される。ヒトについての投与量の値は、典型的には、70kgの患者につき、約500μg～約50,000μgの範囲である。患者の血液から得られたCTLおよびHTLの比活性を測定することによって決定される場合、数週間～数ヶ月間にわたる追加免疫レジメンに従って、約1.0μg～約50,000μgの追加免疫投与量が、患者の応答および状態に依存して投与することができる。投与は、少なくとも臨床的症状または検査試験が、その新生物がその後一定期間の間に排除された、または減少したことを示すまで継続すべきである。投与量、投与経路、および投与スケジュールは当技術分野で公知の方法論に従って調節される。

【０３０２】
特定の態様において、本発明のペプチドおよび組成物は、重篤な疾患段階、すなわち、生命が脅かされている、または潜在的に生命が脅かされる状況において使用される。このような場合、本発明の好ましい組成物中の最小量の無関係の物質および前記ペプチドの関係する非毒性性質の結果として、これらの述べられた投与量と比べて実質的に過剰量のこれらのペプチド組成物を投与することは可能であり、かつ処置を行っている医師が望ましいと感じることがある。

【０３０３】
本発明のワクチン組成物はまた、純粋に予防剤として使用することができる。一般的に、初回予防免疫のための投与量は、一般的に、低い方の値が、約1μg、5μg、50μg、500μg、または1000μgであり、高い方の値が、約10,000μg；20,000μg；30,000μg；または50,000μgである単位投薬量範囲において見出される。ヒトについての投与量の値は、典型的には、70kgの患者につき、約500μg～約50,000μgの範囲である。この次に、ワクチンの初回投与から約4週間～約6ヶ月後の規定された間隔において投与される約1.0μg～約50,000μgのペプチドが、追加免疫投与される。ワクチンの免疫原性は、患者血液のサンプルから得られたCTLおよびHTLの比活性を測定することによって評価することができる。

【０３０４】
治療処置のための薬学的組成物は、非経口投与、局部投与、経口投与、鼻投与、くも膜下腔内投与、または局所投与(例えば、クリーム剤または局部軟膏剤として)について意図される。好ましくは、この薬学的組成物は、非経口的に、例えば、静脈内に、皮下に、皮内に、または筋肉内に投与される。従って、本発明は、許容可能な担体、好ましくは水性担体中に溶解または懸濁された免疫原性ペプチドの溶液を含む、非経口投与のための組成物を提供する。

【０３０５】
種々の水性担体、例えば、水、緩衝化した水、0.8% 食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などを使用することができる。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌されてもよいし、滅菌濾過されてもよい。得られた水溶液は、そのまま使用するためにパッケージされてもよいし、凍結乾燥されてもよい。この凍結乾燥調製物は、投与前に滅菌用液と合わせられる。

【０３０６】
組成物は、適切な生理学的条件に必要とされる場合、薬学的に許容可能な補助物質、例えば、pH調節剤および緩衝化剤、張度調節剤、湿潤剤、保存剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含んでもよい。

【０３０７】
薬学的製剤中の本発明のペプチドの濃度は、広範に、すなわち、約0.1%未満、通常は、約2%または少なくとも約2重量%～20重量%から50重量%またはそれ以上で変動してもよく、選択される特定の投与様式に従って、主に、流体の体積、粘度などによって選択さ

れる。

【０３０８】

組成物のヒトの単位剤形は、典型的には、許容可能な担体、一態様においては、水性担体のヒト単位用量を含む薬学的組成物中に含まれ、ヒトにこのような組成物を投与するために使用される、当業者に公知の体積/量で投与される(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, A.Gennaro編, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985を参照のこと)。例えば、初回免疫のためのペプチド用量は、70kgの患者に対して約1μg～約50,000μg、一般的に、100μg～5,000μgであり得る。例えば、核酸に関しては、初回免疫は、複数部位に0.5～5mgの量でIM(またはSCもしくはIDで)投与される、裸の核酸の形をした発現ベクターを使用して行うことができる。この核酸(0.1μg～1000μg)はまた遺伝子銃を用いて投与することができる。3～4週間のインキュベーション期間後に、追加免疫用量が投与される。この追加免疫は、5～10^7～5×10^9pfuの用量において投与される組換え鶏痘ウイルスでもよい。

【０３０９】

抗体に関して、処置は、一般的に、静脈内注射(IV)のような許容可能な投与経路を介した、典型的には、約0.1～約10mg/kg体重の範囲の用量での、抗24P4C12抗体調製物の反復投与を含む。一般的に、10～500mg MAb/週の範囲の用量が有効であり、かつ十分に許容される。さらに、抗24P4C12 MAb調製物の約4mg/kg患者体重IVの初回負荷投与、続いて、約2mg/kg IVの毎週投与は、許容可能な投薬レジメンの代表である。当業者によって認識されるように、種々の要因が、特定の症例における理想的な用量に影響を及ぼし得る。このような要因には、例えば、組成物の半減期、Abの結合親和性、物質の免疫原性、患者における24P4C12発現の程度、循環中の分離した24P4C12抗原の程度、望ましい定常状態の濃度レベル、処置頻度、および本発明の処置方法と併用される化学療法剤もしくは他の薬剤の影響、ならびに特定の患者の健康状態が含まれる。非限定的な好ましいヒトの単位用量は、例えば、500μg～1mg、1mg～50mg、50mg～100mg、100mg～200mg、200mg～300mg、400mg～500mg、500mg～600mg、600mg～700mg、700mg～800mg、800mg～900mg、900mg～1g、または1mg～700mgである。特定の態様において、この用量は、2～5mg/kg体重の範囲であり、例えば、その後、1～3mg/kgの毎週投与；0.5mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg/kg体重の毎週投与、例えば、2週間、3週間または4週間続く；例えば、0.5～10mg/kg体重の毎週投与、2週間、3週間、または4週間続く；225mg体表面積m^2、250mg体表面積m^2、275mg体表面積m^2、300mg体表面積m^2、325mg体表面積m^2、350mg体表面積m^2、375mg体表面積m^2、400mg体表面積m^2が毎週； 1～600mg 体表面積m^2が毎週；225～400mg 体表面積m^2が毎週である。これらの投与の後に、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、19週間、11週間、12週間、またはそれ以上にわたって毎週投与が続いてもよい。

【０３１０】

一態様において、ポリヌクレオチドのヒト単位剤形は、任意の治療効果を提供する適切な投与量範囲または有効量を含む。当業者によって認識されるように、治療効果は多くの要因に依存し、これらの要因には、ポリヌクレオチドの配列、ポリヌクレオチドの分子量、および投与経路が含まれる。投与量は、一般的に、当技術分野で公知の種々のパラメーター、例えば、症状の重篤度、患者の病歴など)に従って、医師または他の健康管理専門家によって選択される。一般的に、約20塩基のポリヌクレオチドに関して、投与量範囲は、例えば、独立して選択される下限、例えば、約0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、200mg/kg、300mg/kg、400mg/kg、または500mg/kgから、下限より大きな独立して選択される上限、例えば、約60mg/kg、80mg/kg、100mg/kg、200mg/kg、300mg/kg、400mg/kg、500mg/kg、750mg/kg、1000mg/kg、1500mg/kg、2000mg/kg、3000mg/kg、4000mg/kg、5000mg/kg、6000mg/kg、7000mg/kg、8000mg/kg、9000mg/kg、または10,000mg/kgまで選択することができる。例えば、用量は、以下:0.1～100mg/kg、0.1～50mg/kg、0.1～25mg/kg、0.1～10mg/kg、1～500mg/kg、100～400mg/kg、200～300mg/kg、

1～100mg/kg、100～200mg/kg、300～400mg/kg、400～500mg/kg、500～1000mg/kg、500～5000mg/kg、または500～10,000mg/kgのいずれかでよい。一般的に、非経口投与経路は、罹患組織へのヌクレオチドの直接的な適用と比較して、高い用量のポリヌクレオチドを必要とする場合があり、さらに長いポリヌクレオチドも同様である。

【０３１１】

一態様において、T細胞のヒト単位剤形は、任意の治療効果を提供する適切な投与量範囲または有効量を含む。当業者によって認識されるように、治療効果は多くの要因に依存する。投与量は、一般的に、当技術分野で公知の種々のパラメーター、例えば、症状の重篤度、患者の病歴などに従って、医師または他の健康管理専門家によって選択される。用量は、約10^4細胞～約10^6細胞、約10^6細胞～約10^8細胞、約10^8細胞～約10^{11}細胞、または約10^8細胞～約5×10^{10}細胞でもよい。用量はまた、約10^6細胞/m^2～約10^{10}細胞/m^2、または約10^6細胞/m^2～約10^8細胞/m^2でもよい。

【０３１２】

本発明のタンパク質および/またはこのタンパク質をコードする核酸はまた、リポソームを介して投与することができる。このリポソームはまた、1)特定の組織、例えば、リンパ組織にこのタンパク質を標的化する；2)疾患細胞に選択的に標的化する；または3)ペプチド組成物の半減期を増大させるように働くこともできる。リポソームは、エマルジョン、発泡体(foam)、ミセル、不溶性単層、脂質結晶、リン脂質分散物、ラメラ層などを含む。これらの調製物において、送達されるペプチドは、リポソームの一部として、単独で、またはリンパ細胞の中で優勢な受容体に結合する分子(例えば、CD45抗原に結合するモノクローナル抗体)または他の治療用組成物もしくは免疫原性組成物と組み合わせて組み込まれる。従って、望ましい本発明のペプチドが満たされた、または望ましい本発明のペプチドで修飾されたリポソームはリンパ球の部位に向かうことができ、ここでリポソームは、ペプチド組成物を送達する。本発明による使用のためのリポソームは標準的な小胞形成脂質から形成される(これは、一般的に、中性リン脂質および負に荷電したリン脂質およびステロール、例えば、コレステロールを含む)。脂質の選択は、一般的に、例えば、リポソームの大きさ、酸に対する不安定性、および血中でのリポソームの安定性の考慮事項に左右される。例えば、Szoka et al., Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467(1980)、および米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号および同第5,019,369号に記載のように、リポソームを調製する種々の方法が利用可能である。

【０３１３】

免疫系の細胞を標的とするために、リポソームへ組み込まれるリガンドは、例えば、望ましい免疫系細胞の細胞表面決定基に特異的な抗体またはそのフラグメントを含んでもよい。ペプチドを含むリポソーム懸濁液は、特に、投与様式、送達されるペプチド、および処置されている疾患の段階に従って変動する用量で、静脈内投与、局所投与、局部投与などすることができる。

【０３１４】

固体組成物に関して、従来の非毒性固体担体を使用することができる。これらの担体には、例えば、薬学等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが含まれる。経口投与のために、薬学的に許容可能な非毒性組成物が、通常使用される賦形剤、例えば、前記に列挙されている担体、および一般的に、活性成分、すなわち、本発明の1種またはそれ以上のペプチドを10～95%、より好ましくは、25%～75%の濃度でを組み込むことによって形成される。

【０３１５】

エアロゾル投与のために、免疫原性ペプチドは、好ましくは、界面活性剤および噴霧剤と一緒に、微粒子の形で供給される。ペプチドの代表的なパーセンテージは、約0.01重量%～20重量%、好ましくは約1重量%～10重量%である。もちろん、界面活性剤は非毒性でなければならず、より好ましくは、噴霧剤中で可溶性でなければならない。このような薬剤の代表は、脂肪族多価アルコールまたはその環状無水物と、約6～22個の炭素原子を

含む脂肪酸、例えば、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン酸(olesteric acid)およびオレイン酸などのエステルもしくは部分エステルである。混合エステル、例えば、混合グリセリドまたは天然グリセリドを使用することができる。界面活性剤は、組成物の約0.1重量％～20重量％、好ましくは、約0.25～5重量％を構成し得る。この組成物のバランス(balance)は通常は噴霧剤である。例えば、鼻腔内送達のためのレシチンのように、望ましい場合には担体も含んでもよい。

【０３１６】

X.)24P4C12の診断態様および予後態様

本明細書で開示されるように、24P4C12ポリヌクレオチド、24P4C12ポリペプチド、24P4C12反応性細胞傷害性T細胞(CTL)、24P4C12反応性ヘルパーT細胞(HTL)および抗24P4C12ポリペプチド抗体が、細胞増殖の調節不全、例えば、癌、特に表Iに列挙した癌、例えば、「正常組織および患者標本における24P4C12の発現分析」という表題の実施例において記載されるような、組織発現ならびに特定の癌における過剰発現の特異的パターンを参照のこと)と関連する状態を調べる、周知の診断アッセイ、予後アッセイ、および治療アッセイにおいて使用される。

【０３１７】

24P4C12は、前立腺癌の存在を同定およびモニタリングするために長年にわたって医者によって使用されてきた典型的なマーカーである前立腺関連抗原PSAから類推して説明することができる(例えば、Merrill et al., J.Urol.163(2):503-5120(2000)；Polascik et al., J.Urol.Aug；162(2):293-306(1999)およびFortier et al., J.Nat.Cancer Inst.91(19):1635-1640(1999)を参照のこと)。種々の他の診断マーカーは、p53およびK-rasを含む類似の状況でも使用される(例えば、Tulchinsky et al., Int J Mol Med 1999 Jul 4(1):99-102およびMinimoto et al., Cancer Detect Prev 2000；24(1):1-12を参照のこと)。従って、24P4C12ポリヌクレオチドおよび24P4C12ポリペプチド(ならびにこれらの分子の存在を同定するために使用される24P4C12ポリヌクレオチドプローブおよび抗24P4C12抗体)ならびにこれらの特性の開示は、当業者が、例えば、癌と関連する状態の調査に関する種々の診断アッセイにおいて使用されるものと類似の方法においてこれらの分子を利用することを可能にする。

【０３１８】

24P4C12ポリヌクレオチド、24P4C12ポリペプチド、24P4C12反応性T細胞および24P4C12抗体を利用する診断方法の典型的な態様は、例えば、PSAポリヌクレオチド、PSAポリペプチド、PSA反応性T細胞およびPSA抗体を使用する、十分に確立された診断アッセイからの方法と類似である。例えば、PSA過剰発現または前立腺癌の転移をモニタリングする方法において、PSA mRNAの存在および/またはレベルを観察するために、PSAポリヌクレオチドがプローブとして(例えば、ノザン分析において、例えば、Sharief et al., Biochem.Mol.Biol.Int.33(3):567-74(1994)を参照のこと)およびプライマーとして(例えば、PCR分析において、例えば、Okegawa et al., J.Urol.163(4):1189-1190(2000)を参照のこと)使用されるのと同じように、本明細書に記載の24P4C12ポリヌクレオチドは、24P4C12過剰発現または前立腺の転移ならびにこの遺伝子を発現する他の癌を検出するために、同じ方法において利用することができる。または、PSAポリペプチドが、PSAタンパク質過剰発現をモニタリングする方法(例えば、Stephan et al., Urology 55(4):560-3(2000)を参照のこと)または前立腺細胞の転移(例えば、Alanen et al., Pathol.Res.Pract.192(3):233-7(1996)を参照のこと)をモニタリングする方法において、PSAタンパク質の存在および/またはレベルを観察するために使用することができる、PSAに特異的な抗体を作製するために使用されるのと同じように、本明細書に記載の24P4C12ポリペプチドも、24P4C12過剰発現、または前立腺細胞およびこの遺伝子を発現する他の癌の細胞の転移を検出することにおいて使用するための抗体を作製するために利用することができる。

【０３１９】

具体的には、転移は、起源器官(例えば、肺または前立腺など)から身体の異なる領域(

例えば、リンパ節または骨)への癌細胞の移動を要するので、24P4C12ポリヌクレオチドおよび/または24P4C12ポリペプチドを発現する細胞の存在について生物学的サンプルを試験するアッセイが、転移の証拠を提供するために使用することができる。例えば、24P4C12発現細胞を通常含まない組織からの生物学的サンプルが、24P4C12発現細胞を含むことが分かった場合、この発見は転移を示す。

【０３２０】

または、例えば、通常24P4C12を発現しない、または異なるレベルで24P4C12を発現する生物学的サンプル中の細胞が、24P4C12を発現する、または増大した24P4C12発現を有する(例えば、添付の図面に示した、表Iに列挙した癌および患者サンプルなどにおける24P4C12発現を参照のこと)ことが分かった場合、24P4C12ポリヌクレオチドおよび/または24P4C12ポリペプチドが、癌の証拠を提供するために使用することができる。このようなアッセイにおいて、当業者であれば、生物学的サンプルを、(24P4C12に加えて)第2の組織限局マーカーの存在について試験することによって、転移の補助的な証拠を得ることをさらに望む場合がある。

【０３２１】

組織切片内の24P4C12ポリペプチドの存在を同定するために免疫組織化学を利用すると、その組織内の特定の細胞の状況の変化を示すことができる。抗体が、癌細胞において発現するポリペプチドの位置を突き止める能力は、疾患の存在、疾患の段階、進行および/または腫瘍悪性度を診断する方法であることが、当技術分野で十分に理解されている。このような抗体はまた、対応する非悪性組織と比較して、癌細胞内のポリペプチドの分布の変化を検出することができる。

【０３２２】

24P4C12ポリペプチドおよび免疫原性組成物はまた、疾患状況では細胞下タンパク質局在が変化するという現象に鑑みると有用である。正常から疾患状況への細胞の変化は細胞形態の変化を引き起こし、しばしば、細胞下タンパク質局在/分布の変化と関連する。例えば、正常細胞において極性を有して発現する細胞膜タンパク質は疾患によって変化することがあり、細胞表面全体にわたって、極性のないタンパク質分布を生じる。

【０３２３】

疾患状況では細胞下タンパク質局在が変化するという現象は、免疫組織化学的手段を用いて、MUC1タンパク質の発現およびHer2タンパク質の発現により実証されている。正常上皮細胞では、糖タンパク質がある程度、核上に局在することに加えて、MUC1が典型的には頂端に分布しているのに対して、悪性病変部では、しばしば、無極性の染色パターンを示す(Diaz et al., The Breast Journal, 7；40-45(2001)；Zhang et al., Clinical Cancer Research, 4；2669-2676(1998):Cao et al., The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 45:1547-1557(1997))。さらに、正常乳房上皮はHer2タンパク質陰性である、または基底外側分布のみを示すのに対して、悪性細胞は細胞表面全体にわたってタンパク質を発現することがある(De Potter et al., International Journal of Cancer, 44；969-974(1989):McCormick et al., 117；935-943(2002))。または、タンパク質分布は、疾患状況では、表面だけの局在から変化して散在性の細胞質発現を含むことがある。このような例は、MUC1(Diaz et al., The Breast Journal, 7:40-45(2001))で認められ得る。

【０３２４】

免疫組織化学法によって検出されるように、細胞内のタンパク質の局在/分布の変化はまた、特定の処置法の好みに関する価値ある情報を提供することができる。この最後の点は、タンパク質が正常組織では細胞内に存在し得るが、悪性細胞では細胞表面に存在し得る状況によって例示される。細胞表面位置のために、細胞は、抗体ベースの診断レジメンおよび処置レジメンに有利に適している。タンパク質局在のこのような変化が24P4C12に関して存在する場合、24P4C12タンパク質およびこれに関する免疫応答は非常に有用である。24P4C12組成物を使用すると、当業者であれば、重要な診断決定および治療決定を下すことができる。

【０３２５】

24P4C12に特異的な免疫組織化学試薬はまた、24P4C12が通常は生成されない組織において、このポリペプチドが見られる場合に、24P4C12を発現する腫瘍の転移を検出するために有用である。

【０３２６】

従って、24P4C12ポリペプチドおよびこれに対する免疫応答から生じる抗体は、当業者に公知の診断目的、予後目的、予防目的および/または治療目的のような種々の重要な状況において有用である。

【０３２７】

さらに、本発明の24P4C12関連タンパク質または24P4C12関連ポリヌクレオチドは、24P4C12の過剰発現によって特徴付けられる病的状態を処置するために使用することができる。例えば、図1のアミノ酸配列または核酸配列、それらのいずれかのフラグメントは、24P4C12抗原に対する免疫応答を発生させるために使用することができる。24P4C12と反応する抗体または他の分子は、この分子の機能を調節し、それによって治療上の利益を提供するために使用することができる。

【０３２８】

X.A.)24P4C12タンパク質機能の阻害

本発明は、24P4C12とその結合パートナーとの結合または24P4C12と他のタンパク質との会合を阻害するための種々の方法および組成物、ならびに24P4C12機能を阻害する方法を含む。

【０３２９】

X.B.)細胞内抗体を用いた24P4C12の阻害

1つのアプローチにおいて、24P4C12に特異的に結合する単鎖抗体をコードする組み換えベクターが、遺伝子移入技術を介して24P4C12発現細胞内に導入される。従って、コードされる単鎖抗24P4C12抗体が細胞内で発現され、24P4C12タンパク質に結合し、それによってその機能を阻害する。このような細胞内単鎖抗体を操作する方法は周知である。このような細胞内抗体(「イントラボディ」とも知られる)は、細胞内の特定の区画に対して特異的に標的化され、このことによって、処置の阻害活性が集中する場所が制御される。この技術は、当技術分野に首尾よく適用されている(総説については、Richardson and Marasco, 1995, TIBTECH第13巻を参照のこと)。イントラボディは、そうでなければ豊富な細胞表面受容体の発現を実質的に排除することが示されている。(例えば、Richardson, et al., 1995, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:3137-3141；Beerli, et al., 1994, J.Biol.Chem. 289:23931-23936；Deshane, et al., 1994, Gene Ther.1:332-337を参照のこと)。

【０３３０】

単鎖抗体は、柔軟なリンカーポリペプチドによって接続された重鎖および軽鎖からなる可変ドメインを含み、単一のポリペプチドとして発現する。任意で、単鎖抗体は、軽鎖定常領域または重鎖定常領域に結合された単鎖可変領域フラグメント(scFv)として発現する。イントラボディを所望の細胞内区画に正確に標的化させるために、周知の細胞内輸送シグナルが、このような単鎖抗体をコードする組み換えポリヌクレオチドベクター内に操作される。例えば、小胞体(ER)に標的化されたイントラボディは、リーダーペプチド、および任意でC末端ER保持シグナル、例えば、KDELアミノ酸モチーフを組み込むように操作される。核において活性を発揮するように意図されたイントラボディは、核局在化シグナルを含むように操作される。イントラボディを細胞膜の細胞質側につなぎとめるために、脂質部分がイントラボディに接続される。イントラボディはまた、サイトゾルにおいて機能を発揮するように標的化することができる。例えば、サイトゾルイントラボディが、サイトゾル内の因子を隔離し、それによってその因子が天然の細胞内目的地へ輸送されることを防ぐために使用される。

【０３３１】

一態様において、イントラボディは、核内で24P4C12を捕捉し、それによって24P4C12の核内での活性を防ぐために使用される。所望の標的化を達成するために、核標的化シグナルがこのような24P4C12イントラボディ内に操作される。このような24P4C12イントラボデ

ィは、特定の24P4C12ドメインに特異的に結合するように設計される。別の態様において、24P4C12タンパク質に特異的に結合するサイトゾルイントラボディが、24P4C12が核へのアクセスを獲得し、それによって24P4C12が核内で任意の生物学的活性を発揮するのを防ぐ(例えば、24P4C12が他の因子と転写複合体を形成するのを防ぐ)ために使用される。

【０３３２】

X.C.)組み換えタンパク質による24P4C12の阻害

別のアプローチにおいて、組み換え分子が24P4C12に結合し、それによって24P4C12機能を阻害する。例えば、これらの組み換え分子は、24P4C12がその結合パートナーに接近/結合すること、または他のタンパク質と会合することを防ぐ、または阻害する。このような組み換え分子は、例えば、24P4C12特異的抗体分子の反応性部分を含んでもよい。特定の態様において、24P4C12結合パートナーの24P4C12結合ドメインが二量体の融合タンパク質内に操作され、それによってこの融合タンパク質は、ヒトIgG、例えば、ヒトIgG_1のFc部分に連結された2つの24P4C12リガンド結合ドメインを含む。このようなIgG部分は、例えばCH_2ドメインおよびCH_3ドメインならびにヒンジ領域を含んでもよいが、CH_1ドメインは含まない。このような二量体融合タンパク質は、24P4C12の発現に関連する癌に罹患している患者に可溶性形態で投与され、それによって二量体タンパク質は24P4C12に特異的に結合し、24P4C12と結合パートナーとの相互作用をブロックする。公知の抗体連結技術を使用して、このような二量体融合タンパク質は組み合わさって、多量体タンパク質となる。

【０３３３】

X.D.)24P4C12の転写または翻訳の阻害

本発明はまた、24P4C12遺伝子の転写を阻害するための種々の方法および組成物を含む。同様に、本発明はまた、24P4C12 mRNAのタンパク質への翻訳を阻害する方法および組成物を提供する。

【０３３４】

1つのアプローチにおいて、24P4C12遺伝子の転写を阻害する方法は、24P4C12遺伝子を24P4C12アンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を含む。別のアプローチにおいて、24P4C12 mRNAの翻訳を阻害する方法は、24P4C12 mRNAをアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を含む。別のアプローチにおいて、24P4C12特異的リボザイムが、24P4C12メッセージを切断し、それによって翻訳を阻害するために使用される。このようなアンチセンスおよびリボザイムに基づく方法はまた、24P4C12遺伝子の調節領域、例えば、24P4C12プロモーターおよび/またはエンハンサーエレメントにも向けることができる。同様に、24P4C12遺伝子転写因子を阻害することができるタンパク質は、24P4C12 mRNA転写を阻害するために使用される。上述の方法において有用な種々のポリヌクレオチドおよび組成物は、前記で説明されている。転写および翻訳を阻害するためのアンチセンスおよびリボザイム分子の使用は、当技術分野において周知である。

【０３３５】

24P4C12転写活性化を妨害することによって24P4C12の転写を阻害する他の因子はまた、24P4C12を発現している癌を処置するためにも有用である。同様に、24P4C12プロセッシングを妨害する因子が、24P4C12を発現する癌の処置に有用である。このような因子を使用する癌の処置方法もまた、本発明の範囲内にある。

【０３３６】

X.E.)治療戦略のための一般的な考慮事項

24P4C12を合成している腫瘍細胞に治療的ポリヌクレオチド分子(すなわち、アンチセンス、リボザイム、イントラボディをコードするポリヌクレオチドおよび他の24P4C12阻害分子)を送達するために、遺伝子移入および遺伝子療法技術を使用することができる。多数の遺伝子療法アプローチが当技術分野において公知である。24P4C12アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、24P4C12転写を妨害することができる因子などをコードする組み換えベクターが、このような遺伝子療法アプローチを使用して腫瘍細胞を標的化するために送達することができる。

【０３３７】
前記の治療アプローチは、広範に種々の外科的、化学療法的または放射線治療的レジメンのうちのいずれか1つと併用することができる。本発明の治療アプローチは、低用量の化学療法(または他の治療)および/または低頻度の投与の使用を可能にし得る。これは、全ての患者に対して、特に化学療法剤の毒性に十分に耐性ではない患者に対しても好都合である。
【０３３８】
特定の組成物(例えば、アンチセンス、リボザイム、イントラボディ)またはこのような組成物の組み合わせの抗腫瘍活性は、種々のインビトロアッセイ系およびインビボ活性系を使用して評価することができる。治療活性を評価するインビトロアッセイには、細胞増殖アッセイ、軟寒天アッセイおよび腫瘍促進活性の指標となる他のアッセイ、治療組成物が24P4C12と結合パートナーとの結合を阻害する程度を決定することができる結合アッセイなどが含まれる。
【０３３９】
インビボでは、24P4C12治療組成物の効果は、適切な動物モデルにおいて評価することができる。例えば、異種腎臓癌モデルを使用することができる。ここで、ヒト前立腺癌外植片または継代された異種移植片組織が免疫障害マウス、例えば、ヌードマウスまたはSCIDマウスに導入される(Klein et al., 1997, Nature Medicine 3:402-408)。例えば、PCT特許出願WO98/16628および米国特許第6,107,540号は、原発腫瘍、微小転移巣、および末期疾患の特徴である造骨性転移の形成の発症を繰り返すことができるヒト前立腺癌の種々の異種移植片モデルを記載する。腫瘍形成、腫瘍退行または転移などの阻害を測定するアッセイを使用して、効力を予測することができる。
【０３４０】
アポトーシスの促進を評価するインビボアッセイは、治療組成物の評価において有用である。一態様において、治療組成物で処置された腫瘍保有マウス由来の異種移植片をアポトーシス巣の存在について試験し、未処置コントロール異種移植片保有マウスと比較することができる。処置されたマウスの腫瘍においてアポトーシス巣が見られる程度は、前記組成物の治療効力を示す。
【０３４１】
上述の方法の実施において使用される治療組成物は、所望の送達方法に適した担体を含む薬学的組成物に処方することができる。適切な担体は、その治療組成物と組み合わされた場合に治療組成物の抗腫瘍機能を保持し、患者の免疫系と一般的に非反応性である任意の材料を含む。例には、任意の多数の標準的な薬学的担体、例えば、滅菌リン酸緩衝食塩水溶液、静菌水などが含まれるが、これに限定されない(一般的に、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A.Osal編、1980を参照のこと)。
【０３４２】
治療製剤は可溶化し、治療組成物を腫瘍部位に送達することができる任意の経路を介して投与することができる。潜在的に効率的な投与経路には、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、器官内、同所などが含まれるが、これに限定されない。静脈注射に好ましい製剤は、防腐処理をした静菌水、防腐処理をしていない滅菌水の溶液に溶解した治療組成物を含み、および/または0.9%の滅菌注射用塩化ナトリウム(USP)を含む塩化ポリビニルバッグまたはポリエチレンバッグの中で希釈される。治療タンパク質調製物は凍結乾燥されてもよく、滅菌粉末として、好ましくは、真空下で保管されてもよく、次いで、注射前に、例えば、ベンジルアルコール防腐剤を含む静菌水または滅菌水に溶解して再構成されてもよい。
【０３４３】
上述の方法を使用した癌の処置のための投与量および投与プロトコールは、方法および標的の癌によって異なり、一般的に、当技術分野において認識される多数の他の要因に依存する。
【０３４４】

XI.)24P4C12のモジュレーターの同定、特徴付け、および使用

モジュレーターを同定および使用する方法

一態様において、特定の発現プロフィールを誘導または抑制し、特定の経路を抑制または誘導し、好ましくは、それによって関連する表現型を作製するモジュレーターを同定するために、スクリーニングが実施される。別の態様において、特定の状況において重要な、発現の異なる遺伝子を同定している場合、個々の遺伝子の発現を変える(増加または減少させる)モジュレーターを同定するために、スクリーニングが実施される。別の態様において、発現の異なる遺伝子の発現産物の生物学的機能を変えるモジュレーターを同定するために、スクリーニングが実施される。また、特定の状況において遺伝子の重要性を同定している場合、結合し、および/または遺伝子産物の生物学的活性を調節する薬剤を同定するために、スクリーニングが実施される。

【０３４５】

さらに、候補薬剤に応答して誘導される遺伝子に対して、スクリーニングが行われる。モジュレーター(癌の発現パターンを抑制して正常の発現パターンを導くモジュレーター、または正常組織のような遺伝子発現を導く癌遺伝子のモジュレーター)を同定した後、前記薬剤に応答して特異的に調節される遺伝子を同定するために、スクリーニングが実施される。正常組織と薬剤で処置された癌組織との間の発現プロフィールの比較により、正常組織または癌組織において発現していないが、薬剤で処置された組織で発現している遺伝子およびその逆の遺伝子が明らかになる。これらの薬剤特異的な配列が同定され、癌遺伝子またはタンパク質について本明細書中に記載される方法によって使用される。特に、これらの配列およびその配列がコードするタンパク質は、薬剤で処理された細胞をマーキングまたは同定するのに使用される。さらに、薬剤で誘導されたタンパク質に対して抗体が産生され、処置された癌組織サンプルに新規の治療剤を標的化するのに使用される。

【０３４６】

モジュレーターに関連する同定およびスクリーニングアッセイ

遺伝子発現に関連するアッセイ

本発明のタンパク質、核酸および抗体は、スクリーニングアッセイにおいて使用される。癌関連タンパク質、抗体、核酸、改変タンパク質およびこれらの配列を含む細胞が、ポリペプチドの発現プロフィールである「遺伝子発現プロフィール」または生物学的機能の変化に対する候補薬物の効果を評価するようなスクリーニングアッセイにおいて使用される。一態様において、発現プロフィールが使用され、好ましくは、候補薬剤による処置後の遺伝子発現プロフィールのモニタリングを可能にするハイスループットスクリーニング技術と組み合わせて使用される。(例えば、Davis, GF, et al., J Biol Screen 7:69(2002);Zlokarnik, et al., Science 279:84-8(1998);Heid, Genome Res 6:986-94, 1996を参照のこと)。

【０３４７】

ネイティブな癌タンパク質もしくはネイティブな癌遺伝子または改変された癌タンパク質もしくは改変された癌遺伝子を含む、癌タンパク質、抗体、核酸、改変タンパク質および細胞が、スクリーニングアッセイにおいて使用される。すなわち、本発明は、本発明の癌タンパク質の癌表現型または生理学的機能を調節する組成物をスクリーニングする方法を含む。これは、遺伝子それ自体に対して行われるか、または「遺伝子発現プロフィール」もしくは生物学的機能に対する候補薬物の効果を評価することによって行われる。一態様において、発現プロフィールが使用され、好ましくは、候補薬剤による処置後のモニタリングを可能にするハイスループットスクリーニングと組み合わせて使用される。Zlokamik、上述を参照のこと。

【０３４８】

種々のアッセイが実施され、本発明の遺伝子およびタンパク質に向けられる。アッセイは、個々の核酸レベルまたはタンパク質レベルについて行われる。すなわち、特定の遺伝子が癌ではアップレギュレートしていると同定している場合、遺伝子発現を調節する能力または本発明の癌タンパク質への結合について、試験化合物がスクリーニングされる。こ

の文脈で「調節」とは、遺伝子発現における増加または減少を含む。調節の好ましい量は、正常組織対癌に罹患している組織の遺伝子発現の元々の変化に左右され、少なくとも10％の変化であり、好ましくは50％、より好ましくは100～300％、いくつかの態様では、300～1000％またはそれ以上である。従って、遺伝子が正常組織に対して癌組織において4倍の増加を示す場合、しばしば、約1/4の減少が望ましく、同様に、正常組織に対して癌組織において1/10に減少している場合は、しばしば、試験化合物による10倍の発現増加の目標値が望ましい。癌組織において見られる遺伝子発現の型を悪化させるモジュレーターは、例えば、さらなる分析においてアップレギュレートされる標的としても有用である。

【０３４９】

遺伝子発現の量は、核酸プローブおよび遺伝子発現レベルの定量を使用してモニタリングされるか、または、遺伝子産物自体が、例えば、癌タンパク質に対する抗体および標準的なイムノアッセイの使用によりモニタリングされる。プロテオミクスおよび分離技術によっても発現の定量が可能である。

【０３５０】

遺伝子発現を改変する化合物を同定するための発現モニタリング

一態様において、遺伝子発現モニタリング、すなわち、発現プロフィールが、多数の実体に対して同時にモニタリングされる。このようなプロフィールは、典型的には、1つまたはそれ以上の図1の遺伝子を含む。この態様において、特定の細胞における癌配列を検出および定量するために、例えば、癌核酸プローブがバイオチップに付着される。または、PCRを使用することができる。このようにして、一連のマイクロタイタープレート、例えば、マイクロタイタープレートウェルが、所望のウェル内の分注されたプライマーと一緒に使用することができる。次いで、PCR反応を実施し、各ウェルに対して分析することができる。

【０３５１】

1つまたはそれ以上の癌関連配列、例えば、図1に示したポリヌクレオチド配列の発現を改変する化合物を同定するために、発現モニタリングが実施される。一般的に、分析の前に、試験モジュレーターが細胞に添加される。さらに、癌を調節するか、本発明の癌タンパク質を調節するか、本発明の癌タンパク質に結合するか、または本発明の癌タンパク質と抗体または他の結合パートナーとの結合を妨害する薬剤を同定するために、スクリーニングも提供される。

【０３５２】

一態様において、ハイスループットスクリーニング法は、多数の潜在的治療化合物(候補化合物)を含むライブラリーを準備する工程を含む。次いで、所望の特徴的な活性を示すライブラリーメンバー(特定の化学種またはサブクラス)を同定するために、このような「コンビナトリアル化合物ライブラリー」は1つまたはそれ以上のアッセイにおいてスクリーニングされる。このようにして同定された化合物は、従来の「リード化合物」としてか、スクリーニング用の化合物としてか、または治療剤として役立ち得る。

【０３５３】

特定の態様において、潜在的モジュレーターのコンビナトリアルライブラリーは、癌ポリペプチドに結合する能力または活性を調節する能力についてスクリーニングされる。従来は、有用な特性を有する新たな化学的実態は、望ましい特性または活性、例えば、活性阻害を有する化合物(「リード化合物」と呼ばれる)を同定し、そのリード化合物の変異体を作製し、変異体化合物の特性および活性を評価することによって生成される。しばしば、ハイスループットスクリーニング(HTS)法が、このような分析のために使用される。

【０３５４】

上述のように、遺伝子発現モニタリングは、候補モジュレーター(例えば、タンパク質、核酸または低分子)を試験するために従来より使用されている。候補薬剤が添加され、細胞が一定期間インキュベートされた後、分析しようとする標的配列を含むサンプルが、例えば、バイオチップに添加される。

【０３５５】

必要に応じて、公知の技術を使用して標的配列が調製される。例えば、サンプルは、公知の溶解緩衝液、エレクトロポレーションなどを使用して細胞を溶解するように処理され、適宜、精製および/またはPCRなどの増幅が行われる。例えば、ヌクレオチドに共有結合される標識と一緒にインビトロ転写が実施される。一般的に、核酸は、ビオチン-FITCもしくはPEで、またはcy3もしくはcy5で標識される。

【０３５６】

標的配列のプローブへの特異的結合を検出する手段を提供するために、標的配列は、例えば、蛍光シグナル、化学発光シグナル、化学シグナルまたは放射能シグナルで標識することができる。この標識は、酵素、例えば、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼでもよく、適切な基質が供給されると、検出される産物を産生する。または、標識は、結合するが、酵素による触媒または改変を受けない標識化合物または低分子、例えば、酵素インヒビターである。標識はまた、ストレプトアビジンに特異的に結合する部分または化合物、例えば、エピトープタグまたはビオチンでもよい。ビオチンの例では、ストレプトアビジンが上述のように標識され、それによって、結合した標的配列についての検出可能なシグナルを提供する。結合していない標識ストレプトアビジンは、典型的には、分析の前に除去される。

【０３５７】

当業者には明白なように、これらのアッセイは、直接ハイブリダイゼーションアッセイでもよく、「サンドイッチアッセイ」を含んでもよい。この「サンドイッチアッセイ」は、複数のプローブの使用を含み、米国特許第5,681,702号；同第5,597,909号；同第5,545,730号；同第5,594,117号；同第5,591,584号；同第5,571,670号；同第5,580,731号；同第5,571,670号；同第5,591,584号；同第5,624,802号；同第5,635,352号；同第5,594,118号；同第5,359,100号；同第5,124,246号；および同第5,681,697号に概説される。この態様においては、一般的に、標的核酸は前記で概説したように調製され、次いで、複数の核酸プローブを含むバイオチップに、ハイブリダイゼーション複合体の形成を可能にする条件下で添加される。

【０３５８】

種々のハイブリダイゼーション条件が、本発明において使用される。この条件には、前記で概説したように高ストリンジェンシー条件、中ストリンジェンシー条件および低ストリンジェンシー条件が含まれる。このアッセイは、一般的に、標的の存在下でのみ標識プローブハイブリダイゼーション複合体の形成が可能であるストリンジェンシー条件下で行われる。ストリンジェンシーは、熱力学的に可変な工程パラメーターを変えることによって制御することができる。このパラメーターには、温度、ホルムアミド濃度、塩濃度、カオトロピック塩濃度pH、有機溶媒濃度などが含まれるが、これに限定されない。これらのパラメーターはまた、米国特許第5,681,697号に概説されているように、非特異的結合を制御するためにも使用される。従って、非特異的結合を減らすために、特定の工程をより高いストリンジェンシーにおいて実施することが望ましい場合がある。

【０３５９】

本明細書中に概説される反応は、種々の様式において達成することができる。反応の成分は、以下に概説される好ましい態様において、同時に添加されてもよいし、異なる順序で連続して添加されてもよい。さらに、反応は、種々の他の試薬を含んでもよい。これらには、最適なハイブリダイゼーションおよび検出を容易にし、ならびに/または非特異的相互作用もしくはバックグラウンド相互作用を低減することができる、塩、緩衝液、中性タンパク質、例えば、アルブミン、界面活性剤などが含まれる。アッセイの効率を別の方法で改善する試薬、例えば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤などもまた、サンプル調製法および標的の純度に依存して、適宜、使用することができる。個々の遺伝子の発現レベルおよび状況間での発現レベルの変化を確かめるために、アッセイデータが分析されて、遺伝子発現プロフィールが形成される。

【０３６０】

生物学的活性に関連するアッセイ

本発明は、本発明の癌関連遺伝子またはタンパク質の活性を調節する化合物を同定またはスクリーニングする方法を提供する。この方法は、本発明の癌タンパク質を含む細胞に、前記で定義した試験化合物を添加する工程を含む。細胞は、本発明の癌タンパク質をコードする組み換え核酸を含む。別の態様において、候補薬剤のライブラリーが複数の細胞について試験される。

【０３６１】

一局面において、アッセイは、生理学的シグナル、例えば、ホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、増殖因子、活動電位、化学療法剤を含む薬理学的薬剤、放射線、発癌物質または他の細胞(すなわち、細胞間接触)の存在下もしくは非存在下、またはその生理学的シグナルに前に曝露されるかもしくは後に曝露されるかにおいて評価される。別の例では、測定は、細胞周期プロセスの異なる段階においてなされる。このように、本発明の遺伝子またはタンパク質を調節する化合物が同定される。薬理学的活性を有する化合物は、本発明の癌タンパク質の活性を増強または妨害することができる。同定されたら、類似の構造を評価して、化合物の重要な構造的特徴を同定する。

【０３６２】

一態様において、癌細胞分裂を調節(例えば、阻害)する方法が提供される。この方法は、癌モジュレーターの投与を含む。別の態様において、癌を調節(例えば、阻害)する方法が提供される。この方法は、癌モジュレーターの投与を含む。さらなる態様において、癌を有する細胞または個体を処置する方法が提供される。この方法は、癌モジュレーターの投与を含む。

【０３６３】

一態様において、本発明の遺伝子を発現する細胞の状態を調節する方法が提供される。本明細書中で使用される場合、状態は、当技術分野で認められた細胞パラメーター、例えば、成長、増殖、生存、機能、アポトーシス、老化、局在、酵素活性、シグナル伝達などを含む。一態様において、癌インヒビターは、前記で議論されたような抗体である。別の態様において、この癌インヒビターは、アンチセンス分子、siRNAオリゴマー、またはshRNAである(DNAとして送達されるか、またはアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、もしくはレトロウイルスを含むが、これに限定されないウイルスに感染することにより送達される)。本明細書中に記載のように、種々の細胞成長アッセイ、細胞増殖アッセイ、および細胞転移アッセイが当業者には公知である。

【０３６４】

モジュレーターを同定するためのハイスループットスクリーニング

適切なモジュレーターを同定するためのアッセイは、ハイスループットスクリーニングを受け入れられる。従って、好ましいアッセイは、癌遺伝子の転写の増強または阻害、ポリペプチド発現の阻害または増強、およびポリペプチド活性の阻害または増強を検出する。

【０３６５】

一態様において、ハイスループットスクリーニング法において評価されるモジュレーターはタンパク質であり、しばしば、天然のタンパク質または天然のタンパク質のフラグメントである。従って、例えば、タンパク質を含む細胞抽出物またはタンパク質性細胞抽出物のランダムな消化物もしくは規則に従った消化物が使用される。このようにして、タンパク質のライブラリーが、本発明の方法のスクリーニングのために作製される。この態様において特に好ましいのは、細菌、菌類、ウイルスおよび哺乳動物タンパク質のライブラリーであり、後者が好ましく、ヒトタンパク質が特に好ましい。特に有用な試験化合物は、標的が属するタンパク質のクラス、例えば、酵素の基質、またはリガンドおよび受容体に関する。

【０３６６】

モジュレーターを同定および特徴付けするための軟寒天増殖およびコロニー形成の使用

正常細胞は、接着および増殖のために固形基材を必要とする。細胞が形質転換すると、細胞はこの表現型を失い、基材から離れて増殖する。例えば、形質転換された細胞は、攪

拌懸濁培地中で増殖されてもよく、半固形培地、例えば、半固形寒天または軟寒天中で懸濁されてもよい。この形質転換された細胞は、腫瘍抑制遺伝子でトランスフェクションされた場合、正常の表現型を再生し、再度、接着および増殖するために固形基材を必要とする。軟寒天増殖アッセイまたはコロニー形成アッセイは、宿主細胞中で発現された時に異常な細胞増殖および形質転換を阻害する癌配列モジュレーターを同定するために使用される。モジュレーターは、固形培地または半固形培地、例えば、寒天中で懸濁された状態で増殖する宿主細胞の能力を低減するか、または無くす。

【０３６７】

懸濁アッセイにおける軟寒天増殖またはコロニー形成のための技術は、Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique(第3版、1994)に記載されている。前記のGarkavtsev et al.(1996)の方法の節もまた参照のこと。

【０３６８】

モジュレーターを同定および特徴付けするための接触阻害および増殖密度限界の評価

正常細胞は、典型的には、他の細胞に触れるまでは、細胞培養中において平坦かつ整理されたパターンで増殖する。細胞が互いに触れ合うと、細胞は接触阻害され、増殖を止める。しかしながら、形質転換された細胞は接触阻害されず、無秩序な細胞増殖巣において高密度になるまで増殖し続ける。従って、形質転換された細胞は、対応する正常細胞よりも高い飽和密集度まで増殖する。これは、細胞増殖巣における乱れた細胞単層または細胞の形成によって、形態学的に検出される。または、飽和密度での(^{3}H)-チミジンでの標識指標が、増殖密度限界を測定するために使用される。同様に、MTTまたはAlmarブルーアッセイは、細胞増殖能力およびモジュレーターが細胞増殖能力に影響を及ぼす能力を明らかにする。前記のFreshney(1994)を参照のこと。形質転換された細胞は、腫瘍抑制遺伝子でトランスフェクションされた場合、正常表現型を再生することができ、接触阻害され、より低い密度で増殖するようになる。

【０３６９】

このアッセイにおいて、飽和密度における(^{3}H)-チミジンでの標識指標が、増殖密度限界を測定する好ましい方法である。形質転換された宿主細胞は、癌関連配列でトランスフェクションされ、非制限培地条件において飽和密度まで24時間増殖させる。(^{3}H)-チミジンで標識されている細胞のパーセンテージは、取り込まれたcpmによって求められる。

【０３７０】

異常な細胞増殖および形質転換につながった癌配列モジュレーターを同定するために、接触非依存性増殖が使用される。モジュレーターは、接触非依存性増殖を低減するか、または無くし、細胞を正常な表現型に戻す。

【０３７１】

モジュレーターを同定および特徴付けするための増殖因子依存性または血清依存性の評価

形質転換された細胞は、その正常対応物よりも低い血清依存性を有する(例えば、Temin, J. Natl. Cancer Inst. 37:167-175(1966)；Eagle, et al., J. Exp. Med 1 31:836-879(1970))；Freshney(前記)を参照のこと)。これは、形質転換された細胞による種々の増殖因子の放出に部分的に起因する。形質転換された宿主細胞の増殖因子依存性または血清依存性の程度を、コントロールの程度と比較することができる。例えば、細胞の増殖因子依存性または血清依存性は、本発明の癌関連配列を調節する化合物を同定および特徴付けする方法においてモニタリングされる。

【０３７２】

モジュレーターを同定および特徴付けするための腫瘍特異的マーカーレベルの使用

腫瘍細胞は、対応する正常細胞よりも多量の特定の因子(本明細書中では以後「腫瘍特異的マーカー」と呼ぶ)を放出する。例えば、プラスミノーゲン活性化因子(PA)が、正常脳細胞よりも高レベルでヒトグリオーマから放出される(例えば、Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, Biological Responses in Cancer, pp.178-184(Mihich編、1985)を参照のこと)。同様に、腫瘍血管新生因子(TAF)が、正常対応物よりも腫瘍細胞において高レベルで放出される。例えば、F

olkman, Angiogenesis and Cancer, Sem.Cancer Biol.(1992)を参照のこと。一方、bFGFは内皮腫瘍から放出される(Ensoli, B et al.,)。

【０３７３】

これらの因子の放出を測定する種々の技術が、前記のFreshney(1994)に記載されている。Unkless, et al., J.Biol.Chem.249:4295-4305(1974)；Strickland & Beers, J.Biol.Chem.251:5694-5702(1976)；Whur, et al., Br.J.Cancer 42:305 312(1980)；Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, Biological Responses in Cancer, pp.178-184(Mihich(編)1985)；Freshney, Anticancer Res.5:111-130(1985)もまた参照のこと。例えば、腫瘍特異的マーカーレベルは、本発明の癌関連配列を調節する化合物を同定および特徴付けする方法においてモニタリングされる。

【０３７４】

モジュレーターを同定および特徴付けするためのマトリゲルへの侵襲性

マトリゲルまたは細胞外マトリクス構成物質への侵襲性の程度は、癌関連配列を調節する化合物を同定および特徴付けするためのアッセイにおいて使用することができる。腫瘍細胞は、悪性度と、マトリゲルまたは他の何らかの細胞外マトリクス構成物質への細胞の侵襲性との間に、正の相関を示す。このアッセイにおいて、典型的には、発癌性細胞が宿主細胞として使用される。これらの宿主細胞における腫瘍抑制遺伝子の発現は、宿主細胞の侵襲性を減少させる。前記のCancer Res.1999；59:6010；Freshney(1994)に記載されている技術を使用することができる。簡潔に述べると、宿主細胞の侵襲のレベルは、マトリゲルまたは他の何らかの細胞外マトリクス構成物質でコーティングされたフィルターを使用して測定される。ゲル内への侵入またはフィルターの遠位側までの侵入が、侵襲性として格付けされるか、細胞数もしくは移動した距離によって組織学的に格付けされるか、または細胞を^{125}Iで予め標識し、フィルターの遠位側もしくはディッシュの底部上で放射能をカウントすることによって格付けされる。例えば、前記のFreshney(1984)を参照のこと。

【０３７５】

モジュレーターを同定および特徴付けするためのインビボでの腫瘍増殖の評価

細胞増殖に対する癌関連配列の効果は、トランスジェニック生物または免疫抑制生物において試験される。トランスジェニック生物は、種々の当技術分野において認められている方法において作製される。例えば、癌遺伝子が破壊されている、または癌遺伝子が挿入されているノックアウトトランスジェニック生物、例えば、マウスのような哺乳動物が作製される。ノックアウトトランスジェニックマウスは、相同組み換えを介したマウスゲノムにおける内因性癌遺伝子部位へのマーカー遺伝子または他の異種遺伝子の挿入によって作製される。このようなマウスはまた、内因性癌遺伝子を、その癌遺伝子の変異したバージョンで置換するか、またはその内因性癌遺伝子を、例えば、発癌物質に曝露することによって変異させることにより作製することができる。

【０３７６】

トランスジェニックキメラ動物、例えば、マウスを調製するために、DNA構築物が胚性幹細胞の核内に導入される。新たに操作された遺伝的損傷を含む細胞が宿主マウスの胚内に注入され、これがレシピエントのメスに再移植される。これらの胚のいくつかが、生殖細胞を有するキメラマウスへと発生し、生殖細胞の一部は変異細胞株に由来する。従って、そのキメラマウスを交配することによって、その導入された遺伝的損傷を含有する新たなマウス系統を得ることが可能である(例えば、Capecchi, et al., Science 244:1288(1989)を参照のこと)。キメラマウスは、2002年4月2日に発行された米国特許第6,365,797号；2000年8月22日に発行された米国特許第6,107,540号；Hogan, et al., Manipulating the Mouse Embryo:A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)およびTeratocarcinomas and Embryonic Stem Cells:A Practical Approach, Robertson編、IRL Press, Washington, D.C., (1987)に従って得ることができる。

【０３７７】

または、種々の免疫抑制宿主動物または免疫欠損宿主動物を使用することができる。例えば、遺伝的に無胸腺の「ヌード」マウス(例えば、Giovanella, et al., J.Natl.Cancer Inst.52:921(1974)を参照のこと)、SCIDマウス、胸腺除去(thymectornized)マウス、または放射線照射マウス(例えば、Bradley, et al., Br.J.Cancer 38:263(1978)、Selby, et al., Br.J.Cancer 41:52(1980)を参照のこと)を宿主として使用することができる。同質遺伝子宿主に注入された移植可能な腫瘍細胞(典型的には、約10^6細胞)は、症例の高い割合において侵襲性の腫瘍を生じるが、類似する起源の正常細胞は生じない。侵襲性の腫瘍を発症した宿主において、癌関連配列を発現している細胞を皮下注射または同所注射する。次いで、マウスを、コントロール群および処置(例えば、モジュレーター処置)実験群を含む群に分ける。適切な時間、好ましくは、4～8週間の後、腫瘍増殖を(例えば、容積によって、またはその2つの最大直径もしくは重量によって)測定し、コントロールと比較する。(例えば、スチューデントT検定を使用して)統計学的に有意に減少した腫瘍は、成長が阻害されたと言われる。

【０３７８】

モジュレーターを同定および特徴付けするためのインビトロアッセイ

調節活性を有する化合物を同定するためのアッセイは、インビトロで実施することができる。例えば、まず最初に、癌ポリペプチドを潜在的モジュレーターと接触させ、適切な時間、例えば、0.5～48時間インキュベートする。一態様において、タンパク質またはmRNAのレベルを測定することによって、癌ポリペプチドレベルをインビトロで確かめる。タンパク質のレベルは、癌ポリペプチドまたはそのフラグメントに選択的に結合する抗体を用いて、ウエスタンブロッティング、ELISAなどのようなイムノアッセイを使用して測定される。mRNAの測定のためには、例えば、PCR、LCRを使用した増幅またはハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノザンブロッティング、RNAse保護、ドットブロッティングが好ましい。タンパク質またはmRNAのレベルは、本明細書中に記載のように、直接的または間接的に標識された検出剤(例えば、蛍光標識核酸もしくは放射標識核酸、放射標識抗体もしくは酵素標識抗体など)を使用して検出される。

【０３７９】

または、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、CATまたはP-galのようなレポーター遺伝子に機能的に連結された癌タンパク質プロモーターを使用して、レポーター遺伝子系を考案することができる。このレポーター構築物は、典型的には、細胞内にトランスフェクションされる。潜在的モジュレーターでの処理後、レポーター遺伝子の転写、翻訳または活性の量が、当業者に公知の標準的な技術に従って測定される(Davis GF(前記);Gonzalez, J. & Negulescu, P.Curr.Opin.Biotechnol.1998:9:624)。

【０３８０】

前記で概説したように、個々の遺伝子または遺伝子産物についてインビトロスクリーニングが行われる。すなわち、特定の状況において重要な、発現の異なる特定の遺伝子を同定している場合、その遺伝子またはその遺伝子産物の発現のモジュレーターのスクリーニングが実施される。

【０３８１】

一態様において、特定の遺伝子の発現のモジュレーターに対するスクリーニングが実施される。典型的には、1つだけまたは数個の遺伝子の発現が評価される。別の態様において、発現の異なるタンパク質に結合する化合物をまず見つけるように、スクリーニングが設計される。次いで、これらの化合物は、発現の異なる活性を調節する能力について評価される。さらに、初期候補化合物が同定されたら、変異体をさらにスクリーニングして、構造活性関係をさらに評価することができる。

【０３８２】

モジュレーターを同定および特徴付けするための結合アッセイ

本発明による結合アッセイでは、本発明の精製または単離された遺伝子産物が一般的に使用される。例えば、本発明のタンパク質に対する抗体が作製され、タンパク質の量および/または位置を確かめるためにイムノアッセイが行われる。または、癌タンパク質を含

む細胞がアッセイにおいて使用される。

【０３８３】

従って、前記方法は、本発明の癌タンパク質と、リガンドのような候補化合物とを組み合わせる工程、および化合物と本発明の癌タンパク質との結合を確かめる工程を含む。好ましい態様ではヒト癌タンパク質が使用され；癌のヒト疾患の動物モデルもまた開発および使用することができる。同様に、他の類似哺乳動物タンパク質もまた、当業者によって理解されるように使用することができる。さらに、いくつかの態様では、変異体または誘導体癌タンパク質が使用される。

【０３８４】

一般的に、本発明の癌タンパク質またはリガンドは、拡散しないように不溶性支持体に結合される。この支持体は、例えば、単離されたサンプル収容領域(マイクロタイタープレート、アレイなど)を有してもよい。不溶性支持体は、組成物が結合することができる任意の組成物から作製することができ、可溶性材料から容易に分離され、他の点ではスクリーニングの方法全体と適合する。このような支持体の表面は、固形であっても多孔性であってもよく、任意の簡便な形状である。

【０３８５】

適切な不溶性支持体の例には、マイクロタイタープレート、アレイ、メンブレンおよびビーズが含まれる。これらは、典型的には、ガラス、プラスチック(例えば、ポリスチレン)、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、またはTeflon(商標)などから作られる。少量の試薬およびサンプルを使用して同時に多数のアッセイを実施することができるので、マイクロタイタープレートおよびアレイが特に簡便である。組成物が支持体に結合する具体的な様式は、本発明の試薬および方法全体に適合し、組成物の活性を維持し、拡散しない限り重要でない。好ましい結合方法には、タンパク質を支持体に付着させた時にリガンド結合部位も活性化配列も立体的にブロックしない抗体の使用、「粘着性」またはイオン性の支持体への直接結合、化学的架橋、表面上でのタンパク質または薬剤の合成などが含まれる。タンパク質またはリガンド/結合薬剤が支持体に結合した後、過剰量の非結合物質が洗浄によって除去される。次いで、サンプル収容領域は、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼインまたは他の無害のタンパク質もしくは他の部分と一緒にインキュベーションすることによってブロッキングされてもよい。

【０３８６】

本発明の癌タンパク質が支持体に結合したら、試験化合物がそのアッセイに添加される。または、候補結合薬剤がその支持体に結合され、次いで、本発明の癌タンパク質が添加される。結合薬剤には、特異的抗体、化学的ライブラリーのスクリーニングにおいて同定された非天然結合薬剤、ペプチドアナログなどが含まれる。

【０３８７】

特に興味深いものは、ヒト細胞に対して低い毒性を有する薬剤を同定するためのアッセイである。広範に種々のアッセイがこの目的のために使用され得、このアッセイには、増殖アッセイ、cAMPアッセイ、標識インビトロタンパク質間結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合についてのイムノアッセイ、機能アッセイ(リン酸化アッセイなど)などが含まれる。

【０３８８】

試験化合物(リガンド、結合薬剤、モジュレーターなど)の本発明の癌タンパク質への結合は、多数の方法において確かめることができる。試験化合物は標識することができ、例えば、本発明の癌タンパク質の全てまたは一部を固形支持体に付着し、標識(例えば、蛍光標識)された候補化合物を添加し、過剰量の試薬を洗い流し、標識がその固形支持体上に存在するかどうかを確かめることによって、結合は直接確かめられる。適宜、種々のブロッキング工程および洗浄工程を使用することができる。

【０３８９】

特定の態様において、1つの成分のみが標識され、例えば、本発明のタンパク質またはリガンドが標識される。または、1より多い成分が、異なる標識、例えば、タンパク質に

対しては^{125}I、化合物に対してはフルオロフォアで標識される。近接試薬、例えば、消光剤またはエネルギー転移試薬もまた有用である。

【０３９０】

モジュレーターを同定および特徴付けするための競合的結合

一態様において、「試験化合物」の結合は、「競合因子」との競合的結合アッセイによって確かめられる。競合因子は、標的分子(例えば、本発明の癌タンパク質)に結合する結合部分である。競合因子は、抗体、ペプチド、結合パートナー、リガンドなどの化合物を含む。特定の状況下で、試験化合物とこの競合因子との競合的結合は、試験化合物と取って代わる。一態様において、試験化合物は標識される。試験化合物と競合因子のいずれか、またはその両方が、結合するのに十分な時間、タンパク質に添加される。最適な活性を促進する温度、典型的には、4℃～40℃において、インキュベーションが実施される。インキュベーション時間は、典型的には、例えば、迅速なハイスループットスクリーニングを促進するために最適化され、典型的には、0時間～1時間で十分である。過剰量の試薬は、一般的に、除去されるか、または洗い流される。次いで第二の成分が添加され、標識された成分の存在または非存在が結合のために追跡される。

【０３９１】

一態様において、競合因子は最初に添加され、次いで、試験化合物が添加される。競合因子と置き換わったことは、試験化合物が癌タンパク質に結合しており、従って、癌タンパク質に結合することができ、その癌タンパク質の活性を潜在的に調節できるという指標である。この態様において、いずれの成分も標識することができる。従って、例えば、競合因子が標識された場合、試験化合物洗浄後の溶液における標識の存在が、試験化合物と置き換わったことを示す。または、試験化合物が標識された場合は、支持体上の標識の存在が、置き換わったことを示す。

【０３９２】

代替の態様において、試験化合物が最初に添加され、続いて競合因子とインキュベーションされて洗浄される。競合因子による結合の非存在は、その競合因子よりも高い親和性で試験化合物が癌タンパク質に結合することを示す。従って、試験化合物が標識された場合は、支持体上での標識の存在と、競合因子の結合の欠如は、試験化合物が本発明の癌タンパク質に結合し、従って、本発明の癌タンパク質を潜在的に調節することを示す。

【０３９３】

従って、競合的結合法は、本発明の癌タンパク質の活性を調節することできる薬剤を同定するためのディファレンシャルスクリーニングを含む。この態様において、この方法は、第一のサンプルにおいて癌タンパク質と競合因子とを組み合わせる工程を含む。第二のサンプルは、試験化合物、癌タンパク質および競合因子を含む。競合因子の結合は、両方のサンプルに対して決定され、2つのサンプル間の結合の変化または差異は、癌タンパク質に結合することができ、その活性を潜在的に調節することができる薬剤の存在を示す。すなわち、第一のサンプルに対して第二のサンプルにおいてその競合因子の結合が異なっている場合は、その薬剤は癌タンパク質に結合することができる。

【０３９４】

または、ネイティブ癌タンパク質に結合するが、改変された癌タンパク質には結合できない薬物候補を同定するために、ディファレンシャルスクリーニングが使用される。例えば、癌タンパク質の構造は、その部位と相互作用する薬剤を合成する合理的薬物設計においてモデル化および使用され、前記の薬剤は、部位が改変されたタンパク質には一般的に結合しない。さらに、ネイティブ癌タンパク質の活性に影響を及ぼす、このような薬物候補はまた、このようなタンパク質の活性を増強または低減する能力について薬物をスクリーニングすることによっても同定される。

【０３９５】

ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールをアッセイにおいて使用することができる。好ましくは、コントロールおよび試験サンプルは、統計的に有意な結果を得るために、少なくとも三回繰り返して実施される。全てのサンプルのインキュベーション

は、薬剤がタンパク質に結合するのに十分な時間行う。インキュベーション後、非特異的に結合した物質がなくなるようにサンプルを洗浄し、結合した薬剤、一般的には標識された薬剤の量を求める。例えば、放射標識が使用される場合は、サンプルをシンチレーションカウンターにおいてカウントし、結合した化合物の量を求める。

【０３９６】

種々の他の試薬を前記スクリーニングアッセイに含めてもよい。これらには、最適なタンパク質間結合を促進し、および/または非特異的相互作用またはバックグラウンドの相互作用を低減させるのに使用される塩、中性タンパク質、例えば、アルブミン、界面活性剤などのような試薬が含まれる。アッセイの効率を他の方法で改善する試薬、例えば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤なども使用することができる。成分の混合物は、必要な結合をもたらす順序で添加される。

【０３９７】

本発明のタンパク質をダウンレギュレートまたは阻害するためのポリヌクレオチドの使用

WO91/04753に記載のように、リガンド結合分子と結合体が形成することによって、癌のポリヌクレオチドモジュレータを、標的ヌクレオチド配列を含有する細胞内に導入することができる。適切なリガンド結合分子には、細胞表面受容体、増殖因子、他のサイトカイン、または細胞表面受容体に結合する他のリガンドが含まれるが、これに限定されない。好ましくは、リガンド結合分子の結合体は、リガンド結合分子が、対応する分子または受容体に結合する能力を実質的に妨害せず、センスオリゴヌクレオチドもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそれらの結合体化バージョンが細胞に侵入するのをブロックしない。または、癌のポリヌクレオチドモジュレータは、WO90/10448に記載のように、例えば、ポリヌクレオチド-脂質複合体の形成によって、標的核酸配列を含有する細胞内へ導入することができる。アンチセンス分子の使用またはノックアウトおよびノックインモデルはまた、処置方法に加えて、前記で議論されたようなスクリーニングアッセイにおいて使用できると理解される。

【０３９８】

阻害性ヌクレオチドおよびアンチセンスヌクレオチド

特定の態様において、癌関連タンパク質の活性は、アンチセンスポリヌクレオチドまたは阻害性低分子核内RNA(snRNA)、すなわち、コーディングmRNA核酸配列、例えば、本発明の癌タンパク質、mRNA、またはその部分配列に相補的であり、好ましくは、特異的にハイブリダイズすることができる核酸を用いてダウンレギュレートされる、または完全に阻害される。アンチセンスポリヌクレオチドがmRNAに結合すると、mRNAの翻訳および/または安定性が低減する。

【０３９９】

本発明の状況において、アンチセンスポリヌクレオチドは、天然ヌクレオチド、または天然サブユニットから形成される合成種、または近いホモログを含んでもよい。アンチセンスポリヌクレオチドはまた、改変された糖部分または糖間連結を有してもよい。これらの例は、ホスホロチオエートおよび当技術分野における使用が公知の他の硫黄含有種である。アナログは、本発明のヌクレオチドと効率的にハイブリダイズするように機能する限り本発明に含まれる。例えば、Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA；Sequitor, Inc., Natick, MA.を参照のこと。

【０４００】

このようなアンチセンスポリヌクレオチドは組み換え手段を使用して容易に合成することができ、インビトロで合成されてもよい。このような合成のための装置は、Applied Biosystemsを含むいくつかの供給業者から販売されている。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体のような他のオリゴヌクレオチドの調製も当業者に周知である。

【０４０１】

本明細書中で使用されるアンチセンス分子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドを含む。センスオリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンス鎖に結合することによって転写をブロックするために使用することができる。このアンチ

センスオリゴヌクレオチドおよびセンスオリゴヌクレオチドは、癌分子の標的mRNA(センス)またはDNA(アンチセンス)配列に結合することができる一本鎖核酸配列(RNAまたはDNAのいずれか)からなる。本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドは、一般的に、少なくとも約12ヌクレオチド、好ましくは約12～30ヌクレオチドのフラグメントからなる。所定のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドを得ることができることは、例えば、Stein & Cohen(Cancer Res. 48:2659(1988)およびvan der Krol et al.(BioTechniques 6:958(1988))に記載されている。

【０４０２】

リボザイム

アンチセンスポリヌクレオチドに加えて、癌関連ヌクレオチド配列の転写を標的化および阻害するために、リボザイムを使用することができる。リボザイムは、他のRNA分子を触媒的に切断するRNA分子である。グループIリボザイム、ハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピン型リボザイム、RNase P、およびアックスヘッド(axhead)リボザイムを含む異なる種類のリボザイムが記載されている(異なるリボザイムの特性の一般的な総説については、例えば、Castanotto, et al., Adv.in Pharmacology 25:289-317(1994)を参照のこと)。

【０４０３】

ヘアピン型リボザイムの一般的特徴は、例えば、Hampel, et al., Nucl.Acids Res.18:299-304(1990)；欧州特許出願第0360257号；米国特許第5,254,678号に記載されている。調製方法は当業者に周知である(例えば、WO 94/26877；Ojwang, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6340-6344(1993)；Yamada, et al., Human Gene Therapy 1:39-45(1994)；Leavitt, et al., Proc.Natl.Acad Sci.USA 92:699-703(1995)；Leavitt, et al., Human Gene Therapy 5:1151-120(1994)；およびYamada, et al., Virology 205:121-126(1994)を参照のこと)。

【０４０４】

表現型スクリーニングにおけるモジュレーターの使用

一態様において、関連する癌発現プロフィールを有する癌細胞の集団に試験化合物が投与される。本明細書中において「投与」または「接触」とは、モジュレーターが、取り込みもしくは細胞内作用によって、または細胞表面での作用によって、モジュレーターが細胞に作用するような様式で、細胞に添加されることを意味する。いくつかの態様では、タンパク質性因子(すなわち、ペプチド)をコードする核酸が、アデノウイルス構築物またはレトロウイルス構築物のようなウイルス構築物内に入れられ、細胞に添加され、その結果、ペプチド因子が発現する。例えば、PCT US97/01019。制御可能な遺伝子療法系もまた使用することができる。モジュレーターが細胞に投与されたら、所望の場合、細胞を洗浄し、好ましい生理学的条件下で、ある期間にわたってインキュベートする。次いで、その細胞を採取し、新しい遺伝子発現プロフィールを作成する。従って、例えば、癌表現型を調節する、例えば、誘導または抑制する因子について、癌組織がスクリーニングされる。発現プロフィールの少なくとも1つ、好ましくは、多くの遺伝子の変化は、その因子が癌活性に影響を及ぼすことを示している。同様に、生物学的機能またはシグナル伝達経路の変化もモジュレーター活性を示している。癌表現型のこのようなサインを規定することによって、表現型を変える新薬についてのスクリーニングが考案される。このアプローチでは、薬物の標的は既知である必要はなく、最初の遺伝子/タンパク質発現スクリーニングプラットフォームにおいて提示されている必要はなく、標的タンパク質の転写レベルも変化する必要もない。モジュレーター阻害機能は代理マーカーとして機能する。

【０４０５】

前記で概説したように、スクリーニングは、遺伝子または遺伝子産物を評価するために行われる。すなわち、特定の状況において、発現の異なる特定の遺伝子を重要なものとして同定した場合、その遺伝子または遺伝子産物の発現のモジュレーターのスクリーニングが実施される。

【０４０６】

本発明のペプチドに影響を及ぼすモジュレーターの使用

癌ポリペプチド活性および癌表現型の測定が、種々のアッセイを使用して実施される。例えば、癌ポリペプチドの機能に対するモジュレーターの効果は、上述のパラメーターを調べることによって測定される。本発明のポリペプチドに対する試験化合物の影響を評価するために、活性に影響を及ぼす生理学的変化が使用される。インタクトな細胞または動物を使用して機能結果が確かめられる時には、種々の効果、例えば、固形腫瘍と関連する癌の場合では、腫瘍増殖、腫瘍転移、新生血管形成、ホルモン放出、既知および特徴付けされていない遺伝子マーカーに対する転写変化(例えば、ノザンブロッティングによる)、細胞成長またはpH変化のような細胞代謝の変化、ならびにcGNIPのような細胞内二次メッセンジャーの変化を評価することができる。

【０４０７】

癌関連配列を同定および特徴付けする方法

種々の遺伝子配列の発現が癌と相関する。従って、変種または変異体癌遺伝子に基づく障害が確かめられる。一態様において、本発明は、変異体癌遺伝子を含む細胞を同定する方法、例えば、細胞における少なくとも1つの内因性癌遺伝子の配列の全てまたは一部の存在を確かめる方法を提供する。これは、多数の配列決定技術を使用して達成される。本発明は、個体の癌遺伝子型を同定する方法、例えば、個体における本発明の少なくとも1つの遺伝子の配列の全てまたは一部を確かめる方法を含む。これは、一般的に、個体の少なくとも1つの組織、例えば、表Iに示した組織において行われ、多数の組織または同じ組織の異なるサンプルの評価を含んでもよい。この方法は、配列決定された遺伝子の配列を、既知の癌遺伝子、すなわち、野生型遺伝子と比較して、ファミリーメンバー、相同性、変異または変異体の存在を確かめる工程を含んでもよい。次いで、遺伝子の全てまたは一部の配列を、既知の癌遺伝子の配列と比較して、差異が存在するかどうかを確かめることができる。これは、多数の公知の相同性プログラム、例えば、BLAST、Bestfitなどを使用して行われる。患者の癌遺伝子の配列と既知の遺伝子の配列との差異の存在は、本明細書中に概説されるように、疾患状況または疾患状況になりやすい傾向と相関する。

【０４０８】

好ましい態様において、癌遺伝子は、ゲノムにおける癌遺伝子のコピー数を確かめるためにプローブとして使用される。癌遺伝子は、癌遺伝子の染色体局在を確かめるためにプローブとして使用される。染色体局在のような情報は、特に、染色体異常、例えば、転座などが癌遺伝子座において同定される場合、診断または予後を提供することにおいて用途が見出される。

【０４０９】

XII.)RNAiおよび低分子干渉RNA(siRNA)の治療的使用

本発明はまた、siRNAオリゴヌクレオチド、特に、24P4C12コード領域もしくは5'UTR領域の少なくともフラグメントを含む二重鎖RNA、または相補鎖、または24P4C12配列に特異的な任意のアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。一態様において、このようなオリゴヌクレオチドは、24P4C12の機能を解明するために使用されるか、または24P4C12の機能もしくは発現のモジュレーターをスクリーニングもしくは評価するために使用される。別の態様において、24P4C12の遺伝子発現は、siRNAトランスフェクションを使用することにより低減され、抗原を内在的に発現する形質転換癌細胞の増殖能を顕著に減少させる。特異的な24P4C12 siRNAで処理された細胞は、例えば、細胞の生存能の代謝読み取りによって測定されるように生存能の減少を示し、このことは増殖能の低減と相関する。従って、24P4C12 siRNA組成物は、24P4C12タンパク質の核酸ORF配列またはその部分配列に対応するsiRNA(二本鎖RNA)を含む。これらの部分配列は、一般的に、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、35または35より多くの連続RNAヌクレオチド長であり、mRNAコード配列の少なくとも一部に相補的な配列および非相補的な配列を含む。好ましい態様において、部分配列は、19～25ヌクレオチド長であり、最も好ましくは21～23ヌクレオチド長である。

【０４１０】
RNA干渉は、インビトロおよびインビボで遺伝子をサイレンシングさせる新規のアプローチであり、従って、小さな二本鎖RNA(siRNA)は、価値のある治療剤である。現在、特定の遺伝子活性をサイレンシングさせるsiRNAの力は疾患動物モデルに提供され、同様にヒトにおいても使用されている。例えば、特定の標的に対するsiRNAを用いてマウスにsiRNA溶液を流体力学的に注入すると、治療に有効であることが証明されている。
【０４１１】
Songらによる先駆的な研究により、ある型の完全に天然の核酸である低分子干渉RNA(siRNA)は、さらなる化学的改変が無くとも、治療剤として役立つことが分かっている(Song, E., et al.,「RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis」Nat.Med.9(3):347-51(2003))。この研究は、動物内へのsiRNAの注入が疾患を軽減し得るという最初のインビボでの証拠を提供した。この場合において、著者らは、FASタンパク質(炎症応答の間に過剰活性化されると、肝細胞および他の細胞の死を誘導する細胞死受容体)をサイレンシングするように設計されたsiRNAを、マウスへ注射した。翌日、動物に、Fasに特異的な抗体を与えた。コントロールのマウスは、数日のうちに急性肝不全で死亡したが、siRNA処置されたマウスのうち80％以上は、重篤な疾患はないままで生存した。肝細胞の約80％～90％は、裸のsiRNAオリゴヌクレオチドを取り込んでいた。さらに、そのRNA分子は、3週間後に効果を失う前に、10日間機能した。
【０４１２】
ヒト治療における使用のために、siRNAは、持続的なRNAi活性を誘導する効率的な系によって送達される。臨床使用のための大多数の注意は、適切な細胞へのsiRNAの送達である。肝細胞は外因性RNAを特に受け入れるように見える。現在、肝臓に位置する標的は魅力的である。なぜなら、肝臓は、核酸分子およびウイルスベクターの標的と容易になり得るからである。しかしながら、他の組織および器官の標的も同様に好ましい。
【０４１３】
細胞膜の通過を促進する化合物とsiRNAからなる製剤が、治療におけるsiRNAの投与を改善するために使用される。ヌクレアーゼ耐性であり、かつ血清安定性を有し、同時にRNAi効果の持続期間が延びた、化学的に改変された合成siRNAが、さらなる態様である。
【０４１４】
従って、siRNA技術は、癌、例えば、表1に列挙した癌を有する個体への、24P4C12に対するsiRNA分子の送達による、ヒト悪性腫瘍の治療法である。このようなsiRNA投与は、24P4C12を発現する癌細胞の増殖の低減につながり、抗腫瘍治療を提供し、悪性腫瘍に関連する罹患率および/または死亡率を低下させる。別の態様において、siRNAは、shRNA(ショートヘアピンRNA)としてウイルスによって送達される。これが可能になると、shRNAは細胞内でインビトロおよびインビボで安定して発現される。shRNAは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびレトロウイルスベクターを含むが、これに限定されないウイルスによって送達することができる。このような系は、ウイルスDNAトランスフェクションまたはウイルス粒子が細胞に感染して、shRNAが安定して発現されるのを、および24P4C12などの癌関連遺伝子が安定して抑制されるのを可能にする。
【０４１５】
遺伝子産物ノックダウンのこの様式の有効性は、インビトロまたはインビボで測定された場合に、顕著である。インビトロでの有効性は、24P4C12タンパク質の発現減少が検出するためのインビトロ法が使用される場合、培養中の細胞(上述の通り)に、またはDNAプラスミドもしくはウイルスにより癌患者生検のアリコートにsiRNAもしくはshRNAを使用することにより、容易に実証可能である。
【０４１６】
XIII.)キット/製造物品
本明細書中で記載される研究用途、予後用途、予防用途、診断用途および治療用途における使用のために、キットが本発明の範囲内に含まれる。このようなキットは、1つまたはそれ以上の容器、例えば、バイアル、チューブなどを収容するために区画化されたキャ

リア、包装、または容器を備えてもよい。各容器は、使用、例えば、本明細書中に記載される使用のための説明書を含むラベルまたは挿入物と一緒に、前記方法において使用される別個の要素の1つを含む。例えば、容器は、検出可能に標識されるプローブまたは検出可能に標識することができるプローブを含んでもよい。このようなプローブは、本発明のタンパク質または遺伝子またはメッセージにそれぞれ特異的な抗体またはポリヌクレオチドでもよい。この方法が標的核酸を検出するために核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合、前記キットはまた、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチドを含む容器を有してもよい。キットは、レポーター分子、例えば、酵素、蛍光または放射性同位体標識に結合した、レポーター、例えば、ビオチン結合タンパク質、例えば、アビジンまたはストレプトアビジンを含む容器を備えてもよい。このようなレポーターは、例えば、核酸または抗体と一緒に使用することができる。キットは、図1、図2もしくは図3におけるアミノ酸配列またはそれらのアナログ、あるいはこのようなアミノ酸配列をコードする核酸分子の全てまたは一部を含んでもよい。

【０４１７】

本発明のキットは、典型的には、前記の容器およびそれに付随した1つまたはそれ以上の他の容器を備える。この他の容器は、商業的なまたは使用者の観点から望ましい物質を含む。この物質には、例えば、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、キャリア、包装、容器、バイアル、ならびに/または内容物を列挙したチューブラベルおよび/もしくは使用説明書、ならびに使用説明書を有する包装挿入物が含まれる。

【０４１８】

ラベルは、組成物が特定の治療用途または非治療的用途、例えば、予後用途、予防用途、診断用途、または研究用途のために使用されることを示すために、容器上または容器と一緒に存在してもよく、本明細書中に記載のように、インビボまたはインビトロでの使用のいずれかについての指示を示してもよい。指示および/または他の情報はまた、キットと一緒に、またはキット上に含まれる挿入物またはラベル上に載っていてもよい。ラベルはまた、容器上にまたは容器に付けられてもよい。ラベルを形成する文字、数字または他の字が容器それ自体に成型またはエッチングされた場合、ラベルはその容器上に存在してもよい。ラベルが、例えば、包装挿入物として、容器を保持する入れ物またはキャリア内に存在する場合は、容器に付けられてもよい。ラベルは、組成物が表Iに示した組織の状態、例えば、新生組織形成の診断、処置、予防または予後のために使用されることを示してもよい。

【０４１９】

「キット」および「製造物品」という用語は、同義語として使用することができる。

【０４２０】

本発明の別の態様において、組成物、例えば、アミノ酸配列、低分子、核酸配列、および/または抗体を含む製造物品、例えば、表Iに示したもののような組織の新生組織形成の診断、予後、予防および/または処置のために有用な物質を含む製造物品が提供される。製造物品は、典型的には、少なくとも1つの容器および少なくとも1つのラベルを備える。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジおよび試験管が含まれる。容器は、ガラス、金属またはプラスチックのような種々の材料から形成することができる。この容器は、アミノ酸配列、低分子、核酸配列、細胞集団および/または抗体を保持してもよい。一態様において、容器は、細胞のmRNA発現プロフィールを調べるのに使用するためのポリヌクレオチドを、この目的のために使用される試薬と共に保持する。別の態様において、容器は、細胞および組織における24P4C12のタンパク質発現の評価において使用するために、ならびに関連する研究目的、予後目的、診断目的および治療目的のために、抗体、その結合フラグメントまたは特異的結合タンパク質を含む。このような使用のための説明書および/または指示書が、このような容器上に、またはその容器と共に備えられてもよく、これらの目的のために使用される試薬および他の組成物またはツールも同様であり得る。別の態様において、容器は、細胞性免疫応答または体液性免疫応答を惹起するための物質を、関連する説明書および/または指示書と一緒に含む。別の態様において、容器

は、細胞傷害性T細胞(CTL)またはヘルパーT細胞(HTL)のような養子免疫療法のための物質を、関連する説明書および/または指示書と一緒に含む。このような目的のために使用される試薬および他の組成物またはツールも含まれ得る。

【０４２１】

または、容器はまた、状態を処置、診断、予後または予防するために有効な組成物を保持してもよく、滅菌アクセスポートを有してもよい(例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静注液バッグまたはバイアルであり得る)。前記組成物における活性薬剤は、24P4C12に特異的に結合し、24P4C12の機能を調節することができる抗体であり得る。

【０４２２】

製造物品はさらに、薬学的に許容可能な緩衝液、例えば、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液および/またはデキストロース溶液を含む第二の容器を含んでもよい。製造物品はさらに、商業的なおよび使用者の観点から望ましい他の物質を含んでもよく、これには他の緩衝液、希釈剤、フィルター、攪拌棒、針、シリンジならびに/または使用のための指示書および/もしくは説明書の付いた包装挿入物が含まれる。

【０４２３】

実施例

本発明の種々の局面が、以下の数個の実施例によって、さらに説明および例示される。これらはいずれも、本発明の範囲を制限することを意図しない。

【０４２４】

実施例1

正常組織および患者標本における24P4C12変異体の発現分析

24P4C12の発現を卵巣癌患者標本において試験した(図5A)。簡単に述べると、正常卵巣、卵巣癌患者腫瘍、およびLAPC-9AD前立腺癌異種移植片から、RNAを抽出した。10ugの総RNAによるノザンブロットを24P4C12 cDNAフラグメントでプローブした。キロベース単位のサイズ標準が端にある。結果から、試験した16個の患者癌標本のうち13個において24P4C12が発現していることが分かる。正常卵巣では発現は観察されなかった。

【０４２５】

乳癌患者標本における24P4C12の発現を図5Bに示した。正常乳房、乳癌患者腫瘍、および細胞株から、RNAを抽出した。10ugの総RNAによるノザンブロットを24P4C12 cDNAフラグメントでプローブした。キロベース単位のサイズ標準が端にある。結果から、試験した患者乳癌標本の大半および細胞株において24P4C12が発現していることが分かる。

【０４２６】

図5Cは、膵臓癌患者標本における24P4C12の発現結果を示す。正常膵臓、膵臓癌細胞株HPAC、CAPAN-1、CFPAC-1、および膵臓癌患者腫瘍標本から、RNAを抽出した。10ugの総RNAによるノザンブロットを24P4C12 cDNAフラグメントでプローブした。キロベース単位のサイズ標準が端にある。結果から、試験した7個の患者膵臓癌標本のうち6個において、および4個の膵臓癌異種移植片のうち3個において24P4C12が発現していることが分かる。正常膵臓では、膵臓癌標本と比べて低い発現が検出された。

【０４２７】

実施例2

24P4C12のスプライス変異体

転写変異体は、同一の遺伝子由来の成熟mRNAの変異体であり、これは選択的転写および選択的スプライシングによって生じる。選択的転写物は、同一の遺伝子由来の転写物であるが、異なる点から転写を開始する。スプライス変異体は、同一の転写物とは異なってスプライシングされたmRNA変異体である。真核生物では、ゲノムDNAから複数のエキソン遺伝子が転写されると、最初のRNAがスプライシングされて機能的mRNAを産生する。これは、エキソンのみを有し、アミノ酸配列への翻訳のために使用することができる。従って、ある特定の遺伝子が0～多数の選択的転写物を有することがあり、各転写物は0～多数のスプライス変異体を有することがある。各転写変異体は独特のエキソン構成を有し、元々の

転写物とは異なるコード領域および/または非コード領域部分(5'末端または3'末端)を有することがある。転写変異体は、同一の機能または類似の機能を有する類似のタンパク質または異なるタンパク質をコードしてもよく、異なる機能を有するタンパク質をコードしてもよく、同時に同一の組織で発現してもよく、同時に異なる組織で発現してもよく、異なる時期に同一の組織で発現してもよく、異なる時期に異なる組織で発現してもよい。転写変異体によってコードされるタンパク質は、類似のまたは異なる細胞局在または細胞外局在、例えば、分泌型対細胞内を有してもよい。

【０４２８】

転写変異体は、種々の当技術分野において許容されている方法によって同定される。例えば、選択的転写物およびスプライス変異体は、全長クローニング実験によって、または全長転写物およびEST配列を使用することによって、同定される。第一に、全てのヒトESTを、互いに直接的または間接的な同一性を示すクラスターにグループ分けした。第二に、同一のクラスターにおけるESTを、さらにサブクラスターにグループ分けし、集合してコンセンサス配列を構築した。元々の遺伝子配列を、このコンセンサス配列または他の全長配列と比較する。各コンセンサス配列は、その遺伝子の潜在的なスプライス変異体である。全長のクローンではない変異体が同定された場合でも、その変異体の一部は、当技術分野で公知の技術を使用して、抗原を作製するのに、または全長スプライス変異体をさらにクローニングするのに非常に有用である。

【０４２９】

さらに、ゲノム配列に基づいて転写変異体を同定するコンピュータープログラムが、当技術分野において利用可能である。ゲノムベースの転写変異体同定プログラムには、FgenesH (A.Salamov and V.Solovyev,「Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA」, Genome Research.2000年4月；10(4):516-22)；Grail (URL compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm)ならびにGenScan (URL genes.mit.edu/GENSCAN.html)が含まれる。スプライス変異体同定プロトコールの一般的な考察については、例えば、Southan, C., A genomic perspective on human proteases, FEBS Lett.2001年6月8日；498(2-3):214-8；de Souza, S.J., et al., Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags, Proc.Natl Acad Sci USA.2000年11月7日；97(23):12690-3を参照のこと。

【０４３０】

転写変異体のパラメーターをさらに確認するために、全長クローニング、プロテオーム検証、PCRベースの検証、および5'RACE検証などの種々の技術が、当技術分野において利用可能である(例えば、プロテオーム検証については:Brennan, S.O., et al., Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, Biochem Biophys Acta.1999年8月17日；1433(1-2):321-6；Ferranti P, et al., Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, Eur J Biochem.1997年10月1日；249(1):1-7を参照のこと。PCRベースの検証については:Wellmann S, et al., Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by Light Cycler technology, Clin Chem.2001年4月；47(4):654-60；Jia, H.P., et al., Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, Gene.2001年1月24日；263(1-2):211-8；PCRベースの検証および5'RACE検証については:Brigle, K.E., et al., Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, Biochem Biophys Acta.1997年8月7日；1353(2):191-8を参照のこと)。

【０４３１】

ゲノム領域は癌においては調節されていることが当技術分野において知られている。遺伝子が位置しているゲノム領域が特定の癌において調節されている場合、その遺伝子の選択的転写物またはスプライス変異体も同様に調節されている。24P4C12が、癌に関連する特定の発現プロフィールを有することが本明細書中で開示される。24P4C12の選択的転写

物およびスプライス変異体もまた、同一のまたは異なる組織の癌に関与する可能性があり、従って、腫瘍関連マーカー/抗原として機能する。従って、本明細書において開示された24P4C12 MAbは、図1に開示された24P4C12変異体にも結合する。

【０４３２】

実施例3

24P4C12の一塩基多型

一塩基多型(SNP)は、ヌクレオチド配列の特定の位置にある1個の塩基対の変化である。ゲノムのどの点においても、4つの可能なヌクレオチド塩基対:A/T、C/G、G/CおよびT/Aが存在する。遺伝型とは、個体のゲノム中の1つまたはそれ以上の位置の特定の塩基対配列をいう。ハプロタイプとは、しばしば1つの遺伝子の文脈においてまたは数種の厳密に連鎖した遺伝子の文脈において、同じDNA分子(またはより高等生物における同じ染色体)上の1つより多い位置の塩基対配列をいう。cDNA上に生じるSNPをcSNPと呼ぶ。これらのcSNPは、遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸を変える可能性があり、従って、そのタンパク質の機能を変える可能性がある。遺伝性疾患の原因となるSNPもあれば、食事および薬物を含む個体間の環境因子に対する表現型および反応の量的変化に寄与するSNPもある。従って、SNPおよび/または対立遺伝子の組み合わせ(ハプロタイプと呼ばれる)には、例えば、遺伝性疾患の診断、薬物反応および投薬量の決定、疾患に応答可能な遺伝子の同定、ならびに個体間の遺伝的関連性の分析を含めて多くの用途がある(P.Nowotny, J.M.Kwon and A.M.Goate,「SNP analysis to dissect human traits」, Curr.Opin.Neurobiol.2001年10月；11(5):637-641；M.Pirmohamed and B.K.Park,「Genetic susceptibility to adverse drug reactions」, Trends Pharmacol.Sci.2001年6月；22(6):298-305；J.H.Riley, C.J.Allan, E.Lai and A.Roses,「The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes」, Pharmacogenomics.2000年2月；1(1):39-47；R.Judson, J.C.Stephens and A.Windemuth, 「The predictive power of haplotypes in clinical response」, Pharmacogenomics.2000年2月；1(1):15-26)。

【０４３３】

SNPは、当技術分野において許容されている種々の方法によって同定される(P.Bean,「The promising voyage of SNP target discovery」, Am.Clin.Lab.2001年10月～11月；20(9):18-20；K.M.Weiss,「In search of human variation」, Genome Res.1998年7月；8(7):691-697；M.M.She, 「Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies」, Clin.Chem.2001年2月；47(2):164-172)。例えば、SNPは、ゲルベースの方法、例えば、制限酵素断片長多型(RFLP)および変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)によって多型を示すDNAフラグメントを配列決定することによって同定される。SNPはまた、異なる個体からプールされたDNAサンプルを直接配列決定することによって、または異なるDNAサンプル由来の配列を比較することによっても発見することができる。公的データベースおよび私的データベースにおける配列データの急速な蓄積により、コンピュータープログラムを使用して配列を比較することによってもSNPを発見することができる(Z.Gu, L.Hillier and P.Y.Kwok,「Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace」, Hum.Mutat.1998；12(4):221-225)。SNPを検証することができ、個体の遺伝型またはハプロタイプを、直接配列決定およびハイスループットマイクロアレイを含む種々の方法によって決定することができる(P.Y.Kwok,「Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms」, Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.2001；2:235-258；M.Kokoris, K.Dix, K.Moynihan, J.Mathis, B.Erwin, P.Grass, B.Hines and A.Duesterhoeft,「High-throughput SNP genotyping with the Masscode system」, Mol.Diagn.2000年12月；5(4):329-340)。

【０４３４】

実施例4

原核生物系における組換え24P4C12の産生

原核細胞において組換え24P4C12および24P4C12変異体を発現させるために、全長または部分長の24P4C12および24P4C12変異体のcDNA配列を、当技術分野において公知の種々の発

現ベクターのうちのいずれか1つにクローニングする。全長cDNA、または24P4C12由来の任意の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もしくはそれ以上の連続するアミノ酸、その変異体もしくはアナログを使用する。

【０４３５】

A.インビトロ転写および翻訳構築物

pCRII:

インサイチュ研究でRNAに対する24P4C12のセンスRNAプローブおよびアンチセンスRNAプローブを作製するために、24P4C12 cDNAの全てまたはそのフラグメントのいずれかをコードするpCRII構築物(Invitrogen, Carlsbad CA)を作製する。このpCRIIベクターは、RNAインサイチュハイブリダイゼーション実験におけるプローブとして使用するための24P4C12 RNAの転写を駆動するために、挿入物に隣接するSp6プロモーターおよびT7プロモーターを有する。これらのプローブは、24P4C12の細胞発現および組織発現をRNAレベルで分析するために使用する。24P4C12タンパク質の合成のために、24P4C12遺伝子のcDNAアミノ酸コード領域に相当する転写された24P4C12RNAを、TnT(商標) Coupled Reticulolysate System(Promega, Corp., Madison, WI)のようなインビトロ翻訳系において使用する。

【０４３６】

B.細菌構築物

pGEX構築物:

細菌において、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タンパク質に融合した組換え24P4C12タンパク質を産生するために、24P4C12 cDNAまたは変異体の全てまたは一部を、pGEXファミリーのGST融合ベクター(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)にクローニングする。これらの構築物により、GSTがアミノ末端に融合され、6個のヒスチジンエピトープ(6×His)がカルボキシ末端に融合した組換え24P4C12タンパク質配列の制御された発現が可能になる。GSTおよび6×Hisタグにより、適切なアフィニティーマトリックスを用いて、誘導された細菌から組換え融合タンパク質を精製することが可能になり、抗GST抗体および抗His抗体による融合タンパク質の認識が可能になる。この6×Hisタグは、クローニングプライマーに、例えば、オープンリディングフレーム(ORF)の3'末端に、6個のヒスチジンのコドンを加えることによって作製される。タンパク質分解部位(例えば、pGEX-6P-1におけるPreScission(商標)認識部位)が使用されてもよく、その結果、24P4C12関連タンパク質からGSTタグを切断することが可能になる。アンピシリン耐性遺伝子およびpBR322複製起点により、大腸菌におけるpGEXプラスミドの選択および維持が可能になる。

【０４３７】

pMAL構築物:

マルトース結合タンパク質(MBP)に融合した組換え24P4C12タンパク質を細菌内で産生するために、24P4C12 cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部を、pMAL-c2XおよびpMAL-p2Xベクター(New England Biolabs, Beverly, MA)にクローニングすることによって、MBP遺伝子に融合させる。これらの構築物は、MBPがアミノ末端に融合され、6×Hisエピトープタグがカルボキシ末端に融合した組換え24P4C12タンパク質配列の制御された発現を可能にする。このMBPおよび6×Hisタグにより、適切なアフィニティーマトリックスを用いて、誘導された細菌からの組換えタンパク質の精製が可能になり、抗MBP抗体および抗His抗体での融合タンパク質の認識が可能になる。6×Hisエピトープタグは、6個のヒスチジンのコドンを3'クローニングプライマーに加えることによって作製する。第Xa因子認識部位により、24P4C12からのpMALタグの切断が可能になる。このpMAL-c2XベクターおよびpMAL-p2Xベクターは、それぞれ細胞質および周辺質において組換えタンパク質を発現するように最適化されている。周辺質の発現は、ジスルフィド結合によるタンパク質のフォールディングを増強する。

【０４３８】

C.酵母構築物

pESC構築物:

組換えタンパク質の産生および機能研究のために酵母種サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)において24P4C12を発現するために、24P4C12 cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部を、各々が4つの選択マーカーHIS3、TRP1、LEU2、およびURA3の1つを有するpESCファミリーのベクター(Stratagene, La Jolla, CA)にクローニングする。これらのベクターは、同一の酵母細胞内において、Flag(商標)またはMycエピトープタグのいずれかを含む2つまでの異なる遺伝子またはクローニングされた配列からなる同一のプラスミドから制御された発現を可能にする。この系は、24P4C12のタンパク質間相互作用を確認するのに有用である。さらに、酵母における発現は、真核細胞において発現した場合に見られる類似した翻訳後修飾、例えば、グリコシル化およびリン酸化をもたらす。

【０４３９】

pESP構築物:

酵母種サッカロマイセス・ポンベ(Saccharomyces pombe)において24P4C12を発現させるために、24P4C12 cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部を、pESPファミリーのベクターにクローニングする。これらのベクターは、アミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに、組換えタンパク質の精製を助けるGSTが融合された24P4C12タンパク質配列の制御された高レベル発現を可能にする。Flag(商標)エピトープタグにより、抗Flag(商標)抗体での組換えタンパク質の検出が可能になる。

【０４４０】

実施例5

高等真核生物系における組換え24P4C12の産生

A.哺乳動物構築物

真核細胞において組換え24P4C12を発現させるために、24P4C12 cDNA配列の全長もしくは一部を、当技術分野で公知の種々の発現ベクターのいずれか1つにクローニングすることができる。24P4C12の以下の1つまたはそれ以上の領域:24P4C12 v.1～v.6に由来するアミノ酸1～710、または8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個もしくはそれ以上の連続する任意のアミノ酸;24P4C12 v.7に由来するアミノ酸1～598、または8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個もしくはそれ以上の連続する任意のアミノ酸;24P4C12 v.8に由来するアミノ酸1～722、または8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個もしくはそれ以上の連続する任意のアミノ酸;24P4C12 v.9に由来するアミノ酸1～712、または8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個もしくはそれ以上の連続する任意のアミノ酸、その変異体もしくはアナログが、これらの構築物において発現する。

【０４４１】

前記構築物は、広範な種々の哺乳動物細胞、例えば、293T細胞のいずれか1つにトランスフェクトすることができる。トランスフェクトされた293T細胞溶解物は、本明細書中で記載されるように、抗24P4C12ポリクローナル血清でプローブすることができる。

【０４４２】

pcDNA3.1/MycHis構築物:

哺乳動物細胞において24P4C12を発現させるために、コンセンサスKozak翻訳開始部位を含む24P4C12の24P4C12 ORFまたはその一部を、pcDNA3.1/MycHis Version A(Invitrogen, Carlsbad, CA)にクローニングした。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターによって駆動される。この組換えタンパク質は、カルボキシ末端に融合したmycエピトープおよび6×Hisエピトープを有する。pcDNA3.1/MycHisベクターはまた、ラージT抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および簡単なベクターレスキューのためのSV40複製起点と一緒に、mRNAの安定性を強化するためのウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列も含む。このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にするので、ネオマイシン耐性遺伝子が用いられてもよく、アンピシリン耐性遺

伝子およびColE1複製起点により、大腸菌におけるプラスミドの選択および維持が可能になる。

【０４４３】

pcDNA4/HisMax構築物:

哺乳動物細胞において24P4C12を発現させるために、24P4C12の24P4C12 ORFまたはその一部を、pcDNA4/HisMax Version A(Invitrogen, Carlsbad, CA)にクローニングする。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターおよびSP16翻訳エンハンサーによって駆動される。組換えタンパク質は、アミノ末端に融合されたXpress(商標)および6個のヒスチジン(6×His)エピトープを有する。pcDNA4/HisMaxベクターはまた、ラージT抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および簡単なベクターレスキューのためのSV40複製起点と一緒に、mRNAの安定性を強化するためのウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列も含む。ゼオシン(Zeocine)耐性遺伝子によって、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択が可能になり、アンピシリン耐性遺伝子およびColE1複製起点により、大腸菌におけるプラスミドの選択および維持が可能になる。

【０４４４】

pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO構築物:

哺乳動物細胞において24P4C12を発現させ、その組換えタンパク質を蛍光を用いて検出するために、コンセンサスKozak翻訳開始部位を含む24P4C12 ORFまたはその一部を、pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO(Invitrogen, CA)にクローニングする。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターによって駆動される。この組換えタンパク質は、カルボキシ末端に、非侵襲性のインビボ検出および細胞生物学研究を容易にする緑色蛍光タンパク質(GFP)を有する。このpcDNA3.1CT-GFP-TOPOベクターはまた、ラージT抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および簡単なベクターレスキューのためのSV40複製起点と一緒に、mRNAの安定性を強化するためのウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列も含む。ネオマイシン耐性遺伝子により、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択が可能になり、アンピシリン耐性遺伝子およびColE1複製起点により、大腸菌におけるプラスミドの選択および維持が可能になる。24P4C12タンパク質の全長に及ぶ、アミノ末端にGFP融合物を有するさらなる構築物が、pcDNA3.1/NT-GFP-TOPOにおいて作製される。

【０４４５】

pTag5:

24P4C12 ORFまたはその一部を、pTag-5にクローニングした。このベクターは、pAPtagと似ているが、アルカリホスファターゼ融合を伴わない。この構築物は、IgGκシグナル配列をアミノ末端に有し、検出およびアフィニティー精製を容易にするmycタグおよび6×Hisエピトープタグをカルボキシ末端に有する、24P4C12タンパク質を産生する。得られた組換え24P4C12タンパク質は、トランスフェクトされた哺乳動物細胞の培地への分泌に最適化されており、24P4C12タンパク質と相互作用するリガンドまたは受容体のようなタンパク質を同定するための免疫原またはリガンドとして使用される。タンパク質発現は、CMVプロモーターにより駆動される。ベクター中に存在するゼオシン耐性遺伝子によって、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択が可能になり、アンピシリン耐性遺伝子により大腸菌におけるプラスミドの選択が可能になる。

【０４４６】

PAPtag:

24P4C12 ORFまたはその一部を、pAPtag-5(GenHunter Corp.Nashville, TN)にクローニングする。この構築物は、24P4C12タンパク質のアミノ末端にIgGκシグナル配列を融合させながら、24P4C12タンパク質のカルボキシ末端にアルカリホスファターゼ融合をもたらす。アミノ末端IgGκシグナル配列を有するアルカリホスファターゼが24P4C12タンパク質のアミノ末端に融合した構築物もまた作製される。得られた組換え24P4C12タンパク質は、トランスフェクトされた哺乳動物細胞の培地への分泌に最適化されており、24P4C12タンパク質と相互作用するリガンドまたは受容体のようなタンパク質の同定に使用すること

ができる。タンパク質発現はCMVプロモーターによって駆動され、この組換えタンパク質はまた、検出または精製を容易にするカルボキシ末端に融合したmycエピトープおよび6×Hisエピトープを含む。ベクター中に存在するゼオシン耐性遺伝子によって、この組換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択が可能になり、アンピシリン耐性遺伝子により大腸菌におけるプラスミドの選択が可能になる。

【０４４７】

PsecFc:

24P4C12 ORFまたはその一部を、psecFcにもクローニングした。このpsecFcベクターは、ヒト免疫グロブリンG1(IgG)Fc(ヒンジ、CH2、CH3領域)をpSecTag2(Invitrogen, California)にクローニングすることによって組み立てられた。この構築物は、IgGKシグナル配列をN末端に融合させながら、24P4C12タンパク質のカルボキシ末端においてIgG1 Fc融合物を産生する。マウスIgG1 Fc領域を用いた24P4C12融合物も使用される。得られた組換え24P4C12タンパク質は、トランスフェクトされた哺乳動物細胞の培地への分泌に最適化されており、免疫原として、あるいは24P4C12タンパク質と相互作用するリガンドまたは受容体のようなタンパク質を同定するために使用することができる。タンパク質発現は、CMVプロモーターにより駆動される。ベクター中に存在するハイグロマイシン耐性遺伝子によって、その組換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択が可能になり、アンピシリン耐性遺伝子により、大腸菌におけるプラスミドの選択が可能になる。

【０４４８】

pSRα構築物:

24P4C12を構成的に発現する哺乳動物細胞株を作製するために、24P4C12の24P4C12 ORFまたはその一部を、pSRα構築物にクローニングした。アンホトロピックレトロウイルスおよびエコトロピックレトロウイルスは、それぞれ、pSRα構築物を293T-10A1パッケージング株にトランスフェクションすることによって、またはpSRαおよびヘルパープラスミド(欠失したパッケージング配列を含む)を293細胞に同時トランスフェクションすることによって作製した。レトロウイルスは種々の哺乳動物細胞株への感染に使用され、クローニングした遺伝子24P4C12の宿主細胞株に組み込まれる。タンパク質発現は長末端反復配列(LTR)によって駆動される。ベクター中に存在するネオマイシン耐性遺伝子により、そのタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択が可能となり、アンピシリン耐性遺伝子およびColE1複製起点により、大腸菌におけるプラスミドの選択および維持が可能になる。レトロウイルスベクターは、その後、例えばPC3、NIH 3T3、TsuPr1、293またはrat-1細胞を使用して、種々の細胞株の感染および作製のために使用することができる。

【０４４９】

抗Flag抗体を使用する検出を可能にするために、FLAG(商標)タグのようなエピトープタグを24P4C12配列のカルボキシ末端に融合したさらなるpSRα構築物を作製する。例えば、FLAG(商標)配列5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3'(配列番号172)を、ORFの3'末端にあるクローニングプライマーに付加する。全長24P4C12タンパク質のアミノ末端およびカルボキシ末端両方にGFPならびにmyc/6×Hisのある融合タンパク質を産生するように、さらなるpSRα構築物を作製する。

【０４５０】

さらなるウイルスベクター:

24P4C12のウイルス媒介性の送達および発現のために、さらなる構築物を作製する。高レベルの24P4C12発現を導く高いウイルス力価は、アデノウイルスベクターおよびヘルペスアンプリコンベクターのようなウイルス送達系において達成される。24P4C12コード配列またはそのフラグメントをPCR増幅し、AdEasyシャトルベクター(Stratagene)にサブクローニングする。製造者の説明書に従って、組換えおよびウイスルのパッケージングを実施し、アデノウイルスベクターを作製する。または、24P4C12コード配列またはそのフラグメントを、HSV-1ベクター(Imgenex)にクローニングして、ヘルペスウイルスベクターを作製する。その後、このウイルスベクターを、PC3細胞、NIH 3T3細胞、293細胞またはrat-1細胞のような種々の細胞株への感染のために使用する。

【０４５１】
調節発現系:
哺乳動物細胞における24P4C12の発現を制御するために、24P4C12のコード配列またはその一部を、T-Rex System(Invitrogen)、GeneSwitch System(Invitrogen)、および厳しく制御されたEcdysone System(Sratagene)のような、調節された哺乳動物発現系にクローニングする。これらの系により、組換え24P4C12の時間的および濃度依存的な効果の研究が可能になる。その後、PC3細胞、NIH 3T3細胞、293細胞またはrat-1細胞のような種々の細胞株において24P4C12の発現を制御するために、これらのベクターを使用する。
【０４５２】
B.バキュロウイルス発現系
バキュロウイルス発現系において組換え24P4C12タンパク質を産生するために、24P4C12 ORFまたはその一部を、バキュロウイルス移入ベクターであるpBlueBac4.5(Invitrogen)にクローニングする。このベクターは、N末端にHisタグを提供する。具体的には、pBlueBac-24P4C12を、ヘルパープラスミドであるpBac-N-Blue(Invitrogen)と一緒にSF9(スポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda))昆虫細胞に同時トランスフェクションして、組換えバキュロウイルスを作製する(詳細については、Invitrogenの指示マニュアルを参照のこと)。次いでバキュロウイルスを、細胞上清から収集し、プラークアッセイによって精製する。
【０４５３】
次いで、精製バキュロウイルスをHighFive昆虫細胞(Invitrogen)に感染させることによって、組換え24P4C12タンパク質を産生する。組換え24P4C12タンパク質は、抗24P4C12抗体または抗Hisタグ抗体を使用して検出することができる。24P4C12タンパク質を精製し、種々の細胞ベースのアッセイにおいて、または24P4C12に特異的なポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を産生するための免疫原として使用することができる。
【０４５４】
実施例6
抗原性プロフィールおよび二次構造
24P4C12抗原性プロフィール:親水性(Hopp T.P., Woods K.R., 1981.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:3824-3828);ハイドロパシー(Kyte J., Doolittle R.F., 1982.J.Mol.Biol.157:105-132);接近可能残基パーセンテージ(Janin J., 1979 Nature 277:491-492);平均可撓性(Bhaskaran R. and Ponnuswamy P.K., 1988.Int.J.Pept.Protein Res.32:242-255);β-ターン(Deleage, G., Roux B.1987 Protein Engineering 1:289-294);任意で、当技術分野で利用可能な他のもの(例えば、ProtScaleウェブサイト上にあるようなもの)を、24P4C12タンパク質の抗原性領域を同定するために使用した。24P4C12の上述のアミノ酸プロフィールはそれぞれ、分析のために、以下のProtScaleパラメーター:1)ウインドウサイズ9;2)ウインドウの中央と比較してウインドウの端の100%の重み;および3)0～1になるように規準化されたアミノ酸プロフィール値を使用して作成した。
【０４５５】
親水性プロフィール、ハイドロパシープロフィール、および接近可能残基パーセンテージプロフィールは、親水性アミノ酸のストレッチを決定するために使用した(すなわち、親水性プロフィールおよび接近可能残基パーセンテージプロフィールでは0.5より大きな値、ハイドロパシープロフィールでは0.5未満の値)。このような領域は、水性環境に曝露されており、タンパク質の表面に存在し、従って、免疫認識、例えば、抗体による認識に利用可能な可能性が高い。
【０４５６】
平均可撓性プロフィールおよびβ-ターンプロフィールは、βシートおよびαヘリックスのような二次構造に束縛されないアミノ酸のストレッチを決定する(すなわち、値が、β-ターンプロフィールおよび平均可撓性プロフィールでは0.5より大きな値)。このような領域もまた、タンパク質上に曝露されており、従って、免疫認識、例えば、抗体による認識が可能な可能性がより高い。

【０４５７】
例えば、上述のプロフィールによって示された24P4C12タンパク質および変異体タンパク質の抗原性配列を、治療的または診断的抗24P4C12抗体を産生するための免疫原、ペプチドまたはそれをコードする核酸のいずれかを調製するのに使用する。この免疫原は、図1に列挙される24P4C12タンパク質変異体由来の、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50個もしくは50個を超える連続する任意のアミノ酸、またはそれらをコードする対応する核酸のいずれかでよい。特に、本発明のペプチド免疫原は、親水性プロフィールにおいて0.5より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、図1の少なくとも5個と、任意の全ての増分のアミノ酸のペプチド領域；ハイドロパシープロフィールにおいて0.5未満の値を有するアミノ酸位置を含む、図1の少なくとも5個と、任意の全ての増分のアミノ酸のペプチド領域；接近可能残基プロフィールにおいて0.5より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、図1の少なくとも5個と、任意の全ての増分のアミノ酸のペプチド領域；平均可撓性プロフィールにおいて0.5より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、図1の少なくとも5個と、任意の全ての増分のアミノ酸のペプチド領域；およびβ-ターンプロフィールにおいて0.5より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、図1の少なくとも5個と、任意の全ての増分のアミノ酸のペプチド領域を含んでもよい。本発明のペプチド免疫原はまた、上述のいずれかをコードする核酸も含んでもよい。

【０４５８】
本発明の全ての免疫原ペプチドまたは核酸は、ヒト単位剤形において具現化されてもよく、ヒトの生理に適合した薬学的賦形剤を含む組成物によって含まれてもよい。

【０４５９】
24P4C12変異体における膜貫通ドメインの潜在的な存在についての分析は、ExPasy分子生物学サーバからアクセスされる種々の膜貫通予測アルゴリズムを使用して実行した。

【０４６０】
実施例7
24P4C12ポリクローナル抗体の作製
ポリクローナル抗体は、例えば、免疫化剤、任意で、アジュバントの1回またはそれ以上の注射により哺乳動物において産生することができる。典型的には、免疫化剤および/またはアジュバントは、複数回の皮下もしくは腹腔内への注射によって哺乳動物に注射される。全長24P4C12タンパク質で免疫化することに加え、アミノ酸配列の解析に基づいて、抗原性があり、免疫化された宿主の免疫系による認識に有効な特徴を含む免疫原の設計において、コンピュータのアルゴリズムが用いられる(「抗原性プロフィールおよび二次構造」という表題の実施例を参照のこと)。このような領域は、親水性かつ可撓性があり、β-ターンの高次構造をとり、タンパク質の表面上に露出されると予測される。

【０４６１】
例えば、24P4C12変異体タンパク質の親水性、可撓性のあるβ-ターン領域を含む、24P4C12組換え細菌融合タンパク質もしくはペプチドは、New Zealand Whiteウサギにおいてポリクローナル抗体を作製するための抗原として使用される。例えば、このような領域には、24P4C12変異体1のアミノ酸1-34、アミノ酸118-135、アミノ酸194-224、アミノ酸280-290、およびアミノ酸690-710が含まれるが、これに限定されない。免疫化されている哺乳動物において免疫原性であることが分かっているタンパク質に、免疫化薬剤を結合体化することは有用である。このような免疫原性タンパク質の例には、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシチログロブリン、およびダイズトリプシンインヒビターが含まれるが、これに限定されない。一態様において、24P4C12変異体1のアミノ酸1-14をコードするペプチドはKLHに結合体化され、ウサギを免疫化するのに用いられる。この抗血清はペプチドに対して高力価(>10,000)を示し、24P4C12を、ウエスタンブロットおよびフローサイトメトリーにより、トランスフェクト293T細胞において(図24)、ウエスタンブロットおよび免疫組織化学により、安定した組換えPC3細胞において認識した(図25)。または、免疫化薬剤は、24P4C12変異体タンパク質、その類似体または融合タンパク質

の全てまたは一部を含んでもよい。例えば、24P4C12変異体1アミノ酸配列は、組換えDNA技法を用いて、当技術分野において周知の様々な融合タンパク質パートナー、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)およびHISタグ化融合タンパク質のいずれか1つに融合することができる。このような融合タンパク質は、適切なアフィニティマトリックスを用いて、誘導された細菌から精製される。

【０４６２】

一態様において、変異体1の第3の推定細胞外ループを含むアミノ酸379-453をコードするGST-融合タンパク質が生成され、精製され、免疫原として用いられる。使用することができる他の組換え細菌融合タンパク質には、マルトース結合タンパク質、LacZ、チオレドキシン、NusA、または免疫グロブリン定常領域が含まれる(「原核生物系における24P4C12の産生」という表題の節と、Current Protocols In Molecular Biology, 第2巻, 第16部, Frederick M. Ausubul et al.編, 1995；Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N., and Ledbetter, L.(1991)J.Exp.Med.174, 561-566を参照のこと)。

【０４６３】

細菌に由来する融合タンパク質に加え、哺乳動物が発現したタンパク質抗原もまた使用される。これらの抗原は、Tag5およびFc-融合ベクターのような哺乳動物発現ベクターから発現され(「真核生物系における組換え24P4C12の産生」という表題の節を参照のこと)、天然のタンパク質に見られるグリコシル化のような翻訳後修飾を保持する。次いで、それぞれの組換えタンパク質を、この組換えベクターを安定して発現する293T細胞の組織培養上清および/または溶解産物から、金属キレートクロマトグラフィーにより精製した。次いで、精製Tag5 24P4C12タンパク質を免疫原として使用した。

【０４６４】

免疫化プロトコールの間に、宿主動物の免疫応答を増強するアジュバント中に抗原を混合または乳化することが有用である。アジュバントの例には、完全フロイントアジュバント(CFA)およびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート(dicorynomycolate))が含まれるが、これに限定されない。

【０４６５】

代表的なプロトコールにおいて、最初に、完全フロイントアジュバント(CFA)中に混合した、KLHに結合体化させた、200μgまで、典型的には、100～200μgの融合タンパク質またはペプチドを用いて、ウサギを皮下免疫する。次いで、ウサギに、2週間毎に、不完全フロイントアジュバント(IFA)に溶解した、200μgまで、典型的には、100～200μgの免疫原を皮下注射する。各免疫化の約7～10日後に、試験血を採取して、ELISAにより抗血清の力価をモニタリングするために使用する。

【０４６６】

24P4C12変異体融合タンパク質、例えば、GST融合タンパク質およびMBP融合タンパク質で免疫化したウサギに由来する抗血清を、融合パートナーを単独で、または無関係の融合タンパク質の状況において含有するアフィニティカラムに通すことによって融合パートナー配列と反応する抗体を枯渇させることによって精製した。例えば、最初に、変異体1のアミノ酸379-453をコードするGST-24P4C12融合タンパク質に由来する抗血清を、AffiGelマトリックス(Biorad, Hercules, Calif.)に共有結合させたGSTタンパク質カラムに通すことによって精製する。次いで、抗血清を、Affigelマトリックスに共有結合させた、アミノ酸379-453をコードするMBP融合タンパク質からなるカラムに通すことによってアフィニティ精製する。次いで、IgG画分を得るために、血清をプロテインGアフィニティクロマトグラフィーによりさらに精製する。他のHisタグ化抗原およびペプチドによって免疫化されたウサギに由来する血清ならびに融合パートナーによって枯渇された血清を、最初のタンパク質免疫原または遊離ペプチドからなるカラムマトリックスに通すことによってアフィニティ精製する。

【０４６７】

実施例8

24P4C12モノクローナル抗体(MAb)の作製

一態様において、24P4C12および24P4C12変異体に対する治療用モノクローナル抗体(「MAb」)は、24P4C12もしくは24P4C12変異体に結合するか、これらを内部移行させるか、これらの生物学的な機能を妨害するか、または調節する、各タンパク質に特異的な配列または変異体間に共通する配列に特異的なエピトープと反応する抗体、例えば、リガンド、基質および結合パートナーとの相互作用を妨害する抗体を含む。このようなMAbを作製するための免疫源には、24P4C12タンパク質の細胞外ドメインまたは全配列をコードするか、もしくは含むように設計されたもの、機能的モチーフを含むと予測される領域、およびアミノ酸配列のコンピュータ解析から抗原性であると予測される24P4C12タンパク質変異体の領域が含まれる。免疫源には、ペプチドおよび組換えタンパク質、例えば、哺乳動物細胞に由来する精製Hisタグ化タンパク質であるtag5-24P4C12が含まれる。さらに、高レベルの24P4C12を発現するように操作した細胞、例えば、RAT1-24P4C12または300.19-24P4C12を、マウスを免疫するために使用する。

【０４６８】

24P4C12に対するMAbを作製するために、最初に、マウスを、適切なアジュバント中で混合した、1～50μgのタンパク質免疫源または10^6～10^7個の24P4C12発現細胞を用いて免疫化した。免疫化に適切なアジュバントの例は、TiterMax(Sigma)およびミョウバンゲルである。最初の注射後、融合のための選択の準備ができるまで、マウスを1週間に2回免疫化した。マウスに融合の準備ができたら(下記を参照のこと)、B細胞をリンパ節または脾臓から採取する。採取したB細胞を標準的なマウス由来融合パートナーと混合し、細胞をエレクトロセルフュージョン(ECF)を用いて融合する

【０４６９】

免疫化の間に、試験血を採取して、免疫応答の力価および特異性をモニタリングした。ほとんどの場合、ELISA、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリー分析により求めた時に、適切な反応性および特異性が得られたら、次いで、エレクトロセルフュージョン(ECF)を用いて融合およびハイブリドーマ作製を行った。

【０４７０】

一態様において、本発明は、Ha5-1(5)1、Ha5-1(5)2.1、Ha5-3(1,4)2.1、Ha5-3(1,4)7.1、Ha5-3(3,5)37.1、Ha5-4(2,5)13.1、Ha5-4(2,5)34.1、Ha5-7acd4.1、Ha5-7acd20.1.1、Ha5-7be31.1、Ha5-7acd10.1、Ha5-7acd13.1、Ha5-7acd19.1、Ha5-7be37.1、Ha5-7acd16.1、Ha5-7acd7.1.1、Ha5-7be20.1、Ha5-7acd5.1.1、Ha5-7be34.1、Ha5-7acd3.1、Ha5-7acd2.1、Ha5-8ac4.1、Ha5-4(2,5)31.1、Ha5-11a1.1.1、Ha5-11b1.1、およびHa5-7be7.1と名付けられたモノクローナル抗体を提供する。

【０４７１】

24P4C12に対するMAbを、XenoMouse technology(登録商標)(Amgen Fremont)を用いて作製した。このマウスにおいては、マウスの重鎖遺伝子座およびκ軽鎖遺伝子座が不活性化されており、ヒト重鎖およびκ軽鎖の免疫グロブリン遺伝子座の大部分が挿入されている。ヒトγ1を産生するXenoMiceのRAT(E)-24P4C12細胞による免疫化から、Ha5-3(1,4)2.1、Ha5-3(1,4)7.1、Ha5-3(3,5)37.1、Ha5-7acd4.1、Ha5-7acd20.1.1、Ha5-7be31.1、Ha5-7acd10.1、Ha5-7acd13.1、Ha5-7acd19.1、Ha5-7be37.1、Ha5-7acd16.1、Ha5-7acd7.1.1、Ha5-7be20.1、Ha5-7acd5.1.1、Ha5-7be34.1、Ha5-7acd3.1、Ha5-7acd2.1、Ha5-8ac4.1、Ha5-4(2,5)31.1、Ha5-11a1.1.1、Ha5-11b1.1、およびHa5-7be7.1と名付けられたMabを作製した。ヒトγ2を産生するXenoMiceのB300.19-24P4C12による免疫化から、Ha5-1(5)1およびHa5-1(5)2.1と称されるMAbを作製した。ヒトγ1を産生するXenoMiceの精製tag5-24P4C12(aa59-227)による免疫化から、Ha5-4(2,5)13.1およびHa5-4(2,5)34.1と称されるMAbを作製した。

【０４７２】

24P4C12 MAb Ha5-1(5)1、Ha5-1(5)2.1、Ha5-3(1,4)2.1、Ha5-3(1,4)7.1、Ha5-3(3,5)37.1、Ha5-7acd4.1、Ha5-7acd20.1.1、Ha5-7be31.1、Ha5-7acd10.1、Ha5-7acd13.1、Ha5-7a

cd19.1、Ha5-7be37.1、Ha5-7acd16.1、Ha5-7acd7.1.1、Ha5-7be20.1、Ha5-7acd5.1.1、Ha5-7be34.1、Ha5-7acd3.1、Ha5-7acd2.1、Ha5-8ac4.1、およびHa5-7be7.1は、組換え24P4C12を発現する細胞(PC3-24P4C12)および24P4C12を発現する複数の癌細胞株に特異的に結合する(図6)。

【０４７３】

Ha5-1(5)1、Ha5-1(5)2.1、Ha5-3(1,4)7.1、Ha5-7acd10.1、Ha5-7acd16.1、およびHa5-11b1.1と名付けられた抗体は、2007年8月8日に、(Federal Expressを介して)American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108に送られ、それぞれ、アクセッション番号PTA-____、PTA-____、PTA-____、PTA-____、PTA-____、PTA-____が割り当てられた。

【０４７４】

24P4C12 MAb Ha5-1(5)1、Ha5-1(5)2.1、Ha5-3(1,4)2.1、Ha5-3(1,4)7.1、Ha5-3(3,5)37.1、Ha5-4(2,5)13.1、Ha5-4(2,5)34.1、Ha5-7acd4.1、Ha5-7acd20.1.1、Ha5-7be31.1、Ha5-7acd10.1、Ha5-7acd13.1、Ha5-7acd19.1、Ha5-7be37.1、Ha5-7acd16.1、Ha5-7acd7.1.1、Ha5-7be20.1、Ha5-7acd5.1.1、Ha5-7be34.1、Ha5-7acd3.1、Ha5-7acd2.1、Ha5-8ac4.1、Ha5-4(2,5)31.1、Ha5-11a1.1.1、Ha5-11b1.1、およびHa5-7be7.1のDNAコード配列は、トリゾル試薬(Life Technologies, Gibco BRL)を用いてそれぞれのハイブリドーマ細胞からmRNAを単離した後に決定した。

【０４７５】

抗24P4C12重鎖および軽鎖の可変核酸配列は、以下のプロトコールを用いてハイブリドーマ細胞から配列決定した。抗24P4C12分泌ハイブリドーマ細胞を、トリゾル試薬(Life Technologies, Gibco BRL)を用いて溶解した。総RNAを精製し、定量した。総RNAから第一鎖cDNAsを、オリゴ(dT)12-18プライミングとGibco BRL Superscript Preamplificationシステムを用いて作製した。第一鎖cDNAsを、ヒト免疫グロブリン可変重鎖プライマーおよびヒト免疫グロブリン可変軽鎖プライマーを用いて増幅した。PCR産物を配列決定し、可変重鎖および軽鎖領域を決定した。

【０４７６】

可変重鎖領域および可変軽鎖領域の核酸配列およびアミノ酸配列を、図2および図3に列挙した。24P4C12抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメントを、図4A～図4AYに示した。

【０４７７】

実施例9

24P4C12 MAbのスクリーニング、同定、および特徴付け

「24P4C12モノクローナル抗体(MAb)の作製」という表題の実施例に示した手順を用いて作製した抗体を、ELISA、FACS、表面プラスモン共鳴(BIAcore)(「SPR」)による親和性の順位付け、エピトープグルーピング、組換え24P4C12および細胞表面上に発現する24P4C12に対する親和性を含む、アッセイの組み合わせを用いて、スクリーニング、同定、および特徴付けした。

【０４７８】

FACSによる24P4C12ヒトMAbのスクリーニング

24P4C12 MAbについての一次ハイブリドーマスクリーニングを、FACS分析により行った。プロトコールは以下の通りである。50μl/ウェルのハイブリドーマ上清(希釈なし)または(連続希釈した)精製抗体を、96ウェルのFACSプレートに加え、24P4C12を発現する細胞(内因性または組換え、50,000細胞/ウェル)と混合する。この混合物を4℃にて2時間インキュベートする。インキュベーションの終了時に、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、100μlの検出抗体(抗hIgG-PE)と共に4℃にて45分間インキュベートする。インキュベーションの終了時に、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、ホルムアルデヒドで固定し、FACScanを用いて分析する。データを、CellQuest Proソフトウェアを用いて分析する。

【０４７９】

一次スクリーニングから同定された陽性ハイブリドーマを、24ウェルプレートに移し、確認のスクリーニングのために上清を回収する。

【０４８０】

B.ELISAによる24P4C12ヒトMAbのスクリーニング

24P4C12 MAbを、抗体アイソタイプを決定するためにELISAによってスクリーニングする。使用プロトコールは、以下の通りである。ELISAプレートを、Tag5-24P4C12-ECDまたは抗hIgG抗体を用いてコーティングする。試験抗体の数種のセットを、そのプレートに添加し、1時間インキュベートする。そのプレートを洗浄して結合していない抗体を洗い流した後、結合した抗体を、以下のHRP結合体化検出抗体:抗hIgG1、抗hIgG2、抗hlgK、および抗hlgLによって検出する。

【０４８１】

C.SPRによる24P4C12ヒトMAbのスクリーニング

SPRは、タンパク質間相互作用の動態および親和性の特定およびリアルタイムな特徴付けを可能にし、従って、関心対象の標的抗原(すなわち、24P4C12)に対するMAbの選択および特徴付けにおいて有用な技術である。SPR分析を、ハイブリドーマ上清および24P4C12に対する精製MAbをスクリーニングおよび特徴付けるために使用する。SPRバイオセンサー(BIAcore3000)による24P4C12に対するMAbについてのハイブリドーマスクリーニングを、以下の通りに行う:50μl/ウェルのハイブリドーマ上清(希釈なし)を、ランニング緩衝液(HBS-P、10ug/mlBSA)によって1.5～2μg/mlに希釈し、96ウェルプレート(BIAcore)に添加し、MAb(20μl)を、CM5センサーチップの表面上に共有結合で固定化したヤギ抗ヒトFcγ pAb上に捕捉した。1回(サイクル)につき、3種類のMAbを含むハイブリドーマ上清をフローセルのチャンネル2、3および4において試験し、チャンネル1を、非特異的結合に対する参照として確保する。それぞれ個々のチャンネルにおける捕捉MAbに対する抗原を測定する前に、60μlのランニング緩衝液を、捕捉MAbベースラインにおけるドリフトに対する参照として機能するように、20μl/分の流速にてチップ表面上に注入する。次いで、抗原結合を測定するために、60マイクロリットル(60μl)の150nM精製組換え161P2F10Bを、20μl/分の同じ流速にてチップ表面上に注入する。MAbに対する抗原結合の各サイクルの後に、捕捉MAbの表面をはがすために100mMリン酸の注入によって表面の再生(1分間)を行う。

【０４８２】

データ分析を、BiaEvaluation4.1およびCLAMPソフトウェア(Myszka and Morton,1998)を使用して行う。参照を差し引き、応答を捕捉MAbのレベルに対して規準化した後、データを、1:1結合モデルを使用してグローバルにフィットさせる。

【０４８３】

親和性を、会合速度定数および解離速度定数から計算する。当業者に明らかであるように、遅い解離速度は、一般的に、MAbに対するより高い全親和性を示す。予備的な親和性データおよび解離速度を、24P4C12に対する治療用MAbの選択基準の基礎として使用する。

【０４８４】

D.FACSによるエピトープグルーピング

ラット1-24P4C12細胞を用いて24P4C12抗体の結合パターンを評価することによって、24P4C12抗体をエピトープに従ってグループ分けした。簡単に述べると、少量の各抗体をビオチン化し、次いで、ビオチン化抗体をそれぞれ、過剰(100倍)量の非ビオチン化抗体の存在下で、Rat1-24P4C12と共に、4℃にて1時間インキュベートした。当業者であれば、インキュベーション中に、過剰量の抗体が同じエピトープに結合すれば、ビオチン化抗体と競合することを理解するだろう。インキュベーションの終了時に、細胞を洗浄し、ストレプトアビジン-PEと共に4℃にて45分間インキュベートした。結合しなかったストレプトアビジン-PEを洗浄して除いた後、細胞をFACSを用いて分析した。MFI値を、CellQuest Proソフトウェアを使用して入手し、データ分析のために使用した。記載のように、28(28)種類の24P4C12 MAbを、ラット1-24P4C12細胞を使用してエピトープグルーピングした。結果から、同じ結合パターンを有する抗体は抗体間で同じエピトープに結合し、試験した抗体の中で17のエピトープグループがあることが分かる。24P4C12 MAbおよびそれぞれのエピトープグループのリストを表VIに示した。

【０４８５】

E.FACSによる親和性の決定

24種類のヒト24P4C12 MAbのパネルを、LNCaP細胞上の24P4C12に対する結合親和性について試験した。LNCaP細胞に対する親和性は、FACSによって、飽和平衡結合アッセイを用いて確かめた。24P4C12 MAbをFACS緩衝液により連続希釈し、最終濃度160～0.003nMで、LNCaP細胞と、4℃で16時間インキュベートした。インキュベーションの終了時に、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、100ulの検出抗体(抗hIgG-PE)と4℃で45分間インキュベートした。次いで、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、2%ホルムアルデヒドで固定し、FACScanを用いて分析した。FACSデータを、CellQuest Proソフトウェアを用いて分析して、各点のヒストグラムおよび平均蛍光強度(MFI)値を得た。MFI値は、Prism4ソフトウェア(Graphpad Software Inc. San Diego California)を用いた非線形回帰を用いて結合親和性を計算するのに使用した。24種類の(24)抗体の親和性値をまとめたものを表VIに示した。

【０４８６】

F.SPRによる親和性決定

精製抗ヒト24P4C12 MAbのパネルを、SPRによって精製組換え24P4C12に対する結合親和性について試験した。簡単に述べると、各精製ヒトMAbを、CM5センサーチップ表面上に捕捉する。平均で約150RUの各MAbをサイクルごとに捕捉する。1nM～100nMの範囲の、5～6種類の一連の組換え24P4C12希釈液をこのような表面上に注入して、CLAMPソフトウェア(Myszka and Morton,1998)を使用して1:1相互作用モデルにグローバルにフィットする結合曲線(センサーグラム)を作成する。K_Dとして表される数種の24P4C12 MAbの親和性は、方程式$K_D = k_{diss}/k_{assoc}$を使用して解離速度定数および会合速度定数によって規定され、表VIIに示した。

【０４８７】

G.カニクイザル24P4C12との交差反応性

24P4C12 MAbを、サル由来の24P4C12と反応する能力についてスクリーニングおよび特徴付けした。この特性は、毒性学上の目的のために、異なるサル種由来の組織における24P4C12の発現を理解するのに有用である。カニクイザル24P4C12遺伝子をクローニングおよび配列決定した。ヒト24P4C12に対する相同性は96.8%である(図7)。24P4C12 MAbは、細胞表面上に存在するカニクイザル24P4C12タンパク質に特異的に結合することが示された(図8)。

【０４８８】

実施例10

抗体免疫媒介性細胞傷害

ADCC(抗体依存性細胞傷害)は、特定の細胞表面抗原を標的する抗体に結合された細胞に対する免疫媒介性の溶解性攻撃である。免疫細胞は、細胞死をもたらす溶解性攻撃を誘発する白血球、単球、およびNK細胞の表面上のFca受容体の結合によって抗体のFc部分を認識する。簡単に述べると、標的抗原24P4C12を発現するように操作したCaki細胞を、インビトロで51クロムと1時間インキュベートする。新鮮な培地で洗浄した後、その標識した細胞を、異なるエフェクター対標的細胞比(E:T比)にて、24P4C12に対する2.5mg/mlヒトMAbおよび新鮮に単離した末梢血単核細胞と一緒にインキュベートする。37℃にて4時間後、その細胞を穏やかに遠心分離し、死細胞から放出された51Crを含む上清を、Betaカウンターにおいてカウントする。

【０４８９】

結果から、エフェクター対標的(E:T)細胞比が増加すると、抗体依存性細胞死滅が増大したことが分かる。アッセイの特異性は、無関係のIgG1コントロールMAbおよび抗体の非存在下での標的細胞およびエフェクター細胞のインキュベーション(細胞＋PBMC)が細胞死滅を引き起こさなかったことを示すことによって確かめられた。

【０４９０】

実施例11

抗体媒介性の二次死滅

24P4C12抗体は、PC3-24P4C12細胞においてサポリン(saporin)依存性死滅を媒介する。

簡単に述べると、1日目に、PC3-24P4C12またはPC3-Neo細胞(500細胞/well)を96ウェルプレートに播種した。翌日、2X濃度の指示された一次抗体と、サポリン毒素と結合体化した2倍過剰の抗ヒト(Hu-Sap)または抗ヤギ(Gt-Sap)ポリクローナル抗体(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA)を含有する等量の培地を、各ウェルに添加した。細胞を37℃で5日間インキュベートした。インキュベーション期間の終了時に、Alamar Blueを各ウェルに添加し、インキュベーションをさらに4時間続けた。プレートリーダーにおいて、530nmの励起波長および590nmの発光波長を用いて、各ウェルの蛍光を確かめた。

【０４９１】

結果から、24P4C12抗体HA5-1(5)1.1、HA5-1(5)2.1およびHA5-acd16.1は、24P4C12を発現するPC3細胞ではサポリン依存性細胞傷害性を媒介したが、Neo遺伝子だけしか感染していないPC3細胞ではサポリン依存性細胞傷害性を媒介しなかったことが分かる。特異性をさらに証明するために、同じ24P4C12一次抗体を、2倍過剰のサポリン結合体化ヤギポリクローナル抗体とインキュベートした。これらの結果は、薬物または細胞傷害性タンパク質を、適切な抗24P4C12 MAbを用いて、24P4C12発現細胞に選択的に送達できることを示している。

【０４９２】

実施例12

F(Ab')2フラグメントの作製

MAbのF(Ab')2フラグメントの作製は、二価抗原結合部位を保持するが、免疫エフェクターFcドメインを欠くMAb分子の効果を、インビトロもしくはインビボの治療モデルにおいて研究するために有用である。一般的に、そのプロトコールは、以下の通りである。20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に溶解した20mgのMabを、固定化したペプシン(Pierce.Rockford IL)と共に、またはこれなしで、指定時間にわたってインキュベートした。インタクトなMAbおよび消化したFcフラグメントを、プロテインAクロマトグラフィーによって除去した。この試薬は、24P4C12発現腫瘍を有する動物を処置するために使用することができる。この抗体フラグメントによって観察される抗腫瘍活性によって、固有の生物学的活性を、免疫依存性機構によって媒介される活性と区別することができる。

【０４９３】

実施例13

組換えDNA方法を用いたヒトMAbの発現

トランスフェクト細胞において24P4C12 MAbを組換え発現させるために、24P4C12 MAb可変重鎖配列および24P4C12 MAb可変軽鎖配列を、それぞれヒト重鎖IgG1および軽鎖Igκ定常領域の上流にクローニングした。完全24P4C12 MAbヒト重鎖カセットおよび完全24P4C12 MAbヒト軽鎖カセットを、クローニングベクター中のCMVプロモーター/エンハンサーの下流にクローニングした。ポリアデニル化部位は、MAbコード配列の下流に含まれた。組換え24P4C12 MAb発現構築物を、293T細胞、Cos細胞およびCHO細胞の中にトランスフェクトした。組換え細胞から分泌された24P4C12 MAbを、細胞表面24P4C12に対する結合について評価する。

【０４９４】

実施例14

24P4C12の腫瘍増殖促進についてのインビボアッセイ

腫瘍細胞の増殖における24P4C12タンパク質の効果を、24P4C12を発現する細胞または24P4C12を欠く細胞の腫瘍発生および腫瘍増殖を評価することによってインビボで評価する。例えば、SCIDマウスに、1×10^{6}個の、空tkNeoベクターもしくは24P4C12を含む結腸癌細胞株を各側腹部に皮下注射する。少なくとも以下の2つの戦略を使用することができる:(1)ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス(英国特許第2,211,504号(1989年7月5日公開)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス2)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノム、または異種の哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから得られるプロモーター、例えば、構成

的プロモーターの調節下における構成的な24P4C12発現。但し、このようなプロモーターは宿主細胞系と適合性である、ならびに(2)誘導性ベクターシステム、例えば、エクジソン、テトラサイクリンなどの制御下における調節された発現。但し、このようなプロモーターは宿主細胞系と適合性である。その後、24P4C12発現細胞がより速い速度で増殖するかどうか、および24P4C12発現細胞によってもたらされた腫瘍が、悪性度が変化した特徴(例えば、転移の増強、血管新生、化学療法剤に対する応答性の低下)を示すかどうかを決定するために、腫瘍体積を、触診可能な腫瘍の出現におけるカリパスによる測定によってモニタリングし、ある期間にわたって追跡する。

【０４９５】

さらに、マウスは、24P4C12が結腸における局所増殖に対する効果を有するかどうか、および24P4C12が細胞の転移能に影響を及ぼすかどうかを確かめるために、1×10^5個の同じ細胞を同所移植することができる(Miki T, et al.,Oncol Res.2001；12:209；Fu X, et al.,Int J Cancer.1991、49:938)。腫瘍形成および腫瘍増殖に対する24P4C12の効果を、結腸腫瘍細胞を脛骨内に注射することによって評価し得る。

【０４９６】

このアッセイはまた、候補治療用組成物、例えば、24P4C12細胞内抗体、24P4C12アンチセンス分子およびリボザイムの24P4C12抑制効果を確かめるのに有用である。

【０４９７】

実施例15

インビボにおける24P4C12モノクローナル抗体媒介性腫瘍阻害

腫瘍組織の細胞表面における24P4C12の顕著な発現と、正常組織における限定的な発現は、24P4C12を抗体療法の良好な標的にする。同様に、24P4C12は、T細胞ベースの免疫療法の標的である。従って、ヒト癌異種移植片マウスモデルにおける24P4C12 MAbの治療有効性を、複数の癌細胞株、例えば、PC3-24P4C12、LNCaP、LAPC9、22RV1、OVCaR-5、HT29、Calu-1、およびCF-PACを使用することによって評価する。

【０４９８】

腫瘍増殖および転移形成に対する抗体の効力を、例えば、マウスの同所性異種移植片モデルにおいて研究する。これらの抗体は、本実施例において議論されるように、結合体化されなくてもよく、当技術分野において認識されるように、治療様式に結合体化されてもよい。24P4C12 MAbは、結腸癌異種移植片の形成を阻害する。24P4C12 MAbはまた、確立された同所腫瘍の増殖を遅延させ、腫瘍を有するマウスの生存を延長させる。これらの結果は、局所性のかつ進行段階にある結腸癌および表Iに示した癌の処置における、24P4C12 MAbの有用性を示す。

【０４９９】

24P4C12 MAbの投与は、確立された同所腫瘍増殖の遅延および遠位部位への転移の阻害をもたらし、腫瘍を有するマウスの生存を大幅に延長する。これらの研究は、24P4C12が免疫療法の魅力的な標的であること示し、局所性かつ転移性の結腸癌の処置に関する、24P4C12 MAbの治療能を証明する。本実施例は、非結合体化24P4C12 MAbが、SCIDマウスにおいて増殖させたヒト結腸腫瘍異種移植片の増殖を阻害するのに有効であり、従って、このような有効なMAbの組み合わせに有効であることを証明する。

【０５００】

複数の24P4C12 MAbを使用した腫瘍の阻害

材料および方法

24P4C12モノクローナル抗体:

モノクローナル抗体を、「24P4C12モノクローナル抗体(MAb)の作製」という表題の実施例に記載のように、24P4C12に対して産生した。これらのMAbを、24P4C12に結合する能力について、ELISA、ウエスタンブロット、FACS、および免疫沈降によって特徴付ける。ELISAおよびウエスタン分析によって決定された、24P4C12 MAbのエピトープマッピングデータは、24P4C12タンパク質上のエピトープを認める。これらの抗体を用いて、正常および癌の組織および細胞の免疫組織化学的な分析を行う。

【０５０１】
MAbを、プロテインG Sepharoseクロマトグラフィーまたはプロテイン A Sepharoseクロマトグラフィーによって腹水またはハイブリドーマ組織の培養上清から精製し、PBSに対して透析し、フィルター滅菌し、-20℃で保存する。タンパク質の確認を、Bradfordアッセイ(Bio-Rad、Hercules、CA)によって行う。治療用MAbまたは個々のMAbの混合物を含むカクテルを調製し、UG-K3腫瘍異種移植片およびRXF-393腫瘍異種移植片の、皮下注射または同所注射を受けたマウスの処置のために使用する。
【０５０２】
細胞株および異種移植片
癌細胞株PC3-24P4C12、LNCaP、LAPC9、22RV1、OVCaR-5、HT29、Calu-1、およびCF-PACを、L-グルタミンおよび10％ FBSを補充したRPMIおよびDMEMにおいて維持する。
【０５０３】
異種移植片を、皮下トロカール移植(Craft,N.,et al., Nat Med.1999,5:280)によって6～8週齢の雄ICR-重症複合免疫不全(SCID)マウス(Taconic Farms)において継代する。腫瘍細胞の単一細胞懸濁物を、Craftらに記載のように調製する。他の細胞株も同様に使用する。
【０５０４】
異種移植片マウスモデル
皮下(s.c.)腫瘍は、Matrigel(Collaborative Research)と1:1に希釈して混合した1×106個の癌細胞を、雄SCIDマウスの右側腹部に注射することによって作製する。腫瘍形成に対する抗体の効力を試験するために、すなわち、抗体の注射を、腫瘍細胞の注射と同じ日に始める。コントロールとして、マウスに、精製したマウスIgG(ICN)もしくはPBS；またはヒト細胞中で発現されない無関係の抗原を認識する精製したMAbのいずれかを注射する。予備的な研究では、腫瘍増殖において、マウスIgGまたはPBSの間に、違いは見出されない。腫瘍のサイズをカリパスによる測定によって求め、腫瘍体積を長さ×幅×高さとして計算する。直径が1.5cmより大きい皮下腫瘍を有するマウスを、屠殺する。
【０５０５】
同所注射を、ケタミン/キシラジンを使用することによる麻酔下で行う。腫瘍増殖をモニタリングするために、マウスを触診する。マウスを適切な処置の群に分け、24P4C12 MAbまたはコントロールMAbを腹腔内注射する。
【０５０６】
24P4C12 MAbは、24P4C12を発現する異種移植片腫瘍の増殖を阻害する
腫瘍形成に対する24P4C12 MAbの効果を、同所モデルを使用することによって試験する。皮下腫瘍モデルと比較すると、この同所モデルは、マウスに直接、腫瘍細胞を注射することを必要とし、局所的な腫瘍増殖、遠位部位における転移の発生、マウスの健康の悪化、およびその後の死を生じる。これらの特徴のために、同所モデルはヒトの疾患の進行を代理するものであり、本発明者らは、臨床的に関連するエンドポイントに対する24P4C12 MAbの治療効果を追跡すること可能にする。
【０５０７】
従って、腫瘍細胞をマウスに注射し、2日後、マウスを2つの群に分け、1週間に3回、2週間から5週間にわたって、a)250～1000μgの24P4C12 MAb、またはb)コントロール抗体を用いて処置する。
【０５０８】
同所癌モデルの主な利点は、転移の発生を研究できることである。確立された同所腫瘍を有するマウスにおける転移の形成を、組織切片に対するIHC分析によって研究する。
【０５０９】
異種移植片癌モデルの別の利点は、新生血管形成および新脈管形成を研究できることである。腫瘍増殖は、新しい血管の発達に部分的に依存する。毛細血管系および血液ネットワークの発達は宿主由来のものであるが、新生血管系(neovasculature)の惹起および構築は、異種移植片腫瘍によって調節される(Davidoff, et al.,Clin Cancer Res.(2001)7:28

70；Solesvik, et al.,Eur J Cancer Clin Oncol.(1984)20:1295)。新生血管形成に対する抗体および低分子の効果を、腫瘍組織およびそれらを囲む微小環境のIHC分析のような当技術分野で公知の手順に従って研究する。

【０５１０】

確立された同所腫瘍を有するマウスに、4週間にわたって24P4C12 MAbまたはコントロール抗体のいずれかの注射を投与する。両方の群におけるマウスは、高い全身腫瘍組織量を確立して、マウスの肺における高頻度の転移形成を確実にする。その後、マウスを殺し、それらの膀胱、肝臓、骨および肺を、腫瘍細胞の存在についてIHC分析によって分析する。これらの研究は、異種移植片マウスモデルにおける癌のイニシエーションおよび進行に対する、抗24P4C12抗体の広範な抗腫瘍効力を示す。抗24P4C12抗体は腫瘍の腫瘍形成を阻害し、既に確立された腫瘍の増殖を遅延させ、処置したマウスの生存を延長させる。さらに、24P4C12 MAbは、大きな全身腫瘍組織量の存在下でさえ、遠位部位への局所腫瘍の拡散に対する劇的な抑制効果を証明する。従って、24P4C12 MAbは、主要な臨床的に関連するエンドポイント(腫瘍増殖)、生存の延長、および健康に対して有効である。

【０５１１】

これらの実験の結果から、24P4C12 MAbは、表Iに示した癌を処置および管理するために治療目的および予防目的に使用できることが分かる。

【０５１２】

実施例16

ヒトにおける抗24P4C12抗体の治療的使用および診断的使用

抗24P4C12モノクローナル抗体は、ヒトにおいて、診断目的、予防目的、予後目的および/または治療目的のために安全かつ有効に使用される。抗24P4C12 MAbを用いた癌組織および癌異種移植片のウエスタンブロットならびに免疫組織化学的な分析は、癌腫において強い広範な染色を示すが、正常組織において著しく低いレベルまたは検出不可能なレベルを示す。癌腫および転移性の疾患における24P4C12の検出は、診断指標および/または予後指標としてのMAbの有用性を証明する。従って、抗24P4C12抗体は、疑わしい患者から癌を検出するために、診断用途、例えば、腎臓の生検標本の免疫組織化学において使用される。

【０５１３】

フローサイトメトリーによって確かめられるように、抗24P4C12 MAbは癌腫細胞に特異的に結合する。従って、抗24P4C12抗体は、24P4C12の発現を示す局所的かつ転移性の癌の検出のために、全身を画像化する診断用途、例えば、ラジオイムノシンチグラフィーおよび放射免疫療法(例えば、Potamianos S., et al.,Anticancer Res20(2A):925-948(2000)を参照のこと)において使用される。アルカリ性ホスホジエステラーゼB10について見られる(Meerson、N.R.、Hepatology27:563-568(1998))ような、細胞外環境への24P4C12細胞外ドメインの脱落(shedding)または放出は、疑わしい患者から得た血清サンプルおよび/または尿サンプルにおける、抗24P4C12抗体による24P4C12の診断的検出を可能にする。

【０５１４】

24P4C12を特異的に結合する抗24P4C12抗体は、24P4C12を発現する癌の処置のための治療用途において使用される。抗24P4C12抗体を、非結合体化様式として、および当技術分野において周知の種々の治療様式または画像化様式、例えば、プロドラッグ、酵素、毒素、または放射性同位体の1つに抗体が取り付けられた結合体化形態として使用する。前臨床試験において、結合体化していない抗24P4C12抗体および結合体化した抗24P4C12抗体を、SCIDマウス癌異種移植片モデル、例えば、結腸癌モデル(例えば、「インビボにおける腫瘍の24P4C12モノクローナル抗体媒介性の阻害」という表題の実施例を参照のこと)における腫瘍の予防および増殖阻害の効力について試験する。結合体化した抗24P4C12抗体および結合体化していない抗24P4C12抗体のいずれかを、単独でまたは以下の実施例に記載されるような他の処置との組み合わせて、ヒトの臨床試験における治療様式として使用する。

【０５１５】

実施例17

24P4C12 MAbを用いてヒトの癌腫を処置および診断するためのヒト臨床試験

24P4C12上のエピトープを認識する抗体を本発明に従って使用し、特定の腫瘍、好ましくは、表Iに列挙した腫瘍の処置において使用した。これらの指標の各々と関連して、3つの臨床的アプローチを、首尾よく実行する。

【０５１６】

I.)補助的療法:補助的療法において、患者を、化学療法剤もしくは抗腫瘍性薬剤および/または放射線療法あるいはそれらの組み合わせと組み合わせた24P4C12 MAb(裸の24P4C12 MAbまたは薬剤と結合体化した24P4C12 MAb)によって処置する。原発癌の標的、例えば、表Iに列挙した癌を、24P4C12 MAbを標準的な一次治療および二次治療に加えることによって標準的なプロトコールの下で処置する。プロトコールの設計は、以下の例によって評価されるような有効性を取り扱う。原発性または転移性の病変の腫瘍塊の縮小、無増悪生存期間の延長、全生存、患者の健康の改善、疾患の安定化、ならびに標準的な化学療法および他の生物学的薬剤の常用量を減少させる能力が含まれるが、これに限定されない。これらの投薬量の減少は、化学療法剤または生物学的薬剤の用量関連毒性を減少させることによって、さらなる療法および/または長期の療法を可能にする。24P4C12 MAbは、化学療法剤または抗腫瘍性薬剤と組み合わせて、数種の補助的な臨床試験において利用される。

【０５１７】

II.)単独療法:腫瘍の単独療法における24P4C12 MAb(裸の24P4C12 MAbまたは結合体化24P4C12 MAb)の使用に関連して、この抗体は、化学療法剤または抗腫瘍性薬剤を伴わずに患者に投与される。一態様において、単独療法を、広範囲の転移疾患を有する末期癌患者において臨床的に行う。プロトコールの設計は、以下の例によって評価されるような有効性を取り扱う。原発性または転移性の病変の腫瘍塊の縮小、無増悪生存期間の延長、全生存、患者の健康の改善、疾患の安定化、ならびに標準的な化学療法および他の生物学的薬剤の常用量を減少させる能力が含まれるが、これに限定されない。

【０５１８】

III.)造影剤:放射性核種(例えば、ヨウ素またはイットリウム(I^{131}、Y^{90}))を24P4C12 MAbに結合させることによって、放射性標識した抗体を、診断剤および/または造影剤として利用する。このような役割において、標識した抗体は、固形腫瘍、および24P4C12を発現する細胞の転移性病変の両方に局在化する。造影剤としての24P4C12 MAbの使用に関連して、この抗体は、術前スクリーニング、および腫瘍が残存する、かつ/または再発したことを確かめるための術後の追跡調査の両方の場合に、固形腫瘍の外科的処置の補助剤として使用する。一態様において、(^{111}In)-24P4C12抗体を、24P4C12を発現する癌腫を有する患者において、ヒトの第1相臨床試験中で造影剤として使用する(類推による。例えば、Divgi, et al.,J.Natl.Cancer Inst.83:97-104(1991)を参照のこと)。患者を、標準的な前後(anterior and posterior)γカメラによって追跡する。この結果は、原発性の病変および転移性の病変が同定されることを示す。

【０５１９】

投薬

投薬レジメンを、最適な所望の応答をもたらすように調整することができる。例えば、単一のボーラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を、ある期間にわたって投与してもよく、またはその用量は、治療状況の難局により示されるように、比例して減少または増加してもよい。投与の容易さおよび投薬の均一性のために単位剤形で非経口組成物を処方することが特に有利である。本明細書中で使用される場合、単位剤形態とは、処置される哺乳動物被験体に対する単一の投薬として適した物理的に分離した単位をいう。所定の量の活性化合物を含む各単位は、必要とされる薬学的担体と関係して所望の治療効果をもたらすように算出される。本発明の単位剤形の仕様は、(a)その抗体の特有の特徴および達成される特定の治療効果または予防効果、ならびに(b)個体における処置の感受性に関する、このような活性化合物を配合する分野に固有の制限によって決められ、それらに直接依存する。

【０５２０】
本発明に従って組み合わせて投与される抗体の治療的有効量についての例示的、非限定的な範囲は、少なくとも1mg/kg、少なくとも5mg/kg、少なくとも10mg/kg、10mg/kgよりも多い、または少なくとも15mg/kg、例えば、1～21mg/kg、または、例えば、5～21mg/kg、または、例えば、5～18mg/kg、または、例えば、10～18mg/kg、または、例えば、15mg/kgである。本発明の高用量の態様は、10mg/kgよりも多い投薬量に関する。投薬量の値が緩和されるべき状態の型および重篤度によって変動し得、単一用量または複数用量を含んでもよいことに留意すべきである。任意の特定の被験体に関して、特定の投薬レジメンは、個々のニーズ、および組成物を投与するか、組成物の投与を監督する者の専門的な判断に従って、ある期間にわたって調整すべきであること、ならびに本明細書中に示した投薬量の範囲は単なる例示であり、特許請求の範囲の組成物の範囲または実施を限定することを意図しないことがさらに理解されるべきである。

【０５２１】
臨床開発計画(CDP)
CDPは、補助的療法、単独療法に関連した24P4C12 MAbによる処置および/または造影剤としての24P4C12 MAbを追求し、開発する。試験は最初に安全性を証明し、その後、反復投与での効力を確認する。試験は、標準的な化学療法と24P4C12 MAbを加えた標準的な療法とを比較する非盲検である。認識される通り、患者の登録に関して利用することができる1つの非限定的な基準は、生検によって決定されるような、患者の腫瘍における24P4C12の発現レベルである。

【０５２２】
任意のタンパク質または抗体の注入に基づく治療と同様に、安全上の問題は、主に以下：(i)サイトカイン放出症候群、すなわち、低血圧、発熱、震え、悪寒；(ii)その物質に対する免疫原性応答の発生(すなわち、その抗体治療に対する患者によるヒト抗体の発生、すなわちHAHA反応)；および(iii)24P4C12を発現する正常細胞に対する毒性に関する。標準的な検査および追跡調査を、これらの安全上の問題の各々をモニタリングするために利用する。24P4C12 MAbは、ヒトへの投与において安全であることが見出された。

【０５２３】
実施例18
24P4C12の機能研究および24P4C12 Mabの阻害研究
10回膜貫通ドメインタンパク質である24P4C12は、多膜貫通タンパク質であるコリン輸送体様(CTL)ファミリーのメンバーであり、このファミリーのメンバー4(CTL4)である。このファミリーはまた、最近、HUGO遺伝子命名委員会によって溶質輸送体ファミリー44(SLC44)と名付けられ、24P4C12はSLC44A4(溶質輸送体ファミリー44、メンバー4)と名付けられた。このファミリーは、最初に、CTL1のクローニングおよび機能分析によって同定された。この遍在発現タンパク質はCDw92とも知られ、ナトリウム非依存的にコリンを輸送することが示された。24P4C12は、アミノ酸レベルではCTL1と46％相同であり、従って、24P4C12もまた高分子またはイオン輸送体として機能すると推測される。参考のために、24P4C12およびCTL1それぞれの膜トポロジーを図10および図11に示した。

【０５２４】
潜在的な細胞外アスパラギン結合型グリコシル化残基を紫色で示し、ジスルフィド結合に用いられる潜在的な細胞外システインを緑色で示した。膜貫通ドメイン内の荷電アミノ酸も示した。塩基性アミノ酸残基であるアルギニン、ヒスチジン、およびリジンを青色で示し、酸性残基グルタミン酸を赤色で示した。これらの荷電残基は、ヘリックスの正しい三次構造および/またはタンパク質によって形成されたチャンネルもしくはポア構造を通る高分子もしくはイオンの移動を媒介することによって、タンパク質の輸送機能に重要である可能性が高い。CTL1はコリン輸送体として機能することが報告されているが、CTL1と比較して24P4C12の膜貫通トポロジーならびに荷電アミノ酸の数および間隔が異なるために、たぶん、24P4C12は、コリン以外の高分子またはイオンの輸送を媒介するだろう。

【０５２５】

24P4C12は、前立腺、結腸、小腸、肺気管支、膵臓、およびこれらの組織に由来する癌腫を含む、数種の分泌腺上皮の頂端膜において発現する。24P4C12は、正常前立腺の頂端膜において顕著に発現する。前立腺の主な生物学的機能は、前立腺液を作り出し、分泌することである。24P4C12は輸送体として作用して、前立腺液の組成物を調節すると考えられる。一態様において、24P4C12の基質は前立腺液に存在する。前立腺液に存在する24P4C12の基質を表VIIに列挙した。前立腺液中のカリウム濃度(30～50mM)は血清(3～4mM)と比較して高く、従って、別の態様において、24P4C12はカリウムを輸送するか、別の高分子の輸送の際に対イオンとしてカリウムを利用する。

【０５２６】

24P4C12の輸送活性を確認するために、MDCK-24P4C12細胞は、高い細胞外カリウム(K+)濃度に曝露された時に、コントロールneo細胞と比較して、pH感受性蛍光色素である二酢酸クロロメチルフルオレセイン(CMFDA)蛍光の減少を示す。この結果は細胞内pHの低下を示しており、24P4C12の輸送活性はK+および/またはH+イオンが関与することを示唆している(図12)。

【０５２７】

さらに、前立腺液はわずかに酸性であり、6.4～6.8のpH範囲を示す。従って、24P4C12はまた、前立腺液のpHホメオスタシスも調節している可能性がある。MDCK-24P4C12細胞は、プロピオン酸ナトリウムにより酸性化された培地に曝露された時に、コントロールneo細胞と比較して、CMFDA蛍光の著しい減少を示す。これらの結果は、24P4C12が、低pH環境に曝露された時に、細胞の細胞内pHホメオスタシスを調節している可能性があることを示唆している(図13)。

【０５２８】

別の態様において、24P4C12の輸送活性は、細胞外環境のpH変化に応じて細胞内pHを調節することを伴う。前立腺液に存在する高分子およびイオンの多くは、24P4C12を発現する他の器官の頂端上皮が入っている体液または24P4C12を発現する他の器官の頂端上皮が分泌した体液にも存在する。このような器官には、肺気管支、結腸、小腸、膵臓、および腎臓が含まれるが、これに限定されない。24P4C12の輸送活性は、これらの器官における体液のホメオスタシスおよび分泌を調節している可能性がある。消化管および肺気管支を含む器官に存在する体液の組成物に基づく24P4C12輸送体活性の他の基質を、表VIIIに列挙した。

【０５２９】

正常組織の発癌プロセスの間に、腫瘍細胞は、腫瘍増殖および転移を促進する有益な栄養分、イオン、高分子、またはシグナル伝達経路をもたらす輸送活性を適合させるか、またはアップレギュレートすることがある。24P4C12輸送活性は、このような利益を腫瘍にもたらすかもしれない。従って、24P4C12輸送活性をブロックまたはダウンレギュレートする24P4C12 MAbは、腫瘍増殖を阻害するまたは細胞死を媒介することによって治療上の利益をもたらすだろう。一態様において、24P4C12 MAbは24P4C12タンパク質に結合し、輸送活性を媒介するチャンネルまたはポアを立体的にブロックする。別の態様において、24P4C12 MAbは24P4C12に結合して、輸送活性を破壊する立体構造変化を引き起こす。さらなる態様において、24P4C12 MAbは、細胞表面からの24P4C12のキャッピング、内部移行、およびダウンレギュレーションを媒介する。

【０５３０】

図14は、24P4C12 MAbが結合した時の、PC3-24P4C12細胞上での24P4C12タンパク質のキャッピングおよび内部移行を示す。簡単に述べると、MAb Ha5-7acd19、Ha5-7be37、およびHa5-3(1,4)7を、製造業者の説明書(Invitrogen, Carlsbad CA)に従って、Alexa Fluor 488蛍光色素で標識した。PC3-24P4C12細胞を、標識MAbと4℃で2時間インキュベートした。洗浄後、細胞を4℃に保つか、または37℃に2時間移した。次いで、細胞を固定し、蛍光顕微鏡で調べた。MAbとインキュベートし、4℃に保った細胞の蛍光写真を、図14Aに示した。これは、24P4C12タンパク質の細胞表面染色を示している。図14Bは、MAbで染色し、次いで、37℃で2時間インキュベートした細胞の蛍光写真を示す。これらの細胞は、リン

グ状の細胞表面染色および明るい点の外観の消失を示しており、点状の蛍光は、24P4C12タンパク質のMAbを介したキャッピングおよび内部移行を示している。

【０５３１】

このようなキャッピングおよび内部移行は、細胞表面から24P4C12輸送活性を取り除き、それにより、腫瘍細胞に対する抑制効果をもたらす。

【０５３２】

実施例19

癌患者標本における24P4C12タンパク質のIHCによる検出

免疫組織化学により、24P4C12タンパク質の発現を膵臓癌および卵巣癌の腫瘍標本において試験した。簡単に述べると、ホルマリン固定、パラフィン包埋した組織を4ミクロン切片に切断し、ガラススライドにのせた。切片を脱ろうし、再水和し、トリプシン溶液(0.05％塩化カルシウムに溶解した0.05％トリプシン(ICN, Aurora, Ohio),pHを7.8に調節)で37℃で10分間処理した。次いで、切片を3％過酸化水素溶液で処理して、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活性化した。無血清タンパク質ブロック(Dako, Carpenteria, CA)を用いて、モノクローナルマウス抗24P4C12抗体とのインキュベーション前に非特異的結合を阻害した。その後に、切片を、Super Enhancer(商標)試薬中でのインキュベーションと、その後の、ポリマー-HRP二次抗体結合体(BioGenex, San Ramon, CA)とのインキュベーションからなるSuper Sensitive(商標)-ポリマー-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)検出システムで処理した。次いで、切片を、DABキット(BioGenex, San Ramon, CA)を用いて発色させ、核を、ヘマトキシリンを用いて染色し、明視野顕微鏡観察法によって分析した。24P4C12抗体と免疫反応性の抗原を含有する細胞は茶色に染色される。

【０５３３】

結果は、ヒト卵巣癌組織および膵臓癌組織の腫瘍細胞における24P4C12の発現を示している。これらの結果から、24P4C12はヒト癌において発現し、この抗原に対する抗体は診断および治療の目的に有用であることが分かる(図15Aおよび図15B)。

【０５３４】

本願全体を通して、種々のウェブサイトのデータコンテンツ、刊行物、特許出願および特許が参照される(ウェブサイトは、ワールドワイドウェブ上のアドレスである、ユニフォームリソースロケーター(Uniform Resource Locator)、すなわち、URLによって参照される)。これらの参照の各々の開示は、本明細書によってその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０５３５】

本発明は、本明細書中に開示される態様によって範囲が限定されるべきではなく、この態様は、本発明の個々の局面の単一の例示として意図され、機能的に等価である任意の態様が本発明の範囲内である。本明細書中に記載されるものに加えて、本発明のモデルおよび方法に対する種々の改変は、前述の説明および開示から当業者に明らかとなり、同様に本発明の範囲内に含まれることが意図される。このような改変または他の態様は、本発明の真の範囲および精神から逸脱することなく実施することができる。

【０５３６】

表

（表Ｉ）悪性である場合に24P4C12を発現する組織

結腸
膵臓
卵巣
乳房
肺
前立腺

【０５３７】

（表ＩＩ）アミノ酸の略語

一文字	三文字	フルネーム
F	Phe	フェニルアラニン
L	Leu	ロイシン
S	Ser	セリン
Y	Tyr	チロシン
C	Cys	システイン
W	Trp	トリプトファン
P	Pro	プロリン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
I	Ile	イソロイシン
M	Met	メチオニン
T	Thr	スレオニン
N	Asn	アスパラギン
K	Lys	リジン
V	Val	バリン
A	Ala	アラニン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
G	Gly	グリシン

【０５３８】

（表ＩＩＩ）アミノ酸置換行列

GCG Software 9.0 BLOSUM62アミノ酸置換行列(ブロック置換行列)から編集。値が大きければ大きいほど、関連する天然タンパク質において置換が見つかる可能性は高くなる。

```
A  C  D  E  F  G  H  I  K  L  M  N  P  Q  R  S  T  V  W  Y  .
4  0 -2 -1 -2  0 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 -1 -1  1  0  0 -3 -2 A
   9 -3 -4 -2 -3 -3 -1 -3 -1 -1 -3 -3 -3 -3 -1 -1 -1 -2 -2 C
      6  2 -3 -1 -1 -3 -1 -4 -3  1 -1  0 -2  0 -1 -3 -4 -3 D
         5 -3 -2  0 -3  1 -3 -2  0 -1  2  0  0 -1 -2 -3 -2 E
            6 -3 -1  0 -3  0  0 -3 -4 -3 -3 -2 -2 -1  1  3 F
               6 -2 -4 -2 -4 -3  0 -2 -2 -2  0 -2 -3 -2 -3 G
                  8 -3 -1 -3 -2  1 -2  0  0 -1 -2 -3 -2  2 H
                     4 -3  2  1 -3 -3 -3 -3 -2 -1  3 -3 -1 I
                        5 -2 -1  0 -1  1  2  0 -1 -2 -3 -2 K
                           4  2 -3 -3 -2 -2 -2 -1  1 -2 -1 L
                              5 -2 -2  0 -1 -1 -1  1 -1 -1 M
                                 6 -2  0  0  1  0 -3 -4 -2 N
                                    7 -1 -2 -1 -1 -2 -4 -3 P
                                       5  1  0 -1 -2 -2 -1 Q
                                          5 -1 -1 -3 -3 -2 R
                                             4  1 -2 -3 -2 S
                                                5  0 -2 -2 T
                                                   4 -3 -1 V
                                                     11  2 W
                                                         7 Y
```

【０５３９】

（表ＩＶ）HLAクラスI/IIモチーフ/スーパーモチーフ

表IV(A):HLAクラスIスーパーモチーフ/モチーフ

スーパーモチーフ	位置	位置	位置
	2(一次アンカー)	3(一次アンカー)	C末端 (一次アンカー)
A1	**TI***LVMS*		**FWY**
A2	**LIVM***ATQ*		**IV***MATL*
A3	**VSMA***TLI*		**RK**
A24	**YF***WIVLMT*		**FI***YWLM*
B7	**P**		**VILF***MWYA*
B27	**RHK**		**FYL***WMIVA*
B44	**E***D*		**FWYLIMVA**
B58	**ATS**		**FWY***LIVMA*
B62	**QL***IVMP*		**FWY***MIVLA*
モチーフ			
A1	**TSM**		**Y**
A1		**DE***AS*	**Y**
A2.1	**LM***VQIAT*		**V***LIMAT*
A3	**LMVISATF***CGD*		**KYR***HFA*
A11	**VTMLISAGN***CDF*		**K***RYH*
A24	**YF***WM*		**FLIW**
A*3101	**MVT***ALIS*		**R***K*
A*3301	**MVALF***IST*		**RK**
A*6801	**AVT***MSLI*		**RK**
B*0702	**P**		**LMF***WYAIV*
B*3501	**P**		**LMFWY***IVA*
B51	**P**		**LIVF***WYAM*
B*5301	**P**		**IMFWY***ALV*
B*5401	**P**		**ATIV***LMFWY*

太字の残基が好ましく、イタリック体の残基はあまり好ましくない。ペプチドは、それぞれの一次アンカー位置に、上の表において特定されたモチーフまたはスーパーモチーフの一次アンカーがあれば、モチーフがあるとみなされる。

表IV(B):HLAクラスIIスーパーモチーフ

1	6	9
W, F, Y, V, .I, L	A, V, I, L, P, C, S, T	A, V, I, L, C, S, T, M, Y

表IV(C):HLAクラスIIモチーフ

モチーフ		1°アンカー1	2	3	4	5	1°アンカー6	7	8	9
DR4	好ましい	FMY*LIVW*	M	T		I	VST*CPALIM*	MH		MH
	有害				W			R		WDE
DR1	好ましい	MF*LIVWY*			PAMQ		VMAT*SPLIC*	M		AVM
	有害		C	CH	FD	CWD		GDE	D	
DR7	好ましい	MF*LIVWY*	M	W	A		IVMSA*CTPL*	M		IV
	有害		C		G			GRD	N	G
DR3	モチーフ	1°アンカー1	2	3	1°アンカー4	5	1°アンカー6			
モチーフa好ましい		LIVMFY			D					
モチーフb好ましい		LIVMFAY			DNQEST		KRH			
DRスーパーモチーフ		MF*LIVWY*					VMSTA*CPLI*			

イタリック体の残基はあまり好ましくない、すなわち「許容可能な」残基を示す。

表IV(D):HLAクラスIスーパーモチーフ

スーパーモチーフ	位置	1	2	3	4	5	6	7	8	C末端
A1			1°アンカー TI*LVMS*							1°アンカー FWY
A2			1°アンカー LIVM*ATQ*							1°アンカー LIVMAT
A3	好ましい		1°アンカー VSMA*TLI*	YFW (4/5)			YFW (3/5)	YFW (4/5)	P (4/5)	1°アンカー RK
	有害	DE (3/5); P (5/5)		DE (4/5)						
A24			1°アンカー YF*WIVLMT*							1°アンカー FIY*WLM*
B7	好ましい	FWY (5/5) LIVM (3/5)	1°アンカー P	FWY (4/5)					FWY (3/5)	1°アンカー VILF*MWYA*
	有害	DE (3/5); P(5/5); G(4/5); A(3/5); QN(3/5)				DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	DE (4/5)	
B27			1°アンカー RHK							1°アンカー FYL*WMIVA*
B44			1°アンカー E*D*							1°アンカー FWYLIMVA
B58			1°アンカー ATS							1°アンカー FWY*LIVMA*
B62			1°アンカー QL*IVMP*							1°アンカー FWY*MIVLA*

イタリック体の残基はあまり好ましくない、すなわち「許容可能な」残基を示す。

表IV(E):HLAクラスIモチーフ

位置		1	2	3	4	5	6	7	8	9	C末端
										または C末端	
A1 9-mer	好ましい	GFYW	1°アンカー STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	1°アンカー Y	
	有害	DE		RHKLIVMP	A	G	A				
A1 9-mer	好ましい	GRHK	ASTCLIVM	1°アンカー DE*AS*	GSTC		ASTC	LIVM	DE	1°アンカー Y	
	有害	A	RHKDEPYFW		DE	PQN	RHK	PG	GP		
A1 10-mer	好ましい	YFW	1°アンカー STM	DEAQN	A	YFWQN		PASTC	GDE	P	1°アンカー Y
	有害	GP		RHKGLIVM	DE	RHK	QNA	RHKYFW	RHK	A	
A1 10-mer	好ましい	YFW	STCLIVM	1°アンカー DE*AS*	A	YFW		PG	G	YFW	1°アンカー Y
	有害	RHK	RHKDEPYFW			P	G		PRHK	QN	
A2.1 9-mer	好ましい	YFW	1°アンカー LM*IVQAT*	YFW	STC	YFW		A	P	1°アンカー V*LIMAT*	
	有害	DEP		DERKH			RKH	DERKH			
A2.1 10-mer	好ましい	AYFW	1°アンカー LM*IVQAT*	LVIM	G		*G*		FYWL VIM		1°アンカー V*LIMAT*
	有害	DEP		DE	RKHA	P		RKH	DERK H	RKH	
A3	好ましい	RHK	1°アンカー LMVISATFCGD	YFW	PRHKYF W	A	YFW		P	1°アンカー KYR*HFA*	
	有害	DEP		DE							
A11	好ましい	A	1°アンカー VTLMISAGN*CD F*	YFW	YFW	A	YFW	YFW	P	1°アンカー K*RYH*	
	有害	DEP						A	G		
A24 9-mer	好ましい	YFWRHK	1°アンカー YFW*M*		STC			YFW	YFW	1°アンカー FLIW	
	有害	DEG		DE	G	QNP	DERH K	G	AQN		
A24 10-mer	好ましい		1°アンカー YFW*M*		P	YFWP		P			1°アンカー FLIW
	有害			GDE	QN	RHK	DE	A	QN	DEA	
A3101	好ましい	RHK	1°アンカー MVT*ALIS*	YFW	P		YFW	YFW	AP	1°アンカー R*K*	
	有害	DEP		DE		ADE	DE	DE	DE		
A3301	好ましい		1°アンカー MVALF*IST*	YFW				AYFW		1°アンカー RK	
	有害	GP		DE							
A6801	好ましい	YFWSTC	1°アンカー AVT*MSLI*			YFWLIV M		YFW	P	1°アンカー RK	
	有害	GP		DEG		RHK			A		
B0702	好ましい	RHKFWY	1°アンカー P	RHK		RHK	RHK	RHK	PA	1°アンカー LMF*WYAI V*	
	有害	DEQNP		DEP	DE	DE	GDE	QN	DE		
B3501	好ましい	FWYLIVM	1°アンカー P	FWY				FWY		1°アンカー LMFWY*IV A*	
	有害	AGP				G	G				

	位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C末端
										または C末端	
B51	好ましい	LIVMFWY	1°アンカー P	FWY	STC	FWY		G	FWY	1°アンカー LIVF*WYA M*	
	有害	AGPDER HKSTC				DE	G	DEQN	GDE		
B5301	好ましい	LIVMFWY	1°アンカー P	FWY	STC	FWY		LIVMFW Y	FWY	1°アンカー IMFWY*AL V*	
	有害	AGPQN					G	RHKQN	DE		
B5401	好ましい	FWY	1°アンカー P	FWYLIVM		LIVM		ALIVM	FWYA P	1°アンカー ATIV*LMF WY*	
	有害	GPQNDE		GDESTC		RHKDE	DE	QNDGE	DE		

表IV(F):

HLAスーパータイプの概要

異なる民族集団におけるHLAスーパータイプの全表現型頻度

スーパータイプ	特異性 位置	C末端	表現型頻度 白人	N.A. 黒人	日本人	中国人	ヒスパニック	平均
B7	P	AILMVFWY	43.2	55.1	57.1	43.0	49.3	49.5
A3	AILMVST	RK	37.5	42.1	45.8	52.7	43.1	44.2
A2	AILMVT	AILMVT	45.8	39.0	42.4	45.9	43.0	42.2
A24	YF (WIVLMT)	FI (YWLM)	23.9	38.9	58.6	40.1	38.3	40.0
B44	E (D)	FWYLIMVA	43.0	21.2	42.9	39.1	39.0	37.0
A1	TI (LVMS)	FWY	47.1	16.1	21.8	14.7	26.3	25.2
B27	RHK	FYL (WMI)	28.4	26.1	13.3	13.9	35.3	23.4
B62	QL (IVMP)	FWY (MIV)	12.6	4.8	36.5	25.4	11.1	18.1
B58	ATS	FWY (LIV)	10.0	25.1	1.6	9.0	5.9	10.3

表IV(G):

異なるHLAスーパータイプの組み合わせにより生じる集団カバー率の計算値

HLAスーパータイプ	表現型頻度 白人	N.A. 黒人	日本人	中国人	ヒスパニック	平均
A2, A3および B7	83.0	86.1	87.5	88.4	86.3	86.2
A2, A3, B7, A24, B44 およびA1	99.5	98.1	100.0	99.5	99.4	99.3
A2, A3, B7, A24, B44, A1, B27, B62, およびB 58	99.9	99.6	100.0	99.8	99.9	99.8

モチーフは、スーパータイプの特異性を規定している残基を示す。モチーフは、スーパータイプ内の複数のアレルによって認められると公表データに基づいて確かめられた残基を組み込んでいる。カッコ内の残基は、スーパータイプ内の複数のアレルによって許容可能であると推定された、さらなる残基である。

【０５４０】

（表Ｖ）頻繁に現れるモチーフ

名称	平均同一性（%）	説明	可能性のある機能
zf-C2H2	34%	ジンクフィンガー、C2H2型	核酸結合タンパク質は転写因子として機能する。おそらく、核に位置する
チトクロム_b_N	68%	チトクロムb(N末端)/b6/petB	膜結合型オキシダーゼ、スーパーオキシドを発生する
Ig	19%	免疫グロブリンドメイン	ドメインは百アミノ酸長であり、保存されたドメイン内ジスルフィド結合を含む
WD40	18%	WDドメイン、G-β反復	約40残基からなる縦列反復であり、それぞれTrp-Aspモチーフを含む。シグナル伝達およびタンパク質相互作用において機能する
PDZ	23%	PDZドメイン	膜下部位へのシグナル伝達分子の標的化において機能し得る
LRR	28%	ロイシンリッチ反復	タンパク質間相互作用に関与する短い配列モチーフ
Pキナーゼ	23%	プロテインキナーゼドメイン	ATP結合部位および触媒部位を含む、セリン/スレオニンプロテインキナーゼおよびチロシンプロテインキナーゼに共通する保存触媒コア
PH	16%	PHドメイン	細胞内シグナル伝達に関与する、または細胞骨格の構成成分としてのプレクストリン相同性
EGF	34%	EGF様ドメイン	膜結合型タンパク質の細胞外ドメインまたは分泌型タンパク質に見られる30～40アミノ酸長
Rvt	49%	逆転写酵素(RNA依存性DNAポリメラーゼ)	
Ank	25%	Ank反復	細胞質タンパク質。内在性膜タンパク質を細胞骨格に結合する
Oxidored_q1	32%	NADH-ユビキノン/プラストキノン(複合体I)、様々な鎖	膜結合型。プロトンの膜通過に関与
Efhand	24%	EFハンド	カルシウム結合ドメイン。12残基αヘリックスドメインが両端に隣接する12残基ループからなる
Rvp	79%	レトロウイルスアスパルチルプロテアーゼ	アスパルチルプロテアーゼおよび酸性プロテアーゼ。触媒アスパルチル残基が中心にある
コラーゲン	42%	コラーゲン三重らせん反復(20コピー)	結合組織の形成に関与する細胞外構造タンパク質。配列はG-X-Yからなり、ポリペプチド鎖は三重らせんを形成する
Fn3	20%	フィブロネクチンIII型ドメイン	受容体の細胞外リガンド結合領域に位置し、ジスルフィド結合に関与する二対のシステインがある約200アミノ酸残基である
7tm_1	19%	7回膜貫通受容体(ロドプシンファミリー)	7つの疎水性膜貫通領域。N末端は細胞外に位置するのに対して、C末端は細胞質にある。Gタンパク質を介してシグナル伝達を行う

【０５４１】

（表ＶＩ）FACSによるLNCaP細胞上への24P4C12 MAbの親和性

クローン	アイソタイプ	親和性 LNCaP (nM)[x]	エピトープ グループ[y]
Ha5-1(5)1	γ2 κ	4.10	1
Ha5-1(5)2	γ2 κ	2.75	1
Ha5-3(1,4)7.1	γ1 κ	5.50	4
Ha5-3(3,5)37.1	γ1 κ	0.45	7
Ha5-7be20.1	γ1 κ	3.20	13
Ha5-7be34.1	γ1 κ	1.76	13
Ha5-7be37.1	γ1 κ	2.80	12
Ha5-7be31.1	γ1 κ	4.15	11
Ha5-7acd2.1	γ1 κ	1.95	13
Ha5-7acd3.1	γ1 κ	4.40	10
Ha5-7acd4.1	γ1 κ	0.99	10
Ha5-7acd10.1	γ1 κ	1.26	10
Ha5-7acd16.1	γ1 κ	0.70	13
Ha5-7acd19.1	γ1 κ	0.19	7
Ha5-7acd7.1.1	γ1 κ	1.85	13
Ha5-7acd20.1.1	γ1 κ	1.10	10
Ha5-8ac4.1	γ1 λ	0.07	ND
Ha5-11b1.1	γ1 κ	3.40	14

x:FACS平衡飽和結合曲線によって求められた親和性
y:FACS平衡競合結合によって確かめられたエピトープグループ(同じ数字は、他の全てのMAbに対して似た競合パターンを有する)
ND:確認できず

【０５４２】

（表ＶＩＩ）前立腺液中の24P4C12基質である高分子、元素、およびイオン

アスコルビン酸	マグネシウム
血液型抗原	窒素
カルシウム	リン
塩素	カリウム
コレステロール	プリン
コリン	ピリミジン
クエン酸	ピルビン酸
クレアチン	ナトリウム
デオキシリボ核酸	ソルビトール
ヌクレオチドおよびヌクレオシドの塩基および糖	スペルミジン
フルクトース	スペルミン
グルタチオン	尿素
ヒアルロニダーゼ	尿酸
イノシトール	ビタミンB12
乳酸	亜鉛
ナトリウム	pH 6.4-6.8

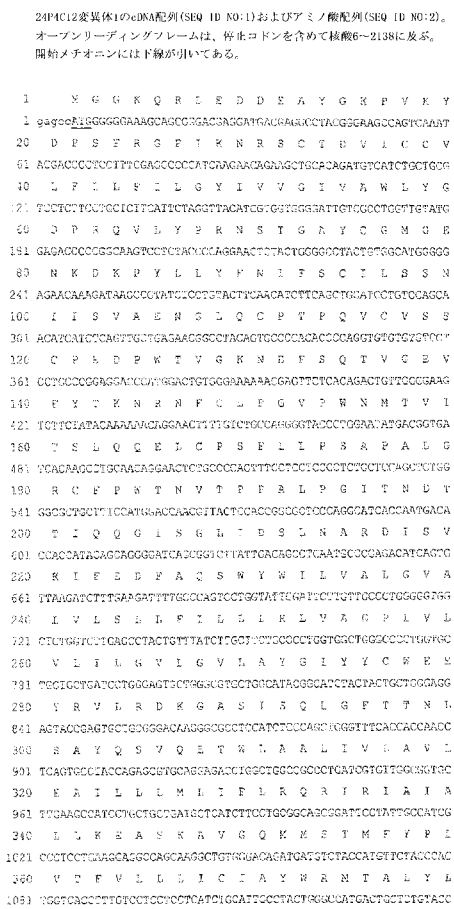
【０５４３】

（表ＶＩＩＩ）消化管液および肺気管支液に存在する24P4C12基質である高分子、元素、およびイオン

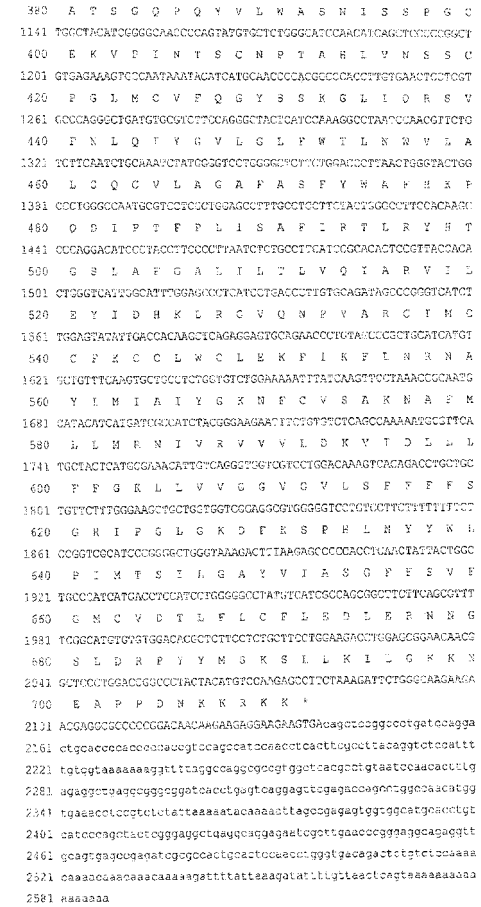
ビタミンA, B1, C, D, E, K, B1, B2, B6, B12
塩素
銅
ヨウ素
ビオチン
鉄
グリセロール
短鎖脂肪酸
モノグリセリド
単糖
二糖
アミノ酸
ジペプチド
脂質
ムチン
重炭酸

10

【図１Ａ－１】

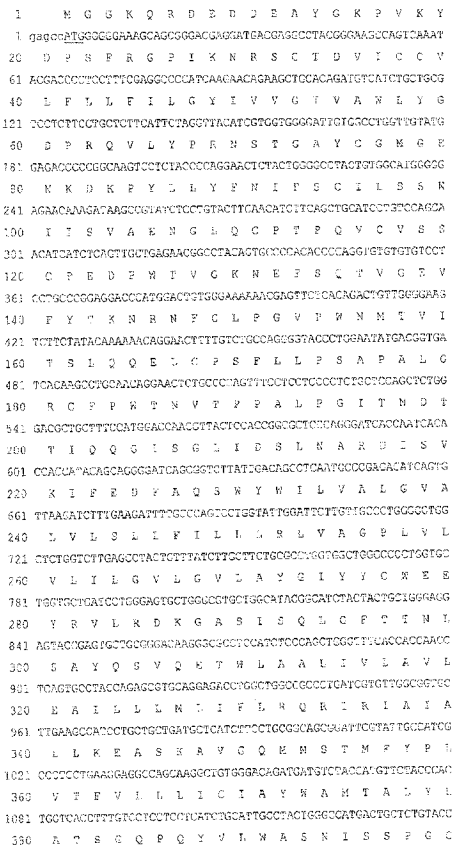


【図１Ａ－２】

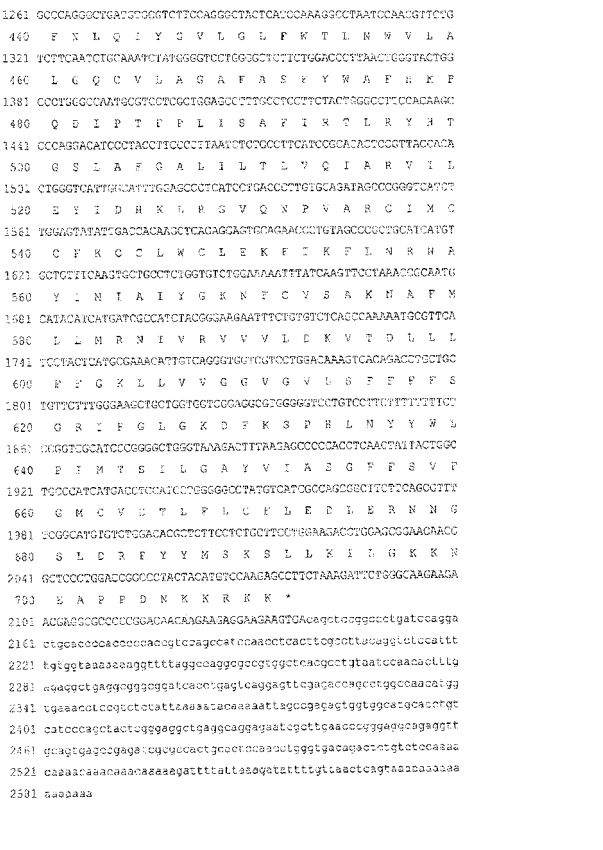


【図１Ｂ－１】

24P4C12変異体2のcDNA配列(SEQ ID NO:3)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:4)。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2138に及ぶ。
開始メチオニンには下線が引いてある。

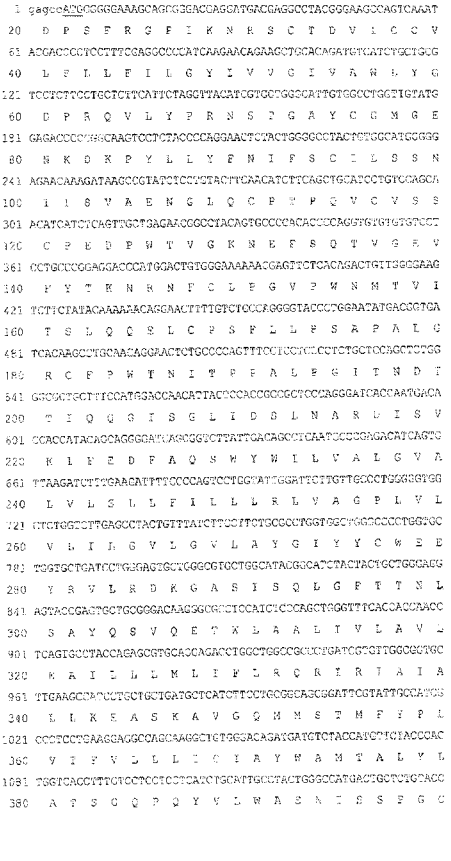


【図１Ｂ－２】

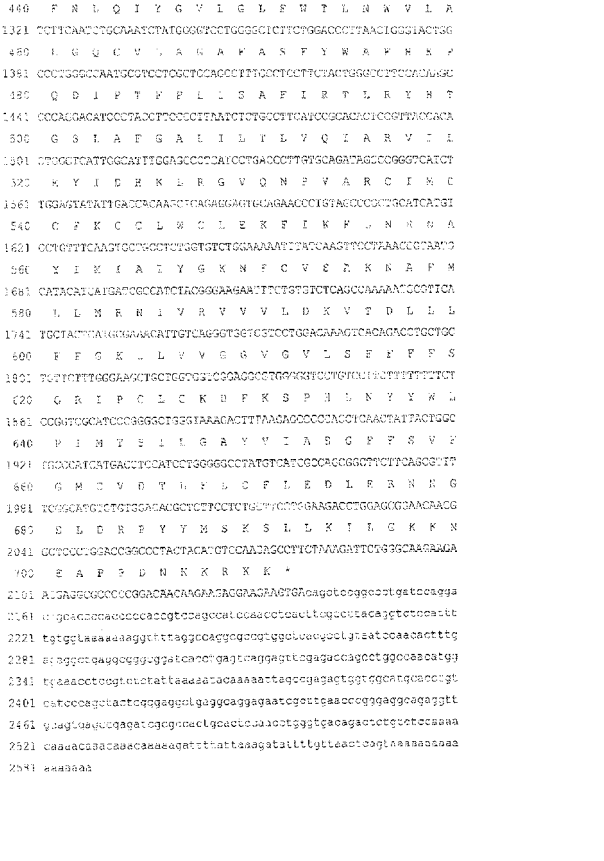


【図１Ｃ－１】

24P4C12変異体3のcDNA配列(SEQ ID NO:5)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:6)。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2138に及ぶ。
開始メチオニンには下線が引いてある。

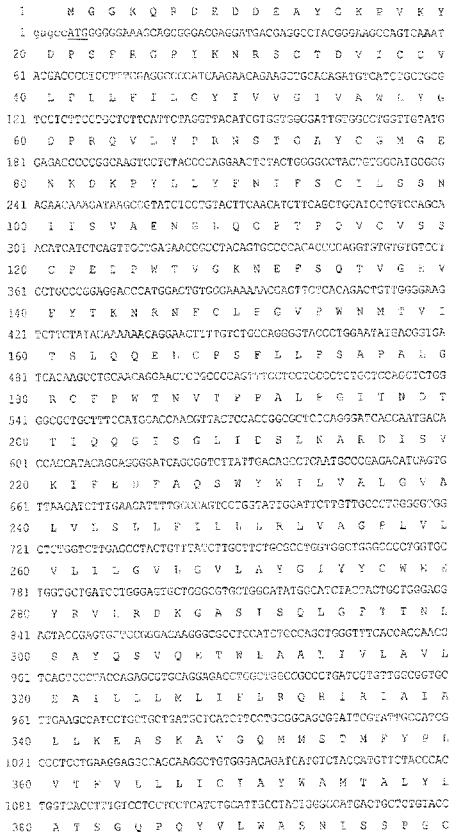


【図１Ｃ－２】

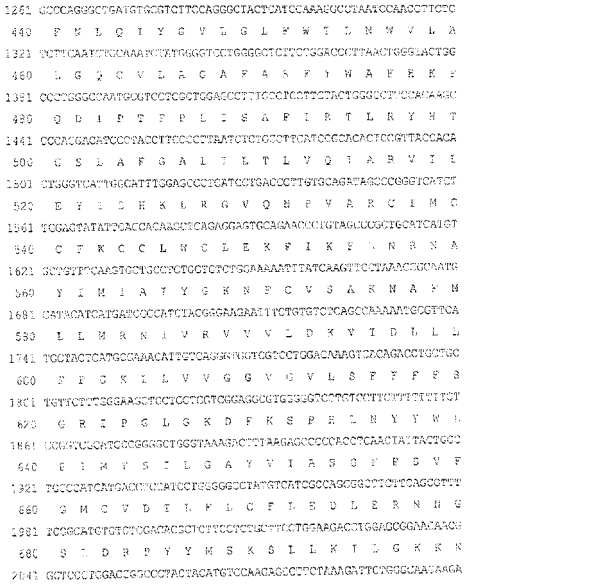


【図１Ｄ－１】

24P4C12変異体4のcDNA配列(SEQ ID NO:7)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:8)。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2138に及ぶ。
開始メチオニンには下線が引いてある。

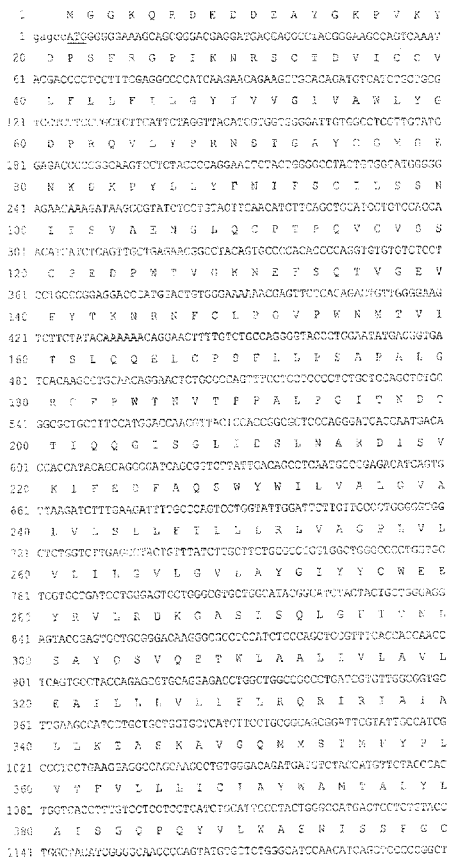


【図１Ｄ－２】

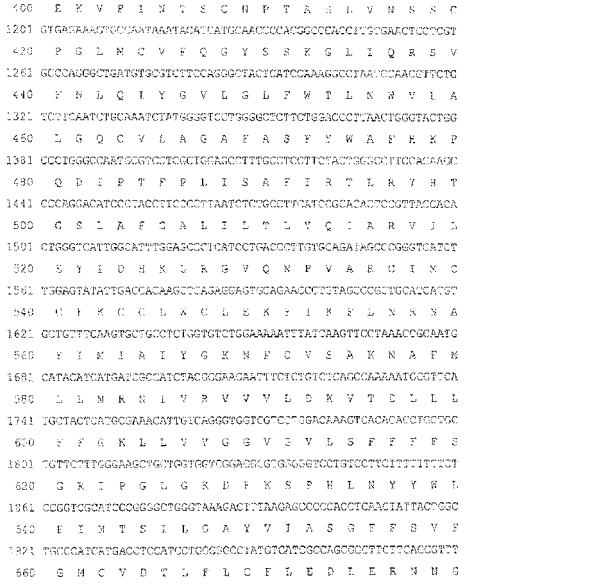


【図１Ｅ－１】

24P4C12変異体5のcDNA配列(SEQ ID NO:9)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:10)。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2138に及ぶ。

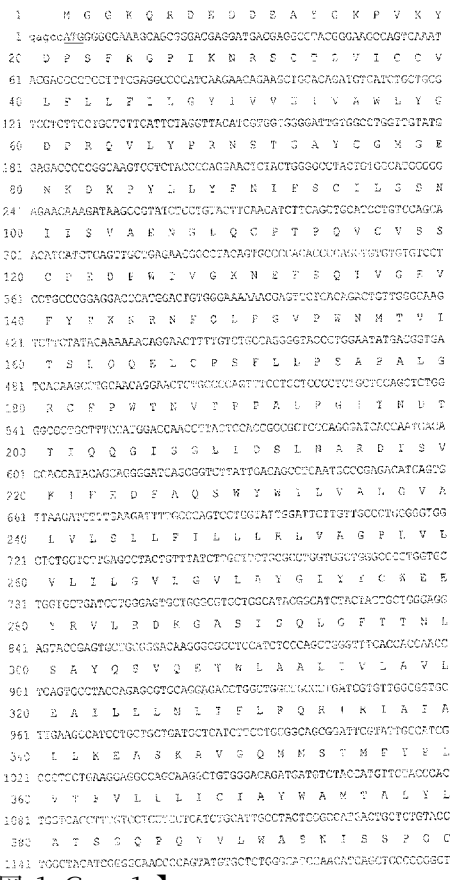


【図１Ｅ－２】

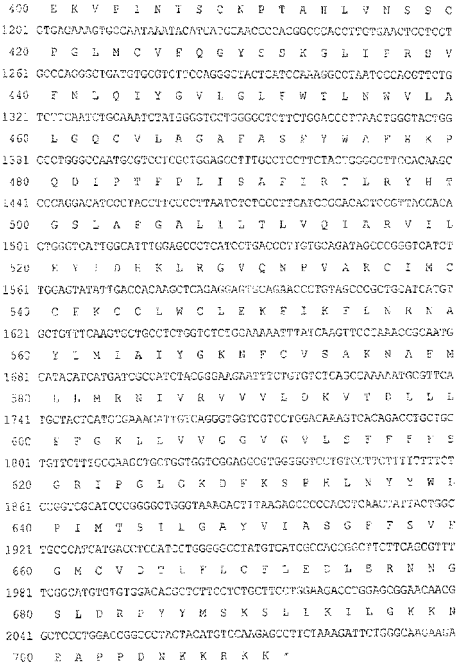


【図１Ｆ－１】

24P4C12変異体6のcDNA配列(SEQ ID NO:11)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:12)。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2138に及ぶ。

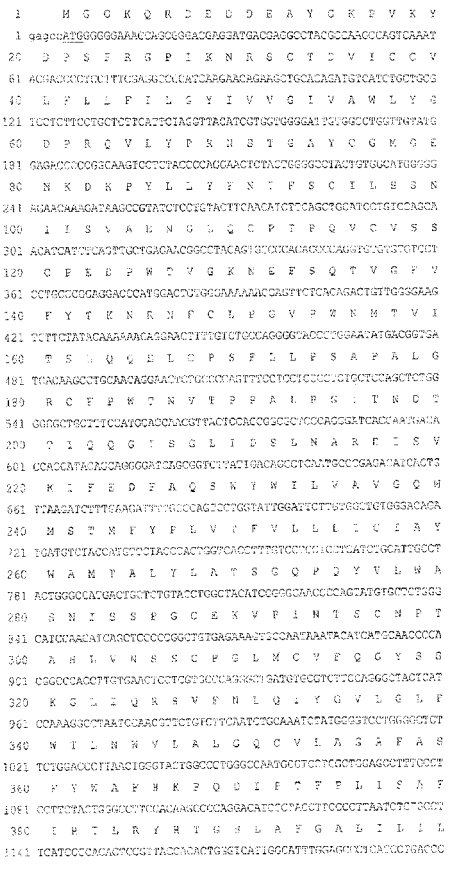


【図１Ｆ－２】

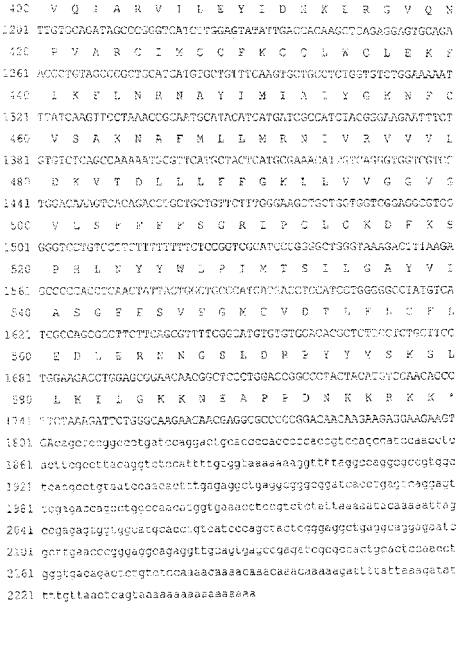


【図１Ｇ－１】

24P4C12変異体7のcDNA配列(SEQ ID NO:13)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:14)。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～1802に及ぶ。



【図１Ｇ－２】



【図１Ｈ－１】

24P4C12v.8のcDNA配列(SEQ ID NO:15)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:16)。
開始メチオニンには下線が引いてある。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2174に及ぶ。

```
   1     M  G  S  K  Q  R  D  E  D  D  F  A  Y  G  K  P  V  K  Y
   1 gagccATGGGGGGAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
  20   D  P  S  F  R  C  P  I  K  N  R  S  C  T  D  V  I  C  C  V
  61 ACGACCCCTCCTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
  40   L  F  L  L  F  I  L  G  Y  I  V  V  G  I  V  A  W  L  Y  G
 121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
  60   D  P  R  Q  V  L  Y  P  R  N  S  T  G  A  Y  C  G  M  G  E
 181 GACACCCCCGGCAAGTTCTCTACCCCAGGAACTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
  80   N  K  D  K  P  Y  L  L  Y  F  N  I  F  S  C  I  L  S  S  N
```

【図１Ｈ－２】

```
 241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
 100   I  I  S  V  A  F  N  G  L  Q  C  P  T  P  Q  V  C  V  S  S
 301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCCAGGTGTGTGTCCT
 120   C  P  E  D  P  W  T  V  G  K  N  E  F  S  Q  T  V  G  E  V
 361 CCTGCCCCGACGACCCATGGACTGTGGGAAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
 140   F  Y  T  K  N  R  N  F  C  L  P  G  V  P  W  N  M  T  V  I
 421 TCTTCTATACAAAAAACAGGAACTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
 160   T  S  L  Q  Q  E  L  C  P  S  F  L  L  P  S  A  P  A  L  G
 481 TCACAAGCCTGCAACAGGAACTCTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
 180   R  C  F  P  W  T  N  V  T  P  P  A  L  P  G  I  T  N  D  T
 541 GGCGCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
 200   T  I  Q  Q  G  I  S  G  L  I  D  S  L  N  A  R  D  I  S  V
 601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATCCCCGACACATCAGTG
 220   K  T  F  E  D  F  A  Q  S  W  Y  W  I  L  V  A  L  G  V  A
 661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTTGCCCTGGGGGTGG
 240   L  V  L  S  L  L  F  I  L  L  I  R  L  V  A  G  P  L  V  L
 721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCCTGGTGC
 260   V  L  I  L  G  V  L  G  V  L  A  Y  G  I  Y  Y  C  W  E  E
 781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATACGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
 280   Y  R  V  L  R  D  K  G  A  S  I  S  Q  L  G  F  T  T  N  L
 841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
 300   S  A  Y  Q  S  V  Q  E  T  W  L  A  A  L  I  V  L  A  V  L
 901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTGCAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTTGGCGGTGC
 320   F  A  I  L  L  L  M  L  I  F  L  R  Q  R  I  R  I  A  I  A
 961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCCTGCGGCAGCGGATTCGTATTGCCATCG
 340   L  L  K  E  A  S  K  A  V  G  Q  M  M  S  T  M  F  Y  F  L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
 360   V  T  F  V  L  L  T  I  C  I  A  Y  W  A  M  T  A  L  Y  L
1081 TGGICACCTTTGTCCTCCTCCTCAICTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
 380   A  I  S  G  Q  P  Q  Y  V  L  W  A  S  N  T  S  S  P  G  C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCCGGCT
 400   E  K  V  D  I  N  T  S  C  N  P  T  A  H  L  V  N  S  S  C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGCAACCCCACGGCCCACCTTCTCAACTCCTCGT
 420   P  G  L  M  C  V  F  Q  G  Y  S  S  K  G  L  I  Q  R  S  V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCCAAAGGCCTAATCCAACGTTCTG
 440   F  N  L  Q  L  Y  G  V  L  G  L  F  W  T  L  N  W  V  L  A
1321 TCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCCTGGGGCTCTTCTGGACCCTTAACTGGGTACTGG
 460   L  G  Q  C  V  L  A  G  A  F  A  S  F  Y  W  A  F  H  K  P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCCTCGCTGGAGCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTICCACAAGC
 480   Q  D  I  P  T  F  F  L  I  S  A  F  I  R  T  L  R  Y  H  T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCCTTAATCTCTGCCTICATCGGCACACTCCGTTACCACA
 500   G  S  L  A  F  G  A  L  I  L  T  L  V  Q  I  A  R  V  I  I
```

【図１Ｈ－３】

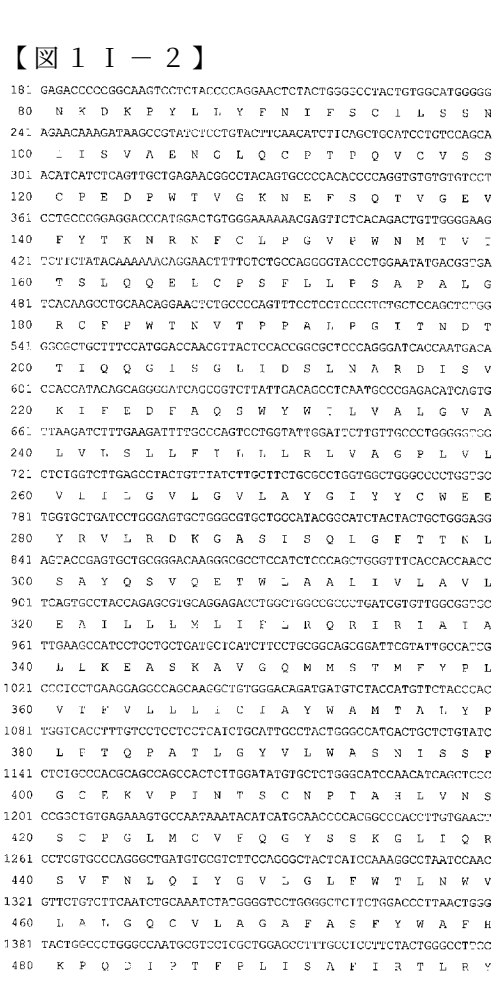
```
1501 CTGGGTCATTGGCATTTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCCGGCTCATCT
 520   E  Y  I  D  H  K  L  R  G  V  Q  N  P  V  A  R  C  I  M  C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGCAGAACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
 540   C  F  K  C  C  L  W  C  I  F  K  F  I  K  F  L  N  R  N  A
1621 GCTGCTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAAATTTATCAAGTTCCTAAACCGCAATG
 560   Y  I  M  I  A  I  Y  G  K  N  F  C  V  S  A  X  N  A  F  K
1681 CATACATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAAATGCGTTCA
 580   L  L  M  R  N  I  V  R  V  V  V  L  D  K  V  T  D  L  I  L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGTCAGGGTGGTCGTCCTGGACAAAGTCACAGACCTGCTCC
 600   F  F  C  K  L  L  V  V  G  G  V  G  V  L  S  F  F  F  F  S
1801 TGTTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTCGGAGGCGTGGGGGTCCTGTCCTTCTTTTTTTCT
 620   G  R  I  P  G  L  C  K  D  F  K  S  P  H  L  N  Y  Y  W  L
1861 CCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCCACCICAACTATTACTGGC
 640   P  I  M  R  N  P  I  T  P  T  G  H  V  F  Q  T  S  I  L  G
1921 TGCCCATCATGAGGAACCCAATAACCCCAACGGGTCATGTCTTCCAGACCTCCATCCTGG
 660   A  Y  V  I  A  S  G  F  F  S  V  F  G  M  C  V  D  T  L  F
1981 GGGCCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCCTCAGCGTTTTCGGCATGTGTGTGGACACGCCCT
 680   L  C  F  L  E  D  L  E  R  N  N  G  S  L  D  R  P  Y  Y  M
2041 TCCTCTGCTTCCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACGGCTCCCTGGACCGGCCCTACTACA
 700   S  K  S  L  L  K  I  L  G  K  K  N  E  A  P  P  D  N  K  X
2101 TGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGAACGAGCCGCCCCCGGACAACAAGA
 720   R  K  K  *
2161 AGAGGAAGAAGTGAcagctccggccctgatccaggactgcaccccaccccaccgtccag
2221 ccatccaacctcacttcgccttacaggtctccatttgtggtaaaaaaaggttttaggcc
2281 aggcgccgtggctcacgcctgtaatccaacactttgaggaggctgaggcgggcggatcacc
2341 tgagtcaggagttcgagaccagcctggccaacatggtgaaacctccgtctctattaaaaa
2401 tacaaaaattagccgagagtggtggcatgcacctgtcatcccagctactcgggaggctga
2461 ggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcacaagttgcagtgagccgagatcgcgccact
2521 gcactccaacctgggtgacagactctgtctccaaaacaaaacaaacaaacaaaaagattt
2581 tattaaagatatttttgttaactcagtaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

【図１Ｉ－１】

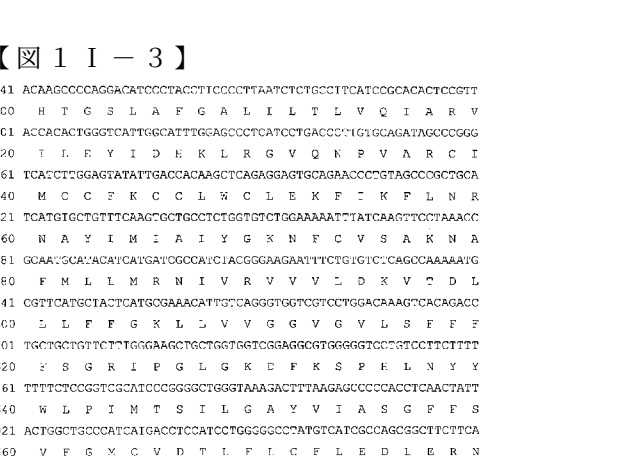
24P4C12v.9のcDNA配列(SEQ ID NO:17)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:18)。
開始メチオニンには下線が引いてある。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2144に及ぶ。

```
   1     M  G  G  K  Q  R  D  E  D  D  E  A  Y  G  K  P  V  K  Y
   1 gagccATGGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
  20   D  P  S  F  R  G  P  I  K  N  R  S  C  T  D  V  I  C  C  V
  61 ACGACCCCTCCTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
  40   L  F  L  L  F  I  L  G  Y  I  V  V  G  I  V  A  W  L  Y  G
 121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
  60   D  P  R  Q  V  L  Y  P  R  N  S  T  G  A  Y  C  G  M  G  E
```

【図１Ｉ－２】

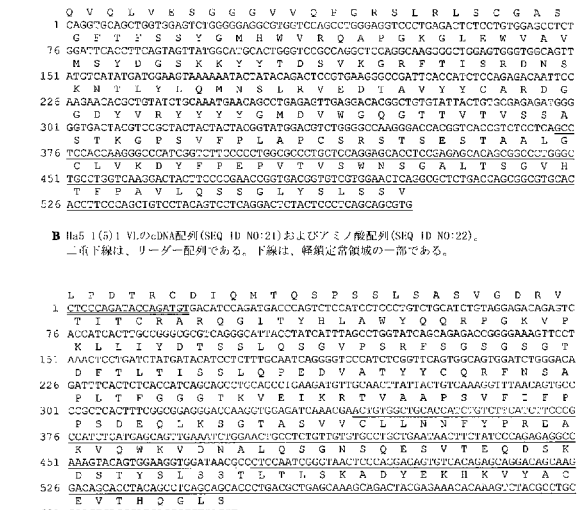


【図１Ｉ－３】

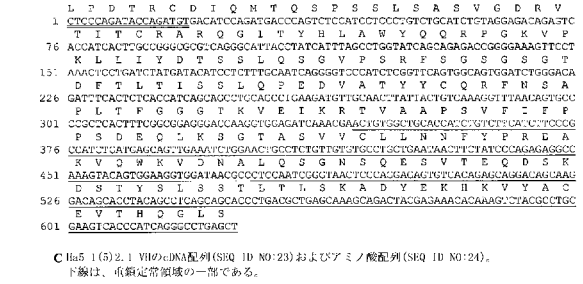


【図２－０１】

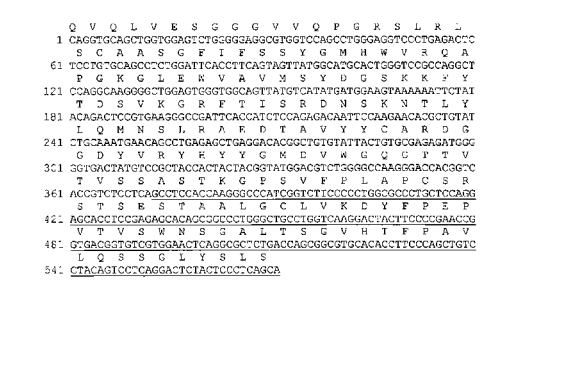
A Ha5-1(5)1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:19)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:20)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。



B Ha5 1(5)1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:21)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:22)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

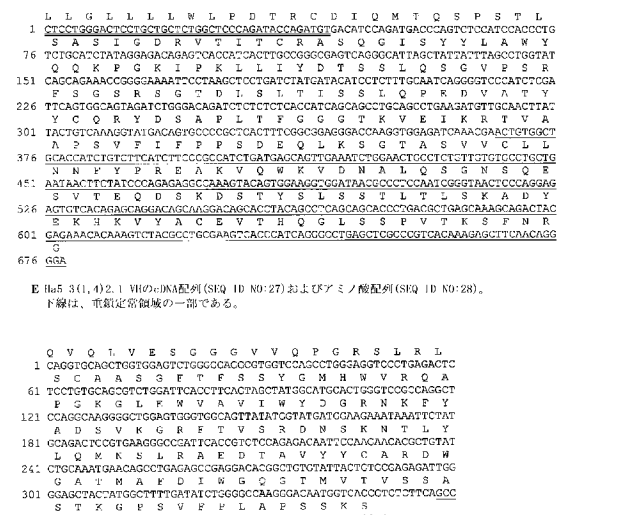


C Ha5 1(5)2.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:23)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:24)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

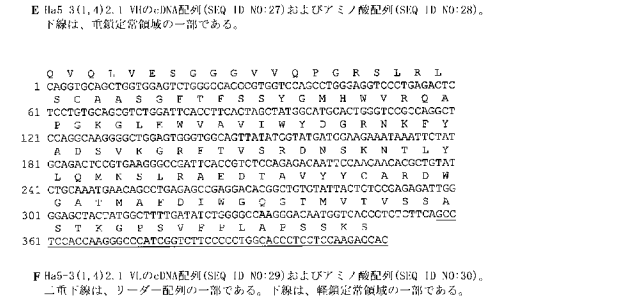


【図２－０２】

D Ha5-1(5)2.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:25)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:26)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。



E Ha5 3(1,4)2.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:27)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:28)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。



F Ha5-3(1,4)2.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:29)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:30)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

【図２－０３】

G Ha5-3(1,4)7.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:31)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:32)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S
1   CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
     G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V
76  GGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
     I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S
151 ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
     K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D R
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGA
     Y S G Y C Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
301 TATAGTGGCTACGGTTACTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
     A S T K G P S V F P L A P
376 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC
```

H Ha5-3(1,4)7.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:33)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:34)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    G A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I
1   GGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
     T C R A S Q D I S K Y L A W F Q Q K P G K A P K S
76  ACTTGTCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCC
     L I Y A A S S L E S G V P S K F S G S G S G T D F
151 CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC
     T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S T I P P
226 ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAGTACTATTTTACCCATTC
     T F G P G T K V D I K R T V A A P S V F I F P P S
301 ACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
     D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V
376 GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
     Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S
451 CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
     T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
526 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
     T H Q G L S S P V T K S F N R G E
601 ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
```

I Ha5-3(3,5)37.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:35)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:36)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S
1   CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
     G G S I S S Y Y W N S W I R Q P P G K G L E W I G Y
76  GGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTAT
     I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K
151 ATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG
     N Q F S L K L N S V T A A D T A V Y Y C A R G Y Y
226 AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTAC
     Y G S E S P Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T
301 TATGGTTCGGAGAGTCCATACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGTCAGCTTCCACC
     K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
376 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
     V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F
451 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
     P A
526 CCAGCTG
```

【図２－０４】

J Ha5-3(3,5)37.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:37)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:38)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S
1   GATATTGTCATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTGCAGGTCT
     S Q S L L H S N G H N Y L D W Y I Q K P G Q S P H
76  AGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATCGGACACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAC
     L L I Y L G S N R D S G V P D R F S G S G S G T D
151 CTCCTGATCTATTTGGGTTCTAACCGGGACTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGAT
     F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q I P
226 TTTACACTGAAAATCACCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAATTCCG
     C S F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P
301 TGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
     S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K
376 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
     V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D
451 GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
     S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
526 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
     V T H Q G L S S P V T K S F N R
601 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
```

K Ha5-4(2,5)13.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:39)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:40)。

```
    Q V Q L V E F G G G V V Q P G R S L R L S C A A S
1   CAGGTGCAGCTGGTGGAGTTTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
     G F T F R S Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V
76  GGATTCACCTTCAGAAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
     I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S
151 ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
     K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D G
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGG
     V A V A G T D Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T
301 GTAGCAGTGGCTGGTACAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
     K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
376 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
     V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F
451 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
```

L Ha5-4(2,5)13.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:41)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:42)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    W L R G A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1   TGTGGCCTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA
     V T I T C R A S Q S I S S H L N W Y Q Q K P G K A
76  GAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAGCCATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG
     P K L L I Y V A S S L Q S G V P S R F S G S G S G
151 CCCCTAAGCTCCTGATCTATGTTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTG
     T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S
226 GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACA
     T P L I F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F
301 GTACCCCGCTCATTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT
     P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E
376 TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
     A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S
451 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA
     K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A
526 GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACC
     C E V T H Q G L S S P V
601 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
```

【図２－０５】

M Ha5-4(2,5)34.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:43)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:44)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
1   GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
     G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A
76  GGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCT
     I S G R G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S
151 ATTAGTGGTCGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
     K N T L F L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K D S
226 AAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATAGC
     S G L G Y G D Y D Y Y Y G M D V W G Q G T L V T V S
301 AGTGGCCCCCTGGCTGGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGTCAGCTTCCACC
     K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
376 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
     V K D Y F P E P V T V S
451 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT
```

N Ha5-4(2,5)34.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:45)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:46)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    S Y E L T Q P P S V S V S P G Q T A S I T C S G D
1   TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGAT
     K V G D K Y A C W Y Q Q K P G Q S P V L V I Y Q D
76  AAAGTGGGGGATAAATATGCTTGTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTACTGGTCATCTATCAAGAT
     S K R P S G I P E R F S G S N S G N T A T L T I S
151 AGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGC
     G T Q A M D E A D Y Y C Q A W D S S T Y V V F G G
226 GGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTTATGTGGTATTCGGCGGA
     G T K L T V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E
301 GGGACCAAACTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG
     L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K
376 CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAG
     A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A
451 GCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
     S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G
526 AGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGG
     S T V E K T
601 AGCACCGTGGAGAAGACACT
```

O Ha5 7acd4.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:47)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:48)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S
1   CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
     G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V
76  GGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
     I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S
151 ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
     K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D R
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGA
     Y S G Y D Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
301 TATAGTGGCTACGATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
     A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L
376 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC
```

【図２－０６】

P Ha5-7acd4.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:49)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:50)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    L C F P G A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
1   CTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
     R V T I T C R A S Q V I Y N Y L A W F Q Q K P G K
76  AGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGTCATTTACAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAA
     A P K S L I Y G A S S L H S G V P S K F S G S G S
151 GCCCCTAAGTCCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCACAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGATCT
     G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y T
226 GGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATACT
     I Y P F S F G P G T K V D I K R T V A A P S V F I
301 ATTTACCCTTTCTCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC
     F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R
376 TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA
     E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
451 GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC
     S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y
526 AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
     A C E V T H Q G L S S P V
601 GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
```

Q Ha5-7acd20.1.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:51)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:52)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S
1   CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
     G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V
76  GGATTCACCTTCAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
     I W Y D G R N K Y Y V D S V K G R F T I S R D N S
151 ATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
     K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D R
226 AAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGG
     Y S C S D Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
301 TATAGTGGCTCCGATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
     A S T K G P S V F P L
376 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC
```

R Ha5-7acd20.1.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:53)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:54)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    L C F P G A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
1   TGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAG
     R V T I T C R A S Q G I Y K Y L A W F Q Q K P G K
76  ACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGCATTTACAACTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGA
     A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S K F S G S G S
151 AAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCAACCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGAT
     G T V F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y T
226 CTGGGACAGTTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATCA
     V Y P F T F G P G T K V D F K R T V A A P S V F I
301 CTGTCTACCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATTTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
     F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R
376 TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
     E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
451 GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG
     S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y
526 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
     A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R
601 ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
```

【図２－０７】

S Ha5 7bc31.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:55)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:56)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
                Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L  T  C  T  V  S
  1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
                G  G  S  I  S  S  Y  Y  W  N  S  W  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  Y
 76 GGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAACTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATAT
                I  Y  Y  S  G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K
151 ATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG
                N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  Y  Y
226 AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTATTAC
                Y  G  A  G  S  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  A  S  T  K
301 TATGGTGCGGGGAGTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
                G  P  S  V  F  P  L  A  P
376 GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
```

T Ha5-7bc31.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:57)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:58)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
                L  W  V  S  C  S  S  G  D  I  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P  V  T  P  G  E
  1 TTCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATACTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAG
                P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S  L  L  H  S  T  G  F  N  Y  L  D  W  Y  L
 76 AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTACTGGATTCAACTATTTGGATTGGTACC
                Q  K  P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  L  G  S  I  R  A  S  G  V  P  D  R  F
151 TGCAGAAGCCAGGGCAGTCCCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTATTCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGT
                S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  K  I  S  R  V  E  T  E  D  V  G  V  Y  Y
226 TCAGTGGCAGTGGTTCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGACTGAGGATGTTGGGGTTTATT
                C  M  Q  T  L  Q  T  P  I  T  F  G  Q  G  T  R  L  E  I  K  R  T  V  A  A
301 ACTGCATGCAAACTCTACAAACTCCCATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTCCAGATTAAACGAACTGTGGCTG
                P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N
376 CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
                N  F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S
451 ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA
                V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E
526 GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
                K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R  G
601 AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
                G
678 GA
```

U Ha5-7acd10.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:59)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:60)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
                Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L  S  C  A  A  S
  1 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGCCT
                G  F  T  F  S  S  Y  G  M  H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V
 76 CGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
                I  W  Y  D  G  S  N  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S
151 ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
                K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  R
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGG
                Y  S  G  Y  D  Y  Y  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
301 TATAGTGGCTACGATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
                A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P  S  S
376 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC
```

【図２－０８】

V Ha5-7acd10.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:61)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:62)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
                L  C  F  P  G  A  R  C  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D
  1 TTGTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCACTGTCTGCGAG
                R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  Y  N  Y  L  A  W  F  Q  Q  K  P  G  K
 76 ACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGCATTTATAATTATTTGGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGA
                A  P  K  S  L  I  Y  A  A  S  S  L  H  S  G  V  P  S  K  F  S  G  G  G  S
151 AAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCACAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCGGTGGTT
                G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  T
226 CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATA
                I  Y  P  F  T  F  G  Q  G  T  K  V  D  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F  I
301 CTATTTACCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTCTCTTCA
                F  P  P  S  D  E  Q  I  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R
376 TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
                E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  T  E  Q
451 GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGACAGTCACAGAGCAGG
                D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V
526 ACAGCAAGGACAGCAGCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
                Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R
601 ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
```

W Ha5-7acd13.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:63)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:64)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
                Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  S  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L  T  C  T  V  S
  1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
                G  G  S  I  S  S  Y  Y  W  S  W  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  Y
 76 GGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTAT
                I  Y  Y  S  G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K
151 ATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG
                N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  Y  Y
226 AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTATTAC
                Y  G  S  G  S  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  A  S  T  K
301 TATGGTTCGGGGAGTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
                G  P  S  V  F  P  L  A  P  S
376 GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA
```

X Ha5-7acd13.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:65)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:66)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
                L  W  V  S  G  S  S  G  D  I  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P  V  T  P  G  E
  1 TGGTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAG
                P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S  L  L  H  S  T  G  H  N  Y  L  D  W  Y  L
 76 AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTACTGGACACAACTATTTGGATTGGTACC
                Q  K  P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  L  G  S  I  R  A  S  G  V  P  D  R  F
151 TGCAGAAGCCAGGGCAGTCCCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTATTCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGT
                S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y
226 TCAGTGGCAGTGGTTCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT
                C  M  Q  A  L  Q  T  I  T  F  G  Q  G  T  R  L  E  I  K  R  T  V  A  A  P
301 ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTATCACCTTGGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCAC
                S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N
376 CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA
                F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V
451 ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
                T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K
526 TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
                H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T
601 AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
```

【図２－０９】

Y Ha5-7acd19.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:67)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:68)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
                Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L  T  C  T  V  S
  1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACCGTCTCT
                G  G  S  I  S  S  Y  Y  W  S  W  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  Y
 76 GGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATAT
                I  Y  Y  S  G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K
151 ATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG
                N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  F  T
226 AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTTTACT
                Y  G  S  G  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  A  S  T  K  G
301 TATGGTTCGGGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC
                P  S  V  F  P  L  A  P  S  S
376 CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA
```

Z Ha5-7acd19.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:69)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:70)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
                L  L  C  L  L  M  L  W  V  S  G  S  S  G  D  I  V  M  T  Q  S  P  L  S  L
  1 AGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGCGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCC
                P  V  T  P  G  E  P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S  L  L  H  S  N  G  F  N
 76 TGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATTCA
                Y  L  D  W  Y  L  Q  K  P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  L  G  S  R  R  A  S
151 ACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAGACGGGCCT
                G  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E
226 CCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTG
                D  V  G  V  Y  Y  C  M  Q  A  L  E  T  I  T  F  G  Q  G  T  R  L  E  I  K
301 AGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTAGAAACTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA
                R  T  V  A  A  P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V
376 AACGAACTGTGGCTGCACCATCTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT
                V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G
451 GTGTGTCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
                N  S  Q  E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S
526 GTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA
                K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K
601 GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
                S  F  N  R
676 AGAGCTTCAACAGGG
```

AA Ha5-7bc37.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:71)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:72)。

```
                Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L  T  C  T  V  S
  1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
                G  G  S  I  S  S  Y  Y  W  S  W  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  Y
 76 GGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTAT
                I  Y  Y  S  G  S  T  N  Y  N  P  S  I  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K
151 ATCTATTACAGCGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATACTCACTAGACACGTCCAAG
                N  Q  F  S  I  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  Y  Y
226 AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTCGCGAGGGCTATTAC
                Y  G  S  G  S  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  A  S  T  K
301 TATGGTTCGGGGAGTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
                G  P  S  V  F  P  L  A  P  S  S
376 GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA
```

【図２－１０】

AB Ha5-7bc37.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:73)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:74)。
二重下線は、リーダー配列の一部である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
                G  S  S  G  D  I  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P  V  T  P  G  E  P  A  S  I
  1 GGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATC
                S  C  R  S  S  Q  S  L  L  H  S  T  G  Y  N  Y  L  D  W  Y  L  Q  K  P  G
 76 TCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTACTGGATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGG
                Q  S  P  Q  L  L  I  Y  L  G  S  N  R  A  S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  G
151 CAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCCAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGA
                S  G  T  D  F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  C  Y  C  M  Q  A
226 TCAGGCACAGATTTTACACTGAAGATCAGCACAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTGTTACTGCATGCAAGCT
                L  Q  T  P  I  T  F  G  Q  G  T  R  L  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F
301 CTACAAACTCCACACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
                I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P
376 ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
                R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  T  E  Q
451 AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG
                D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V
526 GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
                Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T
601 TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
```

AC Ha5-7acd16.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:75)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:76)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

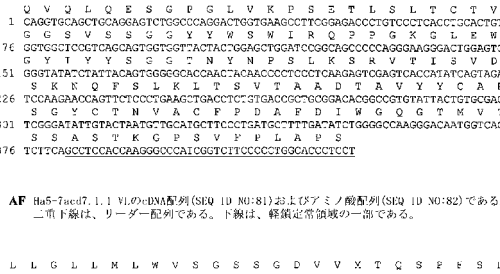
```
                Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L  S  C  A  A  S
  1 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGCCT
                G  F  T  F  S  S  H  G  M  H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V
 76 GGATTCACCTTCAGTAGCCATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
                I  W  Y  D  G  S  N  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S
151 ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
                K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  A
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCA
                Y  S  G  S  Y  Y  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
301 TATAGTGGCTACGATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
                A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L
376 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC
```

AD Ha5-7acd16.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:77)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:78)である。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列の一部である。

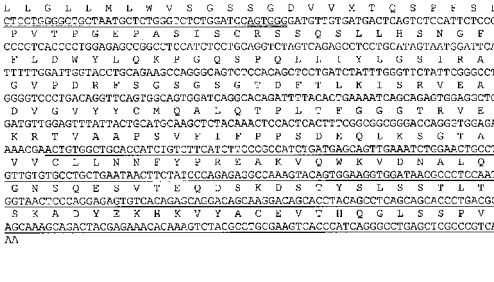
```
                C  L  L  L  L  C  F  F  G  A  R  C  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A
  1 GGGGCTGCTGCTGCTCTGTTTCCAGGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGC
                S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  Y  T  Y  L  A  W  F  Q  Q
 76 ATCTSTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGCATTTACACTTATTTAGCCTGGTTTCAGCA
                K  P  G  K  A  P  K  S  L  I  Y  G  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S
151 GAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGGTGCATCCAGTCTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAG
                G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  T  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C
226 CGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTG
                Q  Q  Y  T  I  Y  P  F  S  F  G  P  G  T  K  V  D  I  K  R  T  V  A  A  P
301 CCAACAGTATACTATTTACCCATTCAGTTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACC
                S  V  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N
376 ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA
                F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V
451 CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
                T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K
526 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCACCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA
                H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R
601 ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
```

【図２－１１】

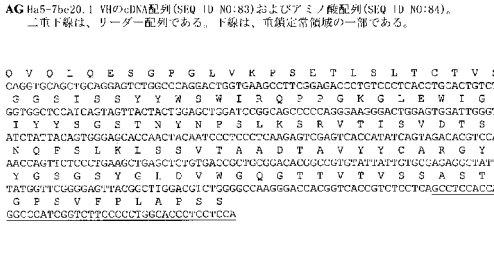
AE Ha5-7acd7.1.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:79)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:80)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。



AF Ha5-7acd7.1.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:81)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:82)である。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

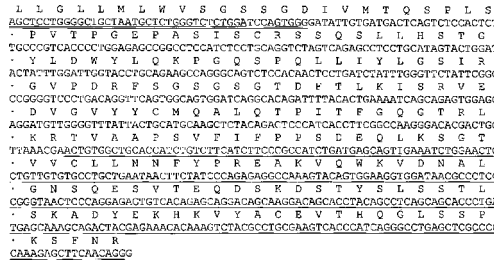


AG Ha5-7bc20.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:83)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:84)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

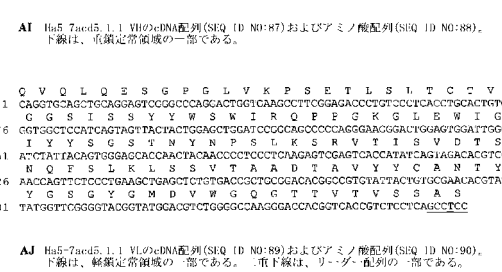


【図２－１２】

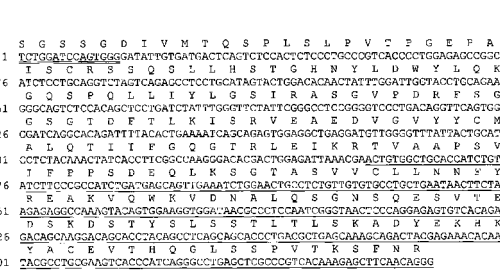
AH Ha5-7bc20.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:85)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:86)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。



AI Ha5-7acd5.1.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:87)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:88)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

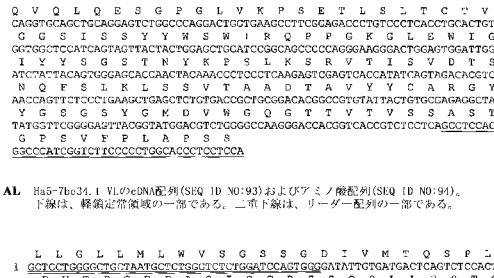


AJ Ha5-7acd5.1.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:89)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:90)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列の一部である。

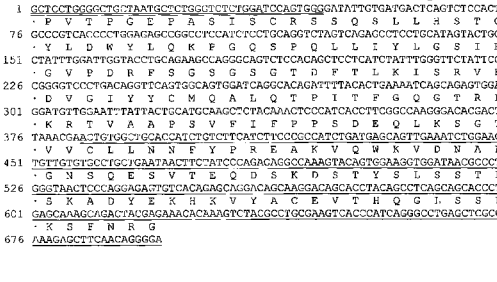


【図２－１３】

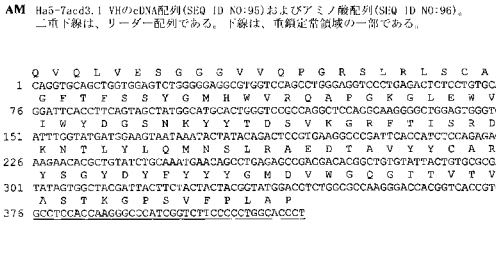
AK Ha5-7bc34.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:91)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:92)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。



AL Ha5-7bc34.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:93)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:94)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列の一部である。

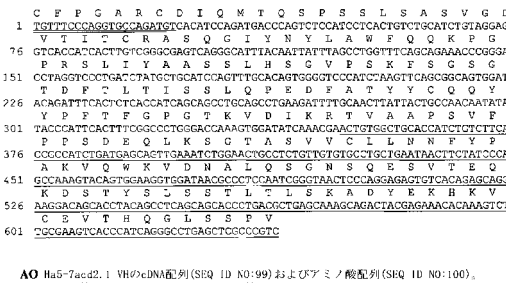


AM Ha5-7acd3.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:95)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:96)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

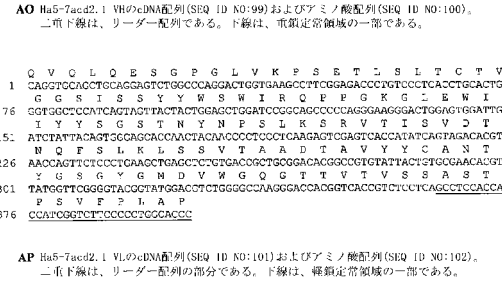


【図２－１４】

AN Ha5-7acd3.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:97)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:98)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。



AO Ha5-7acd2.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:99)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:100)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。



AP Ha5-7acd2.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:101)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:102)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

【図２－１５】

AO Ha5 8ac4.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:103)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:104)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L  T  C  T  V  S
1   CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTSAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
    G  G  S  I  S  R  Y  Y  W  S  W  I  R  Q  P  A  G  K  G  L  E  R  I  G  R
76  GGTGGCTCCATCAGTCGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGAGGATTGGGCGG
    I  Y  T  S  G  S  T  D  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  M  S  V  D  T  S  K
151 ATCTATACCAGTGGGAGCACCGACCACAACCCCTCTCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAG
    N  Q  F  S  L  K  L  R  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  L  Y
226 AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTTGTAT
    S  N  G  Y  W  Y  F  D  L  W  G  R  G  T  L  V  T  V  S  S  A  S  T  K  G
301 AGCAATGGCTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC
    P  S  V  F  P  L  A
376 CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC
```

AR Ha5 8ac4.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:105)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:106)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
      Q  S  V  L  T  Q  P  P  S  V  S  G  A  P  G  Q  R  V  T  I  S  C  T  G
1     TGCCAGTCTGTCTGTCACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCAGGCGAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGG
      S  S  N  I  G  A  G  Y  D  V  H  W  Y  Q  Q  L  P  G  T  A  P  K  L  L
76    GAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCT
      I  Y  G  N  S  N  R  P  S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  K  S  G  T  S  A  S
151   CATCTATCGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC
      L  A  I  T  G  L  Q  A  E  D  E  A  D  Y  Y  C  Q  S  Y  D  S  S  L  S  G
226   CGTCGCCATCACTGGGCTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAGTGG
      V  V  F  G  G  G  T  K  L  T  V  L  G  Q  P  K  A  A  P  S  V  T  L  F  P
301   TCGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCC
      P  S  S  E  E  L  Q  A  N  K  A  T  L  V  C  L  I  S  D  F  Y  P  G  A  V
376   GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGT
      T  V  A  W  K  A  D  S  S  P  V  K  A  G  V  E  T  T  T  P  S  K  Q  S  N
451   GACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAA
      N  K  Y  A  A  S  S  Y  L  S  L  T  P  E  Q  W  K  S  H  R  S  Y  S  C  Q
526   CAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCA
      V  T  H  E  G  S  T  V  E  K  T  V  A  P  T  E  C  S  *
601   GGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAGA
```

AS Ha5-4(2,5)31.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:107)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:108)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L  S  C  A  A  S
1   CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
    G  F  T  F  R  S  Y  G  M  H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V
76  GGATTCACCTTCAGAAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
    I  W  Y  D  G  S  N  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S
151 ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
    K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  Q
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAA
    Y  S  G  Y  D  L  Y  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
301 TATAGTGGCTACGATCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
    A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P
376 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC
```

AT Ha5 4(2,5)31.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:109)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:110)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    W  L  R  G  A  R  C  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  T  S  V  C  D  R
1   CTGGGTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTACATCTGCAGGAGACAG
    V  T  I  T  C  R  A  T  Q  S  I  S  S  H  L  N  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A
76  AGTCACCATCACTTGCCGGGCAACTCAGAGCATTAGCAGCCATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGC
    P  K  L  L  I  Y  V  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G
151 CCCTAAGCTCCTGATCTATGTTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGG
    T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  S  Y  S
226 GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAG
    T  P  L  T  F  G  G  G  T  K  V  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F  I  F
301 TACCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
    P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E
376 CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
    A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  T  E  Q  D  S
451 GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG
    K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y  A
526 CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
    C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V
601 CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
```

AU Ha5-11a1.1.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:111)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:112)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  Q  T  L  S  L  T  S  T  V  S
1   CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCAGCACTGTCTCT
    G  G  S  I  S  S  G  G  Y  Y  W  S  W  I  R  Q  L  P  G  K  G  L  E  W  V
76  GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCTCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTT
    G  Y  I  H  N  S  G  S  T  Y  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T
151 GGGTACATCCATAACAGTGGGAGCACCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACG
    S  K  N  Q  F  S  L  K  L  K  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G
226 TCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGC
    Y  Y  Y  G  S  G  S  P  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  A
301 TATTACTATGGTTCGGGGAGCCCCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCC
    S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P
376 TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
```

AV Ha5-11a1.1.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:113)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:114)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列の部分である。

```
    E  W  V  S  G  S  S  G  D  I  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P  V  T  P  G  E
1   GCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
    P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S  L  L  Q  S  N  G  H  N  Y  L  D  W  Y  L
76  GACGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCAAAGTAATGGACACAACTATTTGGATTGGTACCT
    Q  K  P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  L  G  S  Y  R  A  S  G  V  P  D  R  F
151 GCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTATCGGGCGTCCGGGGTCCCTGACAGGTT
    S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y
226 CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTACCCTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTCTATTA
    C  M  Q  A  L  Q  T  P  P  T  F  G  G  G  T  K  L  E  I  K  R  T  V  A  A
301 CTGCATGCAAGCTCTTCAAACTCCTCCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGC
    P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N
376 ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
    N  F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S
451 TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
    V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E
526 TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA
    K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T
601 GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
```

【図２－１６】

【図２－１７】

AW Ha5-11b1.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:115)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:116)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
    Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L  S  C  A  A  S
1   CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
    G  F  T  F  S  S  H  G  M  H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V
76  GGATTCACCTTCAGCAGTCATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
    I  W  Y  D  G  S  N  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S
151 ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
    K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  Q
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAA
    Y  S  G  Y  D  L  Y  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
301 TATAGTGGCTACGATCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
    A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P
376 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC
```

AX Ha5-11b1.1 VLのcDNA配列(SEQ ID NO:117)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:118)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    L  L  L  W  I  S  G  A  Y  G  D  I  V  M  T  Q  S  P  D  S  L  A  V  S  L
1   CTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT
    G  E  R  A  T  I  N  C  K  S  S  Q  S  V  L  Y  S  S  N  N  K  N  Y  L  A
76  GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGC
    W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P
151 TTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCC
    D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  A  E  D  V  A
226 TGACCGATTCAGCGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGC
    V  Y  Y  C  Q  Q  Y  Y  S  T  P  R  T  F  G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R  T
301 AGTTTATTACTGTCAGCAAATATTATAGTACTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAC
    V  A  A  P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C
376 TGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTG
    L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S
451 CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC
    Q  E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A
526 CCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGC
    D  Y  E  K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F
601 AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
    N  R  G  E
676 CAACAGGGGAGAGTG
```

AY Ha5-7be7.1 VHのcDNA配列(SEQ ID NO:119)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:120)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
    E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S
1   GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
    G  F  T  F  S  S  Y  A  M  N  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  A
76  GGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCT
    I  S  G  S  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S
151 ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
    K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  A  P
226 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGCCCCG
    Y  Q  L  L  P  Y  Y  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  A  S  T  K
301 TACCAGCTGCTGCCATACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
    G  P  S  V  F  P  L  A
376 GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA
```

【図３－０１】

A Ha5-1(5)1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:121)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCGASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV MSYDGSKKYY
 61 TDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMKSLRVED TAVYYCARDG GDYVRYYYYG MDVWGQGTTV
121 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
181 LQSSGLYSLS SV
```

B Ha5-1(5)1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:122)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LPDTRCDIQM TQSPSSLSAS VGDRVTITCR AKQGITYHLA WYQQRPGKVP KLLIYDTSSL
 61 QSGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLQPEDVA TYYCQRFNSA PLTFGGGTKV EIKRTVAAPS
121 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS
181 LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLS
```

C Ha5-1(5)2.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:123)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV MSYDGSKKFY
 61 TDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG GDYVRYHYYG MDVWGQGTTV
121 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
181 LQSSGLYSLS
```

D Ha5-1(5)2.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:124)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LLGLLLLWLP DTRCDIQMTQ SPSTLSASIG DRVTITCRAS QGISYYLAWY QQKPGKIPKL
 61 LIYDTSSLQS GVPSRFSGSR SGTDLSLTIS SLQPEDVATY YCQRYDSAPL TFGQGTKVEI
121 KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
181 DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRG
```

E Ha5-3(1,4)2.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:125)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGRNKFY
 61 ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDW GATMAFDIWG QGTMVTVSSA
121 STKGPSVFPL APSSKS
```

F Ha5-3(1,4)2.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:126)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LLYLLTHCAG SWAQSVLTQP PSASGTPGQR VTISCSGSSS NIGSNTVNWY QQLPGTAPKL
 61 LIFGNNRQRP SGVPDRFSGS KSGTSASLAI SGLQSEDEAD YYCAAWDDSL NVVFGTGTKV
121 TVLGQPKANP TVTLFPPSSE ELQANKATLV CLISDFYPGA VTVAWKADGS PVKAGVETTK P
181 STKQSNNKYAA SSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQ VTHEG
```

G Ha5-3(1,4)7.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:127)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGHSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY
 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR YSGYGYYYYY GMDVWGQGTT
121 VTVSSASTKG PSVFPLAP
```

【図３－０２】

H Ha5-3(1,4)7.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:128)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 GARCDIQMTQ SPSSLSASVG DRVTITCRAS QDISNYLAWF QQKPGKAPKS LIYAASSLHS
 61 GVPSKFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQYTIYPF TFGPGTKVDI KRTVAAPSVF
121 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
181 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGE
```

I Ha5 3(3,5)37.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:129)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN
 61 PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLNSVIAADT AVYYCARGYY YGSESPYGMD VWGQGTTVTV
121 SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPA
```

J Ha5-3(3,5)37.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:130)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGHNYLDW YLQKPGQSPH LLIYLGSNRD
 61 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQALQIP CSFGQGTKLE IKRTVAAPSV
121 FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
181 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNR
```

K Ha5-4(2,5)13.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:131)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFR SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY
 61 ADSVKGRSTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG VAVAGTDYFD YWGQGTLVTV
121 SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHT
```

L Ha5 4(2,5)13.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:132)。
下線は、軽鎖定常領域である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 WLRGARCDIQ MTQSPSSLSA SVGDRVTITC RASQSTSSHL NWYQQKPGKA PKLLIYVASS
 61 LQSGVPSRFS GSGSGTDFTL TISSLQPEDF ATYYCQQSYS TPLIFGGGTK VEIKRTVAAP
121 SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY
181 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PV
```

M Ha5-4(2,5)34.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:133)。
下線は、重鎖定常領域の一部である

```
  1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASTFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA FSGRGGSTYY
 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCAKDS SGPLLGYGMD VWGQGTTVTV
121 SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VS
```

N Ha5-4(2,5)34.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:134)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDKVGDK YACWYQQKPG QSPVLVIYQD SKRPSGIPER
 61 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCQAW DSSTYVVFGG GTKLTVLGQP KAAPSVTLFP
121 PSSEELQANK ATLVCLISDF YPGAVTVAWK ADSSPVKAGV ETTTPSKQSN NKYAASSYLS
181 LTPEQWKSHR SYSCQVTHEG STVEKT
```

O Ha5-7acd4.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:135)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY
 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR YSGYDYYYYY GMDVWGQGTT
121 VTVSSASTKG PSVFPLAPS
```

【図３－０４】

X Ha5-7acd13.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:144)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LWVSGSSGDI VMTQSPLSLP VTPGEPASIS CRSSQSLLHS TGHNYLDWYL
 51 QKPGQSPQLL IYLGSIRASG VPDRFSGSGS GTDFTLKISR VEAEDVGVYY
101 CVQALQTITF GQGTRLEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN
151 FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK
201 HKVYACEVTH QGLSSPVT
```

Y Ha5-7acd19.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:145)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGF
 51 IYYTGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCANTYY
101 YGSGYGMDVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSS
```

Z Ha5-7acd19.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:146)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LLGLLMLWVS GSSGDIVMTQ SPLSLPVTPG EPASISCRSS QSLLHSNGFN
 51 YLDWYLQKPG QSPQLLIYLG SRRASGVPDR FSGSGSGTDF TLKISRVEAE
101 DVGVYYCMQA LETITFGQGT RLEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV
151 VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES VTEQDSKDST YSLSSTLTLS
201 KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNR
```

AA Ha5-7be37.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:147)。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
 51 IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 YGSGSYGMDV WGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSS
```

AB Ha5-7be37.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:148)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 GSSGDIVMTQ SPLSLPVTPG EPASISCRSS QSLLHSTGYN YLDWYLQKPG
 51 QSPQLLIYLG SNRASGVPDR FSGSGSGTDF TLKISRVEAE DVGVCYCMQA
101 LQTPITFGQG TRLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP
151 REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV
201 YACEVTHQGL SSPVT
```

AC Ha5 7acd16.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:149)。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SHGMHWVRQA PGKGLEWVAV
 51 IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDA
101 YSGYDYYYYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPL
```

AD Ha5-7acd16.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:150)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 GLLLLCFPGA RCDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASQG IYTYLAWFQQ
 51 KPGKAPKSLI YGASSLQSGV PSKFSGSGSG TDFTLTITSL QPEDFATYYC
101 QQYTIYPFSF GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN
151 FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK
201 HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNR
```

【図３－０３】

P Ha5-7acd4.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:136)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LCFPGARCDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQGIYNY LAWFQQKPGK APKSLIYGAS
 61 SLQSGVPSKF SGSGSGTDFT LTISSLQPED FATYYCQQYT YPFTFGPGTK VDIKRTVAA
121 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES VTEQDSKDST
181 YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNR
```

Q Ha5-7acd20.1.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:137)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV
 51 IWYDGRNKYY VDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR
101 YSGSDYYYYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPL
```

R Ha5 7acd20.1.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:138)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LCFPGARCDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQGIYNY LAWFQQKPGK APKSLIYAAS
 61 SLQSGVPSKF SGSGSGTVFT LTISSLQPED FATYYCQQYT VYPFTFGPGT KVDFKRTVAA
121 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES VTEQDSKDST
181 YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNR
```

S Ha5-7be31.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:139)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
 51 IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 YGAGSYGMDV WGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAP
```

T Ha5-7be31.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:140)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LWVSGSSGDJ VMTQSPLSLP VTPGEPASIS CRSSQSLLES TGFNYLDWYL QKPGQSPQLL
 61 IYLGSIRASG VPDRFSGSGS GTDFTLKISR VETEDVGVYY CMQTLQTPIT FGQGTRLEIK
121 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD
181 SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRG
```

U Ha5-7acd10.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:141)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV
 51 IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR
101 YSGYDYYYYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS
```

V Ha5 7acd10.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:142)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LCFPGARCDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQGIYNY LAWFQQKPGK APKSLIYAAS
 61 SLHSGVPSKF SGGGSGTDFT LTISSLQPED FATYYCQQYT IYPFTFGPGT KVDIKRTVAA
121 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES VTEQDSKDST
181 YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNR
```

W Ha5 7acd13.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:143)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
 51 IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCANTYY
101 YGSGYGMDVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAP
```

【図３－０５】

AE Ha5-7acd7.1.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:151)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SGGYYWSWIR QPPGKGLEWI GYIYYSGGTN
 61 YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYYCARE SGYCTNVACF PDAFDIWGQG
121 TMVTVSSAST KGPSVFPLAP S
```

AF Ha5 7acd7.1.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:152)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 LLGLLMLWVS GSSGDVVMTQ SPFSLPVTPG EPASISCRSS QSLLHSNGFN
 51 FLDWYLQKPG QSPQLLIYLG SIRASGVPDR FSGSGSGTDF TLKISRVEAE
101 DVGVYYCMQA LQTPLTPGGG TRVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVT
```

AG Ha5-7be20.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:153)。
二重下線は、リーダー配列である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
 51 IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 YGSGSYGLDV WGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSS
```

AH Ha5-7be20.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:154)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 LLGLLMLWVS GSSGDIVMTQ SPLSLPVTPG EPASISCRSS QSLLHSTGYN
 51 YLDWYLQKPG QSPQLLIYLG SIRASGVPDR FSGSGSGTDF TLKISRVEAE
101 DVGVYYCMQA LQTPITFGQG TRLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR
```

AI Ha5-7acd5.1.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:155)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
 51 IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCANTYY
101 YGSGYGMDVW GQGTTVTVSS AS
```

AJ Ha5-7acd5.1.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:156)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 SGSSGDIVMT QSPLSLPVTP GEPASISCRS SQSLLHSTGH NYLDWYLQKP
 51 CQSPQLLIYL GSIRASGVPD RFSGSGSGTD FTLKISRVEA EDVGVYYCMQ
101 ALQTITFGQG TRLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP
151 REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV
201 YACEVTHQGL SSPVTKSFNR
```

AK Ha5-7be34.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:157)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
 51 IYYSGSTNYK PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 YGSGSYGMDV WGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSS
```

【図３－０６】

AL Ha5-7be34.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:158)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LLQLLMLWVS GSSGDIVMTQ SPLSLPVTPG EPASISCRSS QSLLHSTGYN YLDWYLQKPG
 61 QSPQLLIYLG SIRASGVPDR FSGSGSGTDF TLKISRVEAE DVGIYYCMQA LQTPITFGQG
121 TRLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE
181 SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR G
```

AM Ha5-7acd3.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:159)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY
 61 TDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR YSGYDYFYYY GMDVWGQGTT
121 VTVSSASTKG PSVFPLAP
```

AN Ha5-7acd3.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:160)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 QEEGARCDIQ MTQSPSSLSA SVGDRVTITC RASQGIYNYL AWFQQKPGKA PRSLIYAASS
 61 LHSGVPSKFS GSGSGTDFTL TISSLQPEDF ATYYCQQYTT YPFTFGPGTK VDIKRTVAAP
121 SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY
181 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PV
```

AO Ha5-7acd2.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:161)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN
 61 PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCANTYY YGSGYGMDVW GQGTTVTVSS
121 ASTKGPSVFP LAP
```

AP Ha5-7acd2.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:162)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 LWVSGSSGDI VMTQSPLSLP VTPGEPASIS CRSSQSLLHS TGHNYLDWYL QKPGQSPQLL
 61 IYLGSIRASG VPDRFSGSGS GTDFTLKISR VEAEDVGVYY CMQALQTPTF GQGTRLEIKR
121 TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS
181 KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRG
```

AQ Ha5-8ac4.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:163)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS RYYWSWIRQP AGKGLEWIGR IYTSGSTDYN
 61 PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCARDLY SNGYWYFDLW GRGTLVTVSS
121 ASTKGPSVFP LA
```

AR Ha5-8ac4.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:164)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGSSSNIG AGYDVHWYQQ LPGTAPKLLI YGNSNRPSGV
 61 PDRFSGSKSG TSASLAITGL QAEDEADYYC QSYDSSLSGV VFGGGTKLTV LGQPKAAPSV
121 TLFPPSSEEL QANKATLVCL ISDFYPGAVT VAWKADSSPV KAGVETTTPS KQSNNKYAAS
181 SYLSLTPEQW KSHRSYSCQV THEGSTVEKT VAPTECS
```

【図３－０７】

AS Ha5-4(2,5)31.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:165)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFR SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY
 61 ADSVKGRSTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG VAVAGTDYFD YWGQGTLVTV
121 SSASTKGPSV FPLAP
```

AT Ha5-4(2,5)31.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:166)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 WLRGARCDIQ MTQSPSSLST SVGDRVTITC RATQSISSHL NWYQQKPGKA PKLLIYVASS
 61 LQSGVPSRFS GSGSGTDFTL TISSLQPEDF ATYYCQQSYS TPLTFGGGTK VEIKRTVAAP
121 SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV IEQDSKDSTY
181 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PV
```

AU Ha5-11a1.1.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:167)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCTVSGGSIS SGGYYWSWIR QLPGKGLEWV GYIHNSGSTY
 61 YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLRSVTAA DTAVYYCARG YYYGSGSPYG MDVWGQGTTV
121 TVSSASTKGP SVFPLAP
```

AV Ha5-11a1.1.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:168)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。二重下線は、リーダー配列である。

```
  1 LWVSGSSGDI VMTQSPLSLP VTPGEIASIS CRSSQSLLQS KGHNYLDWYL QKPGQSPQLL
 61 IYLGSYRDSG VPDRFSGSGS GTDFTLKISR VEAEDVGVYY CMQALQTPPT FGGGTKLEIK
121 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD
181 SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVT
```

AW Ha5-11b1.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:169)。
下線は、重鎖定常領域の一部である。

```
  1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SHGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY
 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDQ YSGYDLYYYY GMDVWGQGTT
121 VTVSSASTKG PSVFPLAP
```

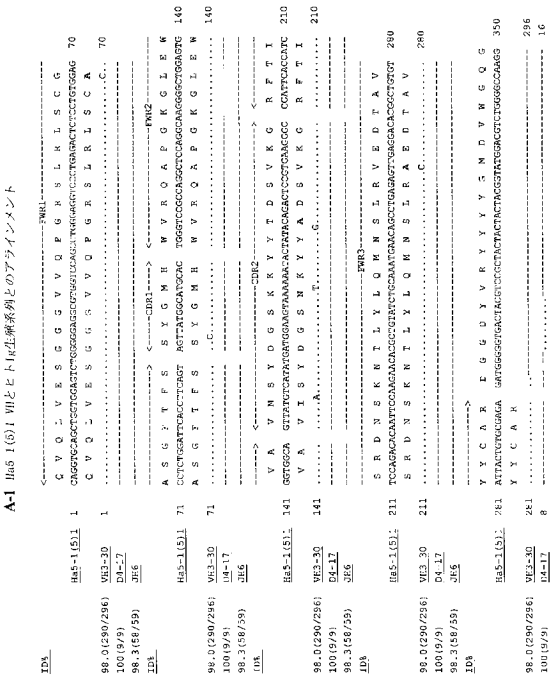
AX Ha5-11b1.1 VLのアミノ酸配列(SEQ ID NO:170)。
二重下線は、リーダー配列の部分である。下線は、軽鎖定常領域の一部である。

```
  1 LLLWISGAYG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL YSSNNKNYLA WYQQKPGQPP
 61 KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQYYST PRTFGQGTKV
121 EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT
181 EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGE
```

AY Ha5-7be7.1 VHのアミノ酸配列(SEQ ID NO:171)。
下線は、軽鎖定常領域の一部である。

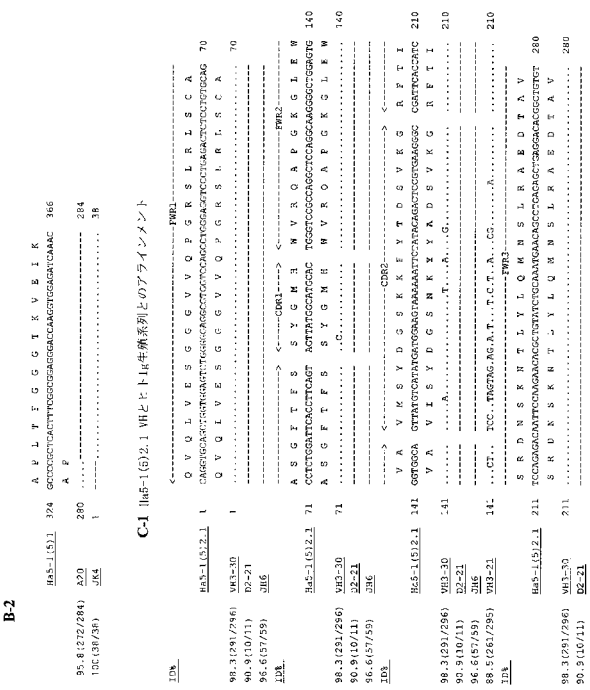
```
  1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SNAMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTCY
 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKAP YQLLPYYFDY WGQGTLVTVS
121 SASTKGPSVF PLA
```

【図４－０１】

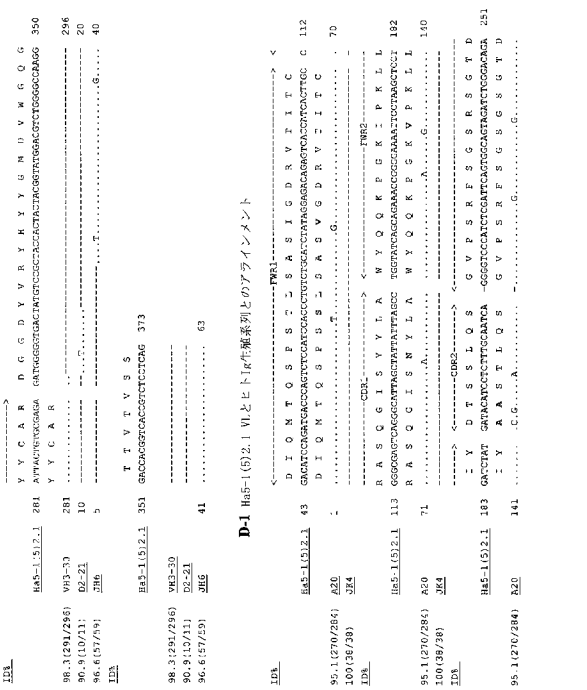


【図４－０２】

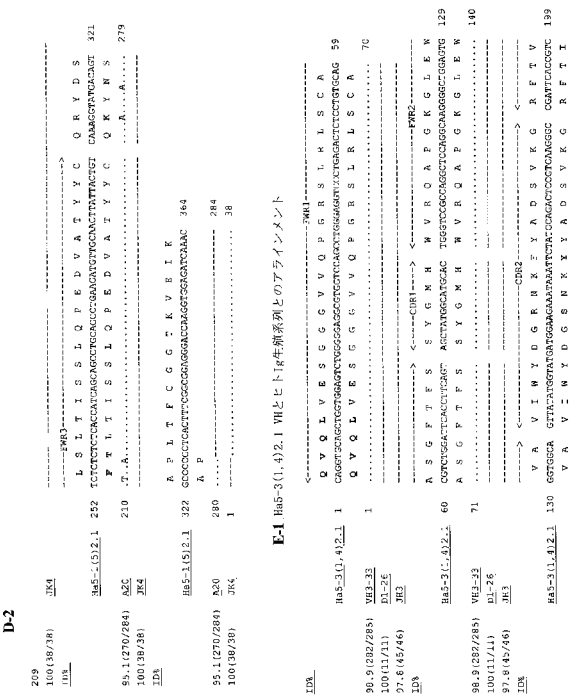
【図４－０３】



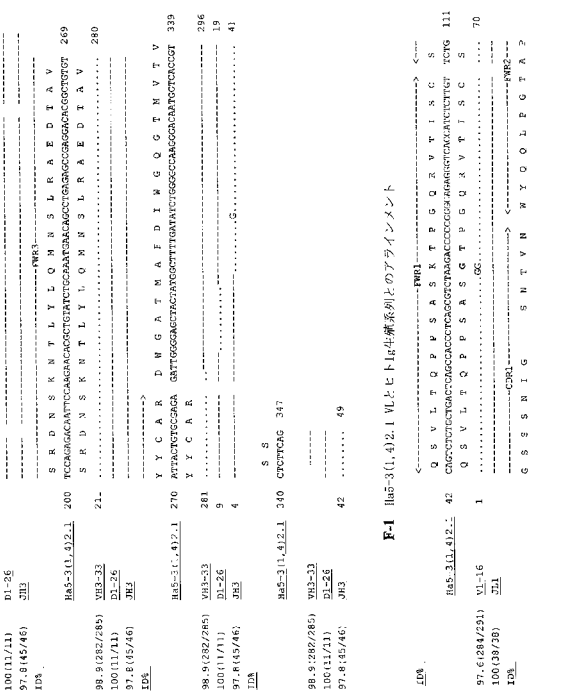
【図４－０４】



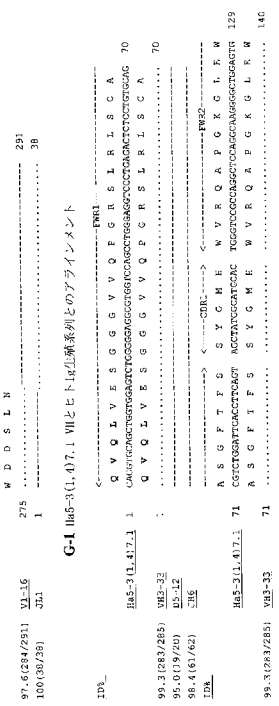
【図４－０５】



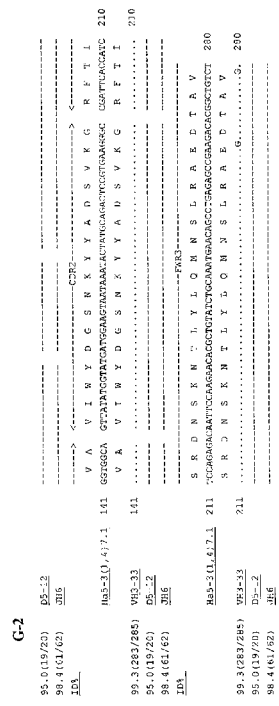
【図４－０６】



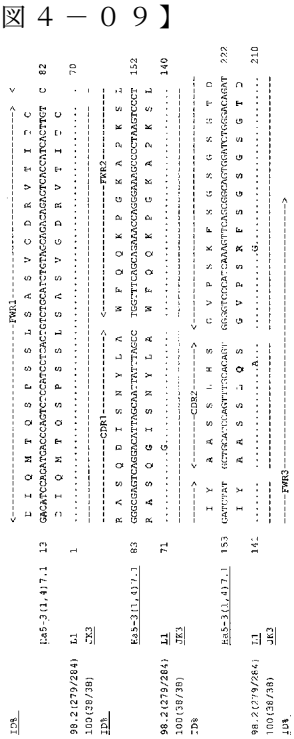
【図４－０７】



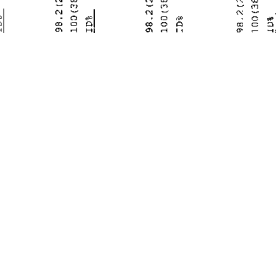
【図４－０８】



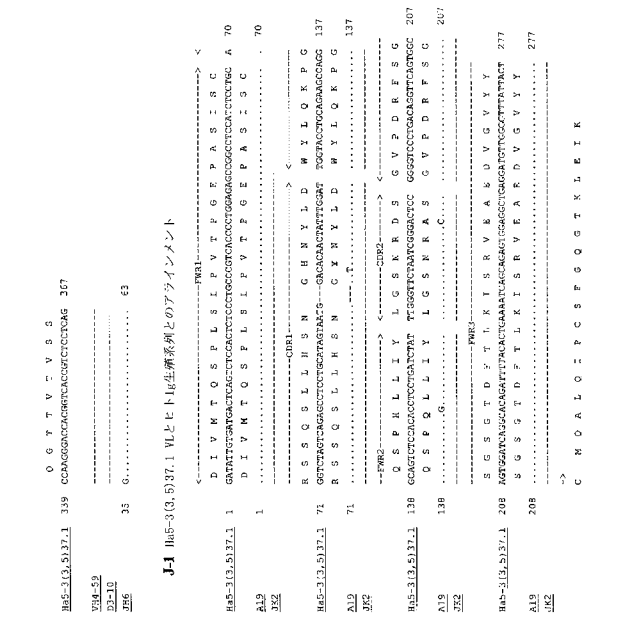
【図４－０９】



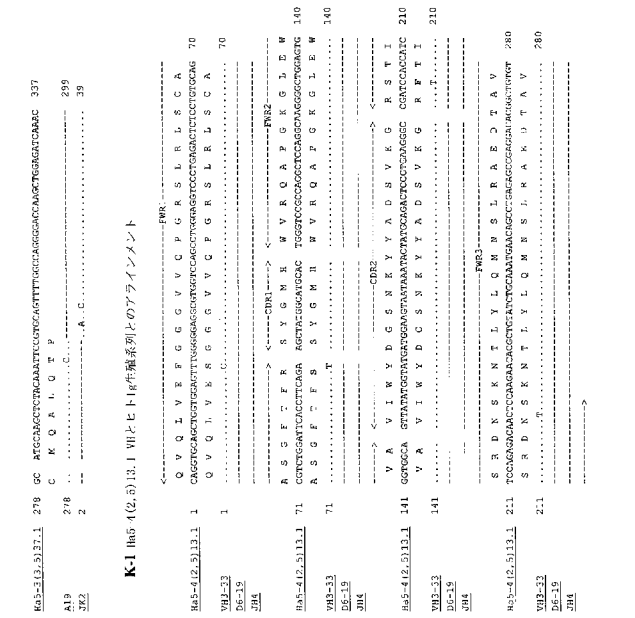
【図４－１０】



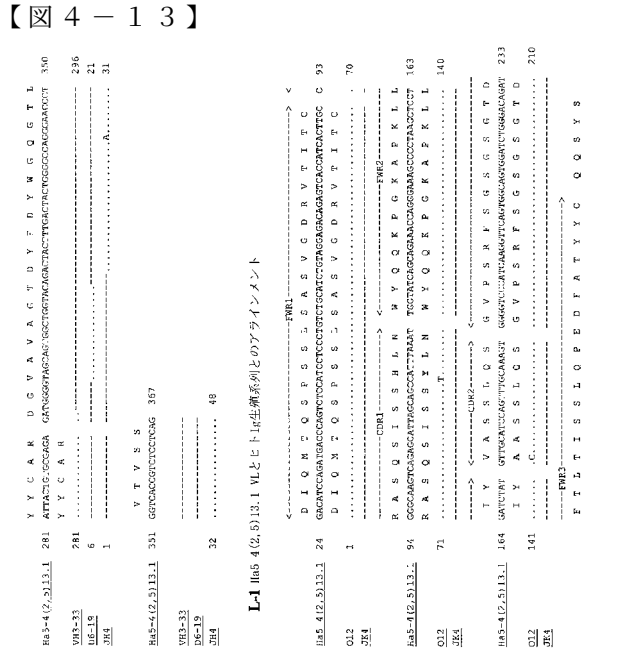
【図４－１１】



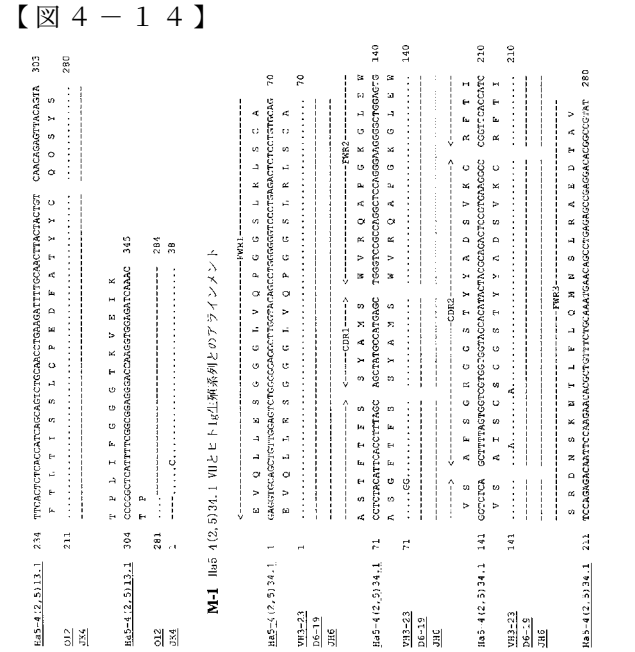
【図４－１２】



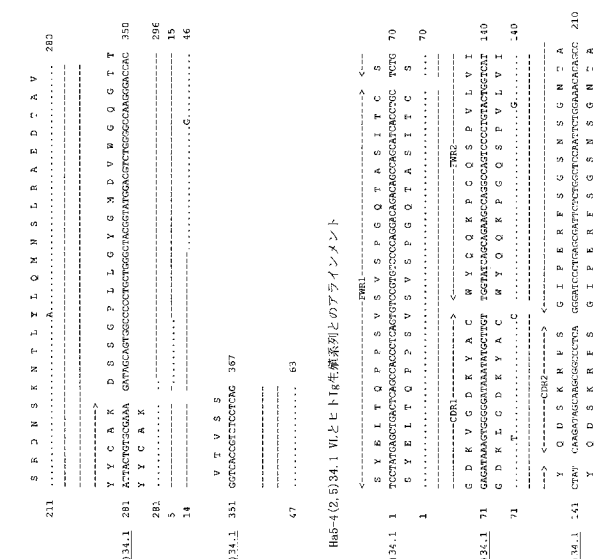
【図４－１３】



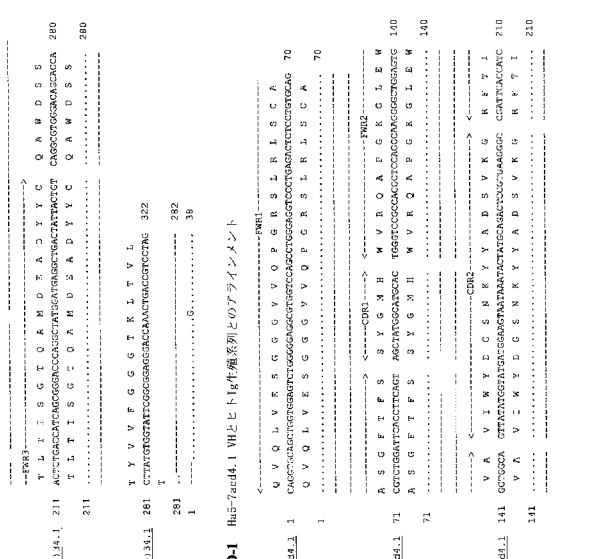
【図４－１４】



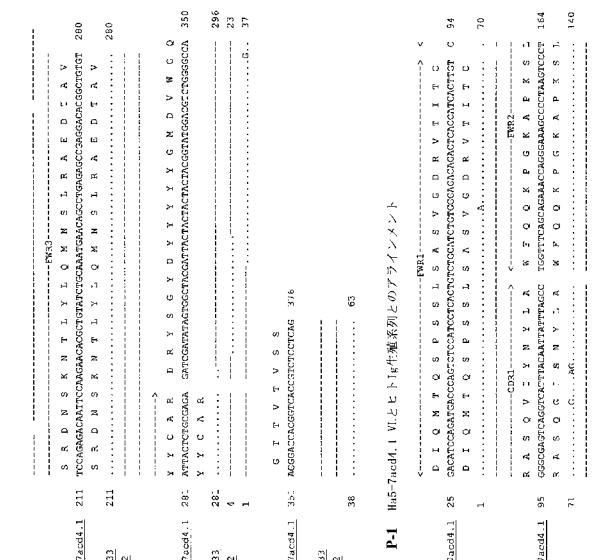
【図４－１５】



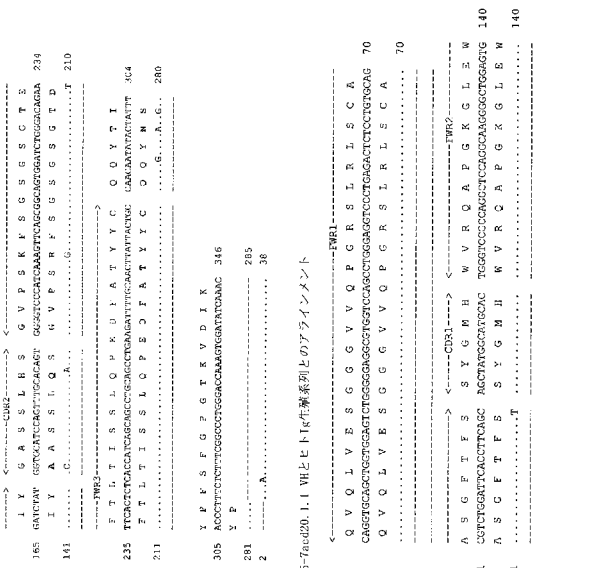
【図４－１６】



【図４－１７】

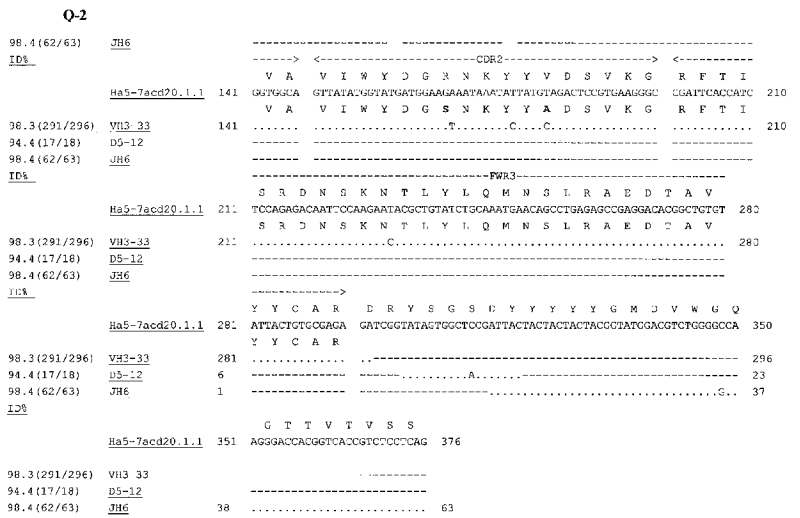


【図４－１８】



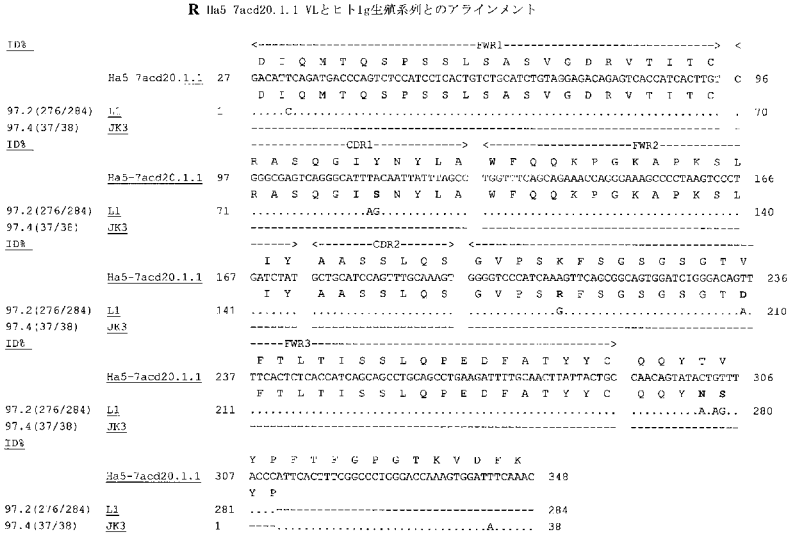
【図４－１９】

Q-2



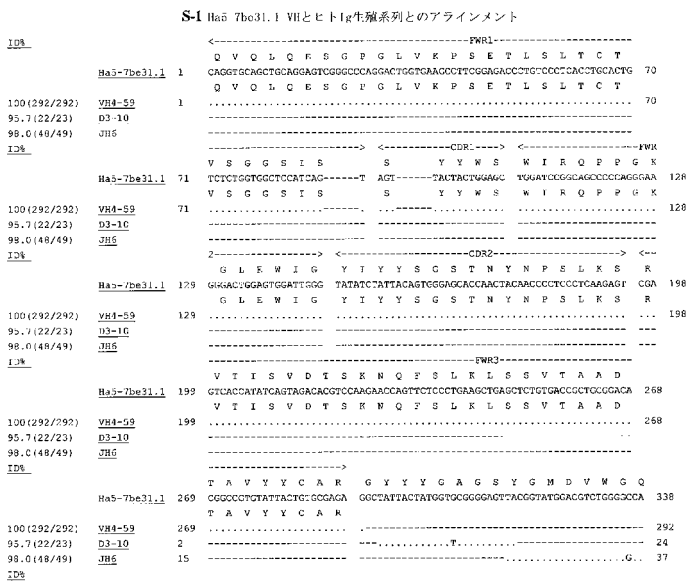
【図４－２０】

R Ha5 7acd20.1.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメント



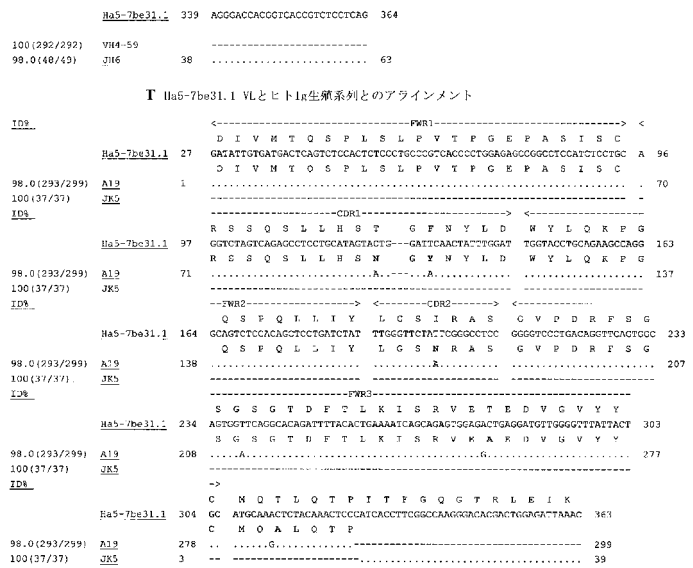
【図４－２１】

S-1 Ha5 7be31.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメント



【図４－２２】

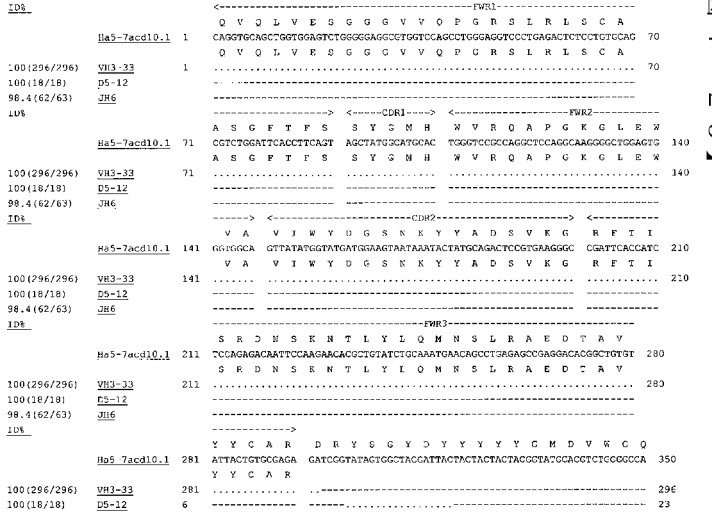
S-2



T Ha5-7be31.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメント

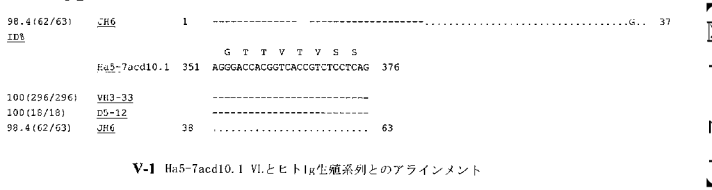
【図４－２３】

U-1 Ha5-7acd10.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメント

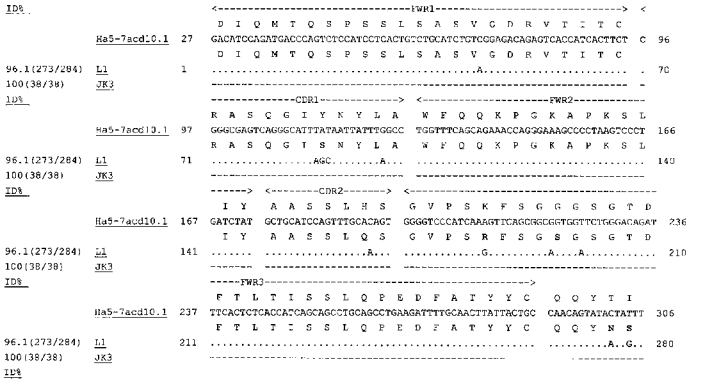


【図４－２４】

U-2

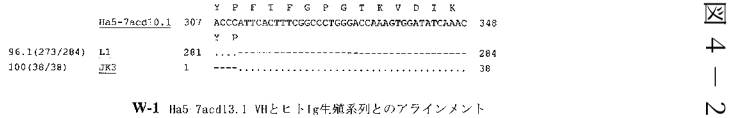


V-1 Ha5-7acd10.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメント

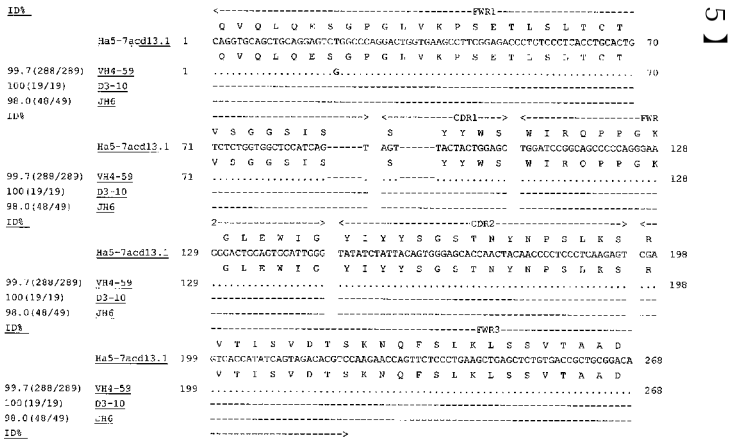


【図４－２５】

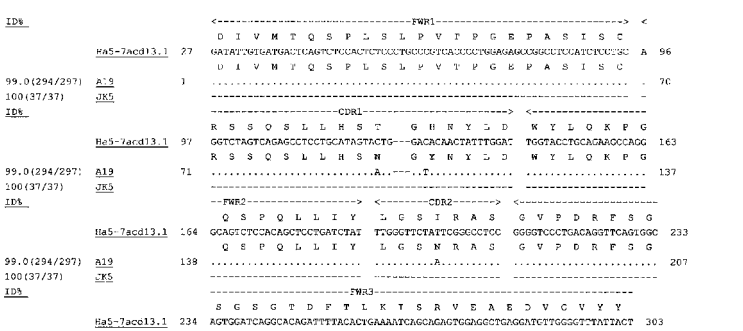
V-2



W-1 Ha5 7acd13.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメント

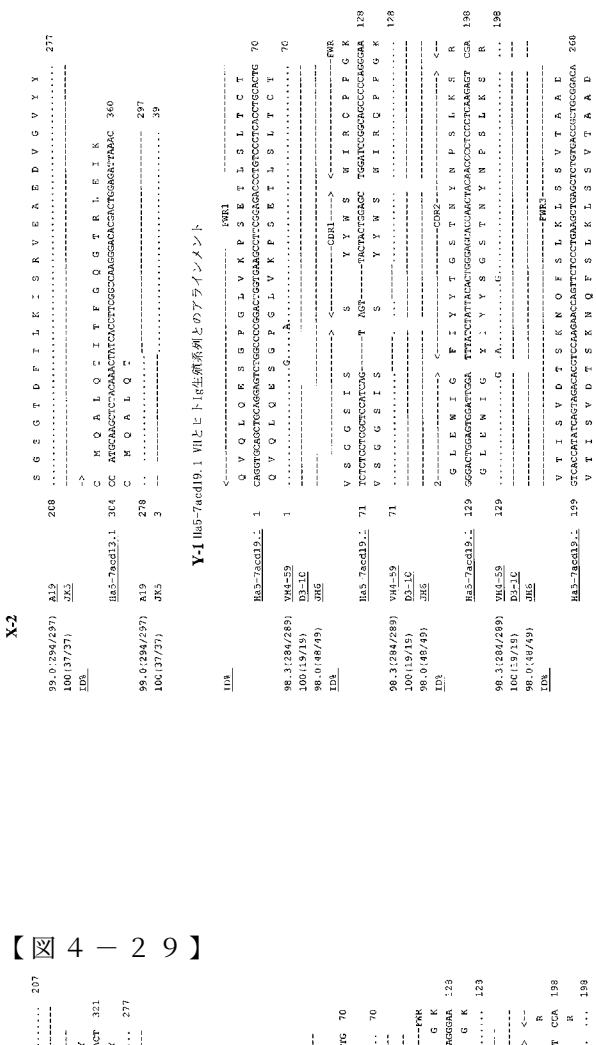


X-1 Ha5-7acd13.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメント

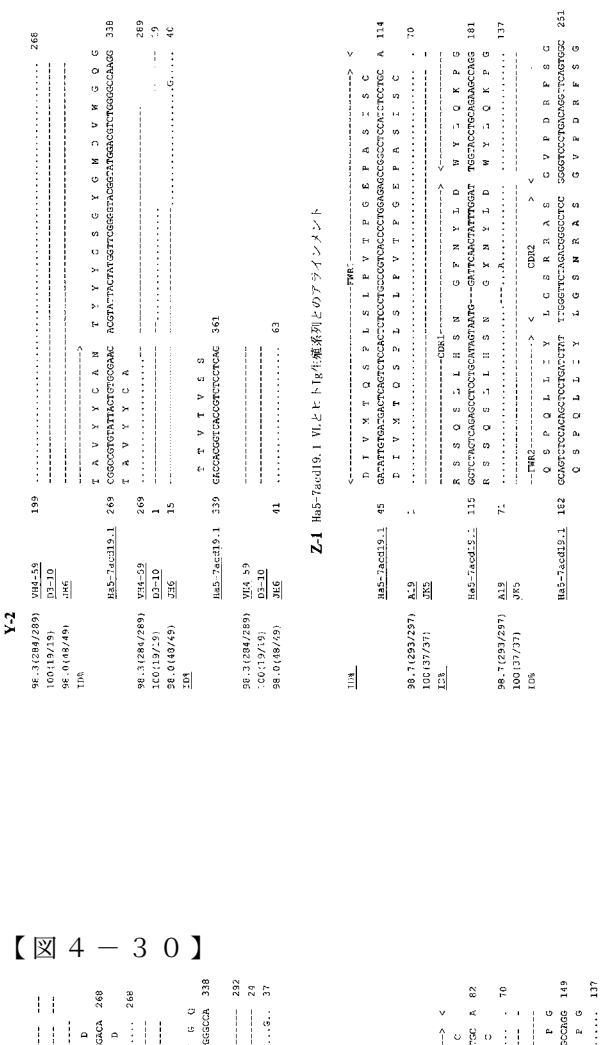


【図４－２６】

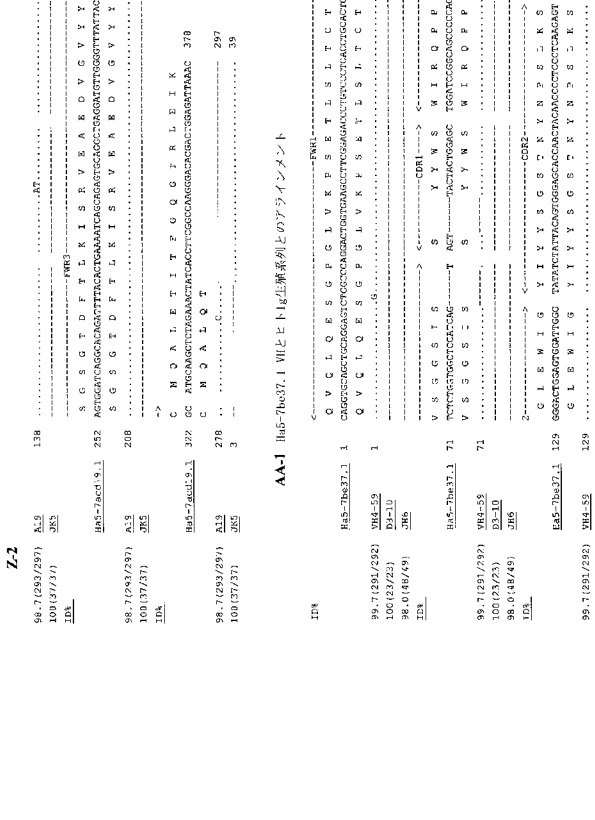
【図４－２７】



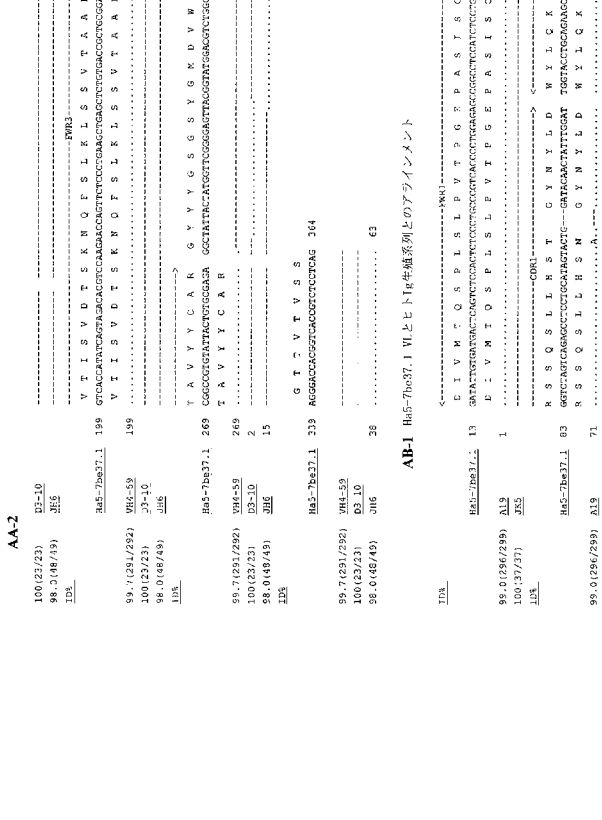
【図４－２８】



【図４－２９】

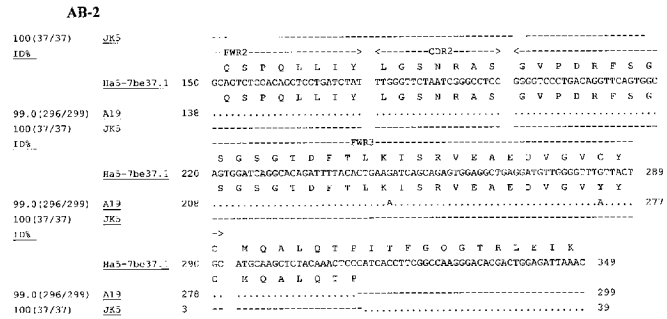


【図４－３０】

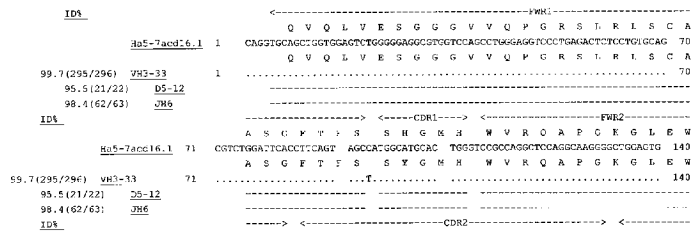


【図４－３１】

AB-2

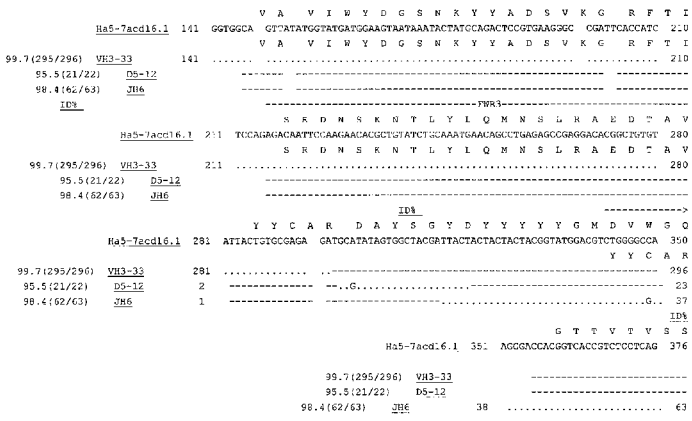


AC-1 Ha5-7acd16.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメント

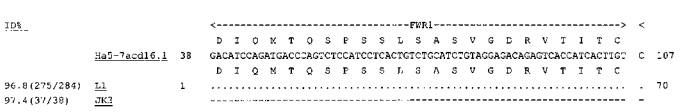


【図４－３２】

AC-2

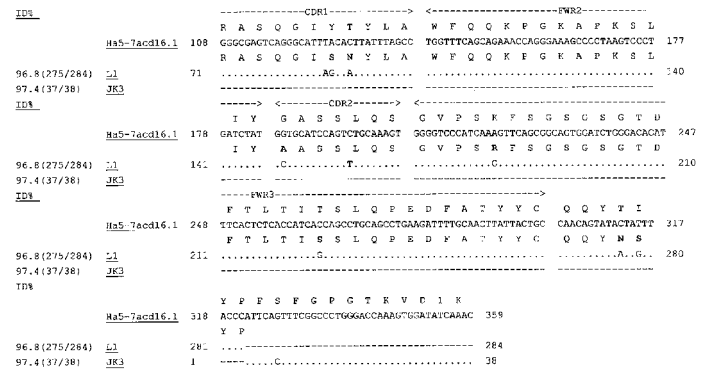


AD-1 Ha5-7acd16.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメント

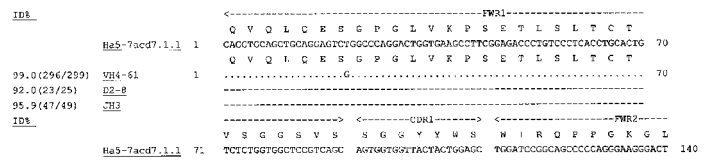


【図４－３３】

AD-2

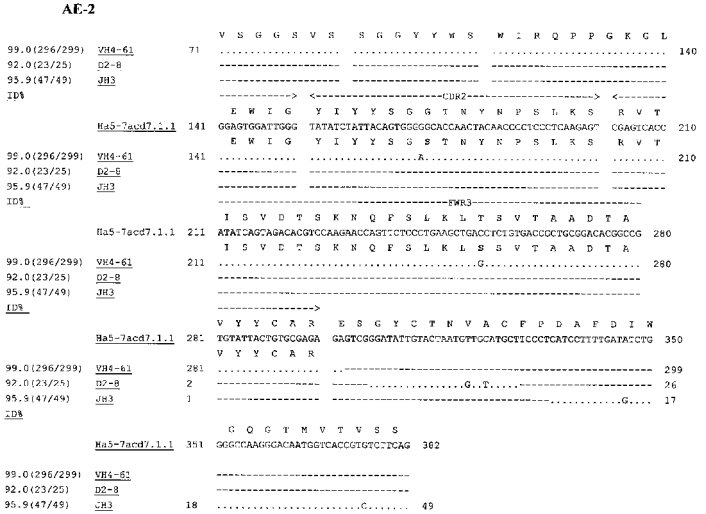


AE-1 Ha5-7acd7.1.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメント



【図４－３４】

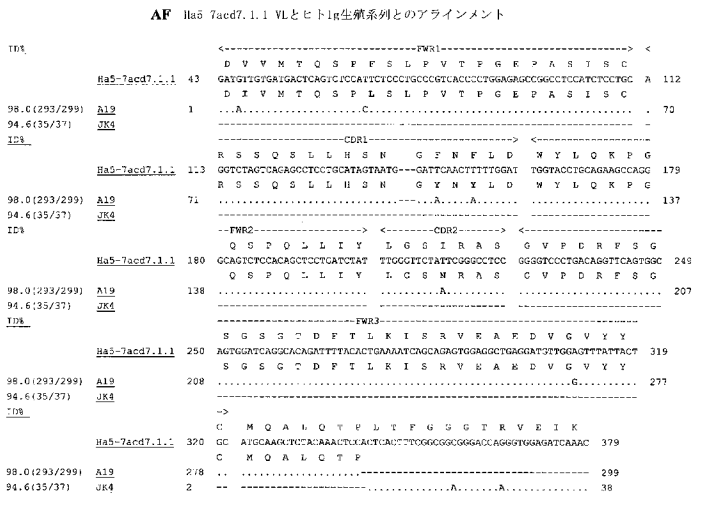
AE-2



JP 2010-537671 A 2010.12.9

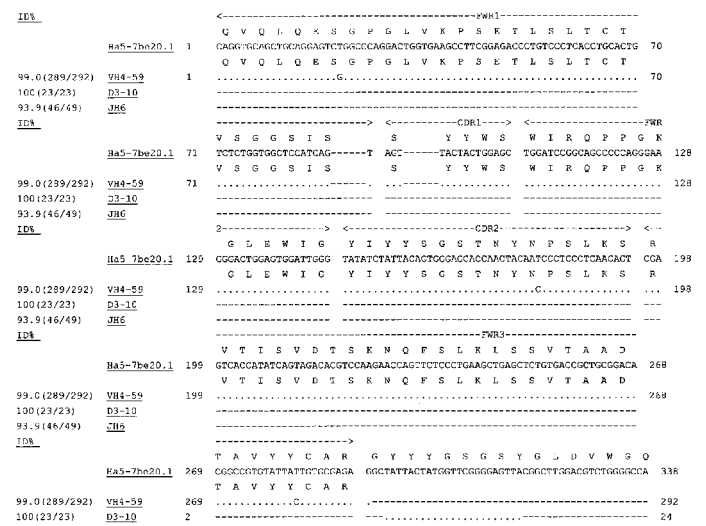
【図４－３５】

AF Ha5 7acd7.1.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメント



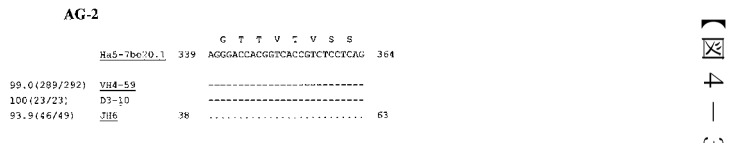
【図４－３６】

AG-1 Ha5-7be20.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメント

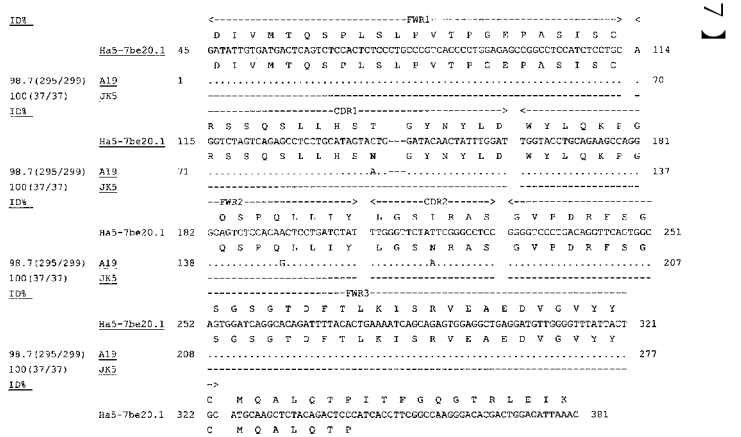


【図４－３７】

AG-2



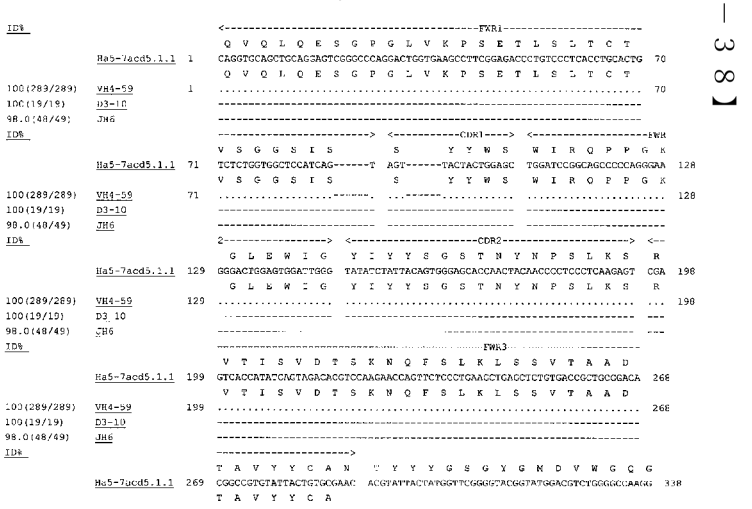
AH-1 Ha5-7be20.1 VLとヒトIg生殖系列とのアラインメント



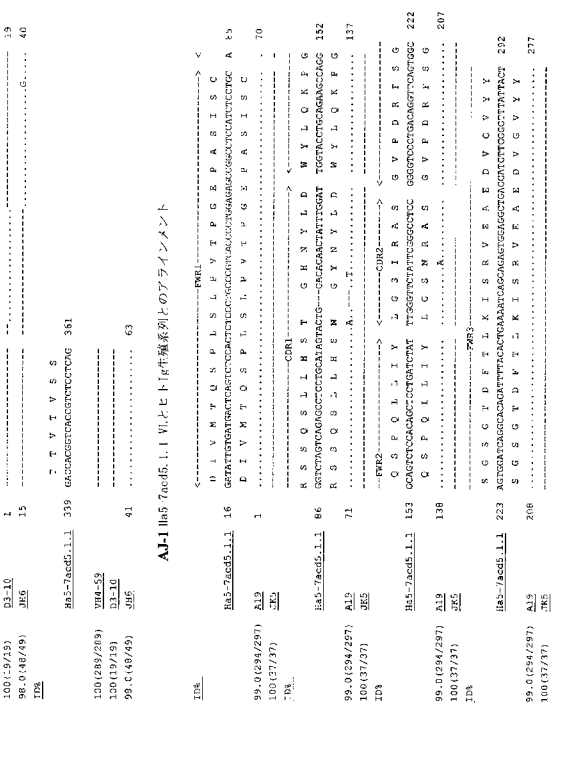
【図４－３８】

AH-2

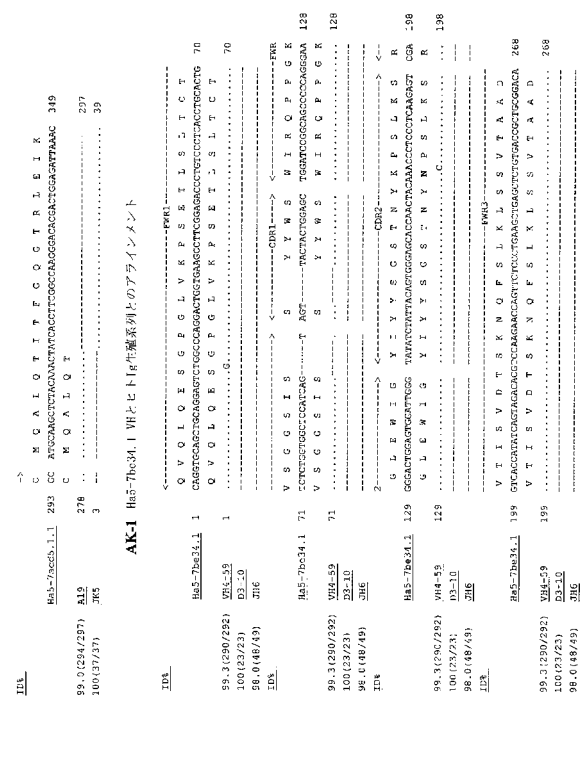
AI-1 Ha5 7acd5.1.1 VHとヒトIg生殖系列とのアラインメント



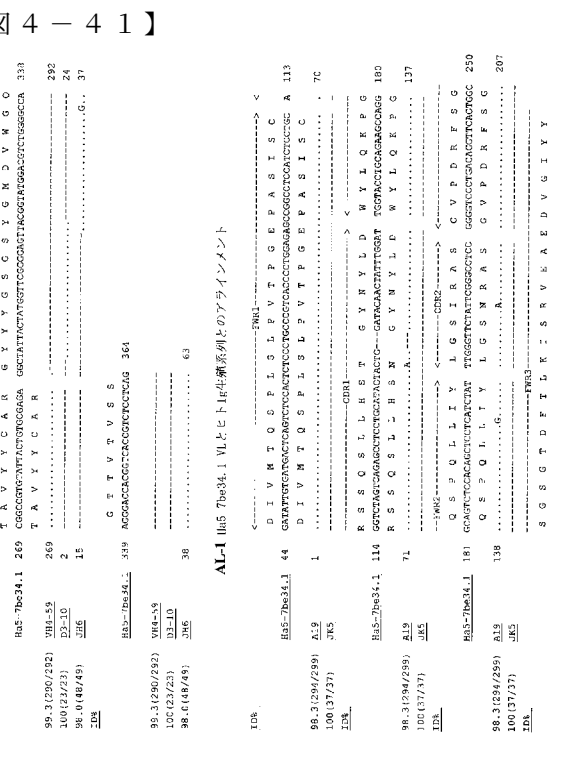
【図４－３９】



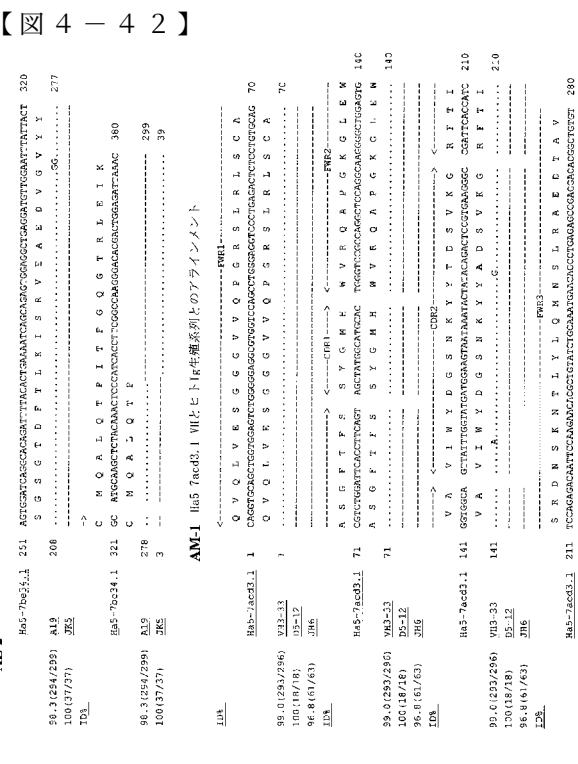
【図４－４０】



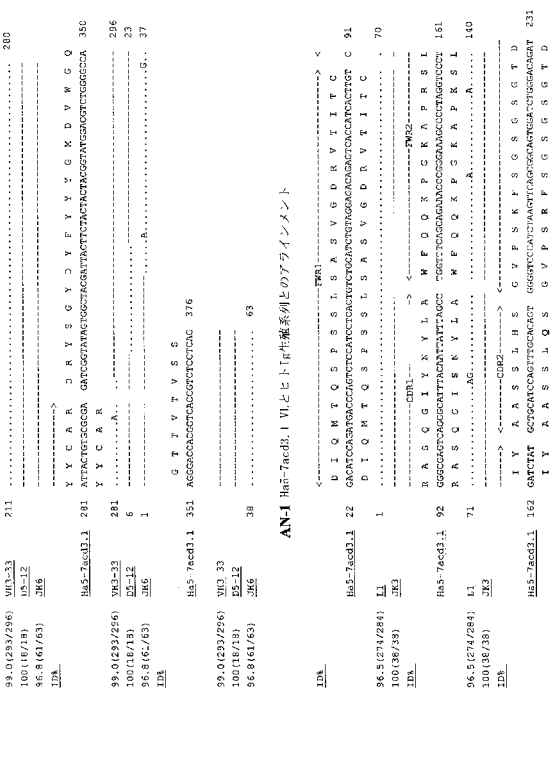
【図４－４１】



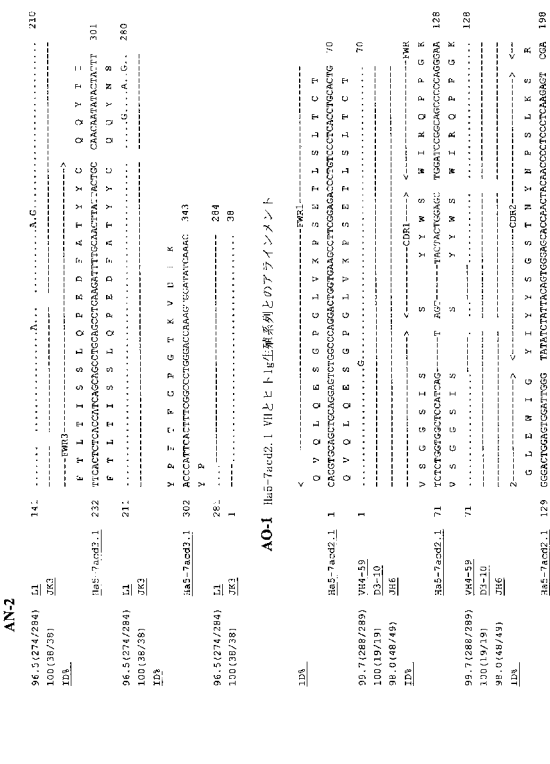
【図４－４２】



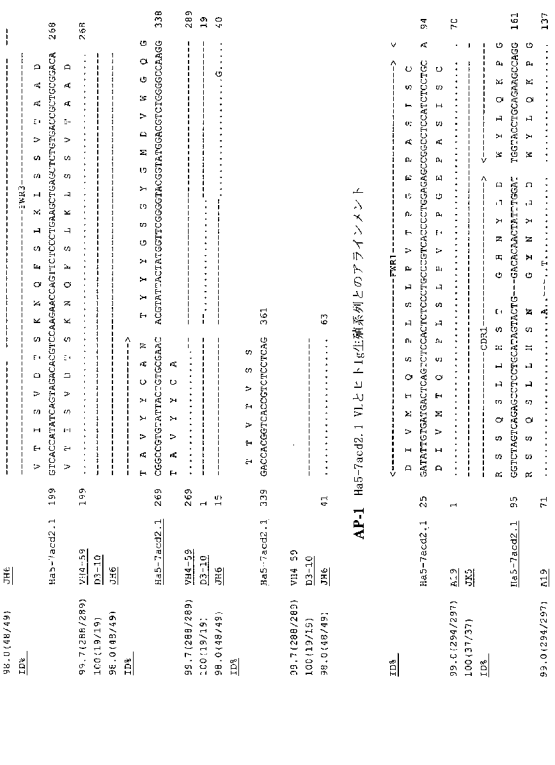
【図４－４３】



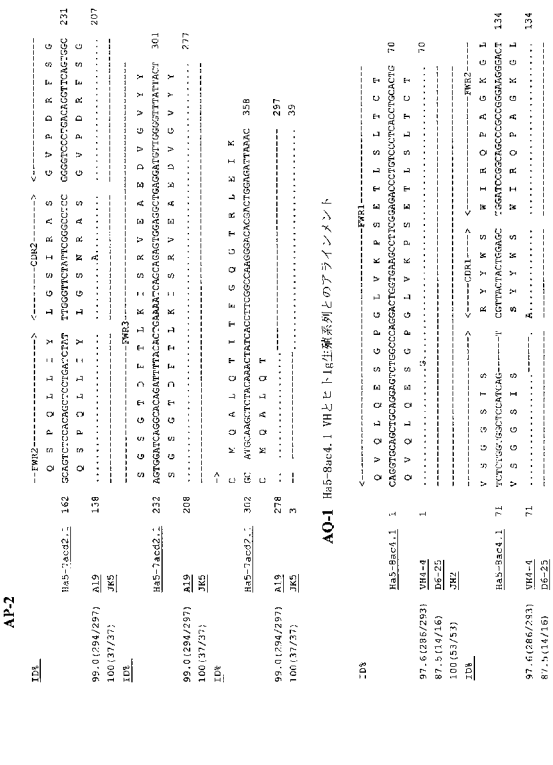
【図４－４４】



【図４－４５】

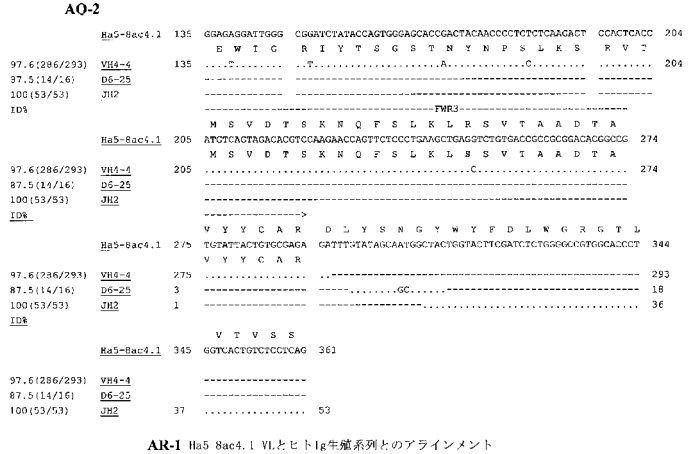


【図４－４６】



【図４－４７】

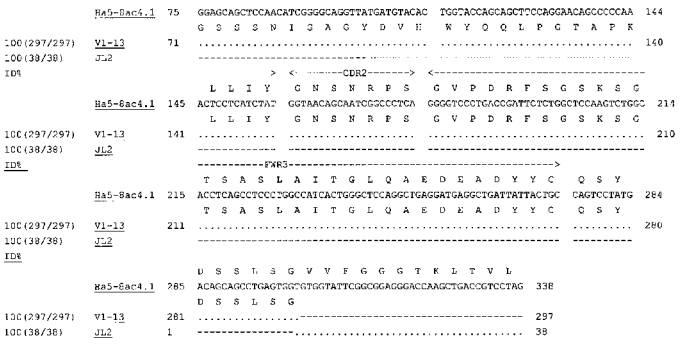
AQ-2



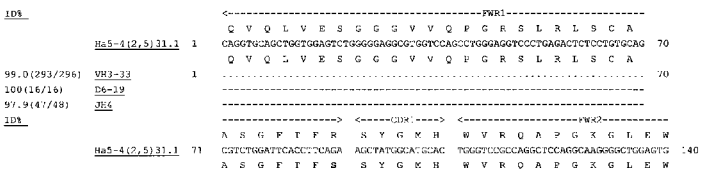
AR-1 Ha5 8ac4.1 VLとヒトIg生殖系列とのアライメント

【図４－４８】

AR-2

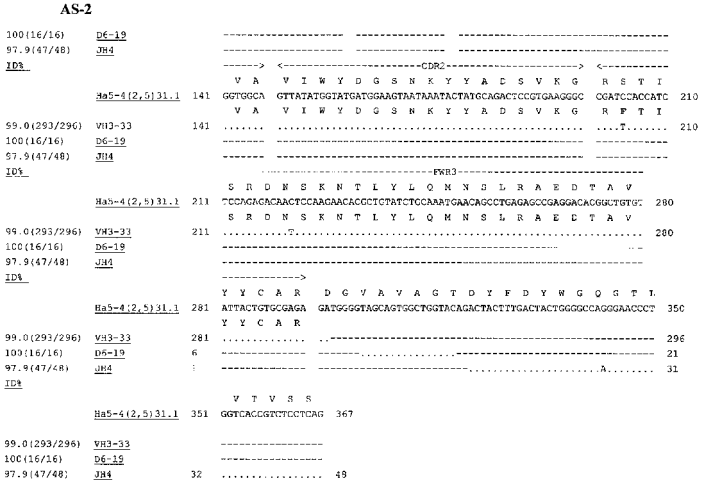


AS-1 Ha5-4(2,5)31.1 VHとヒトIg生殖系列とのアライメント



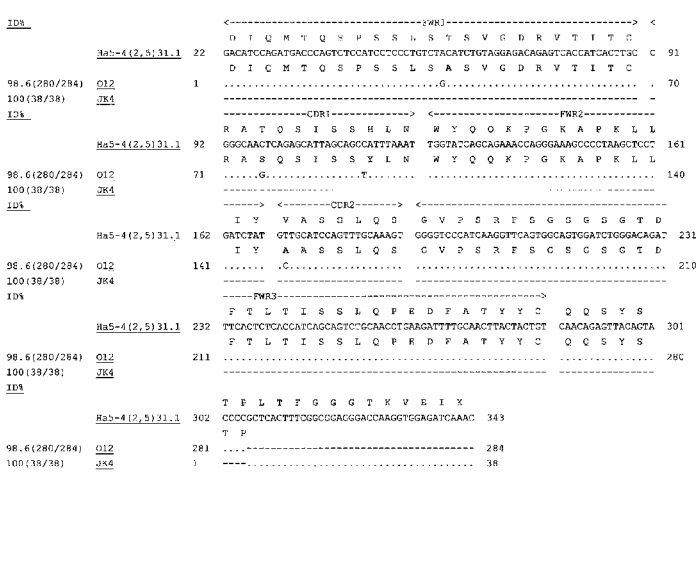
【図４－４９】

AS-2



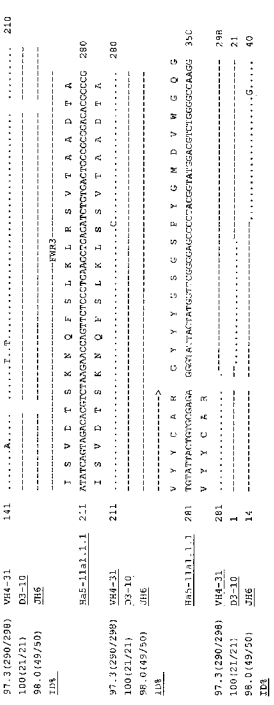
【図４－５０】

AT Ha5-4(2,5)31.1 VLとヒトIg生殖系列とのアライメント

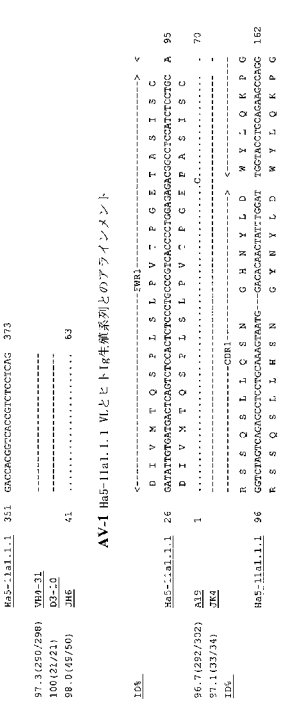


JP 2010-537671 A 2010.12.9

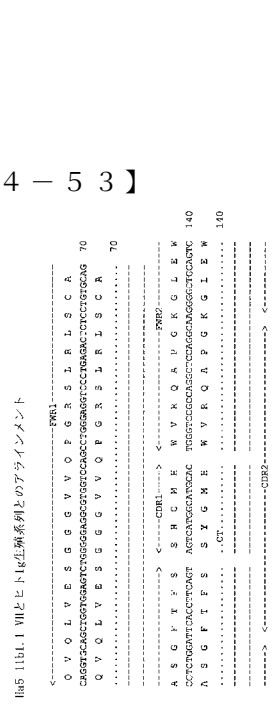
【図４－５１】



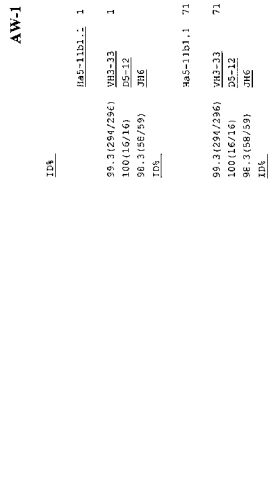
【図４－５２】



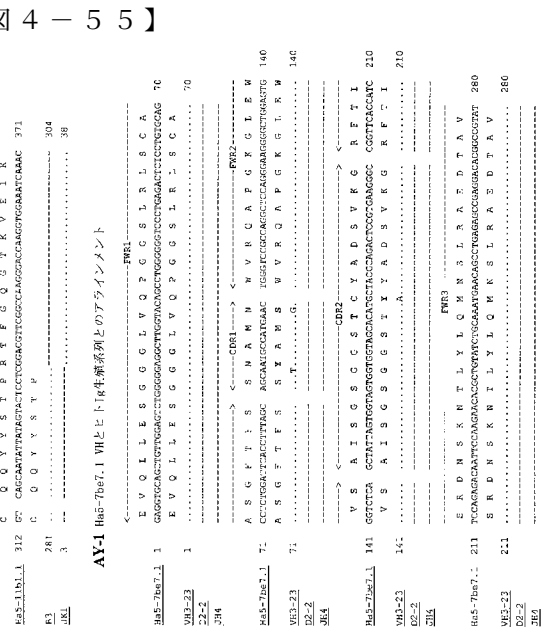
【図４－５３】



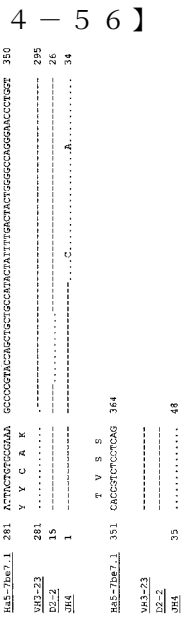
【図４－５４】



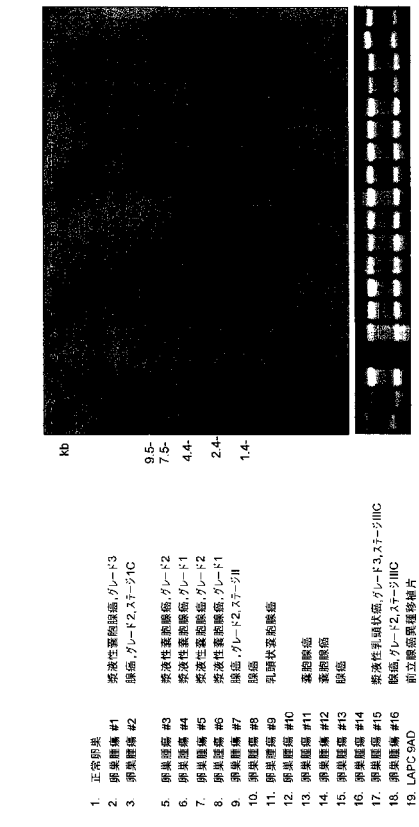
【図４－５５】



【図４－５６】



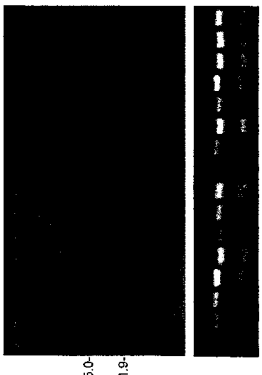
【図５Ａ】



【図５Ｂ】

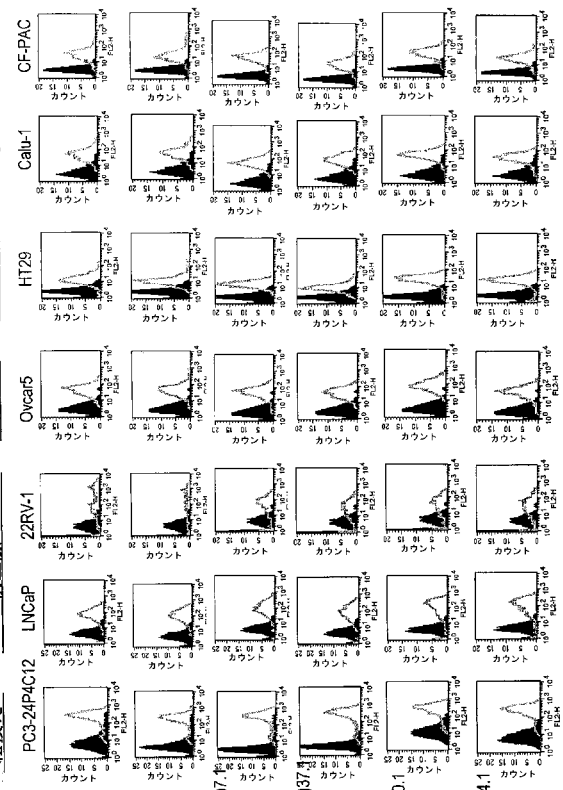
【図５Ｃ】

膵臓癌患者標本、異種移植片、および細胞株における24P4C12の発現

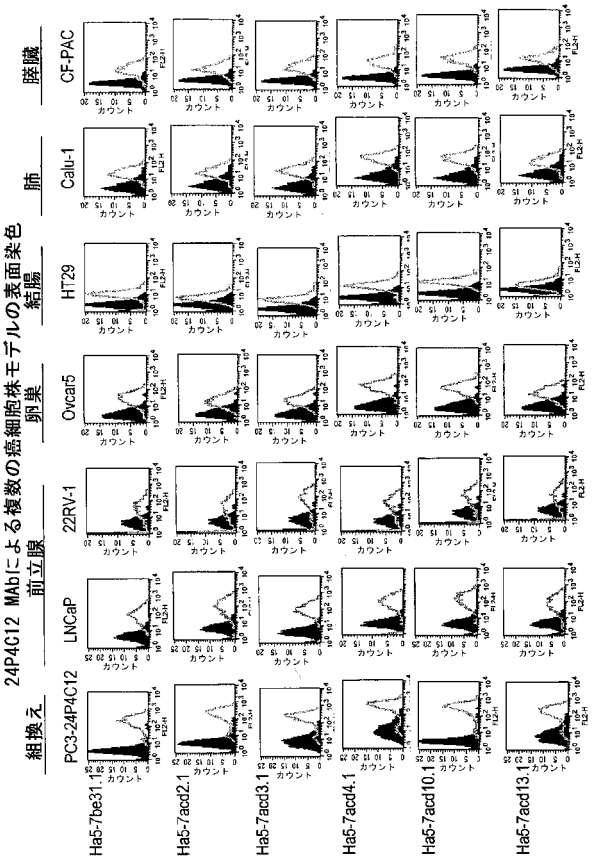


	サンプル名	診断
1	正常	正常膵臓
2	HPAC	膵臓癌細胞株
3	CAPAN-1	膵臓癌細胞株
4	CFPAC-1	膵臓癌細胞株
5	結腸腫瘍	腺癌：ステージIIA：グレード2
6	膵臓腫瘍 #1	腺癌：グレード1
7	膵臓腫瘍 #2	腺癌：ステージI：グレード1
8	膵臓腫瘍 #3	腺癌：グレード3
9	膵臓腫瘍 #4	腺癌：ステージIIB：グレード：低分化
10	膵臓腫瘍 #5	腺癌：ステージIIINX ステージIIB：グレード：低～中分化
11	膵臓腫瘍 #6	腺癌：グレード：II～III
12	膵臓腫瘍 #7	腺癌
13	AG-Panc1異種移植片	腺癌に由来する異種移植片： ステージIIB：グレード：低分化
14	AG-Panc2異種移植片	腺癌に由来する異種移植片： ステージIIINX、ステージIIB、 グレード：低～中
15	AG-Panc3異種移植片	腺癌に由来する異種移植片： グレード：中分化
16	AG-Panc4異種移植片	腺癌に由来する異種移植片： グレード：中分化

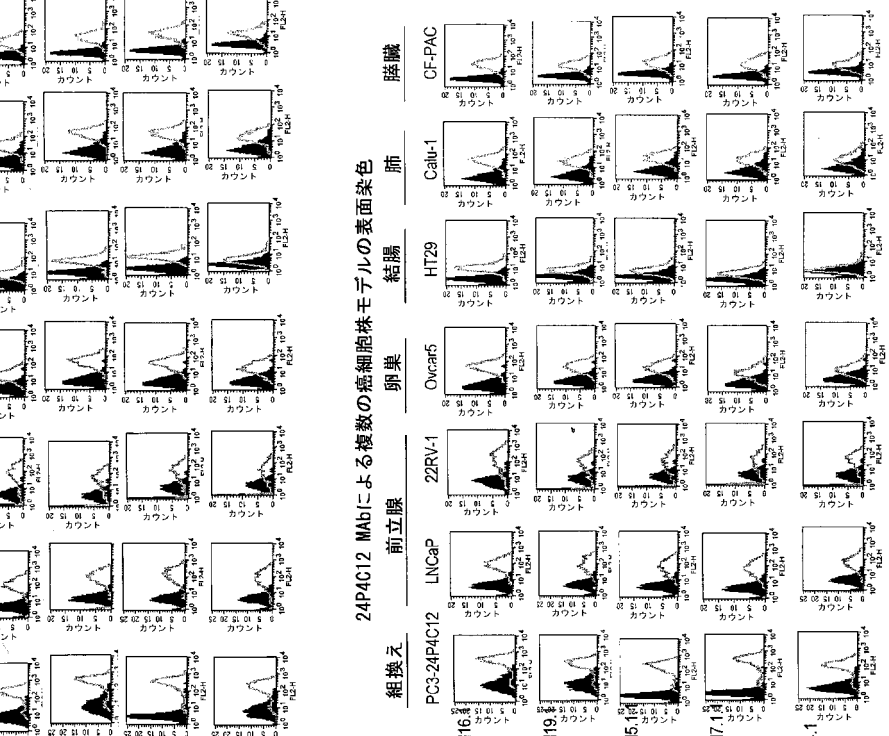
【図６Ａ】



【図６Ｂ】

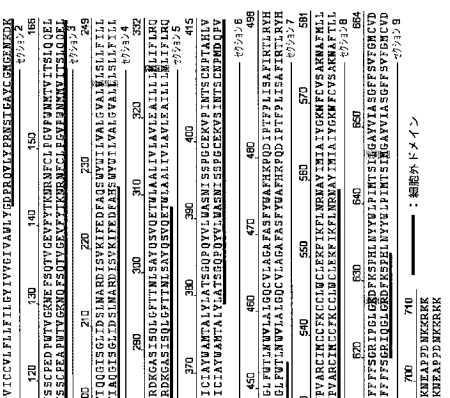


【図６Ｃ】



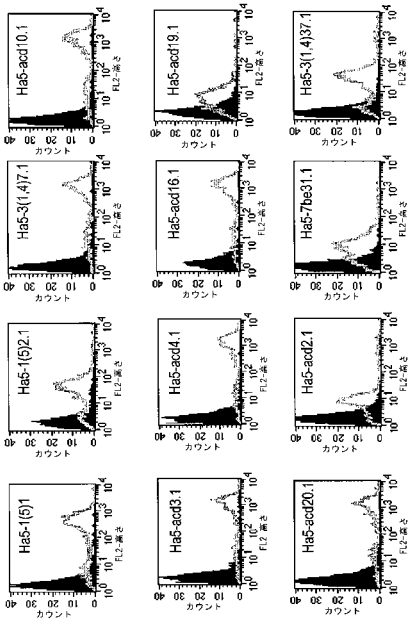
【図７】

24P4C12タンパク質配列とカニクイザルオルソログとのアラインメント
96.8%の同一性

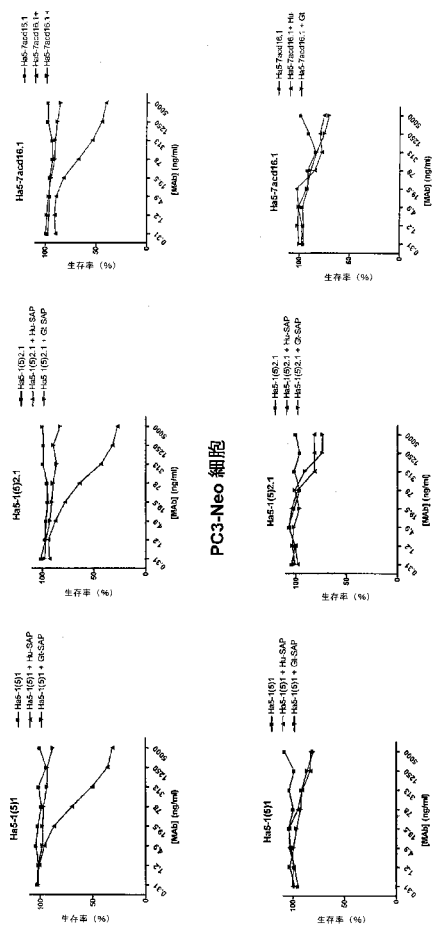


【図８】

MAbと、Rat1細胞において発現させた
24P4C12タンパク質カニクイザルオルソログとの表面結合

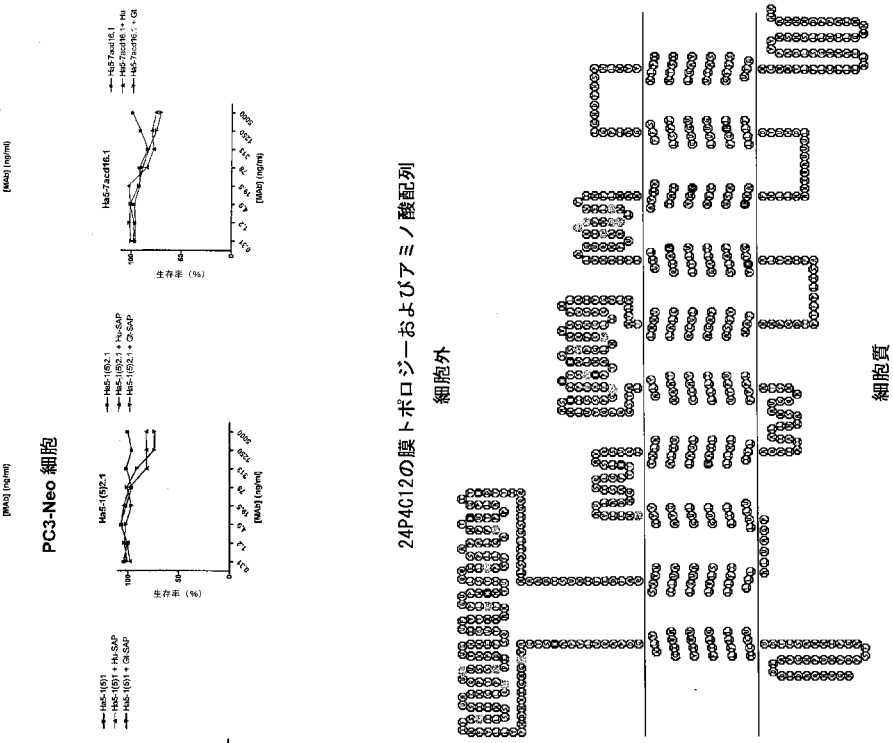


【図９】

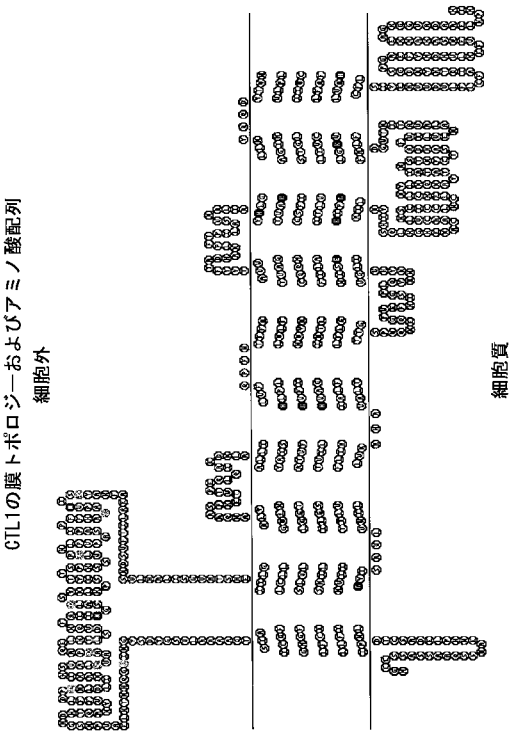


【図１０】

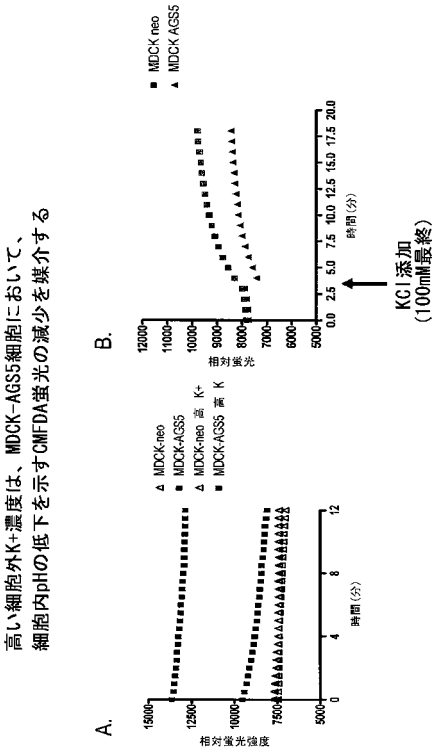
24P4C12の膜トポロジーおよびアミノ酸配列



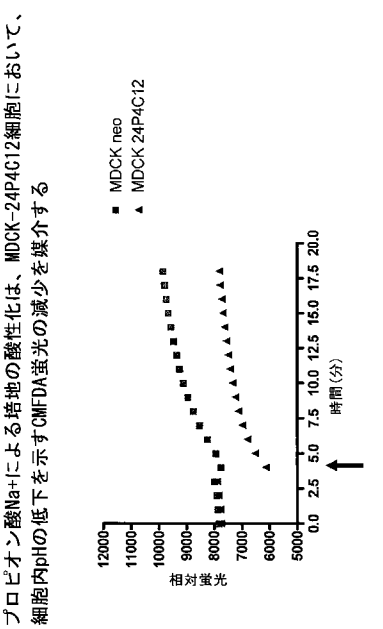
【図１１】



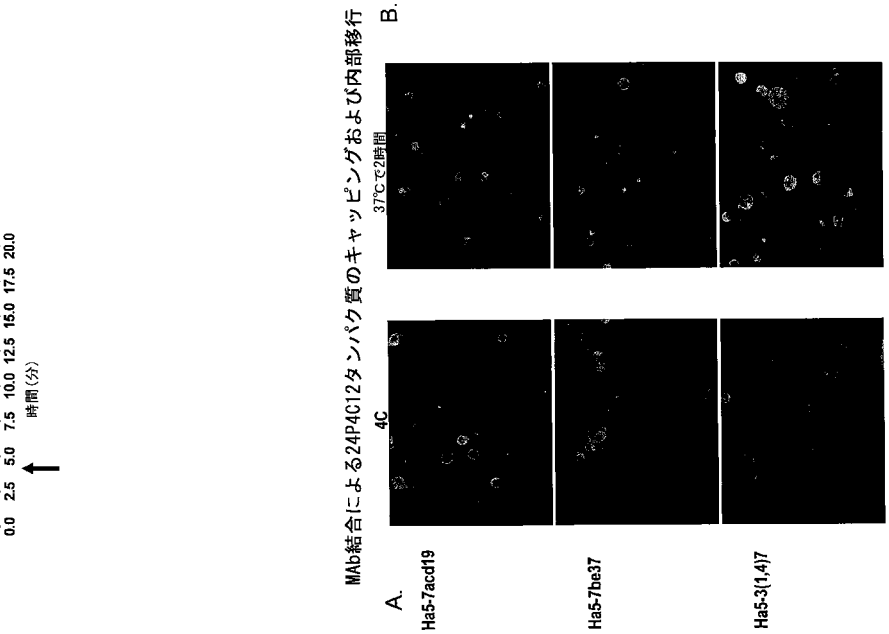
【図１２】



【図１３】



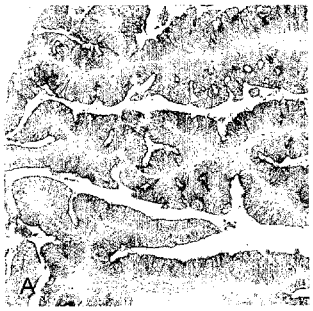
【図１４】



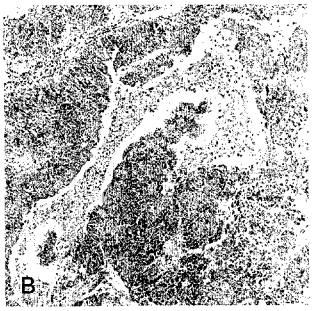
【図１５】

膵臓癌患者標本および卵巣癌患者標本における免疫組織化学による24P4C12タンパク質の検出

A: 卵巣癌標本



B: 膵臓癌標本



【配列表】

2010537671000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/75488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07H 21/02, A61K 31/713 (2009.01)
USPC - 514/44, 536/24.5, 435/375
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - C07H 21/02, A61K 31/713 (2009.01)
USPC - 514/44, 536/24.5, 435/375

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
IPC(8) - C07H 21/02, A61K 31/713 (2009.01) - see keyword below
USPC - 514/44, 536/24.5, 435/375 - see keyword below

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google
Search terms: 24P4C12, siRNA, double stranded, RNA, T-lymphocyte associated antigen-4, CTLA4, CD152, antisense, RNAi, interference, prostate, cancer, inhibit, composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005/0019870 A1 (AFAR et al.) 27 January 2005 (27.01.2005), para [0002], [0012], [0037], [0056], [0066], [0181], and [0258]	30
Y	US 2004/0228858 A1 (HANSON et al.) 18 November 2004 (18.11.2004), para [0018], [0047], [0088], and [0167]	30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 February 2009 (03.02.2009)	13 FEB 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/75488

Box No. II ***Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)***

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-29 and 45-48
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

the claims are incomplete

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III **Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The special technical feature is a composition comprising a siRNA molecule to 24P4C12, wherein the siRNA molecule contains a sequence that corresponds to the nucleic acid that encodes a subsequence of SEQ ID NO: 2. There is prior art on a nucleic acid encoding a 24P4C12 protein and subsequence of SEQ ID NO: 2, see Afar et al. (US 6943235). There is also prior art on making siRNA to inhibit target mRNA, see Raitano et al (US 20040083497). Thus, it would have been obvious to make the composition.

Groups 1-51: claim 30, directed towards a composition comprising 24P4C12 siRNA that corresponds to the nucleic acid that encodes a protein set forth by cDNA sequences represented by all odd SEQ ID NOs between SEQ ID NO: 19 and SEQ ID NO: 119, and *corresponding amino acid sequences represented by all even SEQ ID NOs between SEQ ID NO: 20 and SEQ ID NO: 120.*

---Please see continuation on extra sheet---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
30, limited to SEQ ID NOs: 19 and 20

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 08/75488

Continuation of: Box No. III (Observations where unity of invention is lacking)

In this case, the first named sequences that will be searched without additional fees is Group 1, represented by claim 30, limited to cDNA sequence SEQ ID NO: 19 and its corresponding amino acid sequence SEQ ID NO: 20. In order for more sequences to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid and the desired sequences clearly identified.

Group 52+, claims 31-44, drawn to a method for identifying a molecule that modulates cell proliferation comprising introducing the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, a nucleotide sequence that encodes a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in Figure 3, and 24P4C12 siRNA that corresponds to the nucleic acid that encodes a protein set forth by cDNA sequences represented by all odd SEQ ID NOs between SEQ ID NO: 19 and SEQ ID NO: 119, and corresponding amino acid sequences represented by all even SEQ ID NOs between SEQ ID NO: 20 and SEQ ID NO: 120. In this case, the first named sequences that will be searched with additional fees is cDNA SEQ ID NO: 19 and its corresponding amino acid SEQ ID NO: 20. In order for more sequences to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid and the desired sequences clearly identified.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***15/113***	***(2010.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ｇ	４Ｈ０４５
A61K	***48/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	48/00		
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｌ	
A61K	***38/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/00		
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
C07K	***19/00***	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ	19/00		
G01N	***33/53***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
G01N	***33/574***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ａ	
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
C07K	*14/82*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/82		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 レイタノ アーサー ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５
(72)発明者 モリスン ロバート ケンダル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５
(72)発明者 モリスン カレン ジェイン メイリック
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５
(72)発明者 カーンメール スティーブン ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５
(72)発明者 シャリーターエイド ピア エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５
(72)発明者 チア シャオーチ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５
(72)発明者 ガダス ジーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５
(72)発明者 ジェイコボヴィッツ アヤ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ コロラド ブールバード ２２２５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA54 CA04
4B064 AG27 BJ12 CA02 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AA90Y AB04 AC15 BA08 CA25 CA44
4C084 AA02 AA13 DA32 NA13 ZB212 ZB262
4C085 AA14 AA21 AA27 BB31 BB41 BB42 CC23 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 DA86 EA28 FA74

【要約の続き】

24P4C12変異体1のcDNA配列(SEQ ID NO:1)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:2)。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含めて核酸6～2138に及ぶ。
開始メチオニンには下線が引いてある。

```
   1      M  G  G  K  Q  R  D  E  D  D  E  A  Y  G  K  P  V  K  Y
   1 gagccATGGGGGGAAAGCAGCGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
  20   D  P  S  F  R  G  P  I  K  N  R  S  C  T  D  V  I  C  C  V
  61 ACGACCCCTCCTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
  40   L  F  L  L  F  I  L  G  Y  I  V  V  G  I  V  A  W  L  Y  G
 121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
  60   D  P  R  Q  V  L  Y  P  R  N  S  T  G  A  Y  C  G  M  G  E
 181 GAGACCCCCGGCAAGTCCTCTACCCCAGGAACTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
  80   N  K  D  K  P  Y  L  L  Y  F  N  I  F  S  C  I  L  S  S  N
 241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
 100   I  I  S  V  A  E  N  G  L  Q  C  P  T  P  Q  V  C  V  S  S
 301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCCAGGTGTGTGTGTCCT
 120   C  P  E  D  P  W  T  V  G  K  N  E  F  S  Q  T  V  G  E  V
 361 CCTGCCCGGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
 140   F  Y  T  K  N  R  N  F  C  L  P  G  V  P  W  N  M  T  V  I
 421 TCTTCTATACAAAAACAGGAACTTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
 160   T  S  L  Q  Q  E  L  C  P  S  F  L  L  P  S  A  P  A  L  G
 481 TCACAAGCCTGCAACAGGAACTCTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
 180   R  C  F  P  W  T  N  V  T  P  P  A  L  P  G  I  T  N  D  T
 541 GGCGCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
 200   T  I  Q  Q  G  I  S  G  L  I  D  S  L  N  A  R  D  I  S  V
 601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCGAGACATCAGTG
 220   K  I  F  E  D  F  A  Q  S  W  Y  W  I  L  V  A  L  G  V  A
 661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTTGCCCTGGGGGTGG
 240   L  V  L  S  L  L  F  I  L  L  L  R  L  V  A  G  P  L  V  L
 721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCCTGGTGC
 260   V  L  I  L  G  V  L  G  V  L  A  Y  G  I  Y  Y  C  W  E  E
 781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATACGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
 280   Y  R  V  L  R  D  K  G  A  S  I  S  Q  L  G  F  T  T  N  L
 841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
 300   S  A  Y  Q  S  V  Q  E  T  W  L  A  A  L  I  V  L  A  V  L
 901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTGCAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTTGGCGGTGC
 320   E  A  I  L  L  L  M  L  I  F  L  R  Q  R  I  R  I  A  I  A
 961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCCTGCGGCAGCGGATTCGTATTGCCATCG
 340   L  L  K  E  A  S  K  A  V  G  Q  M  M  S  T  M  F  Y  P  L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
 360   V  T  F  V  L  L  L  I  C  I  A  Y  W  A  M  T  A  L  Y  L
1081 TGGTCACCTTTGTCCTCCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
```

专利名称(译)	与24P4C12蛋白结合的抗体和相关分子		
公开(公告)号	JP2010537671A	公开(公告)日	2010-12-09
申请号	JP2010524202	申请日	2008-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	艾更斯司股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Agensys公司		
[标]发明人	レイタノアーサービー モリスンロバートケンダル モリスンカレンジェインメイリック カーンメールスティーブンビー シャリータエイドピアエム チアシャオチ ガダスジーン ジェイコボヴィッツアヤ		
发明人	レイタノ アーサー ビー. モリスン ロバート ケンダル モリスン カレン ジェイン メイリック カーンメール スティーブン ビー. シャリータ-エイド ピア エム. チア シャオ-チ ガダス ジーン ジェイコボヴィッツ アヤ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/30 C12N15/02 A01K67/027 C12N5/10 C12N15/113 A61K48/00 A61P35/00 A61K39/395 A61K38/00 A61P43/00 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/574 C12P21/08 C07K14/82		
CPC分类号	A01K2267/0331 A61K51/1045 C07K16/30 C07K16/3015 C07K16/303 C07K16/3046 C07K2317/56 C07K2317/732 C07K2317/77 G01N33/57484 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/30 C12N15/00.C A01K67/027 C12N5/00.102 C12N15/00.G A61K48/00 A61P35/00 A61K39/395.L A61K37/00 A61P43/00.105 C07K19/00 G01N33/53.D G01N33/574.A C12P21/08 C07K14/82		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA54 4B024/CA04 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC15 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/DA32 4C084/NA13 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA27 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关		
优先权	61/190,034 2007-09-07 US PCT/US2007/077942 2007-09-07 WO		
其他公开文献	JP2010537671A5 JP5518711B2		

外部链接 Espacenet

摘要(译)

描述了与24P4C12蛋白及其变体结合的抗体和由其衍生的分子，其中24P4C12在正常成人组织中表现出组织特异性表达，并且在表I中列出的癌症中异常表达。因此，24P4C12提供诊断，预后，预防和/或癌症的治疗靶点。 24P4C12基因或其片段，或其编码的蛋白质，或其变体，或其片段，可用于引发体液或细胞免疫应答;与24P4C12反应的抗体或T细胞可用于主动或被动免疫。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-53
(P2010-537
(43)公表日　平成22年12月9日(2010.

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4B064
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	4B065
A01K 67/027	(2006.01)	A01K	67/027		4C084
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102	4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 163 頁）　最終頁に

(21)出願番号　特願2010-524202 (P2010-524202)
(86)(22)出願日　平成20年9月5日 (2008.9.5)
(85)翻訳文提出日　平成22年4月27日 (2010.4.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/075488
(87)国際公開番号　WO2009/033094
(87)国際公開日　平成21年3月12日 (2009.3.12)
(31)優先権主張番号　61/190,034
(32)優先日　平成19年9月7日 (2007.9.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2007/077942
(32)優先日　平成19年9月7日 (2007.9.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500553659
アジェンシス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９０４，　サンタ　モニカ，　コロラドールバード　２２２５
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

最終頁に続