

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 523207**

(P2003 - 523207A)

(43)公表日 平成15年8月5日(2003.8.5)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	C 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/395			D 4 B 0 2 4
			L 4 B 0 6 3
			N 4 B 0 6 4
		45/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全208数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 561030(P2001 - 561030)

(86) (22)出願日 平成13年1月25日(2001.1.25)

(85)翻訳文提出日 平成14年7月25日(2002.7.25)

(86)国際出願番号 PCT/US01/02622

(87)国際公開番号 W001/055178

(87)国際公開日 平成13年8月2日(2001.8.2)

(31)優先権主張番号 60/177,951

(32)優先日 平成12年1月25日(2000.1.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/195,761

(32)優先日 平成12年4月10日(2000.4.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ジェネンテック・インコーポレーテッド  
GENENTECH, INC.  
アメリカ合衆国カリフォルニア・94080 - 4  
990・サウス・サン・フランシスコ・ディー  
エヌエー・ウェイ・1

(72)発明者 ゴッダード, オードリー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131,  
サン フランシスコ, コンゴ ストリート  
110

(72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002,  
ベルモント, デビー レーン 1

(74)代理人 弁理士 園田 吉隆 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L I V - 1 関連タンパク質、それをコードするポリヌクレオチド、及び癌の治療へのその利用

(57)【要約】

本発明は、L I V - 1 の過剰発現によって特徴付けられる疾患の治療のための組成物及び方法に関する。更に具体的には、この組成物は、L I V - 1 のDNA及びアミノ酸配列、L I V - 1 に対する抗体、並びにL I V - 1 が過剰発現する、癌に罹りやすく、又は癌と診断された哺乳動物の治療のための方法に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号：3のヌクレオチド412からヌクレオチド477を包含する配列、又はその相補性配列に対して、少なくとも65%の同一性を有する配列を含んで成る単離された核酸。

【請求項2】 同一性が少なくとも75%である、請求項1の単離された核酸。

【請求項3】 同一性が少なくとも85%である、請求項1の単離された核酸。

【請求項4】 同一性が少なくとも90%である、請求項1の単離された核酸。

【請求項5】 同一性が少なくとも96%である、請求項1の単離された核酸。

【請求項6】 配列番号：3のヌクレオチド412からヌクレオチド477を包含する配列、又はその相補性配列を含んでなる請求項1の単離された核酸。

【請求項7】 配列番号：3を含んでなる、請求項1の単離された核酸。

【請求項8】 配列番号：3のヌクレオチド446からヌクレオチド463を包含する配列、又はその相補性配列を含んでなる請求項1の単離された核酸。

【請求項9】 核酸が抗原性ポリペプチドをコードする、請求項1の単離された核酸。

【請求項10】 配列が細胞外ドメインである、請求項1の単離された核酸。

【請求項11】 配列番号：19に対して、少なくとも65%の同一性を有する配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項12】 同一性が少なくとも75%である、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項13】 同一性が少なくとも85%である、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項14】 同一性が少なくとも90%である、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項15】 相同性が少なくとも96%である、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項16】 配列番号：19を含んでなる請求項11の単離された核酸。

【請求項17】 配列番号：17に対して、少なくとも50%の相同性を有する配列を含んでなる請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項18】 配列番号：17を含んでなる、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項19】 配列番号：18に対して、少なくとも20%の相同性を有する配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項20】 配列番号：4を含んでなる請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項21】 ポリペプチドが抗原性である、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項22】 配列が細胞外ドメインの一部を含む、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項23】 ポリペプチドが水溶性である、請求項11の単離されたポリペプチド。

【請求項24】 配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を包含する配列に対して、少なくとも98%の相同性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項25】 ポリペプチドがモノクローナル抗体と結合し、その抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション 寄託番号 ATCC (LIV-1.2945.2G1.1C7.2F10) によって生産された抗体が結合するのと同じエピトープに結合する、単離されたポリペプチド。

【請求項26】 ポリペプチドがモノクローナル抗体と結合し、その抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション 寄託番号 ATCC (LIV-1.2982.4A12.1E8.1C4) によって生産された抗体が結合するのと同じエピトープに結合する、単離されたポリペプチド。

【請求項27】 ポリペプチドがモノクローナル抗体と結合し、その抗体が

、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション 寄託番号 ATCC

(LIV-1.2983.3G9.1D4.1D7)によって生産された抗体が結合するのと同じエピトープに結合する、単離されたポリペプチド。

【請求項28】 ポリペプチドがモノクローナル抗体と結合し、その抗体が

、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション 寄託番号 ATCC

(LIV-1.2984.6D6.1H10.2C1)によって生産された抗体が結合するのと同じエピトープに結合する、単離されたポリペプチド。

【請求項29】 ポリペプチドがモノクローナル抗体と結合し、その抗体が

、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション 寄託番号 ATCC

(LIV-1.2985.4F3.2D6.1D7)によって生産された抗体が結合するのと同じエピトープに結合する、単離されたポリペプチド。

【請求項30】 ポリペプチドがモノクローナル抗体と結合し、その抗体が

、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション 寄託番号 ATCC

(LIV-1.2987.1D8.1C11.2B7)によって生産された抗体が結合するのと同じエピトープに結合する、単離されたポリペプチド。

【請求項31】 ポリペプチドがモノクローナル抗体と結合し、その抗体が

、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション 寄託番号 ATCC

(LIV-1.2988.1A7.1F2.1H7)によって生産された抗体が結合するのと同じエピトープに結合する、単離されたポリペプチド。

【請求項32】 配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を包含する配列に対して、少なくとも80%の相同的な配列を含むポリペプチドと結合するモノクローナル抗体。

【請求項33】 相同性が少なくとも98%である、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項34】 配列番号：19に対して、少なくとも65%相同的である配列を含むポリペプチドと結合するモノクローナル抗体。

【請求項35】 相同性が少なくとも75%である、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項36】 相同性が少なくとも85%である、請求項32のモノクロー

ーナル抗体。

【請求項37】 相同性が少なくとも90%である、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項38】 相同性が少なくとも96%である、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項39】 ポリペプチドが配列番号：19を含む、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項40】 ポリペプチドが配列番号：17を含む、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項41】 抗体がLIV-1-164647である、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項42】 抗体が腫瘍細胞の増殖を阻害する、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項43】 腫瘍細胞が、LIV-1-164647タンパク質を発現する、乳房、肺、前立腺、結腸、卵巣、子宮、腎臓、胃、及び唾液腺癌、或いはその他の細胞型から成る群から選択される、請求項42のモノクローナル抗体。

【請求項44】 抗体が、LIV-1を過剰発現する腫瘍細胞のインビトロでの増殖を阻害する、請求項42のモノクローナル抗体。

【請求項45】 抗体がマウスモノクローナル抗体である、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項46】 抗体がマウス-ヒトハイブリッド抗体である、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項47】 抗体が、LIV-1タンパク質のリガンドのリガンド結合部位との結合に関して競合する、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項48】 抗体がLIV-1の発現を減じる、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項49】 抗体が補体を活性化する、請求項32のモノクローナル抗体。

【請求項50】 抗体が抗体依存性細胞性細胞障害を媒介する、請求項32

のモノクローナル抗体。

【請求項51】 エピトープが、配列番号：19に対して少なくとも65%の相同性を有するアミノ酸配列を含むエピトープと結合するモノクローナル抗体。

【請求項52】 エピトープが、配列番号：17に対して少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、請求項49のモノクローナル抗体。

【請求項53】 エピトープが配列番号：17を含む、請求項52のモノクローナル抗体。

【請求項54】 ハイブリドーマ細胞株が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 ATCC (LIV-1.2945.2G1.1C7.2F10); ATCC (LIV-1.2982.4A12.1E8.1C4); ATCC (LIV-1.2983.3G9.1D4.1D7); ATCC (LIV-1.2984.6D6.1H10.2C1); ATCC (LIV-1.2985.4F3.2D6.1D7); ATCC (LIV-1.2987.1D8.1C11.2B7); ATCC (LIV-1.2988.1A7.1F2.1H7) へ寄託したハイブリドーマ細胞株から成る群から選択され、ハイブリドーマ細胞株によって生産されるモノクローナル抗体がエピトープと結合するように、同じエピトープと結合するモノクローナル抗体。

【請求項55】 細胞障害性成分と請求項32のモノクローナル抗体のコンジュゲートである免疫毒素。

【請求項56】 請求項32のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項57】 ATCC (LIV-1.2945.2G1.1C7.2F10); ATCC (LIV-1.2982.4A12.1E8.1C4); ATCC (LIV-1.2983.3G9.1D4.1D7); ATCC (LIV-1.2984.6D6.1H10.2C1); ATCC (LIV-1.2985.4F3.2D6.1D7); ATCC (LIV-1.2987.1D8.1C11.2B7)

); ATCC (LIV-1.2988.1A7.1F2.1H7) から成る群から選択されたハイブリドーム。

【請求項58】 (a) 哺乳動物からの試料を、配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を包含する配列に対して、少なくとも80%の相同性を有する配列を含んでなるポリペプチドと特異的に結合する抗体へ曝露すること；並びに

(b) 試料中のポリペプチドへの結合の程度を測定することを含んでなる方法である、腫瘍を検出するためのアッセイ。

【請求項59】 試料中のポリペプチドが哺乳動物からの細胞上にある、請求項58のアッセイ。

【請求項60】 試料は哺乳動物の体液であり、ポリペプチドは可溶性ポリペプチドである、請求項58のアッセイ。

【請求項61】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項58のアッセイ。

【請求項62】 インビトロでおこなわれ、そしてアッセイがELISAアッセイである、請求項58のアッセイ。

【請求項63】 細胞が哺乳動物の体の中にとどまる複数個の細胞であり、抗体が放射活性アイソトープで標識され、そして哺乳動物へ投与され、抗体の細胞との結合の程度が放射活性に関する外部スキニングによって観察される、請求項59の抗体。

【請求項64】 更に二次放射活性アイソトープで標識され、そして哺乳動物へ投与された抗-ErbB2抗体を含み、標識抗-ErbB2抗体と細胞とによる抗体の細胞との結合の程度が、放射活性に関する外部スキニングによって観察される、請求項58のアッセイ。

【請求項65】 配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を包含する配列に対して少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列と結合することができ、LIV-1-164647発現細胞の増殖を阻害する抗体の治療的有効量を哺乳動物へ投与することを含んでなる方法である、腫瘍細胞の成長を阻害する方法。

【請求項66】 抗体が補体を活性する、請求項65の方法。

【請求項67】 抗体が抗体依存性細胞性細胞障害を媒介する、請求項65の方法。

【請求項68】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項65の方法。

【請求項69】 腫瘍細胞が、LIV-1-164647タンパク質を発現する、乳房、肺、前立腺、結腸、卵巣、子宮、腎臓、胃、及び唾液腺癌、或いはその他の細胞型から成る群から選択される癌を含む、請求項65のモノクローナル抗体。

【請求項70】 腫瘍細胞が乳房組織細胞である、請求項69の方法。

【請求項71】 哺乳動物がヒトである、請求項69の方法。

【請求項72】 細胞障害性因子の治療的有効量を投与することを更に含む方法である、請求項65の方法。

【請求項73】 抗体及び細胞障害性因子を同時に投与する、請求項72の方法。

【請求項74】 細胞障害剤の前に抗体を患者へ投与する、請求項72の方法。

【請求項75】 抗体の前に細胞傷害剤を投与する、請求項72の方法。

【請求項76】 細胞傷害剤を抗体とコンジュゲートさせた、請求項72の方法。

【請求項77】 配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を包含する配列に対して少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列と特異的に結合する抗体、並びに製薬的に許容される担体を含んでなる組成物。

【請求項78】 抗体が、ATCC (LIV-1.2945.2G1.1C7.2F10); ATCC (LIV-1.2982.4A12.1E8.1C4); ATCC (LIV-1.2983.3G9.1D4.1D7); ATCC (LIV-1.2984.6D6.1H10.2C1); ATCC (LIV-1.2985.4F3.2D6.1D7); ATCC (LIV-1.2987.1D8.1C11.2B7); ATCC (LIV-1.2988.1A7.1F2.1

H7) から成る群から選択されるハイブリドーマ細胞株によって生産されるモノクローナル抗体である、抗体及び製薬的に許容される担体を含んでなる組成物。

【請求項79】 細胞傷害性因子を更に含んでなる、請求項77の組成物。

【請求項80】 被験試料における高発現レベルが、被験試料が得られた哺乳動物における腫瘍の存在を示し、配列番号：3のヌクレオチド412からヌクレオチド477を包含する配列に対して少なくとも65%の相同性を有する配列を含んでなる核酸配列、又はその相補性配列の発現のレベルを、哺乳動物から得た被験試料、及びコントロール試料で検出することを含んでなる、哺乳動物での腫瘍を診断する方法。

【請求項81】 (a) 抗体を被験試料哺乳動物から得た被験試料と接触させ；並びに (b) 配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を包含する配列に対して少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドであって、抗体がポリペプチドと結合し、抗体と被験試料のポリペプチドの間の複合体の形成を検出することを含んでなる、哺乳動物での腫瘍を診断する方法。

【請求項82】 前記被験試料が、腫瘍性細胞の成長又は増殖を有すると思われる個体から得られる、請求項80の方法。

【請求項83】 前記被験試料が、腫瘍性細胞の成長又は増殖を有すると思われる個体から得られる、請求項81の方法。

【請求項84】 容器；及び  
容器内に含有される請求項77の組成物を含んでなる製造品。

【請求項85】 容器；及び  
容器に含有される請求項78の組成物を含んでなる製造品。

【請求項86】 容器；  
容器上の標識；及び  
組成物が腫瘍細胞の成長を阻害するための効果的であり、容器上の標識がLIV-1-164647ポリペプチドの過剰発現によって特徴付けられる症状を治療するために組成物を使用することができることを示す、請求項77の組成物を含んでなる製造品。

【請求項87】 容器；

容器上の標識；及び

組成物が腫瘍細胞の成長を阻害するために効果的であり、並びに容器上の標識が L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 ポリペプチドの過剰発現によって特徴付けられる症状を治療するために組成物を使用することができることを示す、請求項78の組成物を含んでなる製造品。

【請求項88】 候補化合物と配列番号：19に対して少なくとも65%の相同性を有する配列を含んでなるポリペプチドを接触せしめることを含んでなる、L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 ポリペプチドの発現又は活性を阻害することができる化合物を同定するための方法。

【請求項89】 候補化合物又はポリペプチドが固体支持体へ固定されている、請求項88の方法。

【請求項90】 非固定化成分が検出可能な標識を保持する、請求項89の方法。

【請求項91】 配列番号：3のヌクレオチド412からヌクレオチド477を包含する配列又はその相補配列に対して、少なくとも65%の核酸配列相同性を有する核酸配列を含んでなる宿主細胞。

【請求項92】 細胞がチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞である、請求項91の宿主細胞。

【請求項93】 細胞が大腸菌である、請求項91の宿主細胞。

【請求項94】 細胞が酵母細胞である、請求項91の宿主細胞。

【請求項95】 細胞が昆虫細胞である、請求項91の宿主細胞。

【請求項96】 抗体がキメラ抗体である、請求項32の抗体。

【請求項97】 抗体がヒト化抗体である、請求項32の抗体。

【請求項98】 抗体がヒト抗体である、請求項32の抗体。

【請求項99】 抗体が、F a b , F a b '、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v 断片、二重特異性抗体、単鎖抗体、及び多特異性抗体から成る群から選択された抗体断片である、請求項32の抗体。

【請求項100】 宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細

胞、大腸菌、及び昆虫細胞から成る群から選択される、請求項32の抗体を生産する宿主細胞。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の分野)

本発明は、腫瘍でのL I V - 1 遺伝子産物の過剰発現によって特徴付けられる疾患の治療のための組成物と方法に関する。この組成物には、核酸、この核酸によってコードされているポリペプチド、及び化合物、好ましくはポリペプチド好ましくはL I V - 1 ポリペプチドの細胞外ドメインと結合する抗体又はその断片が含まれる。

## 【0002】

## (発明の背景)

乳癌は、世界中で毎年数百万人もの女性を冒す、広範で破壊的な癌の形態である。多くの乳癌はエストロゲンに対して感受性あり、エストロゲンの乳癌組織上に発現するエストロゲンレセプター ( E R s ) との結合を妨害する化合物によってしばしば治療が可能である。E R 発現及びエストロゲン刺激に対する感受性のレベルを検出することは、抗ホルモン型化学療法が特定の患者において有効があり得ることを確定するのに有用である。

エストロゲン誘導遺伝子、p L I V - 1 及びp L I V 2 ( p S 2 と命名されている ) の過剰発現は、エストロゲンレセプターをも発現する幾つかの乳癌において起こる ( Manning, D.L., ら., European J. Cancer 29A(10): 1462-1468(1993) ; Manning, D.L., ら., European J. Cancer 30A(5): 675-678(1994) ; Manning, D.L., ら., Oncologica 34(5):641-646(1995) ; Manning, D.L., ら., 米国特許第5,693, 465号)。p S 2 ではなく、p L I V - 1 の発現は、乳癌細胞の領域リンパ節への転移と関連している ( Manningら., 米国特許第5,692, 465号)。

更には、乳癌を含む、種々のヒト悪性腫瘍の病因は、成長因子及び成長因子レセプターをコードするプロトオンコジーンの影響を受ける。上皮細胞成長因子 ( E G F R ) に関連する185-kd膜貫通糖タンパク質レセプター ( E r b B 2 、 H E R 2 又はp 1 8 5 <sup>HER2</sup> としても知られている ) をコードするヒト E r b 2 遺伝子 ( e r b B 2 、 h e r 2 としても知られている、又はc-e r b B - 2 ) は、ヒト乳癌の約25%から30%で過剰発現している ( Slamonら., Science

235: 177-182[1987]; Slamonら., Science 244: 707-712[1989])。

【0003】

幾つかの証拠は、E r b B 2 を過剰発現する腫瘍の病原性及び臨床的病原力におけるE r b B 2 の直接的な役割を支持している。非新生物細胞へE r b B 2 を導入すると、その悪性形質転換を引き起こすことが示されている(Hudziakら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7159-7163[1987]; DiFioreら, Science 237:78-82[1987])。E r b B 2 を発現するトランスジェニックマウスは、乳腫瘍を発症する(Guyら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10578-10582[1992])。E r b B 2 過剰発現は、特に腋窩リンパ節に關与する原疾患を有する患者における、乏しい予後の予測指標であると一般的に考えられている(Slamonら, [1987]及び[1989], 前掲; Ravdin及びChamness, Gene 159:19-27[1995]; 及びHynesとStern, Biochim Biophys Acta 1198:165-184[1994])。

e r b B 2 タンパク質産物(抗-E r b B 2 抗体)に対して、そしてe r b B 2 遺伝子(n e u)のラット同等物(抗-n e uタンパク質抗体)によってコードされているタンパク質に対して向けられている抗体は、B 1 0 4 - 1 - 1細胞上でのp 1 8 5の細胞表層発現(n e uプロトオンコジーンで形質移入されたN I H - 3 T 3細胞)を下方制御し、この細胞のコロニー形成を阻害する。Drebinら., Cell 41: 695-706(1985)。抗-n e u抗体の生物学的効果は、Myersら., Meth. Enzym. 198: 277-290(1991)にてレビューされている。1994年10月13日に発行のW O 9 4 / 2 2 4 7 8も参照のこと。

【0004】

抗-E r b B 2 抗体である4 D 5 は、S K D R 3 ヒト乳癌腫瘍細胞株に対して抗増殖作用を示し、およそ細胞増殖の5 6 %を阻害し、T N F - の細胞障害性作用に対してp 1 8 5<sup>e r b B 2</sup>過剰発現乳腫瘍細胞株を感作させた。また、1989年7月27日に公開された国際公開89/06692号を参照のこと。Hudziakらにより検討された抗E r b B 2 抗体は、Fendlyら, Cancer Research 50:1550-1558(1990); Kottsら, In Vitro 26(3):59A(1990); Sraupら, Growth Regulation 1:72-82(1991); Shepardら, J. Clin. Immunol. 11(3):117-127(1991); Kumarら, Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986(1991); Lewisら, Cancer. Immunol. Imm

another. 37:255-263(1993); Pietrasら, Oncogene 9:1829-1838(1994); Vitettaら, Cancer Research 54:5301-5309(1994); Sliwkowskiら, J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994); Scottら, J. Biol. Chem. 266:14300-5(1991); 及び D'souzaら, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206(1994)においてもさらに特徴付けられている。

#### 【0005】

Erbb2 過剰発現はまた、CMF (シクロホスファミド、メトトレキサート及びフルオロウラシル)及びアントラサイクリン(Baselgaら, Oncology 11(3 Suppl 1):43-48[1997])を含む、ホルモン治療法及び化学療法に対する感受性及び/又は耐性に関連している。Erbb2 過剰発現が乏しい予後に関連しているにもかかわらず、タキサンでの治療に臨床的に反応するHER2 ポジティブ患者の見込みは、HER2 ネガティブ患者の3倍を越えていた(同上)。rhuma b HER2 は、高レベルのHER2 を発現するBT-474 ヒト乳癌細胞を注射したヌードマウスにおける乳癌異種移植片に対するパクリタキセル(タキソール(登録商標))とドキシソルピシンの活性を高めることが示されている(Baselgaら, Breast Cancer, Proceeding of ASCO, vol.13, Abstract 53[1994])。

乳及び他の癌が健康へ絶えず脅威を突きつけることから、同時に多くの否癌性細胞を害さずに癌細胞を標的にし、典型的な癌化学療法につきまとっている逆副作用を制限する方法を用いることによる癌の治療法を開発する継続的な必要性が存在している。

#### 【0006】

##### (発明の要約)

本発明は、前立腺、結腸、肺、乳房のような幾つかの腫瘍細胞において過剰発現される独特のタンパク質LIV-1-164647、並びにLIV-1-164647を過剰発現するがErbb2を過剰発現しない乳腫瘍の集団の発見に関する。本発明は、更に、ここにて開示されたLIV-1 遺伝子配列(DNA164647と命名)に対して相同性を有する核酸配列及びアミノ酸配列、並びにDNA164647によってコードされているLIV-1タンパク質のアミノ酸配列に関する。腫瘍細胞においてLIV-1-164647が過剰発現しているという

出願者の発見は、腫瘍細胞の検出と治療ための組成物のさらなる発見、並びにそのような検出と治療を実行する方法につながった。

【0007】

一側面では、本発明は、DNA 164647（配列番号：3（コード化配列））の核酸配列、或いはその一部分に対して相同性を有する核酸配列に関する。好ましくは、この相同性とは、少なくとも約80%相同性、より好ましくは少なくとも約90%、さらにより好ましくは少なくとも約95%、及び最も好ましくは少なくとも97%の相同性である。好ましくは、本発明の核酸は、DNA 164647（配列番号：3）の約核酸73から約1060に対して、少なくとも80%相同的である水溶性細胞外ドメイン（ECD）をコードする。好ましくは、本発明の相同的な核酸は、緊縮性の条件下で、DNA 164647（配列番号：3）の核酸配列の30核酸又はより長い部分、或いはその相補的な配列とハイブリダイズし、好ましくは、緊縮性の条件下で、配列番号：3のヌクレオチド440からヌクレオチド470を含有するまでの30ヌクレオチド領域、又はその相補的な配列とハイブリダイズする。関連する実施態様では、本発明の相同的核酸には、配列番号：3のヌクレオチド446からヌクレオチド463を含有する配列、又は配列番号：3のヌクレオチド2297から2337を含有する配列、或いは両方の配列に対して、少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%相同的である配列を含んでなる核酸配列が含まれる。最も好ましくは、単離された核酸は、ヌクレオチド446からヌクレオチド464を含有するまで、及び/又はヌクレオチド2297から2337を含有するまでの配列を含む。現在開示されている発明によると、本発明の単離された核酸は、配列番号：3の約ヌクレオチド412からヌクレオチド477を含有するまでの配列、或いはその相補的な配列に対して、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも96%の相同性を有する配列を含む。好ましくは、この配列は、抗原性ポリペプチドのヒスチジンリッチ領域、好ましくはECDをコードする。

【0008】

その他の側面では、本発明は、アミノ酸配列（配列番号：4）、或いはここでLIV-1-164647と命名されたDNA164647によって、又はそのものによってコードされているアミノ酸配列（配列番号：4）に対して相同性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドに関する。好ましくは、その相同性とは、少なくとも約80%相同性、より好ましくは少なくとも約90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも約97%の相同性である。好ましくは、本発明のLIV-1-164647アミノ酸配列は、アミノ酸1から約アミノ酸327、又は少なくとも10のアミノ酸を含んでなるその断片に対して、水溶性のECD相同体である。このECDの領域は、標準的なハイドロパシープロットによって容易に決定でき、疎水性膜貫通領域の比較的により親水性領域のN末端を示す。関連する実施態様では、本発明の相同的アミノ酸配列には、配列番号：4のアミノ酸126からアミノ酸132を含有するまでの配列（具体的には、アミノ酸配列HDHSHH（配列番号：17）、又は配列番号：4のアミノ酸743からアミノ酸755を含有する配列（具体的には、アミノ酸配列SIFEHKIVFRINF（配列番号：18）、或いは両方の配列が含まれる。本発明は、更に、配列番号：17に対して、少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドを含む。本発明は、より更には、配列番号：18に対して、少なくとも20%、より少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドを含む。更なるその他の実施態様では、本発明は、配列番号：3の単離された核酸、並びに配列番号：4の単離されたポリペプチドを含む。本発明は、更には、配列番号：4のアミノ酸114からアミノ酸135を含有する配列に対して、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも96%を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドを含む。アミノ酸114から135のこのアミノ酸配列は、配列番号：19と命名されている。よりさらなる実施態様は、配列番号：17及び/又は配列番号：18を含んでなる単離されたポリペプチドを

含む。

【0009】

さらにその他の実施態様では、本発明は、配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を含有する配列に対して少なくとも98%の相同性があるアミノ酸、より好ましくはLIV-1-164647のECDを含んでなる単離されたポリペプチドを含む。最も好ましくは、この配列は、配列番号：17を含み、細胞外ドメイン(ECD)の一部、好ましくはLIV-1-164647のECDを形成する。ここで使用される「一部分」という用語は、配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸327を含有する、LIV-1-164647のECDの7つのアミノ酸を含む配列に相当する。

【0010】

その他の実施態様では、本発明は、LIV-1-ポリペプチドと特異的に結合する抗体に関する。好ましくは、この抗体はモノクローナル抗体である。より好ましくは、この抗体はヒト抗体、又はヒト化抗体である。一実施態様では、この抗体は、細胞での過剰発現LIV-1ポリペプチドの活性を減じる。その他の側面では、この抗体は、好ましくは、非ヒト相補性決定領域(CDR)の残基、及びフレームワーク領域(FR)の残基を有するモノクローナル抗体である。この抗体を標識して、固体支持体上に固定化してもよい。更なる側面では、この抗体は、抗体断片、一本鎖抗体、又は抗-イディオタイプ抗体である。好ましくは、本発明のLIV-結合抗体は、LIV-1ECD核酸配列、又はDNA164647(配列番号：3)のECDコード化領域(ヌクレオチド1-1000)内によってコードされているその断片に対して、少なくとも約80%の相同性、より好ましくは少なくとも約90%の相同性、さらにより好ましくは少なくとも約95%の相同性、そして最も好ましくは少なくとも約97%の相同性を有するポリペプチドと特異的に結合する。より好ましくは、本発明のLIV-1-結合抗体は、LIV-1ECD(配列番号：4のアミノ酸1-327)のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%の相同性、より好ましくは少なくとも約90%の相同性、さらにより好ましくは少なくとも約95%の相同性、そして最も好ましくは少なくとも約97%の相同性を有するポリペプチドと特異的に結合する。好ましい実施態

様では、本発明は、配列番号：3のヌクレオチド446からヌクレオチド463を含有する配列、或いは配列番号：3の2297から2337を含有する核酸配列、又は両方の核酸配列に対して、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも96%の相同性を有する核酸配列を含んでなる核酸配列によってコードされているLIV-1ポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体に関する。その他の好ましい実施態様では、本発明は、配列番号：4のアミノ酸126からアミノ酸132を含有する配列、或いは配列番号：4のアミノ酸743からアミノ酸755を含有するアミノ酸配列、又は両方のアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも96%の相同性を有するアミノ酸配列を含んでなるLIV-1ポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体に関する。

#### 【0011】

さらにその他の実施態様では、本発明は、抗体、好ましくは、LIV-1の同じエピトープと特異的に結合するモノクローナル抗体、好ましくは、ここで開示されているアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)へ寄託したハイブリドーマ細胞株によって生産されるモノクローナル抗体のいずれか一つと結合するLIV-1-1164647に関する。

更なる実施態様では、本発明には、配列番号：4のアミノ酸1からアミノ酸147を含有する配列を含んでなるポリペプチドと結合する抗体が含まれる。その他の実施態様では、抗体は、配列番号：4のアミノ酸148からアミノ酸298を含有する配列を含んでなるポリペプチドと結合する。好ましくは、この抗体はモノクローナル抗体である。より好ましくは、このモノクローナル抗体は、ヒト抗体又はヒト化抗体である。

#### 【0012】

その他の側面では、本発明は、製薬的に許容可能な担体との混合であるLIV-1ポリペプチドと結合する抗体を含んでなる組成物に関する。一側面では、この組成物には、抗体の治療的有効量が含まれる。その他の側面では、この組成物

には、例えば、さらに抗体、又は細胞障害性、或いは化学療法剤でもよいさらなる活性成分が含まれる。好ましくは、この組成物は無菌である。

更なる実施態様では、本発明は、本発明に記載の抗-L I V-抗体をコードする核酸、並びにそのような核酸を含んでなるベクター及び組み換え宿主細胞に関する。

さらに更なる実施態様では、本発明は、抗体が発現する条件下で抗体をコードする核酸で形質転換した宿主細胞を培養し、その細胞培養から抗体を回収することによって抗-L I V-抗体を生産する方法に関する。

#### 【0013】

本発明は、更に、L I V-1ポリペプチドのアンタゴニスト及びアゴニストに関し、そのアゴニストはL I V-1ポリペプチドの機能又は活性の一つ以上を阻害し、アゴニストはL I V-1ポリペプチドの機能又は活性の一つ以上を模倣する。好ましくは、L I V-1ポリペプチドは、機能又は活性がアンタゴナイズ又はアゴナイズしているL I V-1-164647ポリペプチドである。

その他の実施態様では、本発明は、L I V-1ポリペプチドを含有すると思われる細胞を本発明の抗-L I V-1抗体へ曝露し、抗体の細胞との結合を測定することを含んでなる、L I V-1ポリペプチド、又はその断片の存在を測定する方法に関する。

更に他の実施態様では、本発明は、哺乳動物から得られた組織細胞の被験試料、並びに同じ細胞型の既知の正常な組織細胞のコントロール試料中でのL I V-1ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなる、哺乳動物における腫瘍の診断方法に関し、ここで、被験試料での高い発現レベルは、被験組織細胞が得られた哺乳動物中に腫瘍が存在することを示す。

#### 【0014】

他の実施態様では、本発明は、哺乳動物から得られた組織細胞の被験試料に抗-L I V-1抗体を接触させ、被験試料中における抗-L I V-1抗体とL I V-1ポリペプチドの間の複合体の生成を検出することを含んでなる、哺乳動物における腫瘍の診断方法に関する。この検出は定量的又は定性的でもよく、同じ細胞型の既知の正常な組織細胞のコントロール試料における複合体の生成をモニターし

て比較しながら行われてもよい。被験試料中に生成された多量の複合体は、被験組織細胞が得られた哺乳動物中に腫瘍が存在することを示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持する。複合体生成は、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、あるいは他の当該分野で知られている方法によりモニターすることができる。

診断方法のために、被験試料は、通常は腫瘍細成長又は増殖(例えばガン細胞)を有すると思われる個人から得られる。

#### 【0015】

その他の実施態様では、本発明には、L I V - 1 タンパク質を過剰発現し、正常なレベルのE r b B 2 を発現する組織としての乳腫瘍組織の診断方法が含まれる。この方法には、コントロールがポジティブコントロール、ネガティブコントロール、或いは両方である場合に、癌性であると思われる組織の被験試料を提供すること、被験試料をL I V - 1 遺伝子産物の天然発生形態に対する抗体と接触させること、同じ又は控えの被験試料と抗-E r b B 2 抗体と接触させること、コントロール試料と比較して被験試料に対する抗体の相対結合を検出することが含まれる。L I V - 1 遺伝子産物(正常組織に対して)を過剰発現し、E r b B 2 タンパク質(正常組織に対して)を過剰発現しない被験試料は、本発明の組成物及び方法によって治療される乳腫瘍の集団の一部として診断される。本発明の診断アッセイ方法において有用なのは、E r b B 2 レセプターの細胞外ドメインと結合し、好ましくはE r b B 2 細胞外ドメイン配列内のエピトープ4 D 5 又は3 H 4 と結合する抗-E r b B 2 抗体である。より好ましくは、この抗体は抗体4 D 5 である。限定されるものではないが、他の好ましいE r b B 2 結合抗体には、抗体7 C 2、7 F 3、及び2 C 4 が含まれる。抗-E r b B 2 抗体に関する情報は、例えば、そのすべてが参考文献としてここに取り入れられているHudzia k, R.M.ら., 米国特許第5, 772, 997号に見出せる。

#### 【0016】

その他の側面では、本発明は、抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 抗体と担体(例えばバッファー)を適当な包装中に含んでなる癌診断キットに関する。このキットは、好ましくはL I V - 1 ポリペプチドを検出するために抗体を使用することに関する

指示を含む。

更なるその他の側面では、本発明は、L I V - 1 ポリペプチドを過剰発現する細胞を、L I V - 1 ポリペプチドの発現及び / 又は活性を阻害する有効量の薬剤に暴露することを含んでなる、腫瘍細胞の成長を阻止する方法に関する。この薬剤は、好ましくは抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 抗体、小さい無機及び有機分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス又はリボザイム分子、あるいは三重らせん体分子である。特定の側面では、この薬剤、例えば抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 抗体は細胞死を誘導するか、或いは少なくとも他の癌療法を施すことを可能にするのに十分に細胞の成長を遅らせる。更なる側面では、腫瘍細胞をさらに放射線治療及び / 又は細胞障害性又は化学療法剤へ曝露する。

#### 【0017】

さらにその他の側面では、本発明は、E r b B 2 レセプターの過剰発現をともなわないL I V - 1 遺伝子産物の過剰発現によって特徴付けられる疾患の診断を下されるか、又はそれに罹りやすいヒト患者の治療方法に関する。実施態様では、この方法には、抗-L I V - 1 ポリペプチド抗体の治療的有效量を投与することが含まれ、投与とは、静脈注射、皮下投与、又は抗体送達の他の製薬的に許容可能な方法であってよい。好ましくは、抗体は、L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 ポリペプチドの天然発生形態と特異的に結合し、この結合は、好ましくは細胞外ドメイン又はその断片に対するものである。好ましくは、初期の一服投与（又は複数投与）と並んでその後の継続の一服投与又は複数投与は、皮下投与される。選択的には、患者の抗-L I V - 1 抗体に耐える力が未知である場合、初期投与は静脈内注射によって行われ、患者の抗体に対する耐性が許容可能ならば、皮下投与の継続投与がその後続く。本発明の実施態様によると、初期投与又は複数投与には、有効な標的レベル又はそれ以上に抗体の底値血清濃度を維持するのに極めて十分な間隔での、等量又は少量の抗体の事後投与が後続く。好ましくは、初期投与又は個々の事後投与は、1 0 0 m g / k g を超えず、各事後投与は、少なくとも1  $\mu$  g / k g である。初期及び維持投与に関する送達方法の選択は、動物又はヒト患者の体への抗体の導入に耐える能力に従って行われる。抗体が上手く耐えられるものであるならば、注入の時間を減じてよい。この実施態様で開示された

送達方法の選択は、本発明に従って考えられたすべての薬剤送達方式へ適用される。

#### 【0018】

更なる側面では、本発明は、抗-L I V - 1 抗体（抗体が、好ましくはL I V - 1 遺伝子産物の細胞外ドメインと結合する）、及び化学療法剤の有効量を患者へ投与することを含んでなる、ヒト患者のL I V - 1 遺伝子産物過剰発現する癌（E r b B 2 の過剰発現を欠く）の治療法を提供する。本発明の一つの実施態様では、限定されるものではないが、化学療法剤は、パクリタキセル及びドキシタキセルを含むタキソイドである。その他の実施態様では、化学療法剤は、限定されるものではないが、ドキソルビシン及びエピルビシンを含むアントラサイクリン誘導体である。更なるその他の実施態様では、化学療法剤は、抗-L I V - 1 抗体とともに同時に患者へ投与されない。また、一つ又は複数の付加的な化学療法剤を患者へ投与してもよい。

#### 【0019】

本発明の方法によってなるべく治療されるべき疾患とは、L I V - 1 遺伝子産物の過剰発現によって特徴付けられる良性又は悪性腫瘍である。好ましくは、腫瘍の悪性細胞は、同じ型の非癌性細胞のように、およそ同じレベルのE r b B 2（又はより低い）を発現する。例えば、治療されるべき疾患は、癌、例えば乳癌、肺癌、及び前立腺癌である。

従って、本発明の一側面には、L I V - 1 タンパク質と結合し、その活性を阻害する化合物が含まれる。好ましくは、この化合物は、L I V - タンパク質の細胞外領域と結合し、その活性を阻害する。本発明の実施態様では、阻害性の化合物は、L I V - 1 遺伝子産物又はその断片に対して特異的な抗体である。好ましくは、本発明の阻害性の化合物は、L I V - 1 タンパク質の細胞外領域と特異的に結合する。

その他の側面では、本発明には、L I V - 1 タンパク質の活性化リガンドの結合をブロックする化合物が含まれる。そのようなリガンド阻止化合物には、ポリペプチドに限定されるものではないが、タンパク質、抗体及びその類似物が含まれる。好ましくは、このリガンド阻止化合物は、L I V - 1 活性化リガンドの活

性をブロックする。より好ましくは、本発明のリガンド阻止化合物は、L I V - 1 -発現細胞の成長を阻害する。

#### 【0020】

その他の側面では、本発明は、被験化合物とポリペプチドとの相互作用が可能となる条件下、並びに十分な時間にわたって、候補化合物とL I V - 1 ポリペプチドを接触させ、L I V - 1 ポリペプチドの発現及び/又は活性を阻害することの可能な化合物を同定する方法を提供する。特別な側面では、候補化合物又はL I V - 1 ポリペプチドのいずれかが、固体支持体上に固定されている。その他の側面では、非固定化成分は検出可能な標識を担持する。

更なるその他の側面では、本発明は、容器；L I V - 1 タンパク質（好ましくは、細胞外ドメイン、又はその断片と結合する）、或いはL I V - 1 タンパク質の活性化リガンドと結合する抗-L I V - 1 抗体を含んでなる容器内の組成物；並びに随意的には、組成物が、E r b B 2 の過剰発現をとまなわないL I V - 1 の過剰発現によって特徴付けられる症状を治療することに使用することができることを示す容器上の、又はその容器と関連しているラベルを含んでなる製造品に関する。本発明のその他の実施態様によると、製造品には、更に、少なくとも一回の投与に関する、好ましくは初期投与に続くすべての事後投与、最も好ましくは全ての投与に関する、抗-L I V - 1 抗体を皮下的に投与するための指示書を含んでなる添付文書が含まれる。

#### 【0021】

本発明の方法及び組成物は、抗-L I V - 1 抗体を含み、その抗体は、L I V - 1 遺伝子産物の細胞外ドメイン、或いは細胞外ドメインの断片と特異的に、そして好んで結合する。本発明の組成物には、好ましくはヒト化L I V - 1 抗体が含まれる。従って、本発明は、L I V - 1 遺伝子産物の細胞外ドメインと特異的に、そして好んで結合する抗体を含んでなる組成物に関し、並びに、例えば高レベルのE r b B 2 を同時発現しないL I V - 1 過剰発現性癌のような、ヒトにおけるL I V - 1 + / E r b B 2 発現性癌の治療のための抗体の使用に関する。好ましくは、この抗体は、モノクローナル抗体、例えば、L I V - 1 の細胞外ドメイン（又は細胞外ドメインの一部）と結合するヒト化抗-L I V - 1 モノクローナ

ル抗体（以下において抗-L I V - 1）である。この抗体は、無傷の抗体（例えば、無傷の I g G 抗体）、又は抗体断片（例えば、F a b、F ( A b )<sub>2</sub>ダイアボディ、及びその類似物）である。ヒト化抗-L I V - 1 抗体の可変軽鎖及び可変重鎖領域。

本発明のこれら及び他の利点と特徴は、下記により完全に記載した本発明と添付した請求項の詳細な内容を読むことによって、当該分野に熟練した者にとって明らかになる。

### 【0022】

（好適な実施態様の詳細な説明）

#### I . 定義

ここで使用されているように、「L I V - 1」という用語は、遺伝子又はそれがコードしているタンパク質に相当し、その遺伝子転写物は、幾つかの癌細胞において上記の標準的なレベルで検出される。より具体的には、本発明の遺伝子又はタンパク質は、DNA 1 6 4 6 4 7（配列番号：3）によってコードされているものであり、配列番号：4の推定アミノ酸配列を有する。ここで使用されているように、L I V - 1という用語は、L I V - 1 6 4 6 4 7に相当し、その開示は少なくとも配列番号：3のヌクレオチドを含んでなるか、或いはその開示は少なくとも、ここで開示されているような配列番号：4の7のアミノ酸を含んでなるアミノ酸配列に相当する。本発明によれば、E r b B 2レセプターをコードする遺伝子は、標準量より高くは発現しないが、L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7は、細胞で標準量よりも高く発現する。標準の発現よりもより高いそのような発現は、遺伝子又はタンパク質の「過剰発現」と称されている。「L I V - 1」又は「L I V - 1 - 1 - 1 6 4 6 4 7」という用語は、L I V - 1 遺伝子又はそれによってコードされているタンパク質を称するために使用され得る。一般的には、タンパク質又はペプチドを考慮する場合には、「L I V - 1 タンパク質」という用語が使用される。

### 【0023】

「L I V - 1 遺伝子産物」又は「L I V - 1 タンパク質」という用語は、その遺伝子の発現タンパク質産物、好ましくは、その遺伝子産物のポリペプチド又はタ

ンパク質形態に相当する。本発明によると、L I V-1 遺伝子産物のポリペプチド又はタンパク質形態には、その遺伝子産物の可溶性形態（すなわち、L I V-1 遺伝子産物の細胞外ドメイン（E C D））が含まれ、その可溶性形態は、完全長L I V-1 遺伝子産物の細胞外ドメインと結合し、その活性化を阻害する抗-L I V-1 遺伝子産物を産生する抗原として有用である。また、L I V-1 遺伝子産物がメッセンジャーRNA（mRNA）遺伝子産物に相当し得ることは理解され、これが適切な場合には、タンパク質とmRNAの区別がなされる。本発明に記載のL I V-1 タンパク質は、DNA 1 6 4 6 4 7（配列番号：3、又はその相補体；F i g 2 A）に対して少なくとも80%の同一性、配列番号：3又はその相補体、或いはその一部分に対して、好ましくは少なくとも約90%の同一性、より好ましくは少なくとも約95%、そして最も好ましくは少なくとも約97%の同一性がある配列を含んでなる本発明の核酸によってコードされている。本発明のL I V-1 核酸は、緊縮性の条件下で、配列番号：3又はその相補体、或いはその一部分とハイブリダイズする。本発明のL I V-1 タンパク質は、DNA 1 6 4 6 4 7（L I V-1 ポリペプチド、配列番号：4；F i g 2 B）によってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%の同一性、配列番号：4、又はその断片に対して、好ましくは少なくとも約90%の同一性、より好ましくは少なくとも約95%、そして最も好ましくは少なくとも約97%の同一性がある。

#### 【0024】

「抗-L I V-1 抗体」、「L I V-1 抗体」という用語、並びに文法的に類似の用語は、少なくとも、配列番号：4の予想されたアミノ酸配列（L I V-1-1 6 4 6 4 7 遺伝子の予想された完全長アミノ酸配列）を有するL I V-1-1-1 6 4 6 4 7 タンパク質の細胞外ドメインの一部分と特異的に結合する抗体に相当する。好ましくは、この抗体は、L I V-1 遺伝子産物の細胞外ドメインと結合し、より好ましくは、ここで開示のモノクローナル抗体が結合するエピトープA、B、又はCと同じようなエピトープと結合する。さらにより好ましくは、抗-L I V-1-1 6 4 6 4 7 抗体は、配列番号：4のアミノ酸1 1 4からアミノ酸1 3 5を含有する配列に対して、少なくとも65%の同一性を有するポリペプチド

と結合する。好ましくは、本発明の抗-L I V-1抗体は、この抗体がヒト患者を治療するために使用される場合には、ヒト又はヒト化のものである。

#### 【0025】

本発明の抗体は、好ましくは、ヒトL I V-1-164647と特異的に結合するものであり、このことは、それが他のタンパク質と顕著に交差反応しないことを意味する。そのような実施態様では、蛍光活性化セルソーター(F A C S)分析又は放射性免疫沈降法(R I A)による測定では、L I V-1遺伝子産物以外のタンパク質との抗体の結合の程度は、約10%より低い。

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗-L I V-1モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ特異性を持つ抗-L I V-1抗体組成物、一本鎖抗-L I V-1抗体を包含している。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、少量存在し得る自然に生じる可能性のある突然変異を除いて、構成する個々の抗体が同一である集団から得られる抗体を称する。

#### 【0026】

「抗体」(A b s)及び「免疫グロブリン」(I g s)は同じ構造的特徴を持つ糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対する結合特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体及び抗原特異性を持たない他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系では低レベルで産生され、ミエロームにおいて産生レベルが増加する。「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、限定されることなく、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成される多重特異的抗体(例えば二重特異的抗体)、及びそれらが所望の生物学的活性を有している限り抗体断片を包含する。

#### 【0027】

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンの異種四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、異なる免疫グロブリンアイソタイプ重鎖中のジスルフィド結合の数は相違す

る。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した部位との間で鎖内ジスルフィド架橋を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインに続いて可変ドメイン( $V_H$ )を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン( $V_L$ )を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

#### 【0028】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なるという事を意味し、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合及び特異性に利用される。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域(CDRs)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、ループ結合を形成し、そしてある場合にはその一部を形成する-シート構造を形成する、3つのCDRにより連結された-シート配置を主にとる4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FR領域により近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, NIH Publ. No.91-3242, Vol. I, 647-669頁(1991)を参照のこと)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性における抗体の関与を示す。

#### 【0029】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合において重要な抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は、「相補性決定領域」から「CDR」のアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基、及び重鎖可変ドメインの残基；Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. [1991])及び/又は「高頻度可変ループ」からの残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基、及び重鎖可変ドメインの残基；Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 19

6:901-917 [1987])を含む。「フレームワーク」又は「FR」残基はここに定義した高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

#### 【0030】

「抗体断片」は、未変性の抗体の一部、好ましくは未変性の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片；ダイアボディ(diabody)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng., 8(10): 1057-1062 [1995])；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異的抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれ、各々単一の抗原結合部位を持つ2つの同一な抗原結合断片、及び、その名称が容易に結晶化する能力を反映している残りの「Fc」断片を生成する。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有するが、交差結合抗原であり得るF(ab')<sub>2</sub>断片が生成される。

#### 【0031】

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、緊密に非共有的に結合した1つの重鎖と1つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。この配置では、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体の表面における抗原結合部位を決定するために各可変ドメインの3つのCDRが相互作用する。正確には、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原特異的な3つのCDRしか含まないFvの半分)でさえも抗原を認識し結合する能力を持つが、結合部位全体よりは親和性が低い。

また、Fab断片は軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端における数個の残基の付加によりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここにおいて、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つFab'の記号である。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、元々、それらの間にヒンジシステインを持つFab'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

#### 【0032】

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常

ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )及びラムダ( )と呼ばれる2つの明らかに異なる型の1つに分類できる。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、免疫グロブリンは異なるクラスに分けられる。免疫グロブリンには5つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mがあり、これらの幾つかは、更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A及びI g A 2に分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、各々、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元配置は良く知られている。

#### 【0033】

ここで用いられる「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団、即ち、集団を構成する個々の抗体が少量存在する起こりうる自然発生突然変異体以外は同一であるような集団から得られる抗体を意味する。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に向けられている。さらに、通常は、異なる決定基(エピトープ)に対して作られた様々な抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは違い、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して向けられている。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養によって合成され、他の免疫グロブリンに汚染されていない点において有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られという抗体の特徴を示すものであって、ある特定の方法による抗体の生産を必要とすることを意味するためのものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256: 495 [1975]によって最初に記載されたハイブリドーマ法により作成してもよいし、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)により作成してもよい。また「モノクローナル抗体」はファージ抗体ライブラリから、例えば、Clackson等, Nature, 352: 624-628 [1991]及び Marks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いて単離してもよい。

#### 【0034】

ここで、モノクローナル抗体は特に、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含

み、それは、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種から誘導された又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導された又は他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限りにおいてそれらの抗体の断片の対応する配列と同一又は相同である(米国特許第4,816,567号; Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984])。ここで対象であるキメラ抗体には、げっ歯類(例えば、マウスの)起源の抗原結合領域をとまなうヒト定常領域配列、又は非ヒト霊長類(例えば、旧世界ザル、サル、マカク等)から誘導した可変領域抗原結合配列を含んでなる「霊長類化」抗体、或いは対象の抗原で免疫化した他の非ヒト類で生成した抗体から誘導した抗原結合領域が含まれる。

#### 【0035】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそれらの断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合性配列)である。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)であって、そのレシピエントCDR由来の残基が、マウス、ラット又はウサギなどのヒト以外の種のCDR(ドナー抗体)に由来する所望の特異性、親和性及び容量を持つ残基で置換されている。ある場合は、ヒト免疫グロブリンのFvFR残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移植されるCDR又は枠配列にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密かつ最適化するために施される。一般にヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質上全てがヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含有するであろう。また、最適なヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含有するであろう。さらなる詳細については、Jones等, Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann等, Nature 332: 323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct

. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照のこと。

【0036】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、FvポリペプチドはV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【0037】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>)内で軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)が結合している。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成を不可能にするリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を形成する。ダイアボディは、例えば、EP404097; WO93/11161; 及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

【0038】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の狭雑成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEを行い、クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色によって、均一になるまで精製されうる。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが

、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

#### 【0039】

ここで使用される「過剰発現」という用語は、遺伝子及び/又はそれによってコードされている癌細胞のような細胞のタンパク質に相当する。タンパク質を「過剰発現」する癌細胞とは、同じ組織型の非癌細胞と比較して、顕著により高いレベルのそのタンパク質を有する癌細胞である。例えば、本発明によれば、L I V - 1 タンパク質の過剰発現は、遺伝子増幅、或いは増大した転写又は翻訳によって起こり得る。

#### 【0040】

L I V - 1 タンパク質の過剰発現は、細胞又は組織でのL I V - 1 mRNAのレベルの増加を評価することによる(例えば、定量P C R法によって)、或いは細胞の表層に存在するL I V - 1 タンパク質を検出することによる(例えば、免疫組織化学アッセイ)、診断又は予後アッセイで測定してもよい。あるいは、又は付加的には、例えば、蛍光インサイツハイブリダイゼーション(F I S H ; 1998年10月に発行のW O 98 / 45479)、サザンブロット、或いはリアルタイム定量P C R ( R T - P C R ) などのポリメラーゼ連鎖反応法(P C R ) 技術によって、細胞の中のL I V - 1 コード化核酸のレベルを測定してもよい。また、L I V - 1 タンパク質又はその断片と結合する抗体と体液又は他の試料を接触させることで、血清などの生物体液中の流出抗原(例えば、L I V - 1 細胞外ドメイン)を測定によって、L I V - 1 の過剰発現を研究し得る。種々のインビトロ及びインビボアッセイが、熟練した技術者にとって入手可能である。例えば、L I V - 1 タンパク質又はその断片、或いは患者の体内の細胞を含んでなる組織又は体液を、例えば放射活性アイソトープで随意的に標識された抗体へ曝露してもよく、そして例えば放射活性の外部走査によって、或いは事前に抗体へ曝露した患者から取り出した生検用組織を分析することによって、試料又は患者の細胞への抗体の結合を評価することができる。

#### 【0041】

L I V - 1 を「過剰発現する」細胞は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、正常な L I V - 1 核酸レベルよりも著しく高い。典型的には、この細胞は、癌細胞、例えば乳房、卵巣、前立腺、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓又は気泡細胞である。また、この細胞は、細胞株、例えば S K B R 3、B T 4 7 4、C a l u 3、M D A - M B - 4 5 3、M D A - M B - 3 6 1 又は S K O V 3 である。

逆に、L I V - 1 タンパク質又は L I V - 1 遺伝子の過剰発現によって特徴付けられない癌は、診断アッセイにおいて、同じ組織型の非癌細胞と比較して、L I V - 1 タンパク質又は L I V - 1 遺伝子の正常なレベルよりもより高い発現をしない。

#### 【0042】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか又は表す。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定な例としては、乳癌、前立腺癌、大腸癌、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。

#### 【0043】

「遺伝子増幅」及び「遺伝子重複」なる語句は交換可能に用いられ、遺伝子又は遺伝子断片の複数のコピーが特定の細胞又は細胞系で生成されるプロセスを意味する。重複された領域（増幅された DNA の伸展）は、しばしば「単位複製配列」と呼ばれる。通常は、生成されるメッセンジャー RNA ( m R N A ) の量、即ち遺伝子発現レベルも、発現された特定遺伝子の作成されたコピー数に比例して増加する。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

#### 【0044】

「治療」とは、疾患の進行を阻害する、もしくは病理を変化させることを意図して、行う処置のことである。従って、「治療」は治療的処置及び予防的又は保護的手段の両方を指す。治療が必要なものは、既に疾患に罹っているもの並びに疾患が防止されるべきものを含む。腫瘍（例えば、癌）治療では、治療薬は直接的に腫瘍細胞の病理を低下させてもよいし、又は腫瘍細胞を他の治療媒介物、例えば放射線及び/又は化学治療に対してより敏感にしてもよい。

癌の「病理」は、患者の良好な生存を損なう全ての現象を含む。これは、限定されるものではないが、異常又は制御不能な細胞成長、転移、隣接細胞の正常機能の阻害、サイトカイン又は他の分泌生成物の異常レベルでの放出、炎症又は免疫反応の抑制又は悪化などを含む。

治療の目的とされる「哺乳動物」は、哺乳類に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ用、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

#### 【0045】

ここで用いられる「担体」は製薬的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、それらは、用いられる用量及び濃度でそれに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容される担体は、pH緩衝水溶液であることが多い。生理学的に許容される担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストラン等の単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又はTWEEN(商品名)、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS(商品名)等の非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0046】

一又は複数のさらなる治療薬「と組み合わせる」の投与は、同時（一時）及び

任意の順序での連続投与を含む。

ここで用いられる「細胞障害性薬」なる用語は、細胞の機能を阻害又は抑制する及び/又は細胞破壊を生ずる物質を意味する。この用語は、放射性同位体（例えば、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 及び $Re^{186}$ ）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素的活性毒素といった毒素、又はその断片を含むとされる。

#### 【0047】

「化学治療薬」は、癌の治療に有用な化合物である。化学治療薬の例は、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソイド、例えばパクリタキセル（Taxol（商品名）、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキセタキセル（Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、トキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、マイトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4,675,187号）、5-FU、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシンD、VP-16、クロランブシル、メルファラン、及び他の関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、この定義に含まれるのは、タモキシフェン及びオナプリストンなどの腫瘍へのホルモン作用を調節又は阻害するように作用するホルモン様薬剤である。

#### 【0048】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にここで同定される任意の遺伝子を過剰発現する癌細胞の成長を、インビトロ又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。即ち、成長阻害剤は、S期でそのような遺伝子を過剰発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス（ピンクリスチン及

びビンブラスチン)、タキソール、及びトポII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特にp13に見出すことができる。

【0049】

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンである。

【0050】

「サイトカイン」なる用語は、1つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエータとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体化ホルモン(LH)；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-及び-；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF-等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF-及びTGF-等のトランスフォーミング成長因子(TGFs)；インシュリン様成長因子-I及びII；エリスロポエチ

ン(EPO);骨誘発因子;インターフェロン-、-、及び-等のインターフェロン;コロニー刺激因子(CSFs)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF);顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF);及び顆粒球-CSF(G-CSF);インターロイキン(ILs)、例えばIL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12;腫瘍壊死因子、例えばTNF-及びTNF-;及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインは、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的な活性等価物を含む。

#### 【0051】

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」は、親薬剤に比較して腫瘍細胞に対する細胞障害性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換される製薬的活性物質の前駆体又は誘導体形態を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, : 375-382, 615th Meeting, Belfast (1986),及びStella 等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borchardt 等(編), pp.247-267, Humana Press (1985)参照。本発明のプロドラッグは、これらに限られないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸変性プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、-ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定するものではないが、本発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害性薬の例には、前記の化学療法剤が含まれる。

#### 【0052】

ここに開示されるポリペプチドの「有効量」とは、腫瘍性細胞成長、腫瘍又は癌細胞成長の阻害に関しては、標的細胞の成長をある程度阻害できる量である。この用語には、標的細胞の成長阻害、細胞分裂停止及び/又は細胞障害性効果及

び/又はアポトーシスを誘起することのできる量が含まれる。腫瘍性細胞成長、腫瘍又は癌細胞成長の阻害に関するL I V-1ポリペプチドアンタゴニストの「有効量」は、経験的に、そして常套手段によって決定することができる。

「治療的有效量」は、腫瘍の治療に関しては、次の効果：(1)遅延化及び完全な成長停止を含む、腫瘍成長の或る程度の阻害；(2)腫瘍細胞数の減少；(3)腫瘍サイズの縮小；(4)腫瘍細胞の末梢器官への浸潤の阻害(即ち、減少、遅延化又は完全な停止)；(5)転移の阻害(即ち、減少、遅延化又は完全な停止)；(6)抗腫瘍免疫反応の促進、これは、腫瘍の退行又は拒絶をもたらしてもよいが、必ずしも必要ではない；及び/又は(7)疾患に伴う徴候の1つ又は複数の或る程度の軽減の1つ又は複数誘起することのできる量を意味する。腫瘍の治療を目的とした、L I V-1ポリペプチドアンタゴニストの「治療的有效量」は、経験的に、そして常套手段によって決定することができる。

#### 【0053】

L I V-1アンタゴニストの「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのL I V-1アンタゴニストの「成長阻害量」は、経験的に、そして日常的手法で決定できる。

L I V-1アンタゴニストの「細胞障害性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのL I V-1アンタゴニストの「細胞障害性量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

#### 【0054】

ここに同定されるL I V-1ポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列相同性又は同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、L I V-1配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegaalign(DNASTAR)ソフトウェアのよ

うな公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって下記に記載のように得られる。ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードがジェネンテック社によって公認され、そしてFig 20A-Qに示すソースコードは、米国著作権事務所、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されていて、表1に提供されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIX (登録商標) オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

#### 【0055】

ここでの目的のためには、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率  $X/Y$  の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

#### 【0056】

特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列相同性又は同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul

ら、Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997) ) を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

#### 【0057】

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対してある程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率  $X / Y$  の 100 倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さ異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

#### 【0058】

さらに、%アミノ酸配列同一性値も、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Aitschulら、Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))を用いて決定してもよい。さらに、殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、(a) WU-BLAST-2によって決定した、DNA164647によってコードされた天然LIV-1ポリペプチドから誘導された配列を有する対象であるLIV-1ポリペプチドのアミノ酸配列と対象である比較アミノ酸

配列（即ち、L I V - 1 ポリペプチド変異体であってもよい、対象である L I V - 1 ポリペプチドが比較される配列）の間で一致する同一アミノ酸残基の数を、（b）対象である L I V - 1 ポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列 B に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する又は有しているアミノ酸配列 A を含んでなるポリペプチド」という記載では、アミノ酸配列 A が対象である比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列 B が対象である L I V - 1 ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0059】

ここに同定される L I V - 1 ポリペプチド-コード化核酸配列にする「パーセント(%)核酸配列相同性又は同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、L I V - 1 ポリペプチド-コード化核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラム ALIGN-2 を使用することによって下記に記載のように得られる。ALIGN-2 プログラム用の完全なソースコードは、米国著作権事務所、ワシントン D.C., 20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 TXU510087 で登録されていて、表 1 に提供されている。この ALIGN-2 プログラムは、ジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能である。ALIGN-2 プログラムは、UNIX オペレーティングシステム、好ましくは デジタル UNIX V4.0D での使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2 プログラムによって設定され変動しない。

【0060】



```

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]: /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]: /* base no. of jmp in seq x */
};
/* limits seq to 2^16 - 1 */

struct diag {
    int          score: /* score at last jmp */
    long        offset: /* offset of prev block */
    short       ijmp: /* current jmp index */
    struct jmp  jp: /* list of jmps */
};

struct path {
    int          spc: /* number of leading spaces */
    short       n[JMPs]: /* size of jmp (gap) */
    int         x[JMPs]: /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char          *ofile; /* output file name */
char          *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char          *prog; /* prog name for err msgs */
char          *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int          dmax; /* best diag: nw() */
int          dmax0; /* final diag */
int          dna; /* set if dna: main() */
int          endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int          gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int          len0, len1; /* seq lens */
int          ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int          smax; /* max score: nw() */
int          *xbm; /* bitmap for matching */
long         offset; /* current offset in jmp file */
struct       diag *dx; /* holds diagonals */
struct       path pp[2]; /* holds path for seqs */

char          *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char          *getseq(), *g_calloc();

```

Page 1 of nw.h

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

```

```

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int ac;
char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)?_dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats. alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

main

Page 1 of nw.c

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char *px, *py; /* seqs and ptrs */
    int *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int ndelx, delx; /* keep track of delx */
    int *tmp; /* for swapping row0, row1 */
    int mis; /* score for each type */
    int ins0, ins1; /* insertion penalties */
}

```

nw

【 0 0 6 3 】

```

register      id:          /* diagonal index */
register      ij:          /* jmp index */
register      *col0, *col1: /* score for curr. last row */
register      xx, yy:      /* index into seqs */

dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0;      /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {
        if (xx == 1)
            col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
        else
            col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
        ndelx = xx;
    }
    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
    }
}

/* update penalty for del in x seq;
* favor new del over ongong del
* ignore MAXGAP if weighting endgaps
*/
if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {

```

Page 2 of nw.c

...nw

【 0 0 6 4 】

```

    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else {
        dely[yy] -= ins1;
        ndely[yy]++;
    }
} else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

```

```

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongoing del
 */

```

```

if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

```

```

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

Page 3 of nw.c  
...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}

```

```

else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;

    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejms(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
        */
        if (endgaps)
            coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (coll[yy] > smax) {
            smax = coll[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

Page 4 of nw.c

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers. stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
#include "nw.h"

```

```

#define SPC      3
#define P_LINE  256    /* maximum output line */
#define P_SPC    3     /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;        /* set output line length */
FILE    *fx;         /* output file */

print()
{
    int     lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) {    /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) {    /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) {    /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

Page 1 of nwprint.c

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int     lx, ly;        /* "core" (minus endgaps) */
    int     firstgap, lastgap;    /* leading trailing overlap */
{
    int     nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double  pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

```

getmat

【 0 0 6 7 】

```

/* get total matches, score
*/
i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
n0 = pp[1].spc + 1;
n1 = pp[0].spc + 1;

nm = 0;
while ( *p0 && *p1 ) {
    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:
* if penalizing endgaps, base is the shorter seq
* else, knock off overhangs and take shorter core
*/
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%=d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

Page 2 of nwprint.c

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outh, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outh);
}

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {

```

...getmat

【 0 0 6 8 】

```

(void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
    ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static nm: /* matches in core -- for checking */
static lmax: /* lengths of stripped file names */
static ij[2]: /* jmp index for a path */
static nc[2]: /* number at start of current line */
static ni[2]: /* current elem number -- for gapping */
static siz[2]:
static char *ps[2]: /* ptr to current element */
static char *po[2]: /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]: /* output line */
static char star[P_LINE]: /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

pr\_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

```

...pr\_align

dumpblock

【 0 0 7 0 】

```

for (i = 0; i < 2; i++)
    *po[i]-- = '\0';

```

Page 4 of nwprint.c

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' '))
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
char nline[P_LINE];
register i, j;
register char *pn, *px, *py;

for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
    *pn = ' ';
for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
    if (*py == ' ' || *py == '-')
        *pn = ' ';
    else {
        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
                *px = '-';
        }
        else
            *pn = ' ';
        i++;
    }
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
}
/*

```

nums

【 0 0 7 1 】

```

* put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
*/
static
putline(ix)                                     putline
{
    int      ix;

    int      i;
    register char *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* these count from 1:
     * ni[] is current element (from 1)
     * nc[] is number at start of current line
     */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
* put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
*/
static
stars()                                         stars
{
    int      i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++){
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A'])
                cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '.';
        else
            cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
    *px++ = cx;
}

```

【 0 0 7 2 】

```

    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

Page 6 of nwprint.c

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

Page 7 of nwprint.c

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps. from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

```

cleanup

【 0 0 7 3 】

```

}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ':', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                                getseq
char *file: /* file name */
int *len: /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

Page 1 of nwsubr.c

```

...getseq
py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);

```

【 0 0 7 4 】

```

    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
char *msg;      /* program, calling routine */
int nx, sz;     /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file. set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                          readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp: j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
            }
            else
                break;
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
            cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax].jp.n[j];

```

Page 2 of nwsubr.c

...readjmps

【 0 0 7 5 】

```

xx = dx[dmax].jp.x[j];
dmax += siz;
if (siz < 0) { /* gap in second seq */
    pp[1].n[i1] = -siz;
    xx += siz;

    /* id = xx - yy + len1 - 1
    */
    pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
    gapy++;
    ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
    siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
    i1++;
}
else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
    pp[0].n[i0] = siz;
    pp[0].x[i0] = xx;
    gapx++;
    ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
    siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
    i0++;
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Page 3 of nwsubr.c

```

/*
* write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
*/
writejmps(ix) writejmps
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);

```

【 0 0 7 6 】

```

        cleanup(1);
    }
    if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
        exit(1);
    }
}
(void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
(void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Page 4 of nwsubr.c

## 【0077】

ここでの目的では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cとすることもできる）は次のように計算される：

分率W / Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDのヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さがアミノ酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

## 【0078】

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパスe-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

## 【0079】

配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性（あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる）は次のように計算される：

分率 $W/Z$ の100倍

ここで、 $W$ は配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一対であると記録されたのヌクレオチドの数であり、 $Z$ はDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さ異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

## 【0080】

さらに、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム（Altschul等，Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値（ $T$ ） = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。ここでの目的のために、%核酸配列同一性値は、（a）天然配列LIV-1ポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするLIV-1ポリペプチドコード化配列の核酸配列と、対象とする比較核酸分子（即ち、対象とするLIV-1ポリペプチドコード化核酸分子の配列が比較される変異体ポリヌクレオチドであってもよい配列）との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、（b）対象とするLIV-1ポリペプチドコード化核酸のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列Aが対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Bが対象とするLIV-1ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

## 【0081】

上記のように実施されるアミノ酸配同一性列比較の内容において、「ポジティブ」という用語には、比較された配列において、同一ではないが類似の特性を持つアミノ残基が含まれる。対象のアミノ酸残基に対してポジティブ値をスコアするアミノ酸残基は、対象のアミノ酸残基と一致するか、或いは対象のアミノ酸残基の好ましい置換（下の表2に定義）であるかいずれかのアミノ酸残基である。

【0082】

表 2

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe

Val (V)            ile; leu; met; phe;  
                   ala; ノルロイシン            leu

### 【0083】

ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の置換的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位での分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然発生残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ルイシン, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

### 【0084】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された(非保存)部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキヤンニング、及びPCR突然変異誘発等の当該分野で知られた方法を使用して生成できる。部位特異的突然変異誘発[Carterら, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zollerら, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wellsら, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wellsら, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)]又は他の既知の技術を実施することができる。

### 【0085】

この目的において、付与されたアミノ酸配列Bとの、又はBに対する付与されたアミノ酸配列Aのポジティブ%値(あるいは、付与されたアミノ酸配列Aが、付与されたアミノ酸配列Bとの、又はBに対する所定の%ポジティブを有するか

、又はこれを含むものとしても呼称することができる)は、次の式：

分率  $X / Y$  の 100 倍

により算出され、ここで、 $X$  は、 $A$  及び  $B$  のプログラムアライメントにおいて、配列アライメントプログラムALIGN-2によりポジティブ値がスコアされたアミノ酸残基の数であり、 $Y$  は  $B$  の全アミノ酸残基の数である。アミノ酸配列  $A$  の長さはアミノ酸配列  $B$  の長さとは等しくなく、 $B$  に対する  $A$  の%ポジティブは、 $A$  に対する  $B$  の%ポジティブとは等しくないと認識されるであろう。

#### 【0086】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを表すために使用するとき、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、自然に結合する全ての成分と結合していない。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、LIV-1の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

#### 【0087】

LIV-1ポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子、又は抗-LIV-1抗体をコードする「単離された」核酸とは、同定され、LIV-1コード化核酸又は抗-LIV-1コード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸分子は、それが天然では付随しているすべての成分を含まないものである。単離されたLIV-1コード化核酸分子、或いは抗-LIV-1-コード化核酸分子は、天然

に見出される形態や設定と異なるものである。

【0088】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列には、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位が含まれる。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアダニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

【0089】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0090】

ハイブリダイゼーション反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性DNAの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ゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にする事になり

、低い温度は緊縮性を低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応の緊縮性の更なる詳細及び説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

#### 【0091】

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、と750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)42における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42における0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55での50%ホルムアミド、次いで55におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

#### 【0092】

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、20%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション、次いで1xSSC中35-50でのフィルター洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因

子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

【0093】

ここで意図している「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生LIV-1ポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性特性を保持するLIV-1ポリペプチドの形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生LIV-1ポリペプチドによって生ずる(阻害性又は刺激性の)機能であって、天然又は天然発生LIV-1ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成を誘発する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生LIV-1ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成を誘発する能力を意味する。

【0094】

この出願に開示したスクリーニングアッセイ(例えば有機又は無機小分子、ペプチド、など)による同定が可能な抗体やその他の分子という面においての「生物活性」は、そのような分子のこの出願において同定された増幅遺伝子によってコードされているポリペプチドと結合又は複合体を形成する、或いはコード化されたポリペプチドと他の細胞タンパク質との相互作用を妨害する、又はLIV-1ポリペプチドの転写又は翻訳を妨害する能力に言及するために使用される。好ましい生物活性は、標的腫瘍細胞の成長阻害である。その他の好ましい生物活性は、標的腫瘍細胞の死を招く細胞傷害性活性である。

LIV-1ポリペプチドという文脈における「生物活性」という用語は、腫瘍性細胞成長又は制御されていない細胞成長を誘導する、或いは特に転移性のある腫瘍の特定の形態の指標として機能するLIV-1ポリペプチドの能力を意味する。

【0095】

「免疫学的活性」という語は、LIV-1ポリペプチドの少なくとも一つのエピトープとの免疫学的交差反応性を意味する。

ここで用いられる「免疫学的交差反応性」とは、候補ポリペプチドが、この活性を持つLIV-1ポリペプチドの定性的生物学的活性を、公知の活性LIV-1

ポリペプチドに対して生じたポリクローナル抗血清と競合的に阻害できることを意味する。そのような抗血清は、例えばヤギ又はウサギに、完全フロイントアジュバント中の周知の活性類似物を皮下注射し、次いで不完全フロイント中で腹膜内又は皮下に追加免疫することにより従来の方法で調製される。免疫学的交差反応性は好ましくは「特異的」であり、これは同定される免疫学的交差反応性分子（例えば抗体）の対応するL I V - 1ポリペプチドに対する結合親和性が、その分子の他の任意の知られた天然ポリペプチドに対する結合親和性より有意に高い（好ましくは少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約4倍、さらにより好ましくは少なくとも約8倍、最も好ましくは少なくとも約10倍高い）ことを意味する。

#### 【0096】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然L I V - 1ポリペプチドの生物学的活性を部分的に又は完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を指す。好適なアンタゴニスト分子は特に、アンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、ペプチド、有機小分子、抗-センス核酸などを含む。L I V - 1ポリペプチドのアンタゴニストを候補アンタゴニスト分子と同定する方法、並びにL I V - 1ポリペプチドと通常は関連している一つ又は複数の生物学的活性の変化を測定することをが含まれる。

#### 【0097】

この出願で定義されている「小分子」は、約500ダルトン未満の分子量を有する。

「標識」という語は、この出願で用いられる場合、抗体に直接的又は間接的に結合して「標識された」抗体を生成する、検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。検出可能な標識として機能する放射性各種には、例えばI-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、及びPd-109が含まれる。

#### 【0098】

「固相」とは、本発明の抗体が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、孔の制御されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固体相も含む。

#### 【0099】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えば、LIV-1ポリペプチド又はそれに加えて抗体、並びに任意の化学療法剤）の送達に有用な、種々の型の脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む小さな小胞である。リポソームの成分は、通常は生物学的メンバーの脂質配列に類似した2層構造に配列される。

#### 【0100】

この出願で用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」、例えばレセプター、リガンド、又は酵素）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位（抗原結合部位）以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリン、並びにその任意のサブクラス又はアイソタイプから得ることができる。

#### 【0101】

「HER2」、「ErbB2」、「c-ErbB2」という用語には互換的に使用される。特にそうでないことを示さない限り、ここで使用される「ErbB2」、「c-ErbB2」及び「HER2」という用語はヒトタンパク質を指し

、「e r b B 2」、「c-e r b-B 2」及び「h e r 2」はヒト遺伝子を指す。ヒトe r b B 2 遺伝子及びE r b B 2 タンパク質は、例えばSembara, PNAS(USA) 82:6497-6501(1985)及びYamamotoら, Nature 319:230-234(1986)(ジーンバンク受託番号 X03363)に記載されている。E r b B 2 は4つのドメインを有する(ドメイン1-4)。

#### 【0102】

「エピトープ4 D 5」は、抗体4 D 5 (ATCC CRL 10463)が結合するE r b B 2 の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープはE r b B 2 の膜貫通領域に近接している。4 D 5 エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の変換ブロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がE r b B 2 の4 D 5 エピトープ(すなわち、約残基529から、例えば約残基561から、約残基625までを含む領域における任意の一又は複数の残基)に結合するか否かを評価するために、エピトープマッピングを行うこともできる。

「エピトープ3 H 4」は、抗体3 H 4 が結合するE r b B 2 の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、E r b B 2 の細胞外ドメインのアミノ酸配列の残基約541から約599までを含む。

#### 【0103】

「エピトープ7 C 2 / 7 F 3」は、7 C 2 及び/又は7 F 3 抗体(各々、ATCC HB-12215及びATCC HB-12216)が結合するE r b B 2 の細胞外ドメインのN末端領域である。7 C 2 / 7 F 3 エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の変換ブロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がE r b B 2 の7 C 2 / 7 F 3 エピトープに結合するか否かを確認するために、エピトープマッピングを行うこともできる。

#### 【0104】

「細胞死を誘発」又は「細胞死を誘発可能な」という用語は、生存している細

胞を生存不能とさせる抗-L I V - 1 遺伝子産物抗体の能力を意味する。ここでの「細胞」とはL I V - 1 遺伝子産物を発現するもの、特にL I V - 1 遺伝子産物を過剰発現する細胞のことである。L I V - 1 を「過剰発現する」細胞は、同じ組織型の非癌化細胞に比べて、正常よりも顕著に高いL I V - 1 mRNA及び/又はL I V - 1 タンパク質レベルを有する。また、本発明の方法によって処置される細胞は、E r b B 2 を過剰発現しない(すなわち、細胞は、同じ細胞又は組織型の正常、非癌細胞とおよそ同じかより低いレベルのE r b B 2 を発現する)。好ましくは細胞は癌細胞、例えば乳房、肺、又は前立腺細胞である。インビトロでは、細胞は、細胞表層でL I V - 1 を発現させるためにL I V - 1 DNA、好ましくはDNA 1 6 4 6 4 7 で形質転換した細胞株由来のものでよい。インビトロでの細胞死は、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で決定され、抗体依存性細胞障害活性(A D C C)又は補体依存性細胞障害活性(C D C)により誘発される細胞死と区別される。よって、細胞死に対するアッセイは、熱不活性化血清(すなわち補体の不在下)を使用し、免疫エフェクター細胞の不在下で行うことができる。抗体が細胞死を誘発可能であるか否かを測定するために、ヨウ化プロピジウム(P I)、トリパンプルー(Mooreら, Cytotechnology 17:1-11[1995]を参照)又は7 A A Dの取込みにより評価される膜インテグリティの損失度合いが未処理細胞と比較して評価される。好ましい細胞死誘発抗体は、「L I V - 1 発現細胞におけるP I取込みアッセイ」において、P Iの取込みを誘発するものである。

#### 【0105】

「アポトーシスを誘発」又は「アポトーシスを誘発可能な」という用語は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び/又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)によって判定されるようなプログラム細胞死を誘発する抗体の能力を意味する。細胞は、L I V - 1 遺伝子産物を過剰発現するものである。好ましくは「細胞」は、腫瘍細胞、例えば乳房、肺、又は前立腺細胞である。インビトロでは、この細胞は、DNA 1 6 4 6 4 7 のような、L I V - 1 DNAで形質転換した細胞株由来のものでよい。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、

ホスファチジルセリン(P S)転位置をアネキシン結合により測定することができ；DNA断片化は以下の実施例に開示されているようにDNAラダーリングにより評価することができ；DNA断片化に伴う細胞核/染色質凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、「アネキシン結合アッセイ使用細胞」において、アポトーシスを誘発する抗体は、未処理細胞の約2~50倍、好ましくは約5~50倍、最も好ましくは約10~50倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである(以下参照)。

「サルベージレセプター結合エピトープ」という用語は、ここで使用されるときは、Ig G分子のインビボでの血清半減期を増加させる原因となるIg分子(例えばIg G<sub>1</sub>、Ig G<sub>2</sub>、Ig G<sub>3</sub>又はIg G<sub>4</sub>)のFc領域のエピトープを意味する。

#### 【0106】

ここで使用される「治療」とは、治癒的処置、予防的療法及び防止的療法の両方を意味する。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患が防止されているものを含む。

「疾患」とは抗-L I V-1 遺伝子産物抗体による治療から恩恵を受けるであろう任意の症状である。これには、哺乳動物が問題とする疾患になる素因になる病的症状を含む慢性及び急性の疾患又は障害が含まれる。ここで治療される限定されない疾患の例には、乳房、肺、及び前立腺組織の良性と悪性腫瘍が含まれる。

#### 【0107】

「パッケージ挿入物」という用語は効能、用法、用量、投与方法、禁忌及び/又はかかる治療製品の使用に関する警告についての情報を含む、治療製品の市販用パッケージに通常含まれるインストラクションを意味するために使用される。

「血清濃度」、「血清薬剤濃度」、又は「血清抗-L I V-1 抗体濃度」という用語は、薬剤を用いて治療される動物又はヒト患者の血清中の薬剤の濃度を意味する。抗体の血清濃度は、例えば好ましくはイムノアッセイにより決定される。好ましくは、イムノアッセイはここに開示される方法に従うE L I S Aである。

「ピーク血清濃度」という用語は、動物又はヒト患者に薬剤を送達した後すぐ

の最高の血清薬剤濃度を意味し、血液システムを通して薬剤が分配された後であるが、有意な組織分配の前に、薬剤の代謝又は排泄が起こる。

【0108】

「血清中谷値濃度」という用語は、前の投薬の送達の後で、一連の投薬において薬剤の次のその後の投薬の送達の直後の血清薬剤濃度を意味する。一般に血清中谷値濃度は、一連の薬剤投与における最少の持続した有効薬剤濃度である。また、血清中谷値濃度は、薬剤の他の投薬が治療投与計画の一部として投与されるためである血清濃度を意味するので、効果的な最少血清濃度として良く目安とされる。静脈内投与により薬が送達された場合、もっとも好ましくは血清中谷値濃度は前注入初期薬剤送達の1日目の内に達成される。薬剤の送達が、皮下投与による場合には、ピーク血清濃度は好ましくは3日以下で達成される。本発明によれば、好ましくは血清中谷値濃度は、ここで開示される薬剤送達方法の何れかを用いて、4週間以下、好ましくは3週間以下、より好ましくは2週間以下、好ましくはもっとも好ましくは一日以下を含む1週間以下で達成される。

【0109】

「静脈内注射」は、約5分以上、好ましくは約30～90分の間の時点で動物又はヒト患者の血管中での薬剤の導入を意味するが、本発明に従うと、静脈内注入はあるいは10時間以下で投与される。

「静脈内ボラス」又は「静脈内プッシュ」は、体が約15分以下、好ましくは5分以下で薬剤を受け入れるような動物又はヒトの血管中への薬剤投与を意味する。

「皮下投与」は、比較的ゆっくりと、薬剤容器からの送達が維持されることによって、動物又はヒト患者の皮膚の下に、好ましくは皮膚及び皮下組織の間のポケットに薬剤を投入することを意味する。ポケットは、皮膚を上につまんで引き上げ皮下組織から離すことにより作成される。

【0110】

「皮下注射」は、比較的ゆっくりと、これに限らないが30分以下又は90分以下を含む時間、薬剤容器からの送達が維持されることによって、動物又はヒト患者の皮膚の下に、好ましくは皮膚と皮下組織の間に薬剤を導入することを意味

する。場合によっては、注入が、動物又はヒト患者の皮膚の下に差し込まれた薬剤送達ポンプの皮下挿入によって成され、ポンプは決定された時間、例えば30分、90分、又は治療投薬計画の時間、定められた量を送達する。

「皮下ポラス」という用語は、動物又はヒト患者の皮膚の下への薬剤投入を意味し、ポラス薬剤送達は好ましくは約15分以下、より好ましくは5分以下、及び最も好ましくは60秒以下である。投与は、例えば皮膚をつまんで引き上げ、皮下組織から離すことによりポケットが形成される、皮膚と皮下組織の間のポケット内が好ましい。

#### 【0111】

薬剤投与に関する場合の「前注入」という用語は、後の間隔をおいた同量またはそれより少量のもの以前の、初期の高用量を示す。初期の高用量は、効果的な標的血清濃度に対する動物又はヒト患者の血清薬剤濃度をより速やかに増加させることを意味する。

L I V - 1 遺伝子発現及び遺伝子産物に関する刊行物としては、次の公開特許及び公開出願を含む：1997年12月2日に公開のManning, D.L.ら., 米国特許第5,693,465号；Manning, D.L.ら., *European J. Cancer* 29A(10): 1462-1468[1993]；Manning, D.L.ら., *European J. Cancer* 30A(5): 675-678[1994]；Manning, D.L.ら., *Acta Oncologica* 34(5): 641-646[1995]；McClelland, R.A.ら., *Breast Cancer Res. & Treatment* 41(1): 31-41 [1996]；Knowlden, J.M.ら., *Clin. Cancer Res.* 3(11): 2165-2172[1997]；及びMcClelland, R.A., ら., *British J. Cancer* 77(10): 1653-1656[1998]。

#### 【0112】

抗-ErbB2抗体に関する刊行物としては、次の公開特許及び公開出願を含む：1989年1月5日公開のPCT/US89/00051；1990年5月18日公開のPCT/US/90/02697；1997年7月23日公開のEU0474727；1997年7月23日公開のDE69031120；1997年10月9日公開のPCT/US97/18385；1997年10月14日公開のSA97/9185；1997年10月14日公開のUS5677171；1998年6月24日公開のUS5720937；1998年2月24日公開のUS5720954；1998年3月10日公開のUS5725856；1998年6月23日公開のUS5770195；1998年6月30日公開のUS5772997；1998年12月10日公開のPCT/US98/2626；及び1999年3

月26日公開のPCT/US/06673、特許及び出願のそれぞれは、出展明示によりその全部を個々に取り込む。

【0113】

以下の実施例は例示目的のためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献は、その全体を出典明示によりここに取り入れる。

【0114】

(実施例)

実施例で言及されている全ての他の市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：Sambrook等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis等，PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlow等，Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J.Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan等，Current Protocols in Immunology, 1991。

【0115】

実施例1 . マイクロアレイ分析で検討した腫瘍細胞でのLIV-1発現

細胞がErbb2を過剰発現しないが、LIV-1遺伝子産物(例えばLIV-1-164647mRNA)を過剰発現する乳癌の形態が見出され、ここで独自に開示されている。腫瘍の型の検出を、マイクロアレイ技術を使用しておこなった。核酸マイクロアレイを使用して、被験及びコントロール組織試料の被験及びコントロールmRNA試料を逆転写し、標識化してcDNAプローブを作成した

。次いで、このcDNAプローブを固体支持体上に固定化した核酸のアレイとハイブリダイズさせた。このアレイは、アレイの各構成物の配列及び位置がわかるように構成されている。標識されたプローブと特定のアレイの構成物とのハイブリダイゼーションは、プローブが誘導された試料においてその遺伝子を発現していることを示す。被験（疾患組織）試料由来のプローブのハイブリダイゼーションシグナルが、コントロール（正常組織）試料由来のプローブのハイブリダイゼーションシグナルよりも高い場合には、疾患組織で過剰発現している遺伝子又は遺伝子群が同定される。この結果の意味は、疾患組織でのタンパク質の過剰発現が、疾患症状の存在に関する診断マーカーとしてだけでなく、疾患症状の治療に関する治療標的としても有用だということである。

#### 【0116】

腫瘍細胞は、乳房腫瘍において、周囲の非癌性細胞から肉眼によって切断分離された。細胞のヘマトキシリン-エオシン染色法によって、摘出細胞が腫瘍由来であることが確かめられた。この腫瘍細胞のmRNA（種々の遺伝子の細胞特異的な発現を反映する）を、RT/PCR方法、蛍光タグによる標識によってcDNAへ変換し、ガラススライド上に配列させてあるESTとハイブリッドさせた。画像化装置によって、スライド上の各試料の蛍光を検出して測定した。この蛍光は、スライド上の既知の位置にある既知の核酸配列（EST）とのハイブリダイゼーションによって同定可能である被験細胞の標識されたメッセンジャーを示した。相対蛍光は遺伝子の相対活性を示し、その強い蛍光は、相対的に多量のメッセンジャーを発現している活性遺伝子を示した。僅か蛍光又は蛍光が無いことは、標識されたメッセンジャーがESTとはハイブリダイズしていないことを示した。マイクロアレイスライド上の配列とハイブリダイズした蛍光標識されたプローブの検出は、例えば、この出願では文献として取り入れられている米国特許第5,143,854号に記載されている。

#### 【0117】

Erbb2も過剰発現しなかった乳房腫瘍組織での過剰発現を示唆するパターンで、調整品のcDNAが公的に入手可能なEST配列（寄託番号H29315（Washington University-Merck EST Project, 著者Hillier, L.ら., 配列番

号：5，Research Genetics(Alabama, USA)とハイブリダイズしたことが見出された。このcDNAを配列決定し、LIV-1-DNA164647としてここで開示した。放射活性で標識したLIV-1-164647プローブの腫瘍組織の組織マイクロアッセイとのインサイツハイブリダイゼーションは、更に乳房、肺、前立腺、結腸、子宮内膜、卵巣の腫瘍、及び移行上皮癌でのLIV-1発現を示した。

更に、同じ型の正常細胞と対比して、LIV-1を過剰発現した乳房腫瘍は、Erbb2を過剰発現しなかったことが見出された（正常細胞とは、癌性ではなく、LIV-1が過剰発現し得る任意の他の疾患ではないものを意味する）。乳房腫瘍細胞でのLIV-1の過剰発現と相対的な正常組織でのLIV-1の低レベル発現は、LIV-1を治療用抗体にとって望ましい標的にする。

#### 【0118】

例えば、乳房腫瘍では、LIV-1の強い蛍光検出は、Erbb2発現の低い検出をとともに生じるか、或いはErbb2の強い蛍光検出は、LIV-1 mRNA発現が無い場合に観察された。17の試料のうち、各々が可変性の腫瘍細胞内容物の異なる乳房腫瘍からのもので、6つの試料が中程度から強いLIV-1発現を示し、そして6つが中程度又は強いErbb2発現を示した。中程度のErbb2及びLIV-1発現を示した一つの腫瘍に重複があった。その他の腫瘍では、Erbb2発現の強い検出は、LIV-1発現のかなり弱い検出をともなった。Erbb2を過剰発現しないが、内因性又は外因性LIV-1タンパク質（好ましくはLIV-1-164647）を発現する細胞株は、従って、Erbb2発現と比較して、検出又はLIV-1発現の試験にとって有用である。また、そのような細胞は、LIV-1-164647発現細胞との結合のための抗-LIV-1抗体、並びに細胞成長への抗-LIV-1抗体の効果を試験するために有用である。

#### 【0119】

ECD及びC末端におけるLIV-1-164647の領域は、GreenらのLIV-1配列と比較して独特であることが見出された（配列番号：4及びGenBank寄託番号AAA96258と比較してFig 4を参照のこと）。この領域は、配列番号：4

(配列番号：17)のアミノ酸126からアミノ酸132を包含する配列番号：4(配列番号：17)、並びにアミノ酸743から755(配列番号：18)に渡る。また、アミノ酸114からアミノ酸135(配列番号：19)を包含するまでのより大きなヒスチジンリッチ領域は、本発明に含まれる。従って、この開示された発明によると、本発明の核酸は、配列番号：3の約ヌクレオチド412から477を包含する配列、又はその相補的配列に対して、少なくとも65%、好ましくは75%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは96%の相同性を有する配列を含む。好ましくは、本発明の核酸は、配列番号：3のヌクレオチド443から核酸446を包含する配列を含む。本発明は更には、配列番号：4の約アミノ酸114からアミノ酸135を包含する配列に対して、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも96%の相同性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドが含まれる。好ましくは、本発明の単離されたポリペプチドは、配列番号：4のアミノ酸126からアミノ酸132を包含するアミノ酸配列を含む。

#### 【0120】

##### 実施例2： LIV-1ポリペプチドの調製

以前に知られていなかったLIV-1遺伝子及びそのコード化タンパク質が、ここで開示されている。LIV-1(DNA164647;配列番号：3及びその補体)の核酸配列、並びにそのLIV-1コード化のアミノ酸配列(配列番号：4)は、ここで独自に開示されている。この実施例は、DNA164647によってコードされたここで開示されたLIV-1タンパク質の調製及び単離を記載する。後の実施例は、LIV-1の組織発現プロフィールを示す。LIV-1遺伝子はここに開示され、乳房、肺、前立腺、及び結腸を含む種々の腫瘍組織で発現する。この腫瘍関連タンパク質の細胞表面発現によって、癌の検出及び治療に関して、LIV-1を有用な標的となる。

#### 【0121】

DNA164647によって表されるLIV-1は、独特の核酸配列及び独特

のアミノ酸配列を有する。現在、開示されているL I V-1は、Greenら (Green, C. ら., 直接投稿, GenBank 寄託番号U41060 (核酸配列) 及びAAA96258 (アミノ酸配列)) によって以前に記載されたL I V-1タンパク質のその他の形態とは、核酸配列及びアミノ酸配列が異なる。AAA96258 L I V-1 (コード化配列) の核酸配列は、F i g 1 Aに示されている。核酸配列U 4 1 0 6 1 (配列番号: 1) によってコードされる予想アミノ酸配列 (AAA96258; 配列番号: 2) は、F i g 1 Bに示されている。このF i gに含まれるのは、シグナル配列、細胞外ドメイン、並びに膜貫通ドメインをコードする配列の予想である。ここに開示されたL I V-1 (DNA 1 6 4 6 4 7) は、予想細胞外ドメイン領域とはかなり異なる。

本発明は、成長阻害化合物 (例えば、腫瘍化合物) を同定するスクリーニング方法の調製のためみならず、腫瘍性成長を阻害する化合物の生産のためのL I V-1ポリペプチドをコードするDNA 1 6 4 6 4 7を使用するための方法を提供する。特に、cDNAは、特定のL I V-1ポリペプチドをコードする。単純性のために、本明細書では、L I V-1ポリペプチドの先の定義に含まれる更なる天然相同体及び変異体のみならず、「DNA 1 6 4 6 4 7」と呼ばれている核酸によってコードされたタンパク質は、その起源又は発現の方式に関わらず、「L I V-1」ポリペプチドと呼ばれる。

#### 【0122】

DNA 1 6 4 6 4 7 L I V-1核酸のクローニング: この方法の長い遺伝子を単離する能力のためにインバース長距離PCRとも呼ばれる完全長インバースPCR (「FLIP」) を、DNA 1 6 4 6 4 7 L I V-1核酸をクローンするために使用した。FLIP PCR技術は、J.C. Grimaldiら (発明者) . ジェネンテック・インコーポレーテッド (譲受人) の2000年1月10日に出願された係属中の米国特許出願09/480,782に記載されていて、この出願は、特に遺伝子をクローニングする方法に関して、そのものが参考文献として取り入れられている。完全長遺伝子をクローンするために標準的なクローニング技術を使用でき得るが、FLIPは、核酸ライブラリをメチル化する宿主細胞において増幅した任意の核酸ライブラリの特定の核酸分子の全クローン、挿入物のあ

るベクターを単離する非常に迅速で高性能な方法である。FLIPクローニング方法は標的遺伝子又はヌクレオチド配列を増幅し、標的遺伝子の高度に精製された集団を生成する。Fig 5は、FLIPクローニング工程のフローチャートである。DNA 164647を、以下のプライマー及びプローブを使用してFLIP法によって単離した。

正方向プライマー：

L I V 1 - I N V 5 ' 5' -ATGTTGACTTGGCAATTTCCACACGGCA-3' (配列番号：6)

逆方向プライマー：

L I V 1 - I N V 3 ' 5' -TAATGCCAGATTCCCAATTCGGACTAA-3' (配列番号：7)

プローブ：

L I V - p 5' -TTAGTTCATGAAGGGGATTTGTGACAGAGAGGGCAAAGGTCAGGAT-3'

(配列番号：8)

### 【0123】

ヒトLIV-1遺伝子 (Genbank 登録番号# U41060) は、C. Greenら.によって配列が決定された (直接投稿、1995年11月21日)。この配列は3461bp (配列番号：1; Fig 1A) で、オープンリーディングフレーム (ORF) を含む。FLIP法、及び上記に開示のプライマーとプローブを使用して、cDNAクローンを種々の組織を代表するcDNAライブラリの50のヒトcDNAのプールから単離した (ジェネンテックcDNAライブラリ、ジェネンテック, インク., So. San Francisco, CA)。この単離されたcDNAには、変異体核酸配列 (DNA 164647; 配列番号：3 (コード化配列) 及びその相補配列) 及び変異体推定アミノ酸配列 (配列番号：4) を含んでなるLIV-1遺伝子が含まれる。単離されたLIV-1 DNA 164647核酸の全長は、2776bpである; 使用されたベクターpRK5Dは5.1kbであり、従ってIPCR及び単離物によって増幅されたDNA分子の全長7.9kbへ加える。

### 【0124】

Greenら., 上掲によって提示されたLIV-1及びここで開示されたDNA 164647の核酸配列の比較は、Fig 3に示されている。星印はヌクレオチド間の同一性を示し、ダッシュは、同一性が生じないギャップを示す。18ヌクレ

オチドの挿入は、DNA 164647 (配列番号: 3) の約ヌクレオチド446から463に観察され、二つの単一のヌクレオチド挿入は、ヌクレオチド2297から2323に生じ、その領域にフレームシフト及び異なる推定アミノ酸配列を引き起こす。Fig 4は、配列番号: 2 (Greenら., 上掲を参照) と配列番号: 4 (ここで開示) のLIV-1ポリペプチドのアミノ酸配列の比較である。六つのアミノ酸挿入が、ECDの約アミノ酸126から131に観察され、一方では、単一のヌクレオチド挿入のために、異なるアミノ酸配列がポリペプチドのC末端に観察される (配列番号: 2のアミノ酸736、並びに配列番号: 4のアミノ酸742よりより先のアミノ酸を参照のこと)。

#### 【0125】

具体的には、DNA 164647の単離を、以下の方法に従っておこなった。二つの近接5'リン酸化プライマーであるLIV1-INV5'及びLIN1-INV3'を反対側の鎖で消化した。これらのプライマー、配列番号: 6及び配列番号: 7をインバースPCR反応に使用した。50µl反応として、以下の試薬を加えた: メチル化ポジティブ細菌で増殖させた、50ngの改良pRK5Dに含まれる骨髄cDNA; 50ピコモルの各PCRプライマー; 10ナノモルの各デオキシヌクレオチド三リン酸; 5µlのPfu 10xバッファー (Stratagene, La Jolla, CA)、並びに1µlのPfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA)。プラスミドベクターpRK5 (4.661bp) が記載されている (1989年3月15日に発行のEP 307, 247)。改良pRK5ベクター (pRK5.tk.neo) は、G418耐性クローンの選択を可能にするためにネオマイシン耐性遺伝子が挿入されたpRK5の誘導体である。

#### 【0126】

PCRサイクルの条件は、3分間に渡る94°Cを1サイクル、次いで65°Cを30秒間、13分間に渡る72°Cを20サイクルである。当然のことながら、PCRの条件を、増幅の特定の必要性を満たすために改良してもよい。このPCR反応はLIV-cDNA挿入物とpRK5Dベクターを含む、直鎖状5'リン酸化単位複製配列を生成する。

次に、10µlの完全PCR反応を、以下の他の試薬を含む100µl反応で

結合させた：10  $\mu$ l の10  $\times$  T4 DNAリガーゼバッファー (New England Biolabs, Beverly, MA)、4  $\mu$ l T4 DNAリガーゼNew England Biolabs, Beverly, MA)、76  $\mu$ l H<sub>2</sub>O。このライゲーションは、実験台の上で1時間にわたって室温でインキュベーションした。

#### 【0127】

一時間のライゲーションの後、2  $\mu$ l の制限酵素DpnI (New England Biolabs, Beverly, MA)をライゲーション反応へ添加し、消化を37  $^{\circ}$ Cで一時間にわたっておこなった。DpnIは、メチル化DNAを特異的に消化するが非メチル化DNAは消化しない；従って、テンプレートとして使用された最初のDNAライブラリが消化され、無傷のLIV-1 /ベクター単位複製配列のみが遊離した。この消化の完了後、試料を、QIAquickPCRキット (Qiagen, Valencia, CA) を使用して、30  $\mu$ l の溶出バッファー又はH<sub>2</sub>Oで溶出し、次いでエタノール沈殿した。ペレットを2  $\mu$ l のH<sub>2</sub>Oに再懸濁し、次いですべての試料を細菌を形質転換するために使用した。

形質転換は、DH10Bエレクトロマックスコンピテント細菌 (Life Technologies, Rockville, MD) へのエレクトロポレーションによっておこなった。形質転換細胞をルリア培養液寒天プレートへプレートし、37  $^{\circ}$ Cで一晩にわたってコロニーを成長させた。

次の日には、このコロニーをナイロン膜上へ移し、変性させ、再生させ、<sup>32</sup>P-ATPキナーゼで標識したLIV-1特異的プローブでプローブした (配列番号：8)。ポジティブコロニーのDNAを、配列がPCR反応によって誘導された点変異を含まないことを確認するために、ポジティブコロニーのDNAの配列決定した。

#### 【0128】

LIV-1ポリペプチド生産： 下記の記述は、LIV-1コード化核酸を含有するベクターで形質転換又は形質移入した細胞を培養することによる、LIV-1ポリペプチドの生産を主に述べている。当然のことながら、LIV-1ポリペプチドを調製するために、当該分野において良く知られた代替方法を用いてもよいことが考慮されている。例えば、LIV-1ポリペプチド配列、或いはその一

部分を、固相技術を使用した直接ペプチド合成によって生産してもよい [ 例えば、Solid-Phase Peptide Synthesis. W.H. Freeman Co. San Francisco. CA(1969): Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154(1963)を参照 ]。インビトロでのタンパク質合成は、自動化による手動技術を使用することでおこなわれ得る。例えば、製造者の指示書をによってApplied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA)を使用することで、自動化合成は完遂され得る。全長L I V-1を生産するための化学的又は酵素的方法を使用して、L I V-1ポリペプチドの種々の部分は、別々に化学的に合成し、結合され得る。

#### 【0129】

##### i . DNAをコードするL I V-1の合成又は単離のための代替方法

ここで開示されているのは、タンパク質を発現及び生産させるのみならず、DNAを単離又は合成するための方法の、種々の制限のない実施例である。これらの方法は、L I V-1-164647遺伝子、mRNA、及びタンパク質、又はその断片の生産及び単離へ応用可能そして有用である。

L I V-1-164647ポリペプチド、その相同体、変異体、又は一部分をコードするDNAは、標準的な核酸合成技術を使用して直接DNA合成によって生産し得る [ 例えば、Gait. M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford. 1984 ]。インビトロでのDNA合成は、手動の技術を使用することで、或いは自動化によっておこなうこなうことができる。自動化オリゴヌクレオチド合成は、例えば、標準的な技術を使用して完遂し得る。全長L I V-1を生産するための化学的又は酵素的方法を使用して、L I V-1コード化核酸配列の種々の部分は、別々に化学的に合成し、結合され得る。

或いは、L I V-1をコードするDNAは、L I V-1 mRNAを有し、それを検出可能なレベルで発現すると考えられている組織より調製されたcDNAライブラリから得ることができる。従って、ヒトL I V-1 DNAは、例えば実施例に記載されているヒト組織より調製したcDNAライブラリから簡便に得ることが出来る。また、L I V-1コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから、或いはオリゴヌクレオチド合成によって得ることができる。

#### 【0130】

ライブラリを、対象となる遺伝子又はそれによってコードされているタンパク質を同定するために設計されたプローブ（例えば、L I V - 1 ポリペプチドに対する抗体、或いは少なくとも約20 - 80塩基のオリゴヌクレオチド）でスクリーニングすることができる。選択したプローブでcDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすることは、Sambrookら., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているような標準的な方法を使用しておこなうことが可能である。L I V - 1をコードする遺伝子を単離する代替手法は、PCR法を使用することである [Sambrook ら., 上掲: Dieffenbachら., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

下記の実施例は、cDNAライブラリをスクリーニングするための技術を記載している。プローブとして選択したオリゴヌクレオチドプローブは、十分な長さであり、偽陽性を最小化するほど十分に明瞭であるべきである。このオリゴヌクレオチドは、好ましくは、スクリーニングされるライブラリのDNAとのハイブリダイゼーションで検出されるように標識されている。標識化の方法は、当該分野において良く知られており、<sup>32</sup>P標識ATP、ビオチン化又は酵素標識のような放射標識の使用が含まれる。中程度の緊縮性及び高度の緊縮性を含むハイブリダイゼーションの条件は、Sambrookら., 上掲にて提供されている。

#### 【0131】

このようなライブラリスクリーニング法で同定された配列を、GenBankなどの公的データベース又は私的配列データベースに寄託され利用可能な他の周知の配列と比較し整列させることができる。分子の特定領域内又は完全長配列を横切る（アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれか）配列同一性は、相同性を測定するために種々のアルゴリズムを用いるALIGN、DNAstar、及びINHERIT等のコンピュータソフトウェアプログラムを用いた配列アラインメントによって決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrookらにより記述されている従来の

プライマー伸展法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすることにより得られる。

#### 【0132】

##### i i . 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞は、ここに記載したLIV-1産生についての発現又はクローニングベクターでトランスフェクト又は形質転換し、プロモータ誘発、形質転換体の選択、又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適するように修飾した従来の滋養媒質中で培養する。培地、温度、pH等の培養条件は、当業者が過度の実験をすることなく選択できる。一般的に、細胞培養の生産性を最大にするための概念、プロトコール、及び実務的技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)及びSambrook, 上掲に見いだすことができる。

#### 【0133】

トランスフェクションの方法は当業者に知られており、例えば、CaPO<sub>4</sub>及びエレクトロポレーションである。用いられる宿主細胞に応じて、そのような細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等により記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、原核生物又は実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shawほか, Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開の国際特許出願第WO89/05859号に記載されたように、ある種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈殿法を用いることができる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母中の形質転換は、典型的には、Van solingenほか, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiaoほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法によって実施する。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロト

プラス融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownほか, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) 及び Mansourほか, *Nature*, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

#### 【0134】

このベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞を含む。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内菌科である。種々の大腸菌株が公的に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294(ATCC31446);大腸菌X1776(ATCC31537);大腸菌株W3110(ATCC27325)及びK5772(ATCC53635)である。

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、LIV-1をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。

LIV-1の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドプテラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より特別の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Grahamほか, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977));チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHF R(CHO, Urlaub及びChasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980));ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065);及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適当な宿主細胞を選択するのは、当業者の技量の範囲内である。

#### 【0135】

i i i . 複製可能なベクターの選択及び使用

LIV-1をコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)を、クロー

ニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入してよい。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、1つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、1つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の1つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

#### 【0136】

L I V - 1 ポリペプチドは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般的に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるP R O -コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p pあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(サッカロミセス(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダアルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のE P 3 6 2 1 7 9)、又は1990年11月15日に公開されたWO 9 0 / 1 3 6 4 6に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

#### 【0137】

発現及びクローニングベクターは共に1つ又は複数の選択された宿主細胞にお

いてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド pBR322 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2  $\mu$  プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

#### 【0138】

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのようにPRO-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Ur laubらにより Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である [Stinchcombら, Nature, 282:39(1979); Kingsmanら, Gene, 7:141(1979); Tschemperら, Gene, 10:157(1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、LIV-1-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Changら, Nature, 275:615 (1978); Goeddelら, Nature, 281:544 (1979)]、アル

カリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系 [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [deBoer ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPROポリペプチドをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

#### 【0139】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman ら, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess ら, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900(1987)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP 73,657に更に記載されている。

#### 【0140】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのLIV-1の転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開のUK 2,211,504)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は

免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望のPROポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100 - 270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PROコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

#### 【0141】

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、PROポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのPROポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, Nature, 293:620-625 (1981); Manteiら, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

#### 【0142】

##### i v . 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び / 又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識

されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットブロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列LIV-1ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はLIV-1 DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

#### 【0143】

##### v. 宿主細胞からのLIV-1ポリペプチドの生産と単離

###### 哺乳動物細胞におけるPROの発現

この実施例は、哺乳動物細胞での組み換え発現によるLIV-1ポリペプチドの潜在的なグリコシル化形態の調製を例証する。

発現ベクターとしては、ベクターpRK5(1989年3月15日公開のEP307,247参照)を用いる。場合によっては、上記のSambrook等に記載のようなライゲーション方法を用いて、選択した制限酵素でLIV-1 DNA 164647をpRK5とライゲーションし、LIV-1 DNAの挿入を可能にする。この結果生じたベクターをpRK5-DNA164647と呼ぶ。

一実施態様では、選択宿主細胞を293細胞にしてもよい。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)を、ウシ胎児血清、そして場合によっては滋養成分及び/又は

抗生物質で補ったDME Mなどの培地中の組織培養プレートで、集密化するまで成長させる。約10  $\mu$ gのpRK5-DNA164647DNAを、約1  $\mu$ gのVARN A遺伝子コード化DNA [Thimmappayaら, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500  $\mu$ lの1mM トリス-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl<sub>2</sub>に溶解する。この混合物に、滴状の500  $\mu$ lの50mM HEPES (pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO<sub>4</sub>を添加し、25℃で10分間にわたって、析出物を形成させる。この析出物を懸濁して293細胞に加え、37℃で約4時間にわたって定着させた。培地を吸引し、2mlの20%グリセロールのPBSを30秒間で添加した。次いで、この293細胞を無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加して細胞を約1-5日間にわたってインキュベートした。

#### 【0144】

形質移入後の約24時間には、培養培地を除去し、培養培地(のみ)或いは200  $\mu$ Ci/ml <sup>35</sup>S-システイン及び200  $\mu$ Ci/ml <sup>35</sup>S-メチオニンを含む培地で置換した。12時間のインキュベーションの後には、培養上清を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに負荷する。この処理したゲルを乾燥し、LIV-1ポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらす。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施してもよく(無血清培地で)、この培地を選択されたバイオアッセイで試験する。

これに換わる技術としては、Sompanyacら, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて、LIV-1 DNA164647を293細胞へ過度的に導入してもよい。293細胞を、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700  $\mu$ gのpRK5-DNA164647DNAを添加する。この細胞を、まずは遠心分離によってスピナーフラスコから濃縮し、PBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈殿物を、細胞ペレット上で4時間にわたってインキュベートする。この細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5  $\mu$ g/ml ウシインシュリン、及び0.1  $\mu$ g/ml ウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入し

た。約4日後に、培養上清を遠心分離し、濾過して細胞及び細胞片を除去した。次いで、任意の透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって、発現したL I V - 1を含む試料を濃縮し、精製することができる。

#### 【0145】

L I V - 1をC H O細胞で発現させることができる。P C R増幅に続いて、Ausubelら, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載のような標準的技術を用いて、それぞれのD N AをC H O発現ベクターにサブクローニングする。C H O発現ベクターを、対象とするD N Aの5'及び3'に適合する制限部位を有し、c D N Aの簡便にシャトル化ができるように作成する。C H O細胞での発現に利用されるベクターは、Lucasら, Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようなものであり、対象とするc D N A及びジヒドロフォレートレダクターゼ(D H F R)の発現の制御にS V 4 0初期プロモーター/エンハンサーを用いる。D H F R発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持に関する選択を可能にする。

所望のプラスミドD N Aの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dospers(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)を使用して、約1千万のC H O細胞に導入する。この細胞を、上記のLucas等に記載されているように成長させる。下記に記載のような更なる成長及び生産のために、約 $3 \times 10^{-7}$ の細胞をアンプルで凍結する。

#### 【0146】

このプラスミドD N Aを含むアンプルを水槽に配することで解凍し、ボルテックスによって混合する。内容物を10mLの媒質を含む遠心管へピペットし、1000rpmで5分間遠心分離する。その上清を吸引し、細胞を10mLの選択培地(0.2µm濾過P S 2 0、5%の0.2µm透析濾過ウシ胎児血清を添加)に懸濁する。次いで、この細胞を90mLの選択培地を含む100mLスピナーに分ける。1-2日後、細胞を150mLの選択培地で満たした250mLスピナーに移し、37℃でインキュベートする。2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを $3 \times 10^5$ 細胞/mLで播種する。遠心分離及び生産培地での再懸濁によって、細胞培地を新鮮な培地で交換する。任意の適

切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載されている生産培地を使用してもよい。3Lの生産スピナーを $1.2 \times 10^6$ 細胞/mLで播種する。0日目に、細胞数とpHを測定する。1日目に、スピナーから試料採取し、濾過空気での散布を実施する。2日目に、スピナーから試料採取し、温度を33℃に変え、30mLの500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)を使用する。生産を通して、7.2近傍に維持するために、必要ならばpHを調節する。10日後、或いは生存率が70%を下回るまで、細胞培養を遠心分離で回収して0.22µmフィルターで濾過する。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムへ負荷する。

#### 【0147】

ポリ-Hisタグ作成物に関しては、タンパク質をNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを培養上清へ5mMの濃度まで添加した。この培養上清を、0.3M NaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mLのNi-NTAカラムへ4-5mL/分の流速で4℃でポンプ供給した。負荷後、このカラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーでタンパク質を溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて25mLのG25 Superfine(Pharmacia)で、10mM Hepes、0.14M NaCl及び4%マンニトール, pH6.8を含む貯蔵バッファーへ脱塩し、-80℃で貯蔵した。

LIV-1は、標準的な技術を使用して、COS細胞などの宿主細胞において一過性又は安定な発現によって生産され得る。

#### 【0148】

##### 酵母菌でのPROの発現

以下の方法は、酵母菌中でのLIV-1の組換え発現を示す。

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのLIV-1の細胞内生産又は分泌のために、酵母菌発現ベクターを作成する。LIV-1をコードするDNA164647及びプロモーターを、選択したプラスミドの適切な制限酵素部位

に挿入してL I V - 1の細胞内発現を指示する。分泌のためには、L I V - 1をコードするDNAを、A D H 2 / G A P D Hプロモーター、シグナルペプチド、例えば哺乳動物のシグナルペプチド、或いは例えば酵母菌 因子又はインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、並びに(必要ならば)リンカー配列とともに、L I V - 1の発現のために選択したプラスミドへクローニングすることができる。

酵母菌株A B 1 1 0等の酵母菌を、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択した発酵培地で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降、並びにS D S - P A G Eによる分離に続くクマシーブルー染色によるゲルの染色によって分析することができる。

続いて、遠心分離と続く選択したカートリッジフィルターを用いての培地の濃縮によって、発酵培地から酵母菌細胞を取り除くことで、組換えL I V - 1を単離そして精製できる。選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を用いて、L I V - 1を含む濃縮物をさらに精製してもよい。

#### 【0149】

##### バキュロウイルス感染昆虫細胞でのL I V - 1の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるL I V - 1の組換え発現を記載する。

L I V - 1のコード化配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグには、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ(I g GのF c領域など)が含まれる。p V L 1 3 9 3(Navagen)などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む、種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、L I V - 1又はL I V - 1のコード化配列の所定部分(例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列、或いはタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列など)が、5'及び3'領域に相補的なプライマーによるP C Rによって増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含してもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA (Pharmingen) を、Spodoptera frugiperda (「Sf9」) 細胞 (ATCC CRL 1711) 中にリポフェクチン (GIBCO-BRLから市販) を用いて同時トランスフェクションすることによって作成される。28 で4 - 5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いる。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilleyら, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施される。

#### 【0150】

次に、発現されたポリ-hisタグLIV-1は、例えばNi<sup>2+</sup>-キレートアフィニティークロマトグラフィーによって、次のようにして精製できる。抽出は、Rupertら, Nature, 362:175-179 (1993)に記載のように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー (25 mLのHepes, pH 7.9; 12.5 mMのMgCl<sub>2</sub>; 0.1 mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4 MのKCl) で再懸濁し、氷上で2回ずつ20秒間超音波処理する。この超音波処理物は、遠心分離によって透明にし、その上清を負荷バッファー (50 mMリン酸塩、300 mMのNaCl、10%グリセロール、pH 7.8) で50倍希釈して0.45 μmフィルターで濾過する。Ni<sup>2+</sup>-NTAアガロースカラム (Qiagenから市販) を5 mLの総容積で調製し、25 mLの水で洗浄して25 mLの負荷バッファーで平衡化する。濾過した細胞抽出物を、毎分0.5 mLでこのカラムに負荷する。カラムを、分画回収が始まる地点であるA<sub>280</sub>のベースラインまで負荷バッファーで洗浄する。次に、このカラムを、非特異的に結合しているタンパク質を溶離する二次洗浄バッファー (50 mMリン酸塩; 300 mMのNaCl、10%グリセロール、pH 6.0) で洗浄する。A<sub>280</sub>のベースラインに再度到達した後、このカラムを二次洗浄バッファーでの0から500 mMイミダゾールのグラジエントで展開する。1 mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ (Qiagen) に共役させたNi<sup>2+</sup>-NTAによるウェスタンブロットで分析する。溶離したHis<sub>10</sub>-タグLIV-1を含む分

画をプールして負荷バッファーで透析する。あるいは、I g G タグ（又はF c タグ）L I V - 1 の精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

#### 【0151】

発現は0.5 - 2 L のスケールでおこなったが、容易により大きな（例えば8L）調製にスケールアップできる。タンパク質はI g G 作成物（イムノアドヘンシ）として発現され、ここではタンパク質細胞外領域がヒンジ、C<sub>H</sub>2 及びC<sub>H</sub>3 ドメイン及び/又はポリ-H i s タグ結合体を含むI g G 1 定常領域配列に融合している。

P C R 増幅に続いて、対応するコード化配列をバキュロウイルス発現ベクター（I g G 融合物に対するpb.PH.IgG及びポリH i s タグタンパク質に対するpb.PH.His.c）にサブクローニングし、そのベクター及びBaculogold（登録商標）バキュロウイルスDNA（Pharmingen）を105スポドプテラグルヒペルダ（*Spodoptera frugiperda*）（「S f 9」）細胞（ATCC CRL 1711）にリポフェクチン（Gibco BRL）を用いて同時形質移入した。pb.PH.IgG及びPH.His.は、市販のバキュロウイルス発現ベクターp V L 1 3 9 3（Pharmingen）の修飾物であり、H i s 又はF c タグ配列を含むように修飾されたポリリンカー領域を持つ。細胞を、10%のF B S（Hyclone）を添加したHinkのT N M - F M 培地で成長させた。細胞は、28℃で5日間インキュベートした。上清を回収し、続いて上清を10% F B S を添加したHinkのT N M - F H 培地中、S f 9 細胞に約10の感染効率（M O I）で感染させることにより、最初のウイルス増幅に用いた。細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収し、バキュロウイルス発現ベクターに対する構成物の発現を、1 m l の上清を25 m L のヒスチジンタグタンパク質用のN i<sup>2+</sup>-N T A ビーズ（Qiagen）又はI g G タグタンパク質用のプロテインAセファロースC L - 4 B ビーズ（Pharmacia）へバッチ結合で結合させ、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するS D S - P A G E 分析により測定した。

#### 【0152】

第1の増幅ウイルス上清をE S F - 9 2 1 培地（Expression System LLC）中

、成長させたスピナー(500ml)により培養させたSf9細胞に、約0.1のMOIで感染させるのに使用した。細胞は28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して濾過した。バッチ結合及びSDS-PAGEを、スピナー培地の発現が確認されるまで、必要に応じて繰り返した。

形質移入細胞からの培養上清(0.5~3L)を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Hisタグ構成物については、配列を含むタンパク質をNi<sup>2+</sup>-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを培養上清に5mMの濃度まで添加した。培養上清を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi<sup>2+</sup>-NTAカラムに4-5ml/分の流速で4時間においてポンプ供給した。添加後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶出した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマンニトールを含む貯蔵バッファー, pH6.8中で25mlのG25 Superfine (Pharmacia)を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

#### 【0153】

タンパク質のイムノアドヘシン(Fc含有)作成物を以下のようにして培養上清から精製した。培養上清を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー, pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム(Pharmacia)に添加した。添加後、カラムを平衡バッファーでよく洗浄した後、100mMのクエン酸, pH3.5で溶出した。溶出したタンパク質は、1mlの画分を275mLの1Mトリスバッファー, pH9を含む管に回収することにより即座に中和した。高度に精製されたタンパク質は、引き続きポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。PROポリペプチドの均一性はSDSポリアクリルアミドゲル(PEG)電気泳動及びエドマン(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価できる。

#### 【0154】

v i . ポリペプチドの精製

L I V - 1 ポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X 1 0 0)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。L I V - 1 の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

L I V - 1 を、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相H P L C；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばD E A Eによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG - 7 5を用いるゲル濾過；I g Gのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びL I V - 1 ポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methodes in Enzymology, 1 82(1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選択される精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のL I V - 1 ポリペプチドの性質に依存する。

#### 【 0 1 5 5 】

#### 実施例3： 抗-L I V - 1 抗体の調製及び効果

本発明で使用される 抗-L I V - 1 抗体を生産するための例示的な技術を以下に説明する。抗-E r b B 2 抗体の生産のための技術は、上掲及びここで参考文献として取り入れられたE r b B 2 の発行物に見出され得る。

抗体の生産にとって特に有用なL I V - 1 抗原は、例えば、所望の抗原性エピトープを含む L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 の細胞外ドメイン又はそれらの一部の可溶性形態のものであってよい。あるいは、抗体を産生するために、その細胞表面にあるいは、抗体を産生するために、その細胞表面にL I V - 1 を発現する細胞(例えばL I V - 1 を過剰発現するように形質転換されたN I H - 3 T 3 細胞)を使用することができる。抗体の産生に有用な他の形態のL I V - 1 は当業者には明らかであろう。

## 【0156】

## (i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(s c)又は腹腔内(i p)注射することにより動物に産生される。免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターに関連抗原を、二官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基による抱合)、N-ヒドロキスクシンイミド(リジン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 $\text{SOCl}_2$ 、又はRとR<sup>1</sup>が異なったアルキル基であるR<sup>1</sup>N=C=NRにより抱合させることが有用である。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 µg又は5 µg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物は、同じ抗原のコンジュゲートであるが、異なったタンパク質にコンジュゲートさせた、及び/又は異なった架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートで追加免疫する。コンジュゲートはまたタンパク融合として組換え細胞培養中で調製することもできる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

## 【0157】

## (ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。よって、「モノクローナル」との修飾詞は、別個の抗体の混合物ではなく、抗体の特性を示すものである。

例えば、モノクローナル抗体は、Kohlerら, Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記したようにして免疫し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁[Academic Press, 1986])。

#### 【0158】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAから入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、並びにアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801 ユニバーシティー ブルバード、マナサス、バージニア、20110-2209から入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されたものである。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and

Applications, 51-63頁[Marcel Dekker, Inc., New York, 1987]。)

【0159】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonほか, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析法によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁[Academic Press, 1986])。この目的に対して好適な培地には、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が含まれる。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

【0160】

モノクローナル抗体をコードしているDNAは、常法を用いて(例えば、マウスの重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離され配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、そうしないと免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中にトランスフェクトし、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を達成することができる。抗

体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する概説論文には、Skerraら, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262(1993)及びPlueckthum, *Immunol. Rev.* s., 130:151-188(1992)がある。

#### 【0161】

更なる実施態様では、抗体又は抗体フラグメントは、McCaffertyら, *Nature*, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから分離することができる。Clacksonら, *Nature*, 352:624-628 (1991)及びMarksら, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖混合による高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生産(Marksら, *Bio/Technology*, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouseら, *Nuc.Acids.Res.*, 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

DNAはまた、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を、相対的マウス配列に代えて置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrisonら, *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, 81:6851[1984])、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることで修飾できる。

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインに置換され、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

#### 【0162】

より具体的には、抗-LIV-1モノクローナル抗体は、以下のようにして調製される。抗-LIV-1 IgG<sub>1</sub> マウスモノクローナル抗体、好ましくはLIV-1-164647タンパク質の細胞外ドメインに対して特異的なものを、Fendlyら., *Cancer Research* 50: 1550-1558(1990)及びWO 89/06692に記載

の方法と組み合わせた当該分野における常套技術を使用して生産することができる。要約すると、L I V - 1 発現細胞 ( 好ましくはDNA 1 6 4 6 4 7 でコードされたL I V - 1 を発現する細胞 ) を、2 5 m M E D T A を含有するリン酸緩衝化生理的食塩水 ( P B S ) で収集し、B A L B / c マウスを免疫化するのに使用する。例えば、0、2、5 及び7 週目に、このマウスへ0 . 5 m l P B S の  $10^7$  細胞を腹腔内 ( i . p . ) 注射をする。好ましくは細胞外ドメイン又は細胞外断片によって $^{32}$ P-標識L I V - 1 タンパク質を免疫沈降する抗血清を有するマウスへ、9 及び1 3 週目に、小麦胚凝集素-セファロース ( W G A ) 精製L I V - 1 膜抽出物の腹腔内 ( i . p . ) 注射をする。0 . 1 m l のL I V - 1 調製物の静脈内 ( i . v . ) 注射がこれに続き、そして脾細胞を、例えばマウスメラノーマ株X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 と融合させる。E L I S A 及び放射性免疫沈降法によって、L I V - 1 結合に関してハイブリドーマの上清をスクリーニングする。M O P C - 2 1 ( I g G 1 ) ( Cappel, Durham, NC ) を、アイソタイプマッチコントロールとして使用する。モノクローナル抗体を生産する他の方法が考慮されているため、開示された抗-L I V - 1 抗体を調製する方法を、例として提供する。

#### 【0163】

治療は、マウス抗-L I V - 1 抗体のヒト化種によっておこなった。このヒト化抗体は、コンセンサスなヒトイムノグロブリンI g G<sub>1</sub> ( I g G<sub>1</sub> ) のフレームワークへマウス抗-L I V - 抗体の相補性決定領域を挿入することによって設計される ( 例として、Carterら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289(1992) を参照 ) 。この結果として生じた抗-L I V - 1 モノクローナル抗体は、好ましくはL I V - 1 タンパク質の細胞外ドメインに対して高い親和性を有し、インビトロ及びインビボ並びにヒト異種移植片において、乳癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞又はL I V - 1 タンパク質を過剰発現する他の細胞の成長を阻害する。好ましくは、本発明の抗-L I V - 1 抗体は、インビトロにおいて、2 0 % を超える、最も好ましくは5 0 % を超える腫瘍細胞成長を阻害する。また、本発明の好ましい抗-L I V - 1 モノクローナル抗体は、単一の薬剤として、或いは細胞障害性又は他の細胞成長阻害剤との組み合わせで、L I V - 1 過剰発現転移性乳癌、

又は肺、前立腺又は他の癌を有する患者では臨床的に活性である。抗-L I V - 1モノクローナル抗体は、大量に成長させた培養培地へ抗体を分泌する遺伝子操作されたチャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞株によって生産される。この抗体は、標準的なクロマトグラフィー及び濾過法を使用して C H O 培養培地から精製する。食品医薬品局の無菌性及び安全性に関する要件を満たすと同時に、同一性、純度、及びり力価を確かめるために、抗体の各ロットをアッセイする。

#### 【 0 1 6 4 】

診断目的、或いは抗体のロットの力価を試験するためにインビトロでヒト癌細胞を死滅させるために使用する場合には、一般的に、この抗体は、L I V - 1を過剰発現している細胞の培養液、特に E r b B 2 をも過剰発現しない癌細胞の培養液へ添加される。コントロールとして、抗体はまた、L I V - 1を過剰発現しない細胞の培養液へ添加される。この抗体は、濃度が少なくとも約 1 0 n M の細胞培養培地へ添加される。インビトロでの使用に関する製剤及び投与方法は重要ではない。培養又は灌流培養培地と合う水溶性製剤が通常は使用される。癌の存在又は程度を測定するために、従来技術によって細胞障害性を測定してもよい。

癌を治療するための細胞障害性放射性医薬品は、抗体へ放射活性アイソトープ (例えば、I、Y、P r ) を抱合させることによって作製され得る。ここで使用される「細胞障害性成分」という用語は、そのようなアイソトープを包含することを意図している。

その他の実施態様では、リポソームは細胞障害性剤で満たされ、そのリポソームは、成長因子のレセプターと特異的に結合する抗体でコーティングされている。多くにレセプター部位があるために、この方法は、正しい細胞型への大量の薬剤を送達することを可能にする。

#### 【 0 1 6 5 】

抗体依存性細胞障害活性 ( A D C C ) は、L I V - 1タンパク質を過剰発現する癌性細胞を細胞障害性作用の標的にする方法として考慮されている。本発明には、( a ) L I V - 1タンパク質の細胞外ドメインに対する、並びに ( b ) 抗体分子が結合する腫瘍細胞の溶解を媒介することができるサブクラス又はアイソタ

イブに属する抗体の使用に基づく方法が含まれる。より具体的には、これらの抗体は、成長因子レセプターとの複合化によって、ナチュラルキラー細胞又はマクロマージのようなエフェクター細胞を活性化することにより血清の補体を活性化し、及び/又は抗体依存性細胞障害活性(ADCC)を媒介するサブクラス又はアイソタイプに属する。

また、本発明は、これら抗体の天然形態での、LIV-1タンパク質を過剰発現するヒト腫瘍の治療のための、これら抗体の一般的使用に関する。例えば腫瘍に関連する細胞表層抗原と結合する多くのIgG2a及びIgG3マウス抗体は、インビボで腫瘍治療に使用できる。実際に、種々の腫瘍にLIV-1が存在するために、主題の抗体及びそれらの治療的利用には、普遍的な適用性がある。

#### 【0166】

##### (iii) ヒト化及びヒト抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は従来からよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的には齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jonesほか, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmannほか, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyenほか, Science, 239:1534-1536[1988])を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくらかのCDR残基及び場合によってはいくらかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

#### 【0167】

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体

のヒトフレームワーク領域(FR)として受け入れる(Simsほか, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothiaら, J. Mol. Biol., 196:901[1987])。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carterほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Prestaほか, J. Immunol., 151:2623[1993])。

#### 【0168】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

#### 【0169】

別法として、内因性の免疫グロブリン産生がなくともヒト抗体の全レパートリーを免疫化することで産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが今は可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域( $J_H$ )遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の転移は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovitsら, Nature 362:255-258 (1993); Bruggermanら, Year in Immunol., 7:33 (1993)を参照されたい。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブ

ラリから取り出すこともできる(Hoogenboomら, J.Mol.Biol., 227:381(1991); Marksら, J.Mol.Biol. 222:581-597[1991])。

#### 【0170】

##### (iv) 抗体フラグメント

抗体フラグメントを生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは、無傷の抗体のタンパク分解性消化を介して誘導された(例えば、Morimotoら, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennanら, Science, 229:81[1985]を参照されたい)。しかし、これらのフラグメントは現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体フラグメントは上において検討した抗体ファージライブラリから分離することができる。別法として、Fab'-SHフラグメントは大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを形成することができる(Carterら, Bio/Technology 10:163-167[1992])。他のアプローチ法では、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体フラグメントの生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖Fvフラグメント(scFv)である。WO93/16185を参照のこと。

#### 【0171】

##### (v) 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、LIV-1タンパク質の2つの異なるエピトープに結合し得る。例えば、一つのアームがLIV-1タンパク質の細胞外ドメインの一番目のエピトープに結合し、その一方では、他方が異なるLIV-1エピトープと結合し得る。あるいは、LIV-1アームは、ErbB2発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばCD2又はCD3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合し得る。また、二重特異性抗体は、LIV-1を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用され得る

。これらの抗体は、L I V - 1 細胞外ドメイン結合アーム、並びに細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン- $\gamma$ 、ビンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は、完全長抗体、又は抗体フラグメント(例えばF(a b')<sub>2</sub> 二重特異性抗体)として調製できる。

#### 【0172】

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において良く知られている。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millsteinら, Nature, 305:537-539[1983])。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法がWO93/08829及びTrautnerら、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

#### 【0173】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C H 2 及びC H 3 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1 )を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチドフラグメントの相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

## 【0174】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)ことからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、WO94/04690に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

WO96/27011に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのC<sub>H</sub>3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

## 【0175】

二特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4,676,980号)及びHIV感染の治療(WO91/00360、WO92/200373及びEP03089)等の用途が提案されてる。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4,676,980号に記載されている。

## 【0176】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')<sub>2</sub>断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

#### 【0177】

最近の進歩により、大腸菌からF a b'-S H断片の直接の回収が容易になり、これは科学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')<sub>2</sub>分子の製造を記述している。各F a b'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役させて二重特異性抗体を形成する。従って、形成された二重特異性抗体は、ヒト乳腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発すると同時に、E r b B 2レセプターを過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞へ結合することが可能であった。同じような技術が、L I V - 1を過剰発現するが、E r b B 2を過剰発現しない細胞と結合することができる二重特異性抗体を調製するために使用される。

#### 【0178】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelnyら, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Ho

Illingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を結合してなる。従って、一つの断片の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインは他の断片の相補的 $V_L$ 及び $V_H$ ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruberら, J.Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J.Immunol. 147:60(1991)。

#### 【0179】

##### (vi) 所望の特性を有する抗体のスクリーニング

抗体を生産するための技術は上述した。ここで記載されている特徴を有する抗体が選択される。

細胞死を誘発する抗体を選択するために、例えばPI、トリパンプルー又はFAADの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。好ましいアッセイは「BT474細胞を使用するPI取込みアッセイ」である。このアッセイでは、BT474細胞(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション[Rockville, MD])が、ダルベッコの変性イーグル培地(D-MEM); 10%の熱不活性化FBS(Hyclone)と2mMのL-グルタミンを補ったハムのF-12(50:50)で培養される。(従って、アッセイは補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる)。BT474細胞を100x20mm皿に、皿当たり $3 \times 10^6$ の密度で播種し、一晚付着させたままにする。ついで培地を除去し、新しい培地を単独で、又は10 $\mu$ g/mlの適切なMAbを含む培地と取り替える。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理により分離する。ついで、1200rpm、5分間、4で細胞を遠心分離し、ペレットを3mlのCa<sup>2+</sup>結合氷冷バッファー(10mMのHepes、pH7.4、140mMのNaCl、2.5mMのCaCl<sub>2</sub>)に再懸濁させ、細胞凝塊除去のために35mmのストレーナキャップ付き12x7

5チューブ(チューブ当たり1ml、処理グループ当たり3チューブ)に等分する。サンプルをFACSCAN(商品名)フローサイトメータとFACSCONVERT(商品名)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析する。PI取込みにより測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗体が選択される。

#### 【0180】

アポトーシスを誘発する抗体を選択するためには、「BT474細胞を使用するアネキシン結合アッセイ」が利用できる。BT474細胞を培養し、先の段落において記載したように皿に播種する。ついで培地を回収し、新しい培地を単独で、又は10µg/mlの適切なMAbを含む培地と取り替える。3日間インキュベートした後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理により分離する。ついで細胞を遠心分離し、Ca<sup>2+</sup>結合氷冷バッファーに再懸濁させ、細胞死アッセイに対して上述したようにチューブに等分する。ついでチューブに標識化アネキシン(例えばアネキシンV-FITC)(1µg/ml)を入れる。サンプルをFACSCAN(商品名)フローサイトメータとFACSCONVERT(商品名)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析する。対照に対して、統計的に有意なレベルのアネキシン結合を誘発する抗体がアポトーシス誘発抗体として選択される。

アネキシン結合アッセイに加えて、「BT474細胞を使用するDNA染色アッセイ」が利用できる。このアッセイを行うために、先の2段落に記載したように関心のある抗体で処理されたBT474細胞を、37℃で2時間、9µg/mlのHOECHST33342(商品名)と共にインキュベートし、ついでMODFITLT(商品名)ソフトウェア(Verity Software House)を使用し、EPICSELITE(商品名)フローサイトメータ(Coulter Corporation)で分析する。このアッセイを使用し、未処理細胞(最大100%のアポトーシス細胞)よりも2倍又はそれ以上(好ましくは3倍以上)のアポトーシス細胞のパーセンテージの変化を誘発する抗体が、プロアポトーシス抗体として選択される。

#### 【0181】

関心のある抗体により結合したLIV-164647の細胞外ドメイン上のエ

ピトープに結合する抗体をスクリーニングするため、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。別法として、従来から公知の方法により、エピトープマッピングを実施することもできる(例えば、切断変異分析及び部位特異的変異誘発(Nakamuraら., J. of Virology 67(10): 6179-6191[1993年10月]; Rentzら., J. Cell Biol. 125(6): 1395-1406[1994年6月])によって決定されたような、ErbB2の細胞外ドメインのエピトープマッピングに使用した方法を参照のこと)。更には、特定のアミノ酸配列が、エピトープのすべて又は実質的な部分を形成すると思われる場合には、その配列から成るポリペプチドは、抗体と接触せしめられ、そして標準的な技術を使用して、L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7、例えばL I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 E C Dとの結合について競合するその能力に関して試験することができる。

細胞培養においてL I V - 1 発現細胞の成長を50-100%阻害する抗L I V - 1 抗体を同定するために、アッセイを以下のように実施することができる: L I V - 1 発現細胞を、10%のウシ胎児血清、グルタミン及びペニシリンストレプトマイシンを補充したD M E M及びF 1 2 培地の1:1混合物で生育させる。L I V - 1 発現細胞を、35mmの細胞培養皿に20,000細胞でプレートする(2ml/35mm皿)。1皿当たり2.5µg/mlの抗L I V - 1 抗体を添加する。6日後、未処理細胞と比べた細胞数を電子C O U L T E R (登録商標)細胞カウンタを使用してカウントする。L I V - 1 発現細胞の成長を50-100%阻害する抗体を、所望のようなアポトーシス抗体と組合せるために選択する。

#### 【0182】

##### (v i i) エフェクター機能の設計

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌の治療における抗体の効能を増強することが望ましい。例えば、システイン残基をF c領域に導入して、この領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を許容する。このようにして産生されたホモダイマー抗体は改善されたインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞死滅及び抗体依存性細胞障害活性(A D C C)を有しうる

。Caronら, J.Exp.Med. 176:1191-1195 (1992)及びShopes,B. J.Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照されたい。抗腫瘍活性が高められたホモダイマー抗体は、Wolffら, Cancer Research 53:2560-2565(1993)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。別法として、二重Fc領域を有し、よって増強された補体溶解及びADCC能を有しうる抗体を設計することができる。Stevensonら, Anti-cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

### 【0183】

#### (viii) 免疫コンジュゲート

また本発明はここで記載され、細胞障害剤、例えば化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物または動物由来の酵素活性毒又はそれらのフラグメント)、又は放射性アイソトープ(すなわち、放射性コンジュゲート)に抱合した抗体を含有する免疫コンジュゲートに関する。

このような免疫コンジュゲートの生成に有用な化学療法剤は上述している。使用可能な酵素活性毒及びそのフラグメントには、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モルディカ・キャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(*Saponaaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(tricothecenes)が含まれる。種々の放射性核種が放射性コンジュゲート抗Erbb2抗体の生成に利用できる。具体例には<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y及び<sup>186</sup>Reを含む。

### 【0184】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリン

グ剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。WO94/11026号を参照されたい。

他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体がコンジュゲートされ得、ここで、抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄化(clearing)剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

#### 【0185】

##### (ix) 免疫リポソーム

ここで開示されている抗-LIV-1抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。抗体を含有するリポソームは、例えばEpsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4,485,045号及び同4,544,545号に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したりポソームは米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なりポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められ

たフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に包含される。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

#### 【0186】

##### (x) 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、WO 81/01145を参照)を活性化酵素に抗体をコンジュゲートさせることにより、ADEPTにおいて使用することができる。例えばWO 88/07378及び米国特許第4,975,278号を参照されたい。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性化細胞毒形態に転化するように、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が含まれる。

#### 【0187】

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアリアルスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに転化するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの転化に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化さ

れた薬剤を遊離の薬剤に転化するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを転化させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458[1987]を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

#### 【0188】

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗-L I V-1抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる(Neubergerら, Nature 312:604-608[1984])。

#### 【0189】

##### (x i) 抗体-サルベージレセプター結合エピトープ融合

本発明のある実施態様においては、例えば腫瘍浸透性を増大させるために無傷の抗体よりも抗体フラグメントを使用することが望ましい。この場合、その血清半減期を増大させるために抗体フラグメントを改変することが望ましい。これは、例えば、抗体フラグメントにサルベージレセプター結合エピトープを導入することにより(例えば、抗体フラグメント中の適当な領域の突然変異により、あるいはついで抗体フラグメントの何れかの末端又は中央に、例えばDNA又はペプチド合成により融合されるペプチドタグ内にエピトープを導入することにより)達成できる。

#### 【0190】

インビボでの半減期が増加したこのような抗体変異体を調製するための組織的方法は、いくつかの工程を含んでなる。第1にはIgG分子のFc領域のサルベージレセプター結合エピトープの配列及び高次構造を同定することが含まれる。ひとたびこのエピトープが同定されると、同定された結合エピトープの配列及び高次構造を含むように、関心のある抗体の配列を修飾する。配列を変異させた後

、抗体変異体を検査して元の抗体よりもインビボ半減期が長くなっているかどうか調査する。検査では、抗体変異体がより長いインビボ半減期を有していなかったら、その配列をさらに改変して、同定された結合エピトープの配列及び高次構造が含まれるようにする。改変された抗体をインビボ半減期が長くなっているか否かについて検査し、このプロセスを、より長いインビボ半減期を示す分子が得られるまで続ける。

#### 【0191】

関心のある抗体にこのようにして導入されているサルベージレセプター結合エピトープは、上述したような任意の適切なエピトープであり、その性質は、例えば修飾されている抗体のタイプに依存する。転移は、関心のある抗体がここで記載した生物学的活性を有するようになされる。

エピトープは、好ましくは、Fcドメインの一又は二つのループからの一又は複数のアミノ酸残基が抗体フラグメントの類似位置に移される領域を構成する。更により好ましくは、Fcドメインの一又は二つのループの3又はそれ以上の残基が移される。更に好ましくは、エピトープはFc領域(例えばIgGの)のCH<sub>2</sub>ドメインから取上げられ、抗体のCH<sub>1</sub>、CH<sub>3</sub>、又はV<sub>H</sub>領域、あるいは一以上のそのような領域に移される。別法として、エピトープをFc領域のCH<sub>2</sub>ドメインから取上げ、抗体フラグメントのC<sub>L</sub>領域又はV<sub>L</sub>領域、又は両方に移す。

#### 【0192】

##### (xii) 抗-LIV-1抗体の精製

組換え技術を使用する場合、抗体は、細胞膜周辺腔において細胞内生産することができ、又は培地に直接分泌させることができる。抗体が細胞内生産されるときは、第一工程として、宿主細胞であれ溶解断片であれ、粒状細片を、例えば遠心分離又は限外濾過により除去する。Carterら、Bio/Technology 10:163-167(1992)には、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離する手順が記載されている。簡単には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、約30分以上かけて溶かす。細胞屑は遠心分離により除去可能である。抗体が培地に分泌される場

合、そのような発現系からの上清は、好ましくは、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えばアミコン又はミリポアペリコン限外濾過ユニットを使用して最初に濃縮される。PMSFのようなプロテアーゼインヒビターを、タンパク分解を阻害するために先の工程の何れかで含めてもよく、また抗生物質を外來性汚染物の成長を防ぐために含めてもよい。

### 【0193】

細胞から調製された抗体組成物は、例えばヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが好適な精製法である。アフィニティーリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAはヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体を精製するために使用することができる(Lindmarkら, J. Immunol. Meth. 62:1-13[1983])。プロテインGが全てのマウスのアイソタイプ及びヒト 3に対して推奨される(Gussら, EMBO J. 5:1567-1575[1986])。アフィニティーリガンドが結合するマトリックスは最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリックスも利用することができる。調整穴あきガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼンのように機械的に安定なマトリックスを使用すれば、アガロースの場合よりも速い流速と短い処理時間が可能になる。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合は、ベイカーボンド(Bakerbond) A B X (商品名)樹脂(J. T. Baker, ニュージャージー州フィリップスバーグ)が精製に有用である。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカによるクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース(SEPHAROSE (商品名))によるクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラムなど)によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE及び硫酸アンモニウム沈殿のような他のタンパク質精製技術も、回収しようとする抗体によっては利用できる。

前段階の精製工程に続いて、関心ある抗体と汚染物質を含有する混合物を、約2.5-4.5のpHで溶離バッファーを使用し、好ましくは低い塩分濃度(例えば、約0-0.25Mの塩)で低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけて

もよい。

【0194】

実施例4： L I V - 1 は、細胞表層に発現

L I V - 1 の推定アミノ酸配列の分析は、タンパク質の一部が細胞外ドメイン ( E C D ) として存在することを示した。この発見を確かなものにするために、 E C D を発現させ、精製し、そして抗 - L I V - 1 E C D 抗体の発生のための抗原として使用した。抗体を完全長 L I V - 1 タンパク質を発現している細胞へ接触させた。この実施例は、抗 - L I V - 1 E C D 抗体が L I V - 1 発現細胞と結合したことを示し、 L I V - 1 が細胞外ドメインを含むことを明らかにする。

【0195】

大腸菌における L I V - 1 E C D の発現

抗体を生成することができる L I V - 1 E C D の試料を得るために、アミノ酸リーダー配列と作用可能に連結した L I V - 1 細胞外ドメインをコードする核酸ベクターを最初に構築した後に、 L I V - 1 の細胞外ドメインを含んでなるポリペプチドを大腸菌で発現させた。核酸構成物を調製し、コードされたタンパク質を発現するために、以下の手法が使用された。

成熟 L I V - 1 の細胞外ドメインをコードするアミノ酸 1 - 298 をコードする D N A を、プライマー 5' - CAACATCAAATGCATCAACTTCATGAACTAAAAGCAGCTGCT - 3' ( 配列番号 : 9 ) 及び 5' - GAGCTCGAGCGCCGCTTAGGTCTTTGGAGGGATTTTCAGCCTT - 3' ( 配列番号 : 10 ) を使用して完全長 c D N A から標準 P C R 技術によって調製した。 P C R 反応を二つに分けた : 最初の半分は、 N s i I 及び S a c I で消化し、他の半分を S a c I 及び N o t I で消化した。アミノ酸 1 - 166 をコードする N s i I - S a c I D N A 断片、並びにアミノ酸 167 - 298 をコードする S a c I - N o t I 断片を単離し、前もって消化した、 N s i I 制限部位である N 末端 p o l y h i s リーダーの 3' 末端を含有する p B R 3 2 2 - 誘導ベクターである発現ベクター p S T 2 3 9 h e ライゲーションした。この結果生じた L I V - 1 E C D 発現プラスミドを p E 1 6 4 6 4 7 と命名した。

【0196】

S T 2 3 9 ベクターにおける発現の転写及び翻訳制御は、以下の遺伝的特徴に

よって提供された。転写開始は、大腸菌のアルカリホスファターゼプロモーターによって制御された (Kikuchi Y. ら., *Nucleic Acids Res.* 9: 5671-5678(1981))。trp オペロンのリボゾーム結合部位は、翻訳開始に使用された (Yanofsky C. ら., *Nucleic Acids Res.* 9: 6647-6668 (1981))。翻訳終結は、希コードン tRNA 遺伝子 pro2、argU、及び glyT (Komine Y., ら., *J. Mol. Biol.* 212: 579-598(1990), Fournier M.J., ら., *Microbiol. Rev.* 49: 379-397(1985)) が後に続く、翻訳終結コドン及び下流の から転写終結因子によって影響をされた (Scholtissek S. ら., *Nucleic Acids Res.* 15: 3185(1987))。

#### 【0197】

発現を促進するために、LIV-1の細胞外ドメインを、N末端poly-histidineリーダ配列をコードするST239発現ベクターによって大腸菌細胞質で発現させた。このリーダのアミノ酸配列は：MKHQHQHQHQHQMHQ (配列番号：11)である。このリーダ配列は、幾つかの利点を提供した。第一に、翻訳開始が最適化された。更には、ニッケルキレートカラムでの吸着によって、精製が簡略化された。最後に、リーダ配列は、TAG Zyme (商品名)システムを使用して、所望の通りに、容易に効率良く除かれた。

発現ベクター、pE164647の構築、並びにDNA配列の確認に続いて、LIV-1発現プラスミドを、大腸菌株58F3 (fhuA (tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP lacIq ompT (nmpc-fepE) slyD)へ形質転換した。形質転換体を最初にルリア培地で30で終夜生育させ、次にリン酸制限培地で100倍に希釈してアルカリホスファターゼプロモーターを誘導した。24時間後に30で振盪後、培地を遠心分離し、次に精製を開始するまで細胞ペレットを凍結した。

#### 【0198】

##### LIV-1 ECDの精製

LIV-1を発現する大腸菌形質転換体の0.5Lの発酵によって、約6-10gの細胞ペレットが生じた。このペーストを、7Mグアニジン、20mMトリス、pH8バッファの10容量(w/v)で再懸濁した。固体硫酸ナトリウム

及びテトラチオン酸ナトリウムを、各々の最終濃度が0.1 M及び0.02 Mとなるように添加し、この溶液を4 で終夜にわたって攪拌した。この亜硫酸分解の工程によって、すべてのシステイン残基がブロックされた変性タンパク質が生じた。この溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000 rpmで30分間濃縮した。その上清を金属キレートカラムバッファー(6 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 7.4)の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターで濾過して透明にした。50 mlの容量に相当するこの透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化した5 mlのQiagen Ni-NTA(ニッケル-ニトリロ三酢酸)金属キレートカラムに負荷した(QIAexpress(登録商標)タンパク質精製システム、Qiagen, Valencia, CA USA)。このカラムを、50 mMのイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade)を含む添加バッファー、pH 7.4で洗浄した。所望のタンパク質を含有する分画をプールし、4 で保存する。タンパク質濃度を、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて、280 nmにおけるその吸収によって見積もった。抗体生産のためのタンパク質は、ジチオスレイトール(最終濃度50 mM)でNi-NTAプールのアリコート還元した後に、1 mM HClに対する大規模な透析によって得られた。

#### 【0199】

##### LIV-1タンパク質に対するモノクローナル抗体の開発

以下の方法によって、LIV-1の細胞外ドメインに対して特異的なモノクローナル抗体を開発した。

10匹のBalb/cマウス(Charles River Laboratories, Wilmington, DE)を、ここに開示したpE164647形質転換大腸菌より単離した組み換えpolyhistidine-タグヒトLIV-1で過免疫化した。Ribiアジュバンドに含まれるタグLIV-1タンパク質(Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO)をマウスへ投与した。以前に記載した修正した類似のプロトコール(Kohler, G. 及びMilstein, C., Nature 256: 495-497(1975); Hongo, J.S.ら., Hybridoma 14: 253-260(1995))を使用して、高い抗-LIV-1抗体力価を示した5匹のマウスのB細胞を、マウスメラノーマ細胞(X63.Ag8.653; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, ロックビル, メリーランド)と融合

させた。

#### 【0200】

7 - 14日後に、上清を収集し、直接酵素結合免疫吸着アッセイ法 (ELISA) を使用して標準技術によって抗体生産に関してスクリーニングした。限界希釈による第二ラウンド目のサブクローニングの後に最も高い免疫結合親和性を示す16のポジティブクローンを、モノクローナル抗体のインビボ生産のために、プリスタンで初回刺激したマウス (Freund, Y. R. 及びBlair, P.B., J. Immunol. 129: 2826-2830(1982)) へ注射した。これらのマウスの腹水をプールし、以前に記載 (Hongo, J.S. ら., Hybridoma, 上掲(1995)) のようにプロテインAアフィニティークロマトグラフィー (Pharmacia fast protein chromatography (FPLC) Pharmacia, ウップラサ, スウェーデン) によって精製した。精製抗体調製物を、無菌的に濾過し (0.2- $\mu$ m粒子サイズ; Nalgene, ロチェスター, ニューヨーク)、そしてリン酸バッファー化生理的食塩水 (PBS) で4℃で貯蔵した。

#### 【0201】

##### 大腸菌におけるLIV-1 ECD断片の発現

LIV-1-164647ECDの断片を、完全長LIV-1-164647のクローニングと発現に関して記載したのと同じ技術を使用して、大腸菌で発現させた。発現させたECD断片は、N末端断片 (配列番号: 4のアミノ酸1からアミノ酸147を含む) 及びC末端断片 (配列番号: 4のアミノ酸148からアミノ酸298を含む) であった。この断片は、上記のように精製した。

どちらのN末端又はC末端ECD断片が上記のように単離したモノクローナル抗体と結合するのかを決定するために、標準的なウエスタンブロット分析を使用した。モノクローナル抗体2945、2982、2984、2985、2987及び2988のみを試験した。モノクローナル抗体2945、2982、2985、2987及び2988がC末端断片と結合する一方で、モノクローナル抗体2984がN末端断片と結合することが見出された。この結果は、表3に列挙されている。

#### 【0202】

## 哺乳動物における外来性完全長L I V - 1の発現

表3に列挙した16の抗体の各々について、L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7のE C Dとの結合に関して調べ、特異的に結合したことが見出された。抗体は、表3に列挙されている特性を有するものと特徴付けられた。A T C Cへ寄託されているハイブリドーマによって生産された抗体を含み、クロス-ブロッキング(例えば、競合E L I S Aアッセイ)を使用する、本発明の抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7抗体が結合したエピトープのように、被験抗体が同じエピトープとの結合に関して競合できるか否かを決定することが包含されるエピトープのキャラクタリゼーションをおこなうことができる。模範的な競合E L I S Aアッセイでは、マイクロタイタープレートのウェルをコートするL I V - 1 - 1 6 7 6 4 7又はそのE C D(又は他の断片)は、候補競合抗体とともに又は候補競合抗体無しでプレインキュベートし、次いで本発明のビオチンで標識した抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7抗体を添加する。ウェル中のL I V - 1抗原と結合した標識抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7抗体の総量を、アビジン-パルオキシダーゼコンジュゲート及び適切な基質を使用して測定する。この抗体は、放射活性又は蛍光標識又はその他の検出可能及び測定可能な標識で標識できる。抗原と結合した標識抗-L I V - 1抗体の総量は、同じエピトープとの結合に関して競合する候補競合抗体(被験抗体)の能力と間接的な関連を有する(すなわち、同じエピトープに対する被験抗体の親和性が高ければ、抗原でコートされたウェルと結合する標識抗体はより少ない)。候補競合抗体は、実質的には、同じエピトープと結合する、或いは候補抗体が、候補競合抗体の非存在下で同時におこなわれたコントロールと比較して(しかし、既知の非競合抗体の存在下でもおこなわれ得る)、少なくとも20%、好ましくは20-50%、さらにより好ましくは少なくとも50%のL I V - 抗体の結合をブロックすることができる場合に、本発明の抗-L I V抗体のように、同じエピトープとの結合について競合する抗体だと考えられている。このアッセイの変形は、同じ定量値を達成するようにおこなうことができる。表3の各抗体に関するエピトープ群の割り当ては、競合E L I S Aによって決定された。各抗体は、ビオチン化され、過度の各非標識抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7の存在又は非存在下において、プレートにコートしたL I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 E C Dとの結合につ

いて試験した。次いで、ストレプトアビジン-HRPを、続いてパルオキシダーゼ基質をプレートへ添加した。少なくとも50%の結合の減少、又はLIV-1-164647ECDとのビオチン化モノクローナル抗体の結合の欠如は、非標識及びビオチン化抗体の双方が、LIV-1-164647の同じ(又は近接する)エピトープと結合することを示した。

### 【0203】

哺乳動物細胞における完全長LIV-1の発現は、結果として細胞の表層に細胞外ドメインを露出することを引き起こす。このことを証明するために、3T3細胞を、過度的に野生型完全長LIV-1646471(pRK5-LIV-164647)をコードする発現構成物で形質移入した。コントロール細胞を、LIV-1挿入物を欠くpRK5ベクターで形質移入した。24時間後、ここで開示の抗-LIV-1-164647ECDモノクローナル抗体をタグとして使用し、蛍光活性化セルソーター(FACS)分析によって、細胞表層発現に関して細胞を分析した。約 $10^6$ 細胞を、氷上で、2%ヤギ血清及び5%ウサギ血清(FACSバッファー)を含有するPBSで30分間にわたってインキュベートし、次いで、2時間にわたって、抗-LIV-164647ECDモノクローナル抗体2982(ハイブリドーマ2982.4A12.1E8.1C4から単離, ATCCと命名)又は抗-LIV-1-164647ECDモノクローナル抗体2983(ハイブリドーマ2983.3G9.1D4.1D7から単離, ATCC)の $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するFACSバッファーでインキュベートした。この細胞は、次いでアイスコールドPBSで洗浄し、20分間にわたって、4でビオチン-コンジュゲートヤギ抗-ヒトIgG二次抗体(Jackson Immunoreagents; West Grove, PA)でインキュベートし、フィコエリトリンコンジュゲートストレプトアビジン(Jackson Immunoreagents; West Grove, PA)で4、20分に渡るインキュベートの前に洗浄した。細胞は、再び細胞蛍光測定法の前に洗浄した。抗体2983を使用するFACS分析の結果は、Fig 6にプロットしてある。この結果は、LIV-1-164647の細胞表層発現が、pRK5-LIV-1-164647で形質移入した3T3細胞で検出され、コントロール(pRK5ベクターのみ)細胞では検出されなかったことを示した。従って、LIV

-1-164647タンパク質のアミノ酸1-298は、細胞外ドメインを構成する。

#### 【0204】

##### 乳房腫瘍細胞株における内因性LIV-1の発現

ここで、内因性LIV-1が、MCF-7乳房腫瘍細胞株(例えば、ATCC HTB-22)の表層で発現することが開示されている。抗-LIV-1モノクローナル抗体2945(ハイブリドーマ2945.2G1.1C7.2F10から; ATCC )を、ラクトパルオキシダーゼ法を使用して<sup>125</sup>Iで放射線標識した。MCF-7細胞を、1mM EDTAを含有するPBSで収集した。3.4百万のMCF-7細胞の集団を、室温で1時間にわたって、過剰の非標識抗体(0.25 μM)の存在(NSB)又は非存在(Tot)下において、5000 cpm(230 pM)の<sup>125</sup>I-2945を含むPBSA(PBS + 0.1% BSA + 0.02% アジド)でインキュベートした。次いで、氷PBS中の20%シュークロースによる1mlクッションで、5000 rpm、5分間に渡る遠心分離によって、結合放射活性を非結合放射活性から分離した。次いで、細胞ペレットに結合している放射活性をガンマカウンターで計測した。Fig 7に示してあるように、抗-LIV-1-164647モノクローナル抗体2945の特異的結合は、MCF-7細胞の表層で検出され、このことは、乳房腫瘍細胞株の細胞表層で内因性LIV-1が発現することを示す。

#### 【0205】

##### LIV-1への抗体結合

本発明の選択されたモノクローナル抗体、並びにそれら各々のハイブリドーマを表3に列挙する。モノクローナル抗体のキャラクタリゼーションを、ここに開示のエピトープ分析のための競合分析の標準的な技術、FACS分析のためのセルソーティング、並びに抗体がLIV-1-164647ECDのN末端又はC末端部分のどちらと結合するのかを決定するためのウェスタンブロットを使用しておこなった。

#### 【0206】

表 3

モノクローナル 抗体	L I V - 1 結合モノクローナル抗体		エピトープ 群 <sup>a</sup>	F A C S (3T3-LIV-1/3T3)	E C D断片 N-又は C-末端 <sup>b</sup>
	ハイブリドーマ 細胞株	アイソタイプ			
2945	2G1.1C7.2F10	IgG2b	A	+++/-	C 末端
2982	4A12.1E8.1C4	IgG1	A	+++/-	C 末端
2983	3G9.1D4.1D7	IgG1	A	+++/-	試験せず
2984	6D6.1H10.2C1	IgG1	C	+++/-	N 末端
2985	4F3.2D6.1D7	IgG1	A	+/-	C 末端
2987	1D8.1C11.2B7	IgG1	C	+/-	C 末端
2988	1A7.1F2.1H7	IgG1	A	+/-	C 末端
2946	2B11.2B11.2A12	IgG2b	B	-/-	試験せず
2947	3H8.2D9.1H8	IgG1	B	+++/-	"
2948	2G4.2C7.2D6	IgG2b	B	-/-	"
2949	5B4.2H11.1G10	IgG2b	B	-/-	"
2950	5H5.2A7.1D8	IgG2b	B	-/-	"
2951	4G3.2F8.2A11	IgG2b	B	+++/-	"
2952	6G9.1G9.1A10	IgG2b	B	-/-	"
2953	6B6.2E11.1F10	IgG1	B	+/-	"
2986	1F1.2G8.2E7	IgG1	B	-/-	"

<sup>a</sup>ここに開示された抗体競合分析によって作製されたエピトープ群の割り当て。

<sup>b</sup>N末端断片が配列番号：4のアミノ酸1 - 147であり、C末端断片が配列番号：4のアミノ酸148 - 298である場合に、「N又はC末端」という用語は、L I V - 1 - 164647 E C DのN末端又はC末端断片への被験抗体の結合を意味する。

ブダペスト条約に基づく、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションへのこれらハイブリドーマの幾つかの寄託は、「寄託材料」という見出しの下に示してある。

### 【0207】

実施例5：RNAインサイツハイブリダイゼーションによって調べられた腫瘍組織におけるL I V - 1 発現

この実施例は、種々のヒト組織におけるL I V - 1 発現の定量のための組織アレイの調製に使用する方法を提供する（例えば、Kononen, J., ら. Nature Medicine 4: 844-847(1998)を参照のこと）。

#### 組織マイクロアレイの調製

組織マイクロアレイ、又は組織アレイは、幾つかの個々の組織試料を含有する

パラフィンブロックである。典型的な組織マイクロアッセイは、1000又はそれより多くの試料を含み得る。組織マイクロアレイは、技術者の時間、試薬、及び価値ある組織リソースの効果的な利用を最大にしつつ、多数のシリーズの検体の検査を可能にする。

#### 【0208】

組織マイクロアレイを、最初に、組織アレイ機器 (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) を使用して、パラフィンブロックに埋め込まれた「ドナー」組織生検試料から小さなコア (直径0.6 mm, 高さ3 - 4 mm) を除くことによって構築する。同じ機器を使用して、次いで、アレイを形成するために、各コアを他の生検コアとともに単一の「受容体」へ再度埋め込む。好ましくは、各組織を、3通りに試料採取する。受容体ブロックの薄いスライス (4 - 8  $\mu$ m の厚さ) を、ガラススライド上に添え付けた。視覚化及びスクリーニングは、限定されるものではないが、形態学的な分析のための標準的なヘマトキシリン及びエオシン染色; タンパク質検出のための免疫組織化学 (IHC); mRNA 検出のためのインサイツハイブリダイゼーション (mRNA ISH) 及びRT-PCR; DNA 検出のための蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) 及びインサイツPCR; アポトーシス性DNA断片化を起こしている細胞の検出のための末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ (TdT) -媒介dUTPニック末端ラベル化 (TUNEL) アッセイを含む組織学的方法によっておこなわれ得る。

以下のmRNA ISH法は、LIV-1のヒト組織発現プロファイルを決定するために使用された。

#### 【0209】

##### インサイツハイブリダイゼーション

インサイツハイブリダイゼーションは、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び局在化のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定及び局在化、特定mRNA合成及び染色体マッピングにおける追跡に有用である。

インサイツハイブリダイゼーションは、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-

176 (1994)のプロトコールの最適な変形に従って、PCR生成<sup>33</sup>P-標識リボプローブを用いて実施された。要約すると、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼK (20 µg/ml) で15分間37°Cで脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGillettに記載されたようなインサイツハイブリダイゼーションのために処理をおこなった。 [<sup>33</sup>P]UTP-標識アンチセンスリボプローブをPCR産物から生成し、55°Cで終夜ハイブリダイゼーションする。スライドをKodak NTB2核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露出した。

#### 【0210】

##### DNAテンプレートの調製

LIV-1特異的リボプローブの分析ために、LIV-1の一部に相当するテンプレートDNAが必要であった。その末端に対して、以下の配列を有するヌクレオチド1690 - ヌクレオチド2240 (配列番号: 3; Fig 2Aを参照) のDNA164647 (LIV-1-164647) 核酸配列の一部を、テンプレートDNAとしての使用のために増幅した: 5'-TGCCATTAC ATTTCCACGA TACAC TCGGC CAGTCAGACG ATCTCATTCA CCACCATCAT GACTACCATC ATATTCTCCA TCATCACCAC CACCAAAACC ACCATCCTCA CAGTCACAGC CAGCGCTACT CTCGGGAGGA GCTGAAAGAT GCCGGC GTCG CCACTTTGGC CTGGATGGTG ATAATGGGTG ATGGCCTGCA CAATTTACAGC GATGGCCTAG C AATTGGTGC TGCTTTTACT GAAGGCTTAT CAAGTGGTTT AAGTACTTCT GTTGCTGTGT TCTGTCA TGA GTTGCCATCAT GAATTAGGTG ACTTTGCTGT TCTACTAAAG GCTGACATGA CCGTTAAGCA GG CTGTCCTT TATAATGCAT TGTCAGCCAT GCTGGCGTAT CTTGGAATGG CAACAGGAATT TTCATTG GT CATTATGCTG AAAATGTTTC TATGTGGATA TTTGCACTTA CTGCTGGCTT ATTCATGTAT GTT GCTCTGG TTGATATGGT ACCTGAAATG CTGCACAATG ATGCTAGTGA CCATGGATGT AGCCGCTGG G G-3' (配列番号: 12)。増幅したDNAは、テンプレートとして利用され、インサイツハイブリダイゼーションのためにそのテンプレートからリボプローブが合成された。

#### 【0211】

テンプレートnt1690 - nt2240からのLIV-1のアンチセンスcDNA鎖を生成するためのプライマー:

プライマーF-99104:

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCTGCCATTACATTTCCACGAT-3'

(配列番号: 13)

プライマーF-99105:

5'-CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGACCCCAGCGCCTACATCC-3'

(配列番号: 14)

【0212】

Clontech(8417-1)のアドバンテージcDNAポリメラーゼミックス(The Advantage cDNA polymerase mix)を、僅かな修正を加えて製造者指示書に従って使用した。要約すると、316 $\mu$ l SQ水(高精製、RNaseフリー水)、40 $\mu$ l 10X PCRバッファー、16 $\mu$ l 10mM dNTP、8 $\mu$ l プライマー配列番号: 13、8 $\mu$ l プライマー配列番号: 14を組み合わせて、マスター混合物を形成した。このマスター混合物から、97 $\mu$ lをPCRチューブへ等分し、その後で2 $\mu$ lのテンプレートDNA及び1 $\mu$ lのアドバンテージcDNAポリメラーゼ(Advantagre cDNA polymerase)の添加をおこなった。パーキンエルマーシートス9600サーモサイクラー(Perkin-Elmer Cetus 9600 thermocycler)を使用し、サイクル条件を以下の通りとした:

開始: 85 5分

60 1.5分

10サイクルの:

94 30秒

68 30秒

72 1分

15サイクルの:

94 30秒

55 30秒

72 1分

続いて:

72 7分

## 4 保持

P C Rサイクルの完了後、プライマー及び過剰なバッファーを除くために、P C R産物をMicrocon-50 (商品名) フィルターユニット (商品名) を通して濾過した。

## 【0213】

<sup>33</sup>P-リボプローブ合成

6.0 μl (125mCi) の<sup>33</sup>P-UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mmol) をスピード真空乾燥させた。乾燥<sup>33</sup>P-UTPを含む管に以下の成分を添加した：

- 2.0 μl の5x転写バッファー
- 1.0 μl のDTT (100mM)
- 2.0 μl のNTP混合物 (2.5mM: 10 μl; 10mMのGTP, CTP & ATP+10 μlのH<sub>2</sub>O)
- 1.0 μl のRNA sin リボヌクレアーゼインヒビター
- 3.0 μl のH<sub>2</sub>O中のDNAテンプレート (1 μg)
- 1.0 μl のRNAポリメラーゼ (P C R産物についてT3=AS (アンチセンス), T7=S (センス), 通常)

## 【0214】

管を37 °Cで1時間インキュベートし、1.0 μlのRQ1 DNaseを添加し、次いで37 °Cで15分間インキュベートした。90 μlのTE (10mMトリス pH7.6 / 1mMのEDTA pH8.0) を添加し、1.0 μlアリコート混合物をDE 81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50限外濾過ユニット (Amicon, 42416) に負荷し、Heraeus Centrifuge 28Sのプログラム10を用いて6分間スピニングさせた。濾過ユニットを第2の管に反転させ、プログラム2を用いて3分間スピニングさせた。最終回収スピンの後、100 μlのTEを添加した。1 μlの最終生成物をDE 81紙にピペットした。濾過の前後にDE 81紙にドットされた試料を、Beckman LS 5000TD シンチレーションカウンターの6 mlのBiofluor IIで数えた。

サイズを確かめるために、プローブをTBE / 尿素ゲルの上に流した。1 - 3

$\mu\text{l}$ のプロープ又は $5\ \mu\text{l}$ のRNA 分子量マーカーIII (Molecular Weight Marker III) (Boehringer Mannheim) を $3\ \mu\text{l}$ の負荷バッファーに添加した。 $37$ の加熱ブロック上で3分間加熱した後、そのプロープを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルをフラッシングし、試料を負荷し、 $180 - 250$ ボルトで45分間走らせた。そのゲルを、サランラップでラップし、補強スクリーンを有するBiomax MS (商品名) フィルムKodack又はXAR-2 (商品名) フィルムへ $-70$ のフリーザー内で1時間から終夜にわたって曝露した。

### 【0215】

#### $^{33}\text{P}$ -ハイブリダイゼーション

パラフィン包埋切片の前処理： ガラススライド上に添え付けた受容体組織アレイブロックの薄いスライスを脱パラフィンし、 $50\ \text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}$ 中に配置し、 $2 \times \text{SSC}$ で室温において各々5分間2回リンスした。切片を $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼK ( $250\ \text{mM}$ のRNase無しRNaseバッファー中 $10\ \text{mg}/\text{ml}$ を $500\ \mu\text{l}$ ;  $37$ 、15分間) 中で除タンパクし、続いてスライドを、 $0.5 \times \text{SSC}$ でリンスし、2分間にわたって各グレードの等級エタノール ( $70\%$ 、 $95\%$ 、及び $100\%$ ) で脱水して空気乾燥した。

プレハイブリッド化： スライドをBoxバッファー ( $4 \times \text{SSC}$ 、 $50\%$ ホルムアミド) - 飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。組織を $100\ \mu\text{l}$ のハイブリダイゼーションバッファー ( $10\%$ デキストラン硫酸、 $50\%$ ホルムアルデヒド、 $1 \times \text{SSC}$ ) で被覆し、 $42$  で1 - 4時間インキュベートした。

ハイブリダイゼーション： スライド当たり $2.0 \times 10^6$  cpmのプロープ及び $2.0\ \mu\text{l}$ のtRNA ( $100\ \text{mg}/\text{ml}$ ストック) を $95$  で3分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり最終容量が $100\ \mu\text{l}$ となるようにハイブリダイゼーションバッファーを添加した。ボルテックスの後、 $100\ \mu\text{l}$ の $^{33}\text{P}$ 混合物をスライド上のプレハイブリッド $100\ \mu\text{l}$ に添加した。スライドを $55$  で終夜インキュベートした。

### 【0216】

洗浄：

洗浄は、 $2 \times SSC$ 、EDTAで $2 \times 10$ 分間、室温で実施し（ $400 \text{ ml}$ の $20 \times SSC + 16 \text{ ml}$ の $0.25 \text{ M}$  EDTA、 $V_f = 4 \text{ L}$ ）、次いでRNAase A処理を $37^\circ\text{C}$ で30分間行った（前もって暖めた $250 \text{ ml}$  RNAaseバッファー中 $10 \text{ mg/ml}$ を $500 \mu\text{l} = 20 \mu\text{g/ml}$ ）。スライドを $2 \times SSC$ 、EDTAで $2 \times 10$ 分間、室温において洗浄した。緊縮性洗浄条件は次の通り： $55^\circ\text{C}$ で2時間、 $0.1 \times SSC$ 、EDTA（ $20 \text{ ml}$ の $20 \times SSC + 16 \text{ ml}$ のEDTA、 $V_f = 4 \text{ L}$ ）。これに、RTでの $2 \times 10$ 分の洗浄が後に続いた。次いで、 $0.3 \text{ M}$ 酢酸アンモニアを含有する各 $50\%$ 、 $70\%$ 、 $90\%$ エタノールで2分間にわたって脱水し、2時間にわたって空気乾燥した。この乾燥スライドを16時間にわたってBiomax MSフィルム（Kodak）、又は2日間にわたってHyperfilm -Maxフィルム（Amersham）へ曝露した。

#### 【0217】

Erbb2及び -アクチン<sup>33</sup>Pリボプローブ合成

RNAインサイツハイブリダイゼーションによるLIV-1及びErbb2発現の比較分析のために、Erbb2核酸配列に対して相補的なリボプローブを調製した。コントロールとしては、その遺伝子のRNAに対して相補的なリボプローブを使用して、-アクチンの発現もモニターした。

#### 【0218】

開示された手法を使用して、Erbb2及び -アクチンに対して特異的なリボプローブも調製した。このErbb2リボプローブを、以下の配列を有するDNAテンプレートの転写によって合成した、5'-TGGTCGTGGTCTTGGGGTGGTCTTTGGGATCCTCATCAA GCGACGGCAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGG AAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGAGCGATGCCCAACCAG GCGCAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCT TGGATCTGGCGCTTTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGAGAATGTGAAAATTCAGTGGCCATCAAAGTGTGAGGGAAAACACA TCCCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTAGACGAAGCATACTGATGGCTGG TGTGGGCTCCCATATGTCTCCCGCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCA CGGTGCAGCTGGTGCACAGCTTATGCCCTATGGCTGCCTCTTAGACCAT GTCCGGGAAAACCGCGGACGCTGGGCTCCAGGACCTGCTGAACTGGTG TATGCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTCGTAC ACAGGGACTTGGCCGCTCGGAACGTGCTGGTCAAGAGTCCCAACCATGTC AAA

ATTACAGACTTCGGGCTGGCTCGGCTG-3' (配列番号: 15)、及びその補体。また、このテンプレートは、T7及びT3プロモーターを含んでいた。この結果によって生じたErbb2特異的アンチセンスリボプローブを「442AS」と命名した。

#### 【0219】

-アクチンリボプローブを、以下の配列を有するDNAテンプレートの転写によって合成した、5'-GCTGCCTGACGGCCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCC CTGAGGCACTCTTCCAGCCTTCCTTCCTGGGCATGGAGTCCTGTGGCATC CACGAAACTACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGACTGTGACATCCGCAA AGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCTG GCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACCCAGCACA ATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCTGAGCGCAAGTACTC-3' (配列番号: 16)、及びその補体。このテンプレートには、T3プロモーターが含まれていた。この結果生じた -アクチン特異的アンチセンスリボプロテインを、「117AS」と命名した。

#### 【0220】

RNAインサイツハイブリダイゼーションによる組織におけるLIV-1の検出

この実施例は、種々の組織におけるLIV-1の発現を検査した組織アレイ分析の結果を提供する。要約すると、LIV-1発現は、胎児腎上皮、腸筋神経叢を含む発達中の胎児脊髄神経節、胎児脳、成人前立腺上皮、乳房腫瘍、乳房線維腺腫、肺癌、扁平上皮肺、結腸癌、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌及びメラノーマにおいて生じることが見出された。

#### 【0221】

表4は、幾つかの組織マクロアレイRNAインサイツハイブリダイゼーション分析の結果を提供する。表にした結果及びコメントは、内部レファレンスのためにポジション番号が与えられた組織マイクロアレイにおいて、IS2000-060及びIS2000-084と命名された研究で作成した。LIV-1の相対発現を、検出のレベルの増加に関して「+」、「++」、又は「+++」で示し、その一方で、非検出発現を「-」で示した。RNAインサイツハイブリダイゼーションに使用されるLIV-1リボプローブを、センスプローブとして「764

S」と命名し、アンチセンスプローブとして「764AS」と命名した。また、ErbB2(プローブ442AS)及び -アクチン(コントロールとしてプローブ117AS)転写物に対して特異的なアンチセンスリボプローブを、IS2000-084研究で使用した。ここで使用されているように、「TMA」という用語は、組織マイクロアレイを指す。「NMA」という用語は、正常な組織マイクロアレイに相当し、「正常」とは非癌性組織を指す。

【0222】

表 4  
RNA インサイツハイブリダイゼーションによる LIV-1 の組織発現

組織	切片	プローブ	結果	コメント
ISH2000-060 研究				
コントロール細胞ペレット	H2000-219.01	764AS	—	
コントロール細胞ペレット	"	764A	—	
LIV-1 細胞ペレット	H2000-219.02	764AS	+++	
LIV-1 細胞ペレット	"	764S	+	
各種、アカゲザル & ヒト	Misc.02	764AS	—	
各種	Misc.02	764S	—	
12 週胎盤	H97-039.02	764AS	—	
12 週胎盤	"	764S	—	
14.5 週胎児	H97-106.31	764AS	++	胎児腎臓上皮、腸管神経叢を含む発達中の脊髄神経節での発現
14.5 週胎児	H97-106.31	764S	—	
胎児脳	H97-045.01	764AS	+	胎児皮質ニューロンでの発現
胎児脳	"	764S	—	
胎児脳	H97-106.36	764AS	+	
成人 NMA	H2000-165.06	764AS	++	前立腺上皮での強い発現、腎細管での病巣低レベル発現、肺、胆嚢、脾臓、心臓及び膵臓でネガティブ
成人 NMA	"	764S	—	
乳房腫瘍 TMA	H2000-94B	764AS	++	13 の乳癌のうちの 5 つで発現の上昇；線維線種での高発現
腫瘍ブロック 3	H2000-165.20	764AS	—	
肺腫瘍 TMA	H1999-637	764AS	+	一つの癌での発現、及び正常な気管支上皮での低レベル発現
肺腫瘍 TMA <sup>b</sup>	H2000-27	764AS	++	質が悪いアレイ、6 つの癌で中から高発現を示す。
結腸腫瘍 TMA	H1999-636	764AS	+	乳房に比例、4 つの癌で低レベル発現
肺腫瘍 TMA <sup>b</sup>	H2000-26	764AS	—	質の悪いアレイ
乳房腫瘍 TMA	H1999-635	764AS	++	3 つの癌で発現が観察された；最も高いレベルは、線維線種のケース及び硬化性腺症の一つ
前立腺腫瘍 TMA <sup>b</sup>	H2000-25	764AS	++	少なくとも、18 のケースで適度なシグナル；正常な前立腺で適度に強いシグナル
ヒト NMA	H2000-2	764AS	+	副腎皮質及び腎細管上皮で低レベルのシグナル
乳房 NMA	HP001595	764AS	++	乳頭皮膚上皮 <sup>d</sup> 、乳房管上皮及び腺房上皮での発現
チンパンジー NMA	H2000-185	764AS	+	扁平上皮での発現
多腫瘍 TMA	H2000-132	764AS	+	扁平上皮肺、転移性、子宮内膜、卵巣癌及びメラノーマでの上昇した発現
IS2000-084 研究				
乳房腫瘍 TMA	H2000-94	764A		LIV-1 mRNA についてポジティブ
	"	442AS		ErbB2 mRNA についてポジティブ
	"	117AS		β-アクチン mRNA についてポジティブ

<sup>a</sup> リボプローブの調製及び番号命名は、この実施例に開示。

<sup>b</sup>アレイは、Clinomics Biosciences, Inc., Pittsfield, MAより購入。

<sup>c</sup> 表4にリストされた幾つかの切片は、種々の組織型を含んだ。例えば、切片 Misc.02は、正常な(すなわち非-癌性)腎臓、膀胱、肺、及び末期段階の腎疾患(非癌性)を含んだ。腫瘍ブロック3(H2000-165.20)は、軟骨肉腫、骨肉腫、腎細胞癌、脂肪肉腫、胃腺腫、扁平上皮癌、及び脳腫瘍を含んだ。ヒトNMA(H2000-2)は、脾臓、副腎、心臓、眼、小腸、腎臓、脾臓、リンパ節、扁桃腺、皮膚、乳房、肺、脳、結腸、肝臓、大動脈、胎盤、胃、卵巣、前立腺、乳房、及び皮膚の試料を含んだ。H2000-2のすべてのリンパ節標本は、アクチンネガティブであり、このことは、これら試料においてmRNAが分解したことを示唆し、その一方で、心臓の試料のみが弱いアクチンポジティブであった。乳房TMA(切片H2000-94B)は、異常な胆管胃の増殖の試料(前の切片の嚢胞肉腫)、巨大細胞の活性変化を含む; DCIS(0の4のリンパ節(LN)ポジティブ); 腺管癌、浸潤性; 腺管癌、不完全に分化、浸潤性(0の24のLNポジティブ); 異常な過形成/CIS; 管及び小葉での癌は、浸潤性リンパ節転移性; 腺管癌、浸潤性、グレードIII/III; DCIS I、低いグレード; LCIS(0の26のLNポジティブ); 良性乳房組織; 線維腺腫; 腺癌、浸潤性(31の31のLNポジティブ); 腺疾患。多腫瘍TMA(切片H2000-132)は、肺腫瘍(細気管支肺胞性癌、腺癌); 結腸腺癌; 胃腺癌; 膵管腺癌; 肝細胞癌; 前立腺癌(Gleason グレード2-3); 膀胱移行上皮癌; 腎臓乳頭移行癌; 前立腺移行上皮癌; 腎明細胞癌; 子宮内膜癌; 卵巣乳頭癌; 卵巣明細胞癌; リンパ種; 及びメラノーマの試料を含んでいた。

<sup>d</sup>正常な乳皮膚の異なる試料の細胞から抽出したmRNAの定量的マイクロアレイ分析は、乳房腫瘍に比べて皮膚での低いLIV-1発現を示した。

### 【0223】

表4のIS2000-060の研究の結果が示すように、RNAインサイツハイブリダイゼーションは、正常な乳房に比べて、幾つかの乳癌での上昇したLIV-1の発現を確かなものにする: TMAの13の乳癌のうち5つで発現が上昇していた。また、高発現が良性の乳疾患、特に線維腺腫及び硬化性腺症にみられた。強い発現は、前立腺癌だけでなく、正常な前立腺上皮で観察された。発現は

、扁平上皮肺、転移性、子宮内膜、卵巣癌腫及びメラノーマを含む多くの他の腫瘍型の上皮組織にみられた。正常組織での発現に関して、L I V - 1 は、正常な扁平上皮（例えば、チンパンジー及びヒト乳皮膚）において高く発現している。強い発現は、正常な前立腺上皮において、病巣の低レベル発現は、正常な腎細管において観察された。肝臓、肺、胆嚢、脾臓、心臓、及び膵臓のすべてにおいて、L I V - 1 R N A 発現はネガティブであった。胎児では、発現は、腸筋神経叢及び胎児脳を含む発達中の脊髄神経節のみならず、胎児腎臓上皮においてみられた。

#### 【0224】

I S 2 0 0 0 - 0 8 4 研究では、乳房腫瘍における -アクチン（コントロールとして）、E r b B 2、及びL I V - 1 のR N A の相対発現を比較した。その結果は、表4に示されている。すべての試料は、-アクチンR N A の十分な発現を示した。E r b B 2 ( H E R 2 ) R N A の弱から中程度の発現は、殆どのケースの良性及び悪性上皮細胞でみられた。特に、強い発現が四つのケース、浸潤腺管癌の三つのケース、並びに腺管癌インサイツ ( D C I S ) の一つのケースにみられた。L I V - 1 R N A は、良性及び悪性哺乳動物上皮細胞においてみられ、殆どのケースで強度が弱から強であり、その殆どのケースが中レベル発現を示した。この研究に關数する組織試料には、良性細胞と比べて悪性細胞ではL I V - 1 が上方制御されていることを示すものは無かった。

#### 【0225】

##### 実施例6：細胞でのL I V - 1 発現の検出

L I V - 1 を過剰発現し、E r b B 2 を同時に発現しない型としての乳房腫瘍組織の診断は、医者が患者の腫瘍治療を組み立てることを可能にするのに有用である。

乳房腫瘍（又は任意の腫瘍又は他の細胞）におけるL I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 発現及びE r b B 2 発現の検出は、実施例1に記載のマイクロアレイ技術を関連したマイクロアレイ技術手法の通常知識と組み合わせることによって容易におこなえる。

細胞でのL I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 発現の検出は、検出のためのプローブがL I

V-1-164647のECDから誘導されたものであり、配列番号：3のヌクレオチド412から477を包含する配列、又はその補体と緊縮性の条件の下でハイブリダイズする配列を有するcDNA又はRNAである場合に、インサイツハイブリダイゼーションによっておこない得る。好ましくは、このプローブは、配列番号：3のヌクレオチド446からヌクレオチド464を包含する配列、又はその相補性配列とハイブリダイズする。この方法の検出のためのハイブリダイゼーションプロトコールは、関連する文献では標準的なものである。LIV-1-164647発現を検出するために有用な非制限RNAインサイツハイブリダイゼーション技術を、ここに開示する。

#### 【0226】

あるいは、LIV-1及びErbb2の相対発現は、過剰発現が非癌性組織の細胞での発現と比べて、腫瘍組織の細胞での発現が少なくとも1.5倍大きい場合に、LIV-1-164647タンパク質の細胞外ドメインと特異的に結合する本発明の抗-LIV-1-164647抗体と、LIV-1-164647タンパク質を発現しないコントロール細胞；Erbb2を過剰発現するがLIV-1-164647を過剰発現しない細胞（例えばSKBR3細胞）；LIV-1-164647を過剰発現するがErbb2を過剰発現しない細胞（例えばLIV-1又はDNA164647を発現する細胞）を接触させ、そしてこれら接触での検出可能な結合量を比較することによっておこなわれる。抗-LIV-1抗体及び/又は抗-Erbb2抗体結合に関する技術は、細胞表層タンパク質の分野に関する通常技術とここで提供された開示の内容を組み合わせたものを基礎にして容易に決定できる。好ましくは、LIV-1-164647ポリペプチドの発現の検出に使用される抗体は、LIV-1-164647のECDと結合し、好ましくはLIV-1ECDのエピトープA、エピトープB、又はエピトープCと結合し、好ましくはLIV-1-164647ECDと結合する。あるいは、LIV-1ポリペプチドの発現を検出するために使用する抗体は、配列番号：4のアミノ酸114から135を包含するアミノ酸配列、より好ましくは、配列番号：4のアミノ酸126から132を含有する配列を含んでなるポリペプチドと結合する。この方法を実行するために有用な抗体は、ここで開示され、それらは限定することなく、

一つ以上のハイブリドーマATCC (LIV-1.2945.2G1.1C7.2F10); ATCC (LIV-1.2982.4A12.1E8.1C4); ATCC (LIV-1.2983.3G9.1D4.1D7); ATCC (LIV-1.2984.6D6.1H10.2C1); ATCC (LIV-1.2985.4F3.2D6.1D7); ATCC (LIV-1.2987.1D8.1C11.2B7); 及び ATCC (LIV-1.2988.1A7.1F2.1H7) によって生産されるモノクローナル抗体が含まれる。抗体結合研究をおこなうための有用な技術は、ここで開示され、関連する文献に見いだされる。

#### 【0227】

##### 実施例7： 製薬組成物

ここで開示したスクリーニングアッセイによって同定され得る本発明のLIV-1ポリペプチド、又はLIV-1ポリペプチドの断片、例えばECDと特異的に結合する抗体は、癌を含む腫瘍の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

抗体断片が用いられる場合には、標的タンパク質の結合ドメインと特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列と結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び/又は組換えDNA技術によって生成できる(例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993])。LIV-1タンパク質と結合する抗体が細胞内部分と結合し、すべての抗体又は断片が阻害剤として利用される場合、抗体を内在化することが好ましい。リポフェクチン又はリポソームが、細胞へ抗体又は抗体断片を送達するために使用できる。

#### 【0228】

本発明に基づく抗体の治療用製剤は、親油性製剤或いは水性溶液の形態で、所望される程度の純度を持つ活性成分を任意の製薬的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することによって調製されて保存される(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦

形剤、又は安定化剤は、用いられる服用量及び濃度では受容者にとって非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及びノ又はトウイーン(TWEEN)（商品名）、プルロニクス(PLURONICS)（商品名）、及びポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0229】

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。例えば、一つの製剤において、血管内皮細胞(VEGF)と結合する抗体をさらに提供することは所望され得る。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞障害性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量での組み合わせで存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術、或いは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16t

h edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

#### 【0230】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸及びD-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ(D)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日にわたって放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下、並びに起こり得る免疫原性の変化をもたらす。関与している機構に依存する安定化に関して、合理的な方法を工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると見出された場合には、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、並びに特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成され得る。

#### 【0231】

##### 実施例8： 製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質を含む製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを具備する。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの材料から形成されてよい。容器は、状態を検出（例えば、診断すること）又は治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し

得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は、通常、ここで同定された遺伝子産物の活性を妨害することができる抗-腫瘍剤、例えば抗体である。容器上又は添付されるラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品はさらに、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容されるバッファーを含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

### 【0232】

#### 実施例9：腫瘍の診断及び予後

或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍（例えば、癌）治療の格好の標的であるが、同じタンパク質は腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる分泌タンパク質とともに腫瘍の診断及び予後診断に用途が見出される。例えば、腫瘍細胞で増幅された遺伝子のタンパク質産物に対する抗体は腫瘍診断又は予後診断要素として使用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅された遺伝子にコードされるタンパク質（「マーカー遺伝子産物」）の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって観察できる。これらの技術は、増幅された遺伝子が細胞表面タンパク質、例えば成長因子をコードする場合に特に好ましい。このような結合アッセイは、上記5節に実質的に記載されたように実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を重層させることにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

## 【0233】

## 実施例10. 組織又は体液におけるLIV-1の測定

ここに記載されるのは、哺乳動物、好ましくは潜在的にLIV-1を過剰発現する細胞の増殖を被っているヒト患者の体液におけるLIV-1遺伝子産物(例えば、LIV-1-164647タンパク質又はその断片)の存在を測定するための血清学的方法である。この方法は、好ましくは、そのような患者の血清におけるLIV-1細胞外ドメイン又はその断片の存在を検出し、場合によってはその量を定量化し、それにより、患者におけるLIV-1の過剰発現の検出のための比較的侵襲的な方法を提供する。

基本的に、本発明のこの実施態様のプロセスは、潜在的にLIV-1-164647細胞外ドメイン又はその断片を含有する体液の試料を、抗-LIV-1-164647モノクローナル抗体とインキュベート又は他で曝露し、反応生成物の存在を検出することを含む。当業者は、これらの基本的な手法に多くの変法があることを認めるであろう。これらは、例えば、RIA、ELISA、沈降、凝集、補体固定、及び免疫蛍光法を含む。現在好ましい手法において、モノクローナル抗体は、検出のために適当に標識される。本発明で有用な標識は、これらに限られないが、酵素などの検出されるために反応又は誘導体化されるべき部分を含む。酵素標識は、現在用いられている比色分析、分光光度、蛍光分光光度、又はガス定量法の任意のものによって検出できる。酵素は、カルボジイミド、過ヨウ素酸、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなどの架橋分子で抗体に結合させる。これらの手法に使用できる多くの酵素が知られており利用可能である。例としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼプラスペルオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼプラスペルオキシダーゼ及び酸ホスファターゼである。使用しうる蛍光物質は、例えば、フルオレセイン及びその誘導體、ローダミン及びその誘導體、オーラミン、ダンシル、ウンベリフェロン(umbelliferone)、ルシフェリア(luciferia)、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リゾチーム、及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼを含む。抗体は、これらの

標識で周知の方法により修飾してよい。例えば、アルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、イミデート、スクシンイミド、ビド-ジアゾ化ベンザジン(bid-diazotized benzadine)などのカップリング試薬は、上記の蛍光、化学発光、及び酵素標識で抗体を修飾するのに使用できる。種々の標識化技術が、Morrison, Methods in Enzymology 32b: 103 [1974]; Syvanen等, J. Biol. Chem. 284: 3762 [1973]; 及び Bolton及びHunter, Biochem J. 133: 529 [1973]に記載されている。さらに、放射性標識後退は、現在利用可能な任意のカウント法により検出できる。好ましい同位体標識は、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、及び $^{35}\text{S}$ である。

さらに、以下の非限定的なアッセイは、哺乳動物の体液における特定の（好ましくはL I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 遺伝子産物の細胞外ドメイン又は細胞外ドメインの一部に特異的な）抗-L I V - 1 抗体の存在及びその量の決定に有用である。体液は、限定されないが、血清、羊水、乳、臍帯血清、眼水及び硝子体液、及び眼硝子体ゲルを含む。

#### 【0234】

ヒト化抗-L I V - 1 モノクローナル抗体を用いたプレート結合活性アッセイ

ここに記載される抗-L I V - 1 抗体を検定する方法は、この様な方法の例として表され、限定する意味ではない。好ましくはL I V - 1 - 1 6 7 6 4 7 遺伝子産物の細胞外ドメインに特異的な抗-L I V - 1 抗体の標準化製剤、コントロール及び血清サンプルを、検定用希釈液（P B S / 0 . 5 % B S A / 0 . 0 5 % ポリソルベート20 / 0 . 0 1 % チメロサル）で希釈した。標準曲線として使用できる濃度の範囲を測るために、標準化抗-L I V - 1 抗体の希釈物を調製した。サンプルは標準曲線内に入るように希釈した。

コーティングバッファークのコート抗原（0 . 0 5 Mの炭酸ナトリウムバッファーク中の抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 抗体）のアリコート、マイクロタイタープレートの各々のウェルに添加して2 - 8 で12 - 72時間インキュベートした。コーティング溶液を取り除き、各々のウェルを水で6回洗浄し、次いで余分な水を取り除くためにプロットした。検定希釈液のアリコートを各々のウェルに加え、攪拌しながら室温で1 - 2時間インキュベートした。ウェルを前記段階のよ

うにして洗浄した。希釈した標準物、コントロール及びサンプル溶液のアリコートウェルに加え、コーティング抗原に抗体を結合させるために攪拌しながら1時間室温でインキュベートした。ウェルは、前の段階のようして水で再び洗浄した。

ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(HRP-コンジュゲート、ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートしたヤギ抗-ヒトIgGFc; Organon Teknika カタログ#55253又は等価物)を最高及び最低基準の間の適切な光密度範囲を有するように検定希釈液で希釈した。HRPコンジュゲート溶液のアリコートを各々のウェルに加え、攪拌しながら1時間室温でインキュベートした。ウェルを前記の段階のようして水で洗浄した。

基質溶液(PBS中12.5mlの4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中o-フェニレンジアミン(OPD)の5mgタブレット(シグマP6912又は等価物))のアリコートを各ウェルに加え、着色するために十分な時間(約8-10分)室温暗所でインキュベートした。反応を4.5N硫酸のアリコートで停止させた。光学密度は、検出吸光度の490-492nm及び参照吸光度の405nmで読取られた。標準曲線のデータがプロットされ、コントロール及びサンプルの結果は標準曲線から決定される。

### 【0235】

#### 実施例11. 治療方法

本発明に従って、抗-LIV-1抗体又は他のLIV-1活性阻止分子が、健常者で見られるErbb2発現を越えるErbb2の同時発現の有又は無においてLIV-1遺伝子産物の過剰発現及び/又は活性化によって特徴づけられる種々の状態を治療するのに使用されることが考えられる。これらの抗体又はこれらに限られないが小有機又は無機分子、ペプチド、アンチセンス分子などを含む他の化合物によって治療される状態又は疾患の例は、良性又は悪性腫瘍(例えば、乳房、前立腺、肺、及び大腸、並びに、肝臓、腎臓、膀胱、胃、卵巣、結腸直腸、膵臓、子宮頸部、甲状腺、肝細胞の癌;肉腫;膠芽細胞腫;及び種々の頭部及び頸部の腫瘍);白血病及びリンパ悪性疾患;ニューロン、グリア、星状、視床下部及び他の腺、マクロファージ、上皮、間質及び胞胚腔の疾患;及び炎症、脈管形成

及び免疫学的疾患を含む。L I V - 1 過剰発現 - 関連疾患の治療に抗体が用いられる場合、抗体は、好ましくは抗-L I V - 1 - 1 6 4 6 4 7 抗体、より好ましくは配列番号：4のアミノ酸114からアミノ酸135までを含むアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合するヒト化抗体である。

本発明の抗腫瘍剤、例えば抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路などにより投与される。抗体の静脈内投与が好ましい。

#### 【0236】

他の治療的養生法を本発明の抗癌剤、例えば抗体の投与に組み合わせてもよい。例えば、このような抗癌剤で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学治療薬を投与してもよい。このような化学治療薬の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療薬は、抗腫瘍剤、例えば抗体の投与に先立って又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。抗体は、タモキシフェンなどの抗-エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗-プロゲステロン (EP616812参照) の、これらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

また、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えばE r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、又は血管内皮因子 ( V E G F ) に結合する抗体を投与することも好ましい。あるいは、又はそれに加えて、同じものに結合する、或いは2又はそれ以上の異なる抗原と結合する2又はそれ以上の抗体を患者に同時投与してもよい。ときどきは、患者に1又はそれ以上のサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、ここの抗体は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗体を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明の抗体を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの

抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

#### 【0237】

化学治療薬の組合せ投与が望ましい場合、組合せ投与はいずれかの順序での同時投与を含むが、好ましくは時間差をとり、両方（又は全て）の活性剤がそれらの生物学的活性を同時に発揮する。このような化学治療薬の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまた Chemotherapy Service M.C. Perry編, Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療薬は、抗腫瘍剤、例えば抗体の投与に先立って又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。抗体は、タモキシフェンなどの抗-エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗-プロゲステロン（EP616812参照）の、これらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

また、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば血管内皮因子（VEGF）に結合する抗体を投与することも好ましい。あるいは、又はそれに加えて、2又はそれ以上の抗-LIV-1抗体を患者に同時投与してもよい。ときどきは、患者に1又はそれ以上のサイトカインを投与することも有利である。抗-LIV-1抗体は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて抗-LIV-1抗体を投与する。しかしながら、同時投与、又は抗-LIV-1抗体を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤と抗-LIV-1抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

#### 【0238】

上記の治療的養生法に加えて、患者に癌細胞の外科的切除及び/又は放射線治療を施してもよい。

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1 - 20\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が、例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入により患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$

以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

#### 【0239】

##### 実施例12 . 抗体結合実験

遺伝子増幅実験の結果は、腫瘍（癌）細胞に対するLIV-1ポリペプチドの効果の存在を検出する又は阻害する抗-LIV-1-164647抗体の能力が試験される抗体結合実験によって更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロ抱合体抗体を含み、それらの調製は以下に記載する。

抗体結合実験は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について被験試料分析物と競合する能力による。被験試料中の（腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる）標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始める標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に固定化し、抗体に結合した標準物及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようにする。

#### 【0240】

サンドウィッチアッセイは2つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて被験試料分析物は固体支持体上に固定化された第1の抗体に結合し、その後第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第2の抗体はそれ自体が検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチアッセイ）、あるいは検出可能部分で標識された抗-免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチアッセイ）。

)。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はE L I S Aアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

免疫組織化学のために、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。

#### 【0241】

##### 実施例13 . 細胞ベースの腫瘍アッセイ

細胞ベースアッセイ及び腫瘍（例えば、癌）の動物モデルを用いて、遺伝子増幅アッセイの知見を確認し、ここで同定される遺伝子と腫瘍形成細胞成長の進行及び病理との関係をさらに理解することができる。ここで同定された遺伝子産物の腫瘍又は癌の進行及び病理における役割は、ここで遺伝子を増幅すると同定された原発腫瘍細胞又は細胞系を用いて試験することができる。このような細胞は、例えば、上記した乳房及び前立腺癌細胞及び細胞系を含む。

異なる方法では、特定の腫瘍に関連することが知られた細胞型の細胞をこのcDNAで形質移入し、これらのcDNAの過剰成長誘発能力を分析する。適当な細胞は、例えば、B104-1-1細胞株（neuプロトオンコジーンで形質移入された安定なNIH-3T3細胞系）及びras-形質移入NIH-3T3細胞等の安定な腫瘍細胞系を含み、これらは所望の遺伝子で形質移入し、そして腫瘍形成的成長を観察できる。このような形質移入細胞系は、次いで、形質転換細胞の成長に対する細胞分裂停止又は細胞障害性活性の発揮により、又は抗体依存性細胞性細胞障害性（ADCC）の媒介により、ポリ-又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の腫瘍形成細胞成長を阻害する能力を試験するのに使用できる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、さらに、癌治療用の候補薬の同定に使用できる。

さらに、（下記のような）トランスジェニック動物の腫瘍に由来する初代培養は、ここでの細胞ベースアッセイに使用できるが、安定な細胞系が好ましい。トランスジェニック動物から連続細胞系を誘導する技術はこの分野で良く知られている（例えば、Small等, Mol. Cell. Biol. 5: 642-648 [1985]参照）。

#### 【0242】

##### 実施例14 . 動物モデル

種々の良く知られた動物モデルが、腫瘍の進行及び病原に関しここで同定された遺伝子の役割を更に理解するために利用でき、さらに抗体、及び小分子アゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために使用することができる。これらのモデルのインビボ性質により、特にヒト患者における反応を予測できる。腫瘍及び癌（例えば、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌など）の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植、又はオルトピン(orthopin)移植、例えば大腸組織に移植された大腸癌細胞により、腫瘍細胞を同系マウスに導入することにより作成される。（例えば、1997年9月18日に発行されたPCT公報WO 97/33551参照。）

癌遺伝子の研究におそらく最もしばしば用いられる動物種は、免疫不全マウス、特にヌードマウスである。低下/形成不全を持つヌードマウスがヒト腫瘍異種移植の宿主としての役割を演じるという観察は、この目的のための広い用途を導いた。常染色体劣性 $nu$ 遺伝子が、例えば、ASW、A/He、AKR、BALB/c、B10.LP、C17、C3H、C57BL、C57、CBA、DBA、DDD、I/st、NC、NFR、NFS、NFS/N、NZB、NZC、NZW、P、RIII及びSJLを含むヌードマウスの極めて多数の異なる共通遺伝子系統に導入された。さらに、ヌードマウス以外の遺伝的な免疫不全を持つ広範な他の動物が生育され、腫瘍異種移植のレシピエントとして用いられた。さらなる詳細については、例えば、The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven及びB. Winograd編, CRC Press, Inc., 1991を参照。

#### 【0243】

これらの動物に導入される細胞は、周知の腫瘍/癌細胞系、例えば上記列挙した腫瘍細胞系、及び、例えばB104-1-1細胞系（neuプロトオンコジーンで形質移入された安定NIH-3T3細胞系）；ras-形質移入NIH-3T3細胞；Caco-2（ATCC HTB-37）、中程度に良く分化したグレードIIヒト大腸腺癌細胞系、HT-29（ATCC HTB-38）から、あるいは腫瘍及び癌から誘導す

ることができる。腫瘍又は癌細胞の試料は、手術を受けている患者から、液体窒素中での凍結及び保存を含む標準的な条件を用いて得ることができる (Karmali 等, Br. J. Cancer 48, 689-696 [1983])。腫瘍細胞は、ヌードマウスなどの動物に、種々の手法によって導入できる。マウスの皮下 (s.c.) 空間は、腫瘍移植に非常に好ましい。腫瘍は、固体ブロックとして、トロチャー (trochar) を用いてニードル生検として、細胞懸濁物として s.c. 移植できる。固体ブロック又はトロチャー移植のために、適切な大きさの腫瘍組織断片が s.c. 空間に導入される。細胞懸濁物は、原発腫瘍又は安定な腫瘍細胞系から新たに調製され、皮下注射される。また腫瘍細胞は、皮下移植として注射することもできる。この位置において、移植細胞が皮膚結合組織の下層と s.c. 組織との間に着床される。Boven及びWinograd (1991), 上掲。

乳癌の動物モデルは、例えば、ラット神経芽腫細胞 (それから neu 癌遺伝子が最初に単離される)、又は neu 形質転換 NIH-3T3 細胞をヌードマウスに移植することにより、基本的には Drebin 等, PNAS USA 83, 9129-9133 (1986) に記載されているように生成される。

#### 【0244】

同様に、大腸癌の動物モデルは、大腸癌細胞を動物、例えばヌードマウスに継代し、これらの動物における腫瘍の発現を導くことにより生成される。ヌードマウスにおけるヒト大腸癌の同所性移植モデルは、例えば、Wang 等, Cancer Research 54, 4726-4728 (1994) 及び Too 等, Cancer Research 55, 681-684 (1995) に記載されている。このモデルは、いわゆる AntiCancer, Inc. (San Diego, California) から市販の「METAMOUSE (商品名)」に基づく。

動物に生じた腫瘍は、取り出してインビトロで培養することができる。インビトロ培地からの細胞は、次いで動物に継代することができる。これらの腫瘍は、さらなる試験及び薬物スクリーニングの標的として提供され得る。あるいは、継代から得られる腫瘍は単離でき、継代前細胞及び 1 又はそれ以上の継代後に単離した細胞の RNA を、対象とする遺伝子の識別可能な発現について分析する。このような継代技術は、周知の腫瘍又は癌細胞系で実施することができる。

例えば、Meth A、CMS 4、CMS 5、CMS 21、及び WEHI-16

4 が B A L B / c 雌マウスの線維肉腫に化学的に導入され (DeLeo等, J. Exp. Med. 146, 720 [1977])、それは、種々の薬剤の抗-腫瘍活性の研究のための高度に制御可能なモデル系を提供する (Palladino等, J. Immunol. 138, 4023-4032 [1987])。簡便には、腫瘍細胞は細胞培地中でインビトロで成長させる。動物に注射する前に、細胞系は洗浄してバッファー中に約  $10 \times 10^6$  から  $10 \times 10^7$  細胞 / ml の細胞密度で懸濁する。次いで動物を 10 から  $100 \mu\text{l}$  の細胞懸濁物で皮下感染し、腫瘍が現れるまで 1 から 3 週間放置する。

#### 【0245】

さらに、最も完全に研究された実験的腫瘍の一つであるマウスのルイス肺 (3LL) 癌腫は、研究用腫瘍モデルとして用いることができる。この腫瘍モデルにおける有効性は、肺の小細胞癌腫 (SCCL) と診断されたヒト患者の治療における有利な効果と相関していた。この腫瘍は、影響を受けたマウスからの腫瘍断片又は培養により維持された細胞を注射することで正常マウスに導入でき (Zupi等, Br. J. Cancer 41: suppl. 4: 309 [1980])、証拠は、腫瘍が一つの細胞の注射からでも開始され、極めて高い割合で感染した腫瘍細胞が生存することを示している。この腫瘍モデルに関する更なる情報については、Zacharski, Haemostasis 16, 300-320 [1986]を参照のこと。

移植された腫瘍の動物モデルにおける被験化合物の有効性を評価する一つの方法は、治療前後での腫瘍の大きさを測定することである。伝統的に、移植した腫瘍の大きさは、二又は三次元のスライドキャリパーで測定される。二次元に制限された測定は、腫瘍の大きさを正確に反映せず、従って、通常は数式を用いて対応する容積に換算される。しかしながら、腫瘍の大きさの測定は極めて不正確である。候補薬の治療効果は、治療-誘発性の成長遅延及び特異的な成長遅延としてより良く記述できる。腫瘍成長の記述における他の重要な変数は、腫瘍容積倍加時間である。Rygaard及びSpang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu及びSheng編, Basel, 1989, 301によって報告されたプログラムなどの、腫瘍成長の計算及び記述のためのコンピュータプログラムも利用可能である。しかし、処置後の壊死及び炎症反応が実際には少なくとも初期に腫瘍の大きさを増大させ得ることを注記しておく。従って、これらの変化は、形

態学的方法及びフローサイトメトリー分析を組み合わせて、注意深く観察する必要がある。

#### 【0246】

組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここに同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象とする動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒツジ、ヤギ、及び非-ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、全核マイクロインジェクション（Hoppe及びWanger, 米国特許第4,873,191号）；胚系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移（例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]）；胚性肝細胞での遺伝子標的化（Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cel. Biol. 3, 1803-1814 [1983]）；精子媒介遺伝子転移（Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989]）を含む。概説のためには、例えば、米国特許第4,736,866号を参照のこと。

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、その一部にのみ導入遺伝子を有するもの（「モザイク動物」）を含む。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又はコンカテマー、例えば頭部対頭部又は頭部対尾部の直列型として組み込まれる。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入も、例えば、Lasko等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992)の技術に従って可能である。

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によって監視できる。例えば、導入遺伝子の組み込みの確認にサザンブロット分析又はPCR増幅が用いられる。次いで、mRNA発現のレベルは、インサイトハイブリッドライゼーション、ノーザンブロット分析、PCR、又は免疫組織化学などの技術を用いて分析できる。動物は、腫瘍又は癌発生の徴候についてさらに試験される。

#### 【0247】

あるいは、動物の胚性細胞に導入された同ポリペプチドをコードする変更ゲノ

ムDNAと、そのポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ここに同定するLIV-1-164647ポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ロックアウト」動物を作成することができる。例えば、特にLIV-1ポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従って当該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。特にLIV-1ポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを確認するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは変異の無いフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas and Capecchi, Cell, 51: 503 (1987)を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞系に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915 (1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入され、キメラ集合体を形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、「ロックアウト」動物を作ると言われる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ロックアウト動物は、LIV-1ポリペプチドが存在しないことによるある種の病理的状态及び病理的状态の進行に対して防御する能力によって特徴付けられる。

#### 【0248】

ここに同定されるポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び他の候補薬の有効性も、自然発生の動物腫瘍の治療において調べることができる。このような研究のための適切な標的は、ネコ口腔扁平上皮癌(SCC)である。ネコ口腔SCCは高度に浸潤性の悪性腫瘍で、ネコに最も普通に見られる口腔悪性腫瘍であり、この種に報告される口腔腫瘍の60%以上を占める。それは、離れた部位には殆ど転移しないが、この転移の低い発生率は単にこの腫瘍を持つネコの短い生存

期間を反映しているにすぎない。これらの腫瘍は通常手術できないが、主にネコの口腔の解剖学的形状による。現在では、この腫瘍の有効な治療法は存在しない。研究に入る前に、各々のネコに完全な臨床検査、生体組織検査を施し、コンピュータ断層撮影（CT）によりスキャンした。舌下口腔扁平上皮細胞腫瘍を持つと診断されたネコは研究から排除した。舌はこの腫瘍のために麻痺し始め、治療によりこの腫瘍が消滅した後でも、動物は自分で餌を取ることができないであろう。各々のネコを長期にわたって繰り返し治療する。治療期間中、毎日及び引き続き行われる再チェックの時点で腫瘍の写真を撮影した。治療の後、各ネコに再度CTスキャンを施した。CTスキャン及び胸部レントゲンは、その後8週間ごとに評価した。データは、対照群と比較した生存数、反応性及び毒性における相違について評価した。ポジティブ反応は、腫瘍の縮小、好ましくは生存の質の向上又は生存期間の延長を必要とする。

さらに、他の自発的動物腫瘍、例えばイヌ、ネコ、及びヒヒの線維肉腫、腺癌、リンパ腫、クロンドローマ(chondroma)、平滑筋肉腫も試験できる。これらのイヌ及びネコでの乳腺癌は、その発現及び挙動がヒトのものに極めて類似しているので、好ましいモデルである。しかし、このモデルの使用は動物におけるこの型の腫瘍の発生率によって制限される。

#### 【0249】

##### 実施例15： 候補薬についてのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定される遺伝子にコードされるポリペプチドと結合又は複合体を形成する化合物、あるいはコードされるポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために計画される。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに利用可能なアッセイ、特に小分子候補薬の同定に適したものにアッセイを含む。小分子とは、合成有機又は無機化合物を含むと考え、それらは、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合体、特に、限定されないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。ア

ッセイは、種々の形式で実施でき、この分野で良く特徴付けられたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースのアッセイを含む。

全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定される核酸にコードされるポリペプチドと、それら2成分が相互作用するのに十分な時間接触させることで共通している。

#### 【0250】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチドのレセプター即ち候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、そのペプチドを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

#### 【0251】

候補化合物がここで同定される遺伝子にコードされる特定のLIV-1ポリペプチドと相互作用するが結合しない場合、その相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、共免疫沈降、及び密度勾配遠心又はクロマトグラフィカラムを通す共精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9578-9582 (1

991) ] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray及びNathans [ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5789-5793 (1991) ] に開示されているように観察することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化因子は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構築に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

#### 【0252】

ここで同定されるLIV-1-コード化遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験することができる：通常は、増幅された遺伝子の生成物及び細胞内又は外成分を含む反応混合物を、条件下で2つの生成物が相互作用及び結合する時間にわたって調製する。被験化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は被験化合物有り又は無しで実施する。さらに、第3の反応混合物に偽薬を添加してポジティブ対照としてもよい。混合物中に存在する被験化合物と細胞内又は外成分との結合（複合体形成）は上記のように観察する。対照反応において複合体が形成され、被験化合物を含む反応混合物ではしないことは、被験化合物が被験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

#### 【0253】

### 実施例16：腫瘍治療のための他の組成物及び方法

ここで同定した遺伝子の増幅を伴う腫瘍の治療に有用な組成物は、限定されな  
いが、抗体、小有機及び無機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス及  
びリボザイム分子、三重螺旋分子などを含み、標的遺伝子産物の発現又は活性を  
阻害するものである。

例えば、アンチセンスRNA及びRNA分子は、標的mRNAにハイブリッド  
形成してタンパク質翻訳を防止することによりmRNAの翻訳を直接阻止する。  
アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレ  
オチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌク  
レオチドが好ましい。

#### 【0254】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リ  
ボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレ  
オチド鎖切断的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切  
断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current B  
iology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、番号WO 97/33551(19  
97年9月18日発行)を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌク  
レオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩  
基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の  
一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さら  
なる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551、上掲を参照。

これらの分子は上記のスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組み合  
わせにより、又は当業者に知られた他のスクリーニング技術により同定できる。

#### 【0255】

##### 材料の寄託

次の細胞系をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801  
ユニバーシティ プルバード マナッサス、バージニア、20110-2209  
米国(ATCC)に寄託した：

材料	ATCC寄託番号	寄託日
プラスミド：		
DNA164647 1803-1	PTA-1534	2000年3月21日
ハイブリドーマ：		
LIV-1.2945.2G1.1C7.2F10	PTA-2961	2001年1月23日
LIV-1.2982.4A12.1E8.1C4	PTA-2962	2001年1月23日
LIV-1.2983.3G9 1D4.1D7	PTA-2963	2001年1月23日
LIV-1.2984.6D6.1H102C1	PTA-2964	2001年1月23日
LIV-1.2985 4F3.2D6 1D7	PTA-2960	2001年1月23日
LIV-1.2987 1D8.1C11.2B7	PTA-2959	2001年1月23日
LIV-1.2988 1A7.1F2.1H7	PTA-2965	2001年1月23日

## 【0256】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

## 【0257】

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

## 【0258】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

#### 【図面の簡単な説明】

【F i g 1】 F i g 1 A - 1 C は、L I V - 1 タンパク質の核酸配列（配列番号：1（コード化配列）、F i g 1 A - 1 から 1 A - 2）、並びにアミノ酸配列（配列番号：2、F i g 1 B）。破線で上線が引かれている部分は、シグナル配列（約アミノ酸1から20）であると予想される。L I V - 1 タンパク質の予想される細胞外ドメインは、破線によって下線が引かれたL I V - 1 アミノ酸配列の一部（およそアミノ酸24から312）である。予想される膜貫通ドメインは、約アミノ酸318から約アミノ酸367まで伸張している。ドメインのおおよその位置は、標準的なハイドロパシー分析プログラムを使用して予想された。L I V - 1 の一部分をコードし、マイクロアレイ分析で有用な核酸配列（配列番号：5）は、F i g 1 C に示されている。

【F i g 2】 F i g 2 A - 2 B は、それぞれDNA 164647に相当する核酸配列とアミノ酸配列である。F i g 2 A 1 - 2 A 5 は、天然配列L I V - 1 タンパク質をコードするcDNAである、DNA 164647のヌクレオチド配列である。配列番号：3は、DNA 164647のコード鎖である。F i g 2 B は、DNA 164647によってコードされている天然L I V - 1 ポリペプチドの誘導アミノ酸配列（配列番号：4）である。

【F i g 3】 F i g 3 - 1 から 3 - 1 1 は、配列番号：1及び配列番号：3の核酸配列のアライメントである。

【F i g 4】 F i g 4-1から4-3は、配列番号：2及び配列番号：4のアミノ酸配列である。配列は、配列番号：4の約アミノ酸740を超える、ECD（配列番号：4のアミノ酸130付近）及びC末端領域において異なる。一つのアミノ酸の違いが、配列番号：4のアミノ酸651に見出された。

【F i g 5】 ここに開示されたような、制限酵素消化選択段階までのFLIPクローニング方法を例示するフローチャート。ベクター配列の側方にある陰付き囲いは、標的遺伝子配列を示す。

【F i g 6】 抗-LIV-164647モノクローナル抗体が、最初にDNA164647で形質移入された3T3細胞の表面と結合する、蛍光活性化セルソーター（FACS）分析のグラフ表示。「pRK5」という用語は、LIV-1-164647挿入物を欠くベクターで形質移入された細胞に相当する。「pRK5-LIV-1-164647」という用語は、完全長LIV-1-164647を発現するベクターで形質移入した細胞に相当する。

【F i g 7】 完全長LIV-1-164647タンパク質をコードするDNAで形質移入した細胞の表層に、LIV-1-164647細胞外ドメインが発現していることを示す棒グラフ。

【配列表】

## Sequence Listing

<110> Genentech, Inc. et al.  
 5 <120> Composition and Methods for Treatment of Cancer  
 <130> P1803R1PCT  
 10 <141> 2001-01-25  
 <150> US 60/177,951  
 <151> 2000-01-25  
 15 <150> US 60/195,761  
 <151> 2000-04-10  
 <160> 19  
 20 <210> 1  
 <211> 3461  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapien  
 25 <400> 1  
 ctctgtgcga attcggcacg agaccgcgtg ttccgcctcg gtagagattt 50  
 ctogaagaca ccagtgggcc cgtgtggaac caaacctgcg cgcgtggcgg 100  
 30 ggccgtggga caaccaggcc gcggagacga aggcgcaatg gcgaggaagt 150  
 tatctgtaat cttgatcctg acctttgccc tctctgtcac aaatcccctt 200  
 catgaactaa aagcagctgc ttccccccag accactgaga aaattagtc 250  
 35 gaattgggaa cctggcatta atgttgacct ggcaatttcc acacggcaat 300  
 atcatctaca acagcttttc taccgctatg gagaaaataa ttctttgtca 350  
 40 gttgaagggt tcagaaaatt acttcaaaat ataggcatag ataagattaa 400  
 aagaatccat atacaccatg accacgacca tcactcagac cagagcctc 450  
 actcagacca tgagcgtcac tcagaccatg agcatcactc agaccacyag 500  
 45 catcactctg accataatca tgctgcttct ggtaaaaata agcgaaaagc 550  
 tctttgccc aaccatgact cagatagttc aggtaaagat cctagaaca 600  
 50 gccaggggaa aggagctcac cgaccagaac atgccagtgg tagaaggaat 650  
 gtaaggaca gtgttagtgc tagtgaagtg acctcaactg tgtacaacac 700  
 tgtctctgaa ggaactcact ttctagagac aatagagact ccaagacctg 750  
 55 gaaaactctt ccccaaagat gtaagcagct ccactccacc cagtgtcaca 800  
 tcaaagagcc gggtgagccg gctggctggt agyaaaacaa atgaatctgt 850  
 60 gagtgagccc cgaaaagget ttatgtatcc cagaaacaca aatgaaaatc 900  
 ctcaggagtg tttcaatgca tcaaagctac tgacatctca tggcatgggc 950

atccaggttc cgctgaatgc aacagagttc aactatctct gtccagccat 1000  
 catcaaccaa attgatgcta gatcttctct gattcataca agtgaaaaga 1050  
 5 aggcctgaaat cccctcaaaag acctattcat tacaatatgc ctggggttgg 1100  
 ggttttatag ccatttccat catcagtttc ctgtctctgc tgggggttat 1150  
 10 cttagtgcct ctcatgaatc ggggtgtttt caaatttctc ctgagtttcc 1200  
 ttgtggcact ggccgttggg accttgagtg gtgatgcttt ttacacctt 1250  
 ctccacatt ctcatgaag tcaccacat agtcatagcc atgaagaacc 1300  
 15 agcaatggaa atgaaaagag gaccactttt cagtcatctg tcttctcaaa 1350  
 acatagaaga aagtgcctat ttgtattcca cgtggaaggg tctaacagct 1400  
 ctaggagggc tgtatttcat gtttcttgtt gaacatgtcc tcacattgat 1450  
 20 caaacaattt aaagataaga agaaaaagaa tcagaagaaa cctgaaaatg 1500  
 atgatgatgt ggagattaag aagcagttgt ccaagtatga atctcaactt 1550  
 25 tcaacaaatg aggagaaagt agatacagat gatcgaactg aaggctattt 1600  
 acgagcagac tcacaagagc cctcccactt tgattctcag cagcctgcag 1650  
 tcttgggaaga agaagaggtc atgatagctc atgctcatcc acaggaagtc 1700  
 30 tacaatgaat atgtaccag aggggtcaag aataaatgcc attcacattt 1750  
 ccacgatata ctggccagt cagacgatct cattcaccac catcatgact 1800  
 35 accatcatat tctccatcat caccaccacc aaaaccacca tctcaccagt 1850  
 cacagccagc gctactctcg ggaggagctg aaagatgccg gcgtcgccac 1900  
 40 tttggcctgg atgggtataa tgggtgatgg cctgcacaat ttcagcgatg 1950  
 gcctagcaat tgggtctgct tttactgaag gcttatcaag tggtttaagt 2000  
 acttctgttg ctgtgtctg tcatgagttg cctcatgaat taggtgactt 2050  
 45 tgctgttcta ctaaaggctg gcatgacogt taagcagget gtcctttata 2100  
 atgcattgtc agccatgctg gcgtatcttg gaatggcaac aggaatttcc 2150  
 50 attggtcatt atgctgaaaa tgtttctatg tggatatttg cacttactgc 2200  
 tggcttattc atgtatgtg ctctggttga tatggtaact gaaatgctgc 2250  
 acaatgatgc tagtgaccat ggatgtagcc gctgggggta tttcttttta 2300  
 55 cagaatgctg ggatgctttt gggttttgga attatgttac ttattccata 2350  
 tttgaacata aaatcgtgtt cgtataaatt tctagttaag gtttaaatgc 2400  
 60 tagagtagct taaaaagttg tcatagtttc agtagtcat agggagatga 2450  
 gtttgtatgc tgfactatgc agcgtttaaa gttagtgggt tttgtgattt 2500

```

ttgtattgaa tattgctgtc tgttacaag tcagttaaag gtacgtttta 2550
atatttaagt taitctatct tggagataaa atctgtatgt gcaattcacc 2600
5 ggtattacca gtttattatg taaacaagag atttggcatg acatgttctg 2650
tatgtttcag ggaaaaatgt ctttaatgct ttttcaagaa ctaacacagt 2700
tattcctata ctggatttta ggtctctgaa gaactgctgg tgtttaggaa 2750
10 taagaatgtg catgaagcct aaaataccaa gaaagcttat actgaattta 2800
agcaaagaaa taaaggagaa aagagaagaa totgagaatt ggggagggcat 2850
15 agattcttat aaaaatcaca aaatttgttg taaattagag gggagaaatt 2900
tagaattaag tataaaaagg cagaattagt atagagtaca ttcattaaac 2950
atTTTTgtca ggattatttc ccgtaaaaao gtagttagca ctctcatata 3000
20 ctaattagtg tacatttaac tttgtataat acagaaatct aaatatattt 3050
aatgaattca agcaatatac acttgaccaa gaaattggaa tttcaaatg 3100
25 ttcgtcgggg ttatatacca gatgagtaca gtgagttagt tatgtatcac 3150
cagactgggt tattgccaag ttatatatca ccaaaagctg tatgactgga 3200
tgttctgggt acctggttta caaaattatc agagttagta aactttgata 3250
30 tatatgagga tattaaaact aactaagta tcatttgatt cgattcagaa 3300
agtactttga tatctctcag tgcttcagtg ctatcattgt gagcaattgt 3350
35 ctttatatac ggtactgtag ccatactagg cctgtctgtg gcattctcta 3400
gatgtttctt ttttacacaa taaattcctt atatcagctt gaaaaaaaaa 3450
aaaaaaaaa a 3461
40 <210> 2
<211> 752
<212> PRT
<213> Homo sapien
45 <400> 2
Met Ala Arg Lys Leu Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Phe Ala Leu
  1          5          10          15
50 Ser Val Thr Asn Pro Leu His Glu Leu Lys Ala Ala Ala Phe Pro
          20          25          30
Gln Thr Thr Glu Lys Ile Ser Pro Asn Trp Glu Ser Gly Ile Asn
          35          40          45
55 Val Asp Leu Ala Ile Ser Thr Arg Gln Tyr His Leu Gln Gln Leu
          50          55          60
60 Phe Tyr Arg Tyr Gly Glu Asn Asn Ser Leu Ser Val Glu Gly Phe
          65          70          75
Arg Lys Leu Leu Gln Asn Ile Gly Ile Asp Lys Ile Lys Arg Ile

```

	80	85	90
	His Ile His His Asp 95	His Asp His His Ser 100	Asp His Glu His His 105
5	Ser Asp His Glu Arg 110	His Ser Asp His Glu 115	His His Ser Asp His 120
10	Glu His His Ser Asp 125	His Asn His Ala Ala 130	Ser Gly Lys Asn Lys 135
	Arg Lys Ala Leu Cys 140	Pro Asp His Asp Ser 145	Asp Ser Ser Gly Lys 150
15	Asp Pro Arg Asn Ser 155	Gln Gly Lys Gly Ala 160	His Arg Pro Glu His 165
	Ala Ser Gly Arg Arg 170	Asn Val Lys Asp Ser 175	Val Ser Ala Ser Glu 180
20	Val Thr Ser Thr Val 185	Tyr Asn Thr Val Ser 190	Glu Gly Thr His Phe 195
25	Leu Glu Thr Ile Glu 200	Thr Pro Arg Pro Gly 205	Lys Leu Phe Pro Lys 210
	Asp Val Ser Ser Ser 215	Thr Pro Pro Ser Val 220	Thr Ser Lys Ser Arg 225
30	Val Ser Arg Leu Ala 230	Gly Arg Lys Thr Asn 235	Glu Ser Val Ser Glu 240
	Pro Arg Lys Gly Phe 245	Met Tyr Ser Arg Asn 250	Thr Asn Glu Asn Pro 255
35	Gln Glu Cys Phe Asn 260	Ala Ser Lys Leu Leu 265	Thr Ser His Gly Met 270
40	Gly Ile Gln Val Pro 275	Leu Asn Ala Thr Glu 280	Phe Asn Tyr Leu Cys 285
	Pro Ala Ile Ile Asn 290	Gln Ile Asp Ala Arg 295	Ser Cys Leu Ile His 300
45	Thr Ser Glu Lys Lys 305	Ala Glu Ile Pro Pro 310	Lys Thr Tyr Ser Leu 315
	Gln Ile Ala Trp Val 320	Gly Gly Phe Ile Ala 325	Ile Ser Ile Ile Ser 330
50	Phe Leu Ser Leu Leu 335	Gly Val Ile Leu Val 340	Pro Leu Met Asn Arg 345
55	Val Phe Phe Lys Phe 350	Leu Leu Ser Phe Leu 355	Val Ala Leu Ala Val 360
	Gly Thr Leu Ser Gly 365	Asp Ala Phe Leu His 370	Leu Leu Pro His Ser 375
60	His Ala Ser His His 380	His Ser His Ser His 385	Glu Glu Pro Ala Met 390

	Glu	Met	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Phe	Ser	His	Leu	Ser	Ser	Gln	Asn	395	400	405
5	Ile	Glu	Glu	Ser	Ala	Tyr	Phe	Asp	Ser	Thr	Trp	Lys	Gly	Leu	Thr	410	415	420
	Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Tyr	Phe	Met	Phe	Leu	Val	Glu	His	Val	Leu	425	430	435
10	Thr	Leu	Ile	Lys	Gln	Phe	Lys	Asp	Lys	Lys	Lys	Lys	Asn	Gln	Lys	440	445	450
	Lys	Pro	Glu	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Glu	Ile	Lys	Lys	Gln	Leu	Ser	455	460	465
15	Lys	Tyr	Glu	Ser	Gln	Leu	Ser	Thr	Asn	Glu	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	470	475	480
20	Asp	Asp	Arg	Thr	Glu	Gly	Tyr	Leu	Arg	Ala	Asp	Ser	Gln	Glu	Pro	485	490	495
	Ser	His	Phe	Asp	Ser	Gln	Gln	Pro	Ala	Val	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	500	505	510
25	Val	Met	Ile	Ala	His	Ala	His	Pro	Gln	Glu	Val	Tyr	Asn	Glu	Tyr	515	520	525
	Val	Pro	Arg	Gly	Cys	Lys	Asn	Lys	Cys	His	Ser	His	Phe	His	Asp	530	535	540
30	Thr	Leu	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Leu	Ile	His	His	His	His	Asp	Tyr	545	550	555
35	His	His	Ile	Leu	His	His	His	His	His	Gln	Asn	His	His	Pro	His	560	565	570
	Ser	His	Ser	Gln	Arg	Tyr	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gly	575	580	585
40	Val	Ala	Thr	Leu	Ala	Trp	Met	Val	Ile	Met	Gly	Asp	Gly	Leu	His	590	595	600
	Asn	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Gly	605	610	615
45	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Ala	Val	Phe	Cys	His	Glu	620	625	630
50	Leu	Pro	His	Glu	Leu	Gly	Asp	Phe	Ala	Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	635	640	645
	Met	Thr	Val	Lys	Gln	Ala	Val	Leu	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Met	650	655	660
55	Leu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Met	Ala	Thr	Gly	Ile	Phe	Ile	Gly	His	Tyr	665	670	675
	Ala	Glu	Asn	Val	Ser	Met	Trp	Ile	Phe	Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Leu	680	685	690
60	Phe	Met	Tyr	Val	Ala	Leu	Val	Asp	Met	Val	Pro	Glu	Met	Leu	His	695	700	705

	Asn Asp Ala Ser Asp His Gly Cys Ser Arg Trp Gly Tyr Phe Phe	
	710	715 720
5	Leu Gln Asn Ala Gly Met Leu Leu Gly Phe Gly Ile Met Leu Leu	725 730 735
	Ile Pro Tyr Leu Asn Ile Lys Ser Cys Ser Tyr Lys Phe Leu Val	740 745 750
10	Lys Val	
	<210> 3	
	<211> 2776	
15	<212> DNA	
	<213> Homo sapien	
	<400> 3	
20	ccggccgtgt ggaaccaaac ctgcgcgcgt ggccgggccc tgggacaacg 50	
	aggcccgcca gacgaaggcg caatggcgag gaagttatct gtaattctga 100	
	tcttgacctt tgccctctct gtcacaaatc cccttcatga actaaaagca 150	
25	gctgctttcc cccagaccac tgagaaaatt agtccgaatt gggaaatctgg 200	
	cattaatggt gacttggcaa tttccacacg gcaatatcat ctacaacagc 250	
30	ttttctaacc ctatggagaa aataattctt tgtcagttga agggttcaga 300	
	aaattacttc aaaatatagg catagataag attaaaagaa tccatataca 350	
	ccatgaccac gaccatcact cagaccacga gcatcactca gaccatgagc 400	
35	gtcactcaga ccatgagcat cactcagacc acgagcatca ctctgaccat 450	
	gatcatcact cccaccataa tcatgctgct tctggtaaaa ataagcgaaa 500	
40	agctctttgc ccagaccatg actcagatag ttcaggtaaa gatcctagaa 550	
	acagccaggg gaaaggagct caccgaccag aacatgccag tggtagaagg 600	
	aatgtcaagg acagtgttag tgctagttaa gtgacctcaa ctgtgtacaa 650	
45	cactgtctct gaaggaacte actttctaga gacaatagag actccaagac 700	
	ctggaaaact ctccccaaa gatgtaagca gctccactcc acccagtgtc 750	
50	acatcaaaga gccgggtgag ccggctggct ggtaggaaaa caaatgaatc 800	
	tgtgagtgag ccccgaaaag gctttatgta ttccagaaac acaaatgaaa 850	
	atcctcagga gtgtttcaat gcatcaaagc tactgacatc tcatggcatg 900	
55	ggcatccagg ttccgctgaa tgcaacagag ttcaactatc tctgtccagc 950	
	catcatcaac caaattgatg ctagatcttg tctgattcat acaagtgaaa 1000	
60	agaaggctga aatccctcca aagacctatt cattacaaat agcctggggt 1050	
	ggtggtttta tagccatttc catcatcagt ttctgtcttc tgctgggggt 1100	

tatcttagtg cctctcatga atcgggtggt tttcaaattt ctctgagtt 1150  
 tccttgtgga acitggcggtt gggactttga gtggtgatgc ttttttacac 1200  
 5 ctttttccac attctcatgc aagtcaccac catagtcata gccatgaaga 1250  
 accagcaatg gaaatgaaaa gaggaccact tttcagtcac ctgtctcttc 1300  
 10 aaaacataga agaaagtgcc tabtttgatt ccacgtggaa gggctcaaca 1350  
 gctctaggag gcctgtatctt catgtttctt gttgaacatg tcctcacatt 1400  
 gatcaaacaa tttaaagata agaagaaaaa gaatcagaag aaacctgaaa 1450  
 15 atgatgatga tgtggagatt aagaagcagt tgtccaagta tgaatctcaa 1500  
 ctttcaacaa atgaggagaa agtagatata gatgatogaa ctgaaggcta 1550  
 tttacgagca gactcacaag agcctctcca ctttgattct cagcagcctg 1600  
 20 cagtcttggg agaagaagag gtcatgatag ctcatgctca tccacaggaa 1650  
 gtctacaatg aatatgtacc cagaggggtg aagaataaat gccattcaca 1700  
 25 tttccacgat acactcggcc agtcagacga tctcattcac caccatcatg 1750  
 actaccatca tattctccat catcaccacc accaaaacca ccatectcac 1800  
 agtcacagcc agegctactc tcgggaggag ctgaaagatg ccggcgtcgc 1850  
 30 cacttctggc tggatggtga taatgggtga tggcctgcac aatttcagcg 1900  
 atggcctage aattggtgct gcttttactg aaggcttacc aagtggttta 1950  
 35 agtacttctg ttgctgtggt ctgtcatgag ttgcctcatg aattaggtga 2000  
 ctttgctggt ctactaaagg ctgacatgac cgttaagcag gctgtctctt 2050  
 40 ataatgcatt gtcagccatg ctggcgtacc ttggaatggc aacaggaatt 2100  
 ttcattgggc attatgctga aaatgtttct atgtggatat ttgcacttac 2150  
 tgetggetta ttcattgatg ttgctctggt tgatatggta cctgaaatgc 2200  
 45 tgcacaaatg tgctagtgc catggatgta gccgctgggg gtatttctct 2250  
 ttacagaatg ctgggatgct tttgggtttt ggaattatgt tacttatttc 2300  
 50 catatttgaa cataaaatcg tgtttcgtat aaatttctag ttaaggttta 2350  
 aatgctagag tagcttaaaa agttgtcata gtttcagtag gtcatagggg 2400  
 gatgagtttg tatgctgtac tatgcagcgt ttaaagctag tgggttttgt 2450  
 55 gatttttgta ttgaatattg ctgtctgta caaagtcagt taaaggtacg 2500  
 ttttaaatatt taagttattc tatcttggag ataaaaatctg tatgtgcaat 2550  
 60 tcaccggtat taccagttta ttatgtaaac aagagatttg gcatgacatg 2600  
 ttctgtatgt ttcagggaaa aatgtcttta atgctttttc aagaactaac 2650

```

acagttatcc ctatactgga ttttaggtct ctgaagaact gctgggtgttt 2700
aggaataaga atgtgcatga agcctaaaat accaagaaag cttatactga 2750
5   atttaagcaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2776
<210> 4
<211> 755
<212> PRT
10  <213> Homo sapien
<400> 4
Met Ala Arg Lys Leu Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Phe Ala Leu
15   1           5           10
Ser Val Thr Asn Pro Leu His Glu Leu Lys Ala Ala Ala Phe Pro
20   20          25          30
Gln Thr Thr Glu Lys Ile Ser Pro Asn Trp Glu Ser Gly Ile Asn
25   35          40          45
Val Asp Leu Ala Ile Ser Thr Arg Gln Tyr His Leu Gln Gln Leu
30   50          55          60
Phe Tyr Arg Tyr Gly Glu Asn Asn Ser Leu Ser Val Glu Gly Phe
35   65          70          75
Arg Lys Leu Leu Gln Asn Ile Gly Ile Asp Lys Ile Lys Arg Ile
40   80          85          90
His Ile His His Asp His Asp His His Ser Asp His Glu His His
45   95          100         105
Ser Asp His Glu Arg His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His
50  110         115         120
Glu His His Ser Asp His Asp His His Ser His His Asn His Ala
55  125         130         135
Ala Ser Gly Lys Asn Lys Arg Lys Ala Leu Cys Pro Asp His Asp
60  140         145         150
Ser Asp Ser Ser Gly Lys Asp Pro Arg Asn Ser Gln Gly Lys Gly
65  155         160         165
Ala His Arg Pro Glu His Ala Ser Gly Arg Arg Asn Val Lys Asp
70  170         175         180
Ser Val Ser Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Val Tyr Asn Thr Val
75  185         190         195
Ser Glu Gly Thr His Phe Leu Glu Thr Ile Glu Thr Pro Arg Pro
80  200         205         210
Gly Lys Leu Phe Pro Lys Asp Val Ser Ser Ser Thr Pro Pro Ser
85  215         220         225
Val Thr Ser Lys Ser Arg Val Ser Arg Leu Ala Gly Arg Lys Thr
90  230         235         240
Asn Glu Ser Val Ser Glu Pro Arg Lys Gly Phe Met Tyr Ser Arg
95  245         250         255

```

	Asn Thr Asn Glu Asn Pro Gln Glu Cys Phe Asn Ala Ser Lys Leu	260	265	270
5	Leu Thr Ser His Gly Met Gly Ile Gln Val Pro Leu Asn Ala Thr	275	280	285
	Glu Phe Asn Tyr Leu Cys Pro Ala Ile Ile Asn Gln Ile Asp Ala	290	295	300
10	Arg Ser Cys Leu Ile His Thr Ser Glu Lys Lys Ala Glu Ile Pro	305	310	315
	Pro Lys Thr Tyr Ser Leu Gln Ile Ala Trp Val Gly Gly Phe Ile	320	325	330
15	Ala Ile Ser Ile Ile Ser Phe Leu Ser Leu Leu Gly Val Ile Leu	335	340	345
	Val Pro Leu Met Asn Arg Val Phe Phe Lys Phe Leu Leu Ser Phe	350	355	360
20	Leu Val Ala Leu Ala Val Gly Thr Leu Ser Gly Asp Ala Phe Leu	365	370	375
	His Leu Leu Pro His Ser His Ala Ser His His His Ser His Ser	380	385	390
	His Glu Glu Pro Ala Met Glu Met Lys Arg Gly Pro Leu Phe Ser	395	400	405
30	His Leu Ser Ser Gln Asn Ile Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Asp Ser	410	415	420
	Thr Trp Lys Gly Leu Thr Ala Leu Gly Gly Leu Tyr Phe Met Phe	425	430	435
	Leu Val Glu His Val Leu Thr Leu Ile Lys Gln Phe Lys Asp Lys	440	445	450
40	Lys Lys Lys Asn Gln Lys Lys Pro Glu Asn Asp Asp Asp Val Glu	455	460	465
	Ile Lys Lys Gln Leu Ser Lys Tyr Glu Ser Gln Leu Ser Thr Asn	470	475	480
45	Glu Glu Lys Val Asp Thr Asp Asp Arg Thr Glu Gly Tyr Leu Arg	485	490	495
	Ala Asp Ser Gln Glu Pro Ser His Phe Asp Ser Gln Gln Pro Ala	500	505	510
	Val Leu Glu Glu Glu Glu Val Met Ile Ala His Ala His Pro Gln	515	520	525
55	Glu Val Tyr Asn Glu Tyr Val Pro Arg Gly Cys Lys Asn Lys Cys	530	535	540
	His Ser His Phe His Asp Thr Leu Gly Gln Ser Asp Asp Leu Ile	545	550	555
60	His His His His Asp Tyr His His Ile Leu His His His His His	560	565	570



agtcatacag cttttgggtg atatataact tgggcaataa cccagtctgg 300  
gtgatacnta aanctactca ctgtactcat ctgggtatat acccgacgg 350  
5 ancattttgg aaanteccaa tttcttgggt caggtgatat a 391  
<210> 6  
<211> 28  
<212> DNA  
10 <213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Primer  
15 <400> 6  
atggtgactt ggcaatttcc acacggca 28  
<210> 7  
<211> 27  
20 <212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Primer  
25 <400> 7  
taatgccaga ttccaattc ggactaa 27  
<210> 8  
30 <211> 46  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220>  
35 <223> Probe  
<400> 8  
ttagttcatg aaggggattt gtgacagaga gggcaaaggt caggat 46  
40 <210> 9  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
45 <220>  
<223> Primer  
<400> 9  
50 caacatcaaa tgcataact tcatgaacta aaagcagctg ct 42  
<210> 10  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
55 <220>  
<223> Primer  
<400> 10  
60 gagctcgagc ggccgcttag gtccttggag ggatttcagc ctt 43  
<210> 11

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

5 <220>  
 <223> Leader sequence

<400> 11  
 Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Met  
 10 1 5 10 15  
 His Gln

15 <210> 12  
 <211> 551  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

20 <220>  
 <223> cDNA

<400> 12  
 25 tgccattcac atttccacga tacactcggc cagtcagacg atctcattca 50  
 ccaccatcat gactaccatc atattctcca tcataccacc caccaaaacc 100  
 accatctca cagtcacagc cagcgtact ctggggagga gctgaaagat 150  
 30 gccggcgtcg ccactttggc ctggatggtg ataatgggtg atggcctgca 200  
 caatttcagc gatggcctag caattgggtc tgcttttact gaaggcttat 250  
 caagtggttt aagtacttct gttgctgtgt tctgtcatga gttgectcat 300  
 35 gaattagggtg actttgctgt tctactaaag gctgacatga ccgttaagca 350  
 ggctgtcctt tataatgcat tgtcagccat gctggcgtat cttggaatgg 400  
 40 caacaggaat ttccattggt cattatgctg aaaatgtttc tatgtggata 450  
 ttgcaactta ctgctggctt attcatgtat gttgctctgg ttgatatggt 500  
 acctgaaatg ctgcacaatg atgctagtga ccatggatgt agcctgtggg 550  
 45 g 551

<210> 13  
 <211> 48  
 50 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Primer

55 <400> 13  
 ggattctaact acgactcact atagggtgc cattcacatt tccacgat 48

<210> 14  
 <211> 44  
 60 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

```

<220>
<223> Primer

<400> 14
5 ctatgaaatt aacctcaact aaagggacce cagcgctac atcc 44

<210> 15
<211> 620
<212> DNA
10 <213> Artificial sequence

<220>
<223> CDNA

15 <400> 15
    tggtcgtggt cttgggggtg gtctttggga tctcatcaa gcgacggcag 50
    cagaagatcc ggaagtacac gatgoggaga ctgctgcagg aaacggagct 100
20 ggtggagccg ctgacaccta gggagcgat gcccaaccag ggcagatgc 150
    ggatcctgaa agagacggag ctgaggaagg tgaaggtgct tggatctggc 200
    gcttttggca cagtctacaa gggcatctgg atccctgatg gggagaatgt 250
25 gaaaattcca gtggccatca aagtgttgag ggaaaacaca tccccaaaag 300
    ccaacaaaga aatcttagac gaagcatacg tgatggctgg tgtgggctcc 350
30 ccatatgtct cccgccttct gggcatctgc ctgacatcca cggatgcagct 400
    ggtgacacag cttatgcctt atggctgctt cttagaccat gtcgggaaa 450
    accggggagc cctgggctcc caggacctgc tgaactggtg tatgcagatt 500
35 gccaaagggg tgagctacct ggaggatgtg cggctcgtac acagggactt 550
    ggccgctcgg aacgtgctgg tcaagagtcc caaccatgtc aaaattacag 600
40 acttogggct ggcteggctg 620

<210> 16
<211> 290
<212> DNA
45 <213> Artificial sequence

<220>
<223> CDNA

50 <400> 16
    gctgcctgac ggccaggtea tcaccattgg caatgagcgg ttccgctgcc 50
    ctgaggcact cttccagcct tccttcctgg gcatggagtc ctgtggcacc 100
55 cacgaaacta ctttcaactc catcatgaag tgtgactgtg acatccgcaa 150
    agaactgtac gccaacacag tgctgtctgg cggcaccacc atgtaccctg 200
    gcattgccga caggatgcag aaggagatca ctgccctggc acccagcaca 250
60 atgaagatca agatcattgc tctctgagc gcaagtactc 290

```

```

5   <210> 17
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Homo sapien

    <400> 17
      His Asp His His Ser His His
        1                               5

10  <210> 18
    <211> 13
    <212> PRT
    <213> Homo sapien

15  <400> 18
      Ser Ile Phe Glu His Lys Ile Val Phe Arg Ile Asn Phe
        1                               5                               10

20  <210> 19
    <211> 22
    <212> PRT
    <213> Homo sapien

    <400> 19
25  His Glu His His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His Asp His
      1                               5                               10                               15

      His Ser His His Asn His Ala
                               20

30

```

## 【図1A-1】

CTCGTGCCGA ATTCGGCAGC AGACCGCGTG TTCGCGCCTG GTAGAGATTT 50  
 CTCGAAGACA CCAGTGGGCC CGTGTGGAAC CAAACCTGCG CGCGTGGCCG 100  
 GGCCGTGGGA CAACGAGGCC GCGGAGACGA AGGCGCAATG GCGAGGAAGT 150  
 TATCTGTAAT CTTGATCCTG ACCTTTGCCC TCTCTGTAC AAATCCCCTT 200  
 CATGAACTAA AAGCAGCTGC TTTCCCCCAG ACCACTGAGA AAATTAGTCC 250  
 GAATTGGGAA TCTGGCATTG ATGTTGACTT GGCAATTTCC ACACGGCAAT 300  
 ATCATCTACA ACAGCTTTTC TACCGCTATG GAGAAAATAA TTCTTTGTCA 350  
 GTTGAAGGGT TCAGAAAATT ACTTCAAAAT ATAGGCATAG ATAAGATTAA 400  
 AAGAATCCAT ATACACCATG ACCACGACCA TCACTCAGAC CACGAGCATC 450  
 ACTCAGACCA TGAGCGTCAC TCAGACCATG AGCATCACTC AGACCACGAG 500  
 CATCACTCTG ACCATAATCA TGCTGCTTCT GGTAAAAATA AGCGAAAAGC 550  
 TCTTTGCCCA GACCATGACT CAGATAGTTC AGGTAAGAT CCTAGAAACA 600  
 GCCAGGGGAA AGGAGCTCAC CGACCAGAAC ATGCCAGTGG TAGAAGGAAT 650  
 GTCAAGGACA GTGTTAGTGC TAGTGAAGTG ACCTCAACTG TGTACAACAC 700  
 TGTCTCTGAA GGAACCTACT TTCTAGAGAC AATAGAGACT CCAAGACCTG 750  
 GAAAACCTTT CCCCAAAGAT GTAAGCAGCT CCACTCCACC CAGTGTCAACA 800  
 TCAAAGAGCC GGGTGAGCCG GCTGGCTGGT AGGAAAACAA ATGAATCTGT 850  
 GAGTGAGCCC CGAAAAGGCT TTATGTATTC CAGAAACACA AATGAAAATC 900  
 CTCAGGAGTG TTTCAATGCA TCAAAGCTAC TGACATCTCA TGGCATGGGC 950  
 ATCCAGGTTT CGCTGAATGC AACAGAGTTC AACTATCTCT GTCCAGCCAT 1000  
 CATCAACCAA ATTGATGCTA GATCTTGTCT GATTCATACA AGTGAAAAGA 1050  
 AGGCTGAAAT CCCTCCAAAG ACCTATTCAT TACAAATAGC CTGGGTTGGT 1100  
 GGTTTATAG CCATTTCCAT CATCAGTTTC CTGTCTCTGC TGGGGGTTAT 1150  
 CTTAGTGCCT CTCATGAATC GGGTGTTTTT CAAATTTCTC CTGAGTTTCC 1200  
 TTGTGGCACT GGCCGTGGG ACTTTGAGTG GTGATGCCTT TTTACACCTT 1250  
 CTCCACATT CTCATGCAAG TCACCACCAT AGTCATAGCC ATGAAGAACC 1300  
 AGCAATGGAA ATGAAAAGAG GACCACTTTT CAGTCATCTG TCTTCTCAA 1350  
 ACATAGAAGA AAGTGCCTAT TTTGATTCCA CGTGGGAGGG TCTAACAGCT 1400  
 CTAGGAGGCC TGTATTTTCA GTTTCTTGTG GAACATGTCC TCACATTGAT 1450  
 CAAACAATTT AAAGATAAGA AGAAAAAGAA TCAGAAGAAA CCTGAAAATG 1500  
 ATGATGATGT GGAGATTAAG AAGCAGTTGT CCAAGTATGA ATCTCAACTT 1550  
 TCAACAAATG AGGAGAAAGT AGATACAGAT GATCGAACTG AAGGCTATTT 1600  
 ACGAGCAGAC TCACAAGAGC CCTCCCCTT TGATTCTCAG CAGCCTGCAG 1650  
 TCTTGGGAAGA AGAAGAGGTC ATGATAGCTC ATGCTCATCC ACAGGAAGTC 1700  
 TACAATGAAT ATGTACCCAG AGGGTGCAAG AATAAATGCC ATTACATTT 1750  
 CCACGATACA CTCGGCCAGT CAGACGATCT CATTCACCAC CATCATGACT 1800  
 ACCATCATAT TCTCCATCAT CACCACCACC AAAACCACCA TCCTCACAGT 1850  
 CACAGCCAGC GCTACTCTCG GGAGGAGCTG AAAGATGCCG GCGTCGCCAC 1900  
 TTTGGCCTGG ATGGTGATAA TGGGTGATGG CCTGCACAA TFCAGCGATG 1950  
 GCCTAGCAAT TGGTGTGCT TTTACTGAAG GCTTATCAAG TGGTTTAAGT 2000  
 ACTTCTGTTG CTGTGTCTG TCATGAGTTG CCTCATGAAT TAGGTGACTT 2050  
 TGCTGTTCTA CTAAAGGCTG GCATGACCGT TAAGCAGGCT GTCCTTTATA 2100

FIG. 1A-1


## 【図1A-2】

```

ATGCATTGTC AGCCATGCTG GCGTATCTTG GAATGGCAAC AGGAATTTTC 2150
ATGGGTCATT ATGCTGAAAA TGTTTCTATG TGGATATTTG CACTTACTGC 2200
TGGCTTATTC ATGTATGTTG CTCTGGTTGA TATGGTACCT GAAATGCTGC 2250
ACAATGATGC TAGTGACCAT GGATGTAGCC GCTGGGGGTA TTTCTTTTTA 2300
CAGAATGCTG GGATGCTTTT GGGTTTTGGA ATTATGTTAC TTATTCCATA 2350
TTTGAACATA AAATCGTGTT CGTATAAATT TCTAGTTAAG GTTTAAATGC 2400
TAGAGTAGCT TAAAAAGTTG TCATAGTTTC AGTAGGTCAT AGGGAGATGA 2450
GTTTGTATGC TGTACTATGC AGCGTTTAAA GTTAGTGGGT TTTGTGATTT 2500
TTGTATTGAA TATTGCTGTC TGTTACAAAG TCAGTTAAAG GTACGTTTTA 2550
ATATTTAAGT TATTCTATCT TGGAGATAAA ATCTGTATGT GCAATTCACC 2600
GGTATTACCA GTTTATTATG TAAACAAGAG ATTTGGCATG ACATGTTCTG 2650
TATGTTTCAG GGAAAAATGT CTTTAATGCT TTTTCAAGAA CTAACACAGT 2700
TATTCCATA CTGGATTTTA GGTCTCTGAA GAACTGCTGG TGTTTAGGAA 2750
TAAGAATGTG CATGAAGCCT AAAATACCAA GAAAGCTTAT ACTGAATTTA 2800
AGCAAAGAAA TAAAGGAGAA AAGAGAAGAA TCTGAGAATT GGGGAGGCAT 2850
AGATTCTTAT AAAAATCACA AAATTTGTTG TAAATTAGAG GGGAGAAAT 2900
TAGAATTAAG TATAAAAAGG CAGAATTAGT ATAGAGTACA TTCATTA AAC 2950
ATTTTTGTCA GGATTATTTT CCGTAAAAAC GTAGTGAGCA CTCTCATATA 3000
CTAATTAGTG TACATTTAAC TTTGTATAAT ACAGAAATCT AAATATATTT 3050
AATGAATTCA AGCAATATAC ACTTGACCAA GAAATTGGAA TTTCAAAATG 3100
TTCGTGCGGG TTATATACCA GATGAGTACA GTGAGTAGTT TATGTATCAC 3150
CAGACTGGGT TATTGCCAAG TTATATATCA CAAAAGCTG TATGACTGGA 3200
TGTTCTGGTT ACCTGGTTTA CAAAATTATC AGAGTAGTAA AACTTTGATA 3250
TATATGAGGA TATTAAACT AACTAAGTA TCATTTGATT CGATTCAGAA 3300
AGTACTTTGA TATCTCTCAG TGCTTCAGTG CTATCATTGT GAGCAATTGT 3350
CTTTATATAC GGTACTGTAG CCATACTAGG CCTGTCTGTG GCATTCTCTA 3400
GATGTTTCTT TTTTACACAA TAAATTCCTT ATATCAGCTT GAAAAAAAAA 3450
AAAAAAAAAA A 3461 (SEQ ID NO:1)


```

FIG. 1A-2

【 1 B - 1】


Met	Ala	Arg	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Leu	Ile	Leu	Thr	Phe	Ala	Leu	1	5	10	15
Ser	Val	Thr	Asn	Pro	Leu	His	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Phe	Pro	20	25	30	
Gln	Thr	Thr	Glu	Lys	Ile	Ser	Pro	Asn	Trp	Glu	Ser	Gly	Ile	Asn	35	40	45	
Val	Asp	Leu	Ala	Ile	Ser	Thr	Arg	Gln	Tyr	His	Leu	Gln	Gln	Leu	50	55	60	
Phe	Tyr	Arg	Tyr	Gly	Glu	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Val	Glu	Gly	Phe	65	70	75	
Arg	Lys	Leu	Leu	Gln	Asn	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Ile	Lys	Arg	Ile	80	85	90	
His	Ile	His	His	Asp	His	Asp	His	His	Ser	Asp	His	Glu	His	His	95	100	105	
Ser	Asp	His	Glu	Arg	His	Ser	Asp	His	Glu	His	His	Ser	Asp	His	110	115	120	
Glu	His	His	Ser	Asp	His	Asn	His	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Asn	Lys	125	130	135	
Arg	Lys	Ala	Leu	Cys	Pro	Asp	His	Asp	Ser	Asp	Ser	Ser	Gly	Lys	140	145	150	
Asp	Pro	Arg	Asn	Ser	Gln	Gly	Lys	Gly	Ala	His	Arg	Pro	Glu	His	155	160	165	
Ala	Ser	Gly	Arg	Arg	Asn	Val	Lys	Asp	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Glu	170	175	180	
Val	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	His	Phe	185	190	195	
Leu	Glu	Thr	Ile	Glu	Thr	Pro	Arg	Pro	Gly	Lys	Leu	Phe	Pro	Lys	200	205	210	
Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Thr	Ser	Lys	Ser	Arg	215	220	225	
Val	Ser	Arg	Leu	Ala	Gly	Arg	Lys	Thr	Asn	Glu	Ser	Val	Ser	Glu	230	235	240	
Pro	Arg	Lys	Gly	Phe	Met	Tyr	Ser	Arg	Asn	Thr	Asn	Glu	Asn	Pro	245	250	255	

FIG. 1B-1

【 1 B - 2】

<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	<u>Cys</u>	<u>Phe</u>	<u>Asn</u>	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	<u>Lys</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>Gly</u>	<u>Met</u>
				260					265					270
<u>Gly</u>	<u>Ile</u>	<u>Gln</u>	<u>Val</u>	<u>Pro</u>	<u>Leu</u>	<u>Asn</u>	<u>Ala</u>	<u>Thr</u>	<u>Glu</u>	<u>Phe</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Leu</u>	<u>Cys</u>
				275					280					285
<u>Pro</u>	<u>Ala</u>	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Asn</u>	<u>Gln</u>	<u>Ile</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	<u>Cys</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>His</u>
				290					295					300
<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Glu</u>	<u>Lys</u>	<u>Lys</u>	<u>Ala</u>	<u>Glu</u>	<u>Ile</u>	<u>Pro</u>	<u>Pro</u>	<u>Lys</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>
				305					310					315
<u>Gln</u>	<u>Ile</u>	<u>Ala</u>	<u>Trp</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Phe</u>	<u>Ile</u>	<u>Ala</u>	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>
				320					325					330
<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Ile</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Pro</u>	<u>Leu</u>	<u>Met</u>	<u>Asn</u>	<u>Arg</u>
				335					340					345
<u>Val</u>	<u>Phe</u>	<u>Phe</u>	<u>Lys</u>	<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	<u>Leu</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>
				350					355					360
<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>	<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>His</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Pro</u>	<u>His</u>	<u>Ser</u>
				365					370					375
<u>His</u>	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>His</u>	<u>His</u>	<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>	<u>Pro</u>	<u>Ala</u>	<u>Met</u>
				380					385					390
<u>Glu</u>	<u>Met</u>	<u>Lys</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Pro</u>	<u>Leu</u>	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>Asn</u>
				395					400					405
<u>Ile</u>	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>	<u>Ser</u>	<u>Ala</u>	<u>Tyr</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Thr</u>	<u>Trp</u>	<u>Lys</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Thr</u>
				410					415					420
<u>Ala</u>	<u>Leu</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Tyr</u>	<u>Phe</u>	<u>Met</u>	<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Glu</u>	<u>His</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>
				425					430					435
<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Lys</u>	<u>Gln</u>	<u>Phe</u>	<u>Lys</u>	<u>Asp</u>	<u>Lys</u>	<u>Lys</u>	<u>Lys</u>	<u>Lys</u>	<u>Asn</u>	<u>Gln</u>	<u>Lys</u>
				440					445					450
<u>Lys</u>	<u>Pro</u>	<u>Glu</u>	<u>Asn</u>	<u>Asp</u>	<u>Asp</u>	<u>Asp</u>	<u>Val</u>	<u>Glu</u>	<u>Ile</u>	<u>Lys</u>	<u>Lys</u>	<u>Gln</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>
				455					460					465
<u>Lys</u>	<u>Tyr</u>	<u>Glu</u>	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	<u>Thr</u>	<u>Asn</u>	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>	<u>Lys</u>	<u>Val</u>	<u>Asp</u>	<u>Thr</u>
				470					475					480
<u>Asp</u>	<u>Asp</u>	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Glu</u>	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Leu</u>	<u>Arg</u>	<u>Ala</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	<u>Pro</u>
				485					490					495
<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>Gln</u>	<u>Pro</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>
				500					505					510


FIG. 1B-2

【 1 B - 3】

Val	Met	Ile	Ala	His	Ala	His	Pro	Gln	Glu	Val	Tyr	Asn	Glu	Tyr
				515					520					525
Val	Pro	Arg	Gly	Cys	Lys	Asn	Lys	Cys	His	Ser	His	Phe	His	Asp
				530					535					540
Thr	Leu	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Leu	Ile	His	His	His	His	Asp	Tyr
				545					550					555
His	His	Ile	Leu	His	His	His	His	His	Gln	Asn	His	His	Pro	His
				560					565					570
Ser	His	Ser	Gln	Arg	Tyr	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gly
				575					580					585
Val	Ala	Thr	Leu	Ala	Trp	Met	Val	Ile	Met	Gly	Asp	Gly	Leu	His
				590					595					600
Asn	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Gly
				605					610					615
Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Ala	Val	Phe	Cys	His	Glu
				620					625					630
Leu	Pro	His	Glu	Leu	Gly	Asp	Phe	Ala	Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly
				635					640					645
Met	Thr	Val	Lys	Gln	Ala	Val	Leu	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Met
				650					655					660
Leu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Met	Ala	Thr	Gly	Ile	Phe	Ile	Gly	His	Tyr
				665					670					675
Ala	Glu	Asn	Val	Ser	Met	Trp	Ile	Phe	Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Leu
				680					685					690
Phe	Met	Tyr	Val	Ala	Leu	Val	Asp	Met	Val	Pro	Glu	Met	Leu	His
				695					700					705
Asn	Asp	Ala	Ser	Asp	His	Gly	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Tyr	Phe	Phe
				710					715					720
Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Gly	Phe	Gly	Ile	Met	Leu	Leu
				725					730					735
Ile	Pro	Tyr	Leu	Asn	Ile	Lys	Ser	Cys	Ser	Tyr	Lys	Phe	Leu	Val
				740					745					750

Lys Val (SEQ ID NO:2)

**FIG.\_1B-3**

【 1 C】

TTTTTTTTTG ATATAAGGAA TTTATTGIGT AAAAAAGAAA CATCTAGAGA 50  
ATGCCACAGA CAGGCCTAGT ATGGCTACAG TACCGTATAT AAAAGACAAT 100  
TGCTCACAAT GATAGCACTG AAGCACTGAG AGATATCAAA GTACTTTCTG 150  
AATCGAATCA AATGATACTT AGTGTAGTTT TAATATCCTC ATATATATCA 200  
AAGTTTTACT ACTCTGATAA TTTTGTAAC CAGGGTAACC AGGANCATCC 250  
AGTCATACAG CTTTTGGGTG ATATATAACT TGGGCAATAA CCCAGTCTGG 300  
GTGATACNTA AANCTACTCA CTGTACTCAT CTGGGTATAT ACCCGCACGG 350  
ANCATTTTGG AAATCCCAA TTTCTTGGGT CAGGTGATAT A 391

(SEQ ID NO:5)

**FIG.\_1C**



ss. DNA164647	780	790	800	810	820	830
	TGGCTGGTAGGAAACAATGAATCTGTGTGAGTGAGCCCCGAAAAGGCTTTATGTATTC					
ss. DNA164647	840	850	860	870	880	890
	GAAACACAAATGAAAATCCTCAGGAGTGTTCATGCATCAAAAGCTACTGACATCTCANG					
ss. DNA164647	900	910	920	930	940	950
	GCATGGGCATCCAGGTTCCGCTGAATGCCAACAGAGTCAACTATCTCTGTCCAGCCATCA					
ss. DNA164647	960	970	980	990	1000	1010
	TCAACCAAAATTGATGCTAGATCTTGTCTGTGATTCATACAAGTGAAAAGAGGCTGAAATCC					
ss. DNA164647	1020	1030	1040	1050	1060	1070
	CTCCRAAGACCTATTCATTACAATAGCCTGGGTGGTGGTTTATAGCCATTTCCATCA					
ss. DNA164647	1080	1090	1100	1110	1120	1130
	TCAGTTTCCCTGCTCTGTGGGGTTATCTTAGTGCCTCTCATGAATCGGGTGTGTTTCA					
ss. DNA164647	1140	1150	1160	1170	1180	1190
	AATTCCTCCTGATTTCCCTTGTGGCCTGGCCGTTGGACTTTGAGTGGTGTGCTTTTT					
ss. DNA164647	1200	1210	1220	1230	1240	1250
	TACACCTTCTTCCACATCTCATGCAAGTCACCACCATAGTCATAGCCATGAAGAACCAG					
ss. DNA164647	1260	1270	1280	1290	1300	1310
	CAATGGAAATGAAAAGAGGACCCTTTTCAGTCACTGTCTTCTCAAACAATAGAAGAAA					
ss. DNA164647	1320	1330	1340	1350	1360	1370
	GTGCCATTTTGTGATCCACGGTGAAGGGTCTAACAGCTTAGGAGGCCCTGTATTTTCATGT					
ss. DNA164647	1380	1390	1400	1410	1420	1430
	TTCTTGTGACATGCTCCTCACATTGATCAAACTAATTAAGATAAGAAGAAAAGAAATC					
ss. DNA164647	1440	1450	1460	1470	1480	1490
	AGAAGAAACCTGAAAATGATGATGATGTGGAGATTAAAGAGCAGTTGTCCAAGTATGAAT					
ss. DNA164647	1500	1510	1520	1530	1540	1550
	CTCAACTTTTCACAAATGAGGAGAAAGTAGATACAGATGATCGAACTGAAGGCTATTTAC					


FIG.-2A-2

1560 1570 1580 1590 1600 1610  
 ss. DNA1.64647 GAGCAGACTCACAAAGAGCCCTCCACTTTGATTCCTCAGCAGCCTGCAGTCTTGGAAAGAG  
  
 1620 1630 1640 1650 1660 1670  
 ss. DNA1.64647 AAGAGGTCAATGATAGCTCATGCTCATCCACAGGAAGTCTACAAATGAATATGTACCCAGAG  
  
 1680 1690 1700 1710 1720 1730  
 ss. DNA1.64647 GGTGCRAAGAAATAATSCCAATTCACATTTCCACGATACACTCGGCCAGTCCAGACGATCTCA  
  
 1740 1750 1760 1770 1780 1790  
 ss. DNA1.64647 TTCACCACCATCATGACTACCATCATATTTCTCCATCATCACCACCACCAAAACCACCATC  
  
 1800 1810 1820 1830 1840 1850  
 ss. DNA1.64647 CTCACAGTCACAGCCAGCCGCTACTCTCGGGAGGAGCTGAANGATGCCGGCTCGCCACTT  
  
 1860 1870 1880 1890 1900 1910  
 ss. DNA1.64647 TGGCCTGGATGGTGATAAATGGGTGATGGCCTGCACAAATTCAGCGATGGCCTAGCAAATG  
  
 1920 1930 1940 1950 1960 1970  
 ss. DNA1.64647 GTGCTGCTTTTACTGAAAGGCTTATCAAGTGGTTTAAAGTACTTCTGTTGCTGTTCTGTC  
  
 1980 1990 2000 2010 2020 2030  
 ss. DNA1.64647 ATGAGTTGCCCTCATGAATAGGTGACTTTGCTGTTCTACTAAAGGCTGACATGACCCGTTA  
  
 2040 2050 2060 2070 2080 2090  
 ss. DNA1.64647 AGCAGGCTGTCCTTATAATGCATTTGTAGCCATGCTGGCGTATCTTGGAAATGGCAACAG  
  
 2100 2110 2120 2130 2140 2150  
 ss. DNA1.64647 GAATTTTCATTTGGTCAATATGCTGAAAATGTTTCTATGTGGATATTTGCACCTTACTGCTG  
  
 2160 2170 2180 2190 2200 2210  
 ss. DNA1.64647 GCTTATTCATGATGTTGCTCTGGTTGATATGGTACCCTGAAAATGCTGCACAATGATGCTA  
  
 2220 2230 2240 2250 2260 2270  
 ss. DNA1.64647 GTGACCATGGATGAGCCCGCTGGGGTATTTCTTTTACAGAAATGCTGGGATGCTTTTGG  
  
 2280 2290 2300 2310 2320 2330  
 ss. DNA1.64647 GTTTTGGAAATTTATGTTACTTATTTCCATATTTTGAACATAAANAATCGTGTTCGTATAAAT

FIG. - 2A-3


2340	2350	2360	2370	2380	2390
TC	TAAGGTTAAATGCTAGAGTAGCTTAA	AAAGTTGTCATAGTTTCAGTAGGTCAT			
2400	2410	2420	2430	2440	2450
AGGAGATGAGTTTGTATGCTGTACTATGCAGCGTTTAA	AGTTAGTGGGTTTGTGATTT				
2460	2470	2480	2490	2500	2510
TTGTATTGAATAATTGCTGTCTGTACAAAGTCAGTTAA	AGGTACGTTTAAATATTTAAGT				
2520	2530	2540	2550	2560	2570
TATTCATCTTGGAGATAAAATCTGTATGTGCAATTC	ACCGGTTATACCAGTTTATTATG				
2580	2590	2600	2610	2620	2630
TAAACAAGAGATTTGGCATGACATGTTCTGTATGTT	TCAGGGAAAATGCTTTAATGCT				
2640	2650	2660	2670	2680	2690
TTTTCAAGAACTAACACACTTATCCCTATACTGGATTT	TAGGTCCTCGAAGAAGTCTGCTGG				
2700	2710	2720	2730	2740	2750
TGTTTAGGATAAGAAATGTCATGAAGCCATAAATACC	AAGAAGCTTATACTGAATTTA				
2760	2770				
AGCAAAAAAAAAAAAAAAAA					

FIG.-2A-4

【 2 B - 1】


Met	Ala	Arg	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Leu	Ile	Leu	Thr	Phe	Ala	Leu	1	5	10	15
Ser	Val	Thr	Asn	Pro	Leu	His	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Phe	Pro	20	25	30	
Gln	Thr	Thr	Glu	Lys	Ile	Ser	Pro	Asn	Trp	Glu	Ser	Gly	Ile	Asn	35	40	45	
Val	Asp	Leu	Ala	Ile	Ser	Thr	Arg	Gln	Tyr	His	Leu	Gln	Gln	Leu	50	55	60	
Phe	Tyr	Arg	Tyr	Gly	Glu	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Val	Glu	Gly	Phe	65	70	75	
Arg	Lys	Leu	Leu	Gln	Asn	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Ile	Lys	Arg	Ile	80	85	90	
His	Ile	His	His	Asp	His	Asp	His	His	Ser	Asp	His	Glu	His	His	95	100	105	
Ser	Asp	His	Glu	Arg	His	Ser	Asp	His	Glu	His	His	Ser	Asp	His	110	115	120	
Glu	His	His	Ser	Asp	His	Asp	His	His	Ser	His	His	Asn	His	Ala	125	130	135	
Ala	Ser	Gly	Lys	Asn	Lys	Arg	Lys	Ala	Leu	Cys	Pro	Asp	His	Asp	140	145	150	
Ser	Asp	Ser	Ser	Gly	Lys	Asp	Pro	Arg	Asn	Ser	Gln	Gly	Lys	Gly	155	160	165	
Ala	His	Arg	Pro	Glu	His	Ala	Ser	Gly	Arg	Arg	Asn	Val	Lys	Asp	170	175	180	
Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Glu	Val	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Asn	Thr	Val	185	190	195	
Ser	Glu	Gly	Thr	His	Phe	Leu	Glu	Thr	Ile	Glu	Thr	Pro	Arg	Pro	200	205	210	
Gly	Lys	Leu	Phe	Pro	Lys	Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Ser	215	220	225	
Val	Thr	Ser	Lys	Ser	Arg	Val	Ser	Arg	Leu	Ala	Gly	Arg	Lys	Thr	230	235	240	
Asn	Glu	Ser	Val	Ser	Glu	Pro	Arg	Lys	Gly	Phe	Met	Tyr	Ser	Arg	245	250	255	

FIG.\_2B-1

【 2 B - 2】

Asn	Thr	Asn	Glu	Asn	Pro	Gln	Glu	Cys	Phe	Asn	Ala	Ser	Lys	Leu
				260					265					270
Leu	Thr	Ser	His	Gly	Met	Gly	Ile	Gln	Val	Pro	Leu	Asn	Ala	Thr
				275					280					285
Glu	Phe	Asn	Tyr	Leu	Cys	Pro	Ala	Ile	Ile	Asn	Gln	Ile	Asp	Ala
				290					295					300
Arg	Ser	Cys	Leu	Ile	His	Thr	Ser	Glu	Lys	Lys	Ala	Glu	Ile	Pro
				305					310					315
Pro	Lys	Thr	Tyr	Ser	Leu	Gln	Ile	Ala	Trp	Val	Gly	Gly	Phe	Ile
				320					325					330
Ala	Ile	Ser	Ile	Ile	Ser	Phe	Leu	Ser	Leu	Leu	Gly	Val	Ile	Leu
				335					340					345
Val	Pro	Leu	Met	Asn	Arg	Val	Phe	Phe	Lys	Phe	Leu	Leu	Ser	Phe
				350					355					360
Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Gly	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp	Ala	Phe	Leu
				365					370					375
His	Leu	Leu	Pro	His	Ser	His	Ala	Ser	His	His	His	Ser	His	Ser
				380					385					390
His	Glu	Glu	Pro	Ala	Met	Glu	Met	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Phe	Ser
				395					400					405
His	Leu	Ser	Ser	Gln	Asn	Ile	Glu	Glu	Ser	Ala	Tyr	Phe	Asp	Ser
				410					415					420
Thr	Trp	Lys	Gly	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Tyr	Phe	Met	Phe
				425					430					435
Leu	Val	Glu	His	Val	Leu	Thr	Leu	Ile	Lys	Gln	Phe	Lys	Asp	Lys
				440					445					450
Lys	Lys	Lys	Asn	Gln	Lys	Lys	Pro	Glu	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Glu
				455					460					465
Ile	Lys	Lys	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Glu	Ser	Gln	Leu	Ser	Thr	Asn
				470					475					480
Glu	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	Thr	Glu	Gly	Tyr	Leu	Arg
				485					490					495
Ala	Asp	Ser	Gln	Glu	Pro	Ser	His	Phe	Asp	Ser	Gln	Gln	Pro	Ala
				500					505					510

FIG.\_2B-2

【 2 B - 3】

Val	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Met	Ile	Ala	His	Ala	His	Pro	Gln	515	520	525
Glu	Val	Tyr	Asn	Glu	Tyr	Val	Pro	Arg	Gly	Cys	Lys	Asn	Lys	Cys	530	535	540
His	Ser	His	Phe	His	Asp	Thr	Leu	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Leu	Ile	545	550	555
His	His	His	His	Asp	Tyr	His	His	Ile	Leu	His	His	His	His	His	560	565	570
Gln	Asn	His	His	Pro	His	Ser	His	Ser	Gln	Arg	Tyr	Ser	Arg	Glu	575	580	585
Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Thr	Leu	Ala	Trp	Met	Val	Ile	590	595	600
Met	Gly	Asp	Gly	Leu	His	Asn	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	605	610	615
Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Gly	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	620	625	630
Ala	Val	Phe	Cys	His	Glu	Leu	Pro	His	Glu	Leu	Gly	Asp	Phe	Ala	635	640	645
Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Asp	Met	Thr	Val	Lys	Gln	Ala	Val	Leu	Tyr	650	655	660
Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Met	Leu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Met	Ala	Thr	Gly	665	670	675
Ile	Phe	Ile	Gly	His	Tyr	Ala	Glu	Asn	Val	Ser	Met	Trp	Ile	Phe	680	685	690
Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Leu	Phe	Met	Tyr	Val	Ala	Leu	Val	Asp	Met	695	700	705
Val	Pro	Glu	Met	Leu	His	Asn	Asp	Ala	Ser	Asp	His	Gly	Cys	Ser	710	715	720
Arg	Trp	Gly	Tyr	Phe	Phe	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Gly	725	730	735
Phe	Gly	Ile	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Ile	Phe	Glu	His	Lys	Ile	Val	740	745	750
Phe	Arg	Ile	Asn	Phe											755		

(SEQ ID NO:4)

**FIG.\_2B-3**

```

SS.u41060      CTCGTCCGGAATTCGGCACGAGACCGCGTGTTCGCGCCCTGGTAGAGATTTCTCGAAGACA
    10      20      30      40      50      60
SS.DNA164647  CCGGCCGTGTGGAACCAACCCTGGCGCGTGGCCGGCCGTGGGCAACGAGGCC
    10      20      30      40      50
SS.u41060      * *****
    70      80      90      100     110     120
SS.DNA164647  60      70      80      90      100     110
GCGGAGACGAAGCGCAATGGCGGAGGAACTATCTGTAATCTTGATCCTGACCTTTGCC
*****
SS.u41060      GCGGAGACGAAGCGCAATGGCGGAGGAACTATCTGTAATCTTGATCCTGACCTTTGCC
    130     140     150     160     170     180
SS.DNA164647  120     130     140     150     160     170
TCTCTGTCCAAATCCCCTTCATGAACATAAAGCAGCTGCTTCCCCAGACCACTGAGA
*****
SS.u41060      TCTCTGTCCAAATCCCCTTCATGAACATAAAGCAGCTGCTTCCCCAGACCACTGAGA
    190     200     210     220     230     240
SS.DNA164647  180     190     200     210     220     230
AAATTAGTCCGGAATGGGAATCTGSCATTAATGTGACTTGGCAATTTCCACACGGCAAT
*****
SS.u41060      AAATTAGTCCGGAATGGGAATCTGSCATTAATGTGACTTGGCAATTTCCACACGGCAAT
    250     260     270     280     290     300
SS.DNA164647  240     250     260     270     280     290
ATCATCTACAACAGCTTTTCTACCGCTATGGGAGAAAATAATCTTTGTCAGTTGAAGGGT
*****
SS.u41060      ATCATCTACAACAGCTTTTCTACCGCTATGGGAGAAAATAATCTTTGTCAGTTGAAGGGT
    310     320     330     340     350     360
SS.DNA164647  300     310     320     330     340     350
TCAGAAAATTAATTAATTCARAAATATAGGCATAGATAAAGATTAAGAAATCCATATACACCATG
*****
SS.u41060      TCAGAAAATTAATTAATTCARAAATATAGGCATAGATAAAGATTAAGAAATCCATATACACCATG
    370     380     390     400     410     420

```

FIG.-3A-1

【 3 A - 2 】

```

ss.DNA164647      360      370      380      390      400      410
ACCAGGACCATCACTCAGACCACGAGCATCACTCAGACCATGAGCCGTCAGACCATG
*****
ACCAGGACCATCACTCAGACCACGAGCATCACTCAGACCATGAGCCGTCAGACCATG
430      440      450      460      470      480
ss.u41060

ss.DNA164647      420      430      440      450      460      470
AGCATCACTCAGACCACGAGCATCACTCTGACCATGATCATCACTCCACCATATCATG
*****
AGCATCACTCAGACCACGAGCATCACTCTG-----ACCATATCATG
490      500      510      520      530      540
ss.u41060

ss.DNA164647      480      490      500      510      520      530
CTGCTTCTGGTAAATAAGCGAAGCTCTTTGCCCCAGACCATGACTCAGATAGTTTCAG
*****
CTGCTTCTGGTAAATAAGCGAAGCTCTTTGCCCCAGACCATGACTCAGATAGTTTCAG
530      540      550      560      570      580
ss.u41060

ss.DNA164647      540      550      560      570      580      590
GTAAGATCCTAGAAACAGCCAGGGGAAGGAGCTCACCCAGCCAGAACATGCCAGTGGTA
*****
GTAAGATCCTAGAAACAGCCAGGGGAAGGAGCTCACCCAGCCAGAACATGCCAGTGGTA
590      600      610      620      630      640      650
ss.DNA164647

ss.u41060      600      610      620      630      640      650
GAAGGAATGTC AAGGACAGTCTTAGTGCTAGTGAAGTGACCTCAACTGTGTACAACACTG
*****
GAAGGAATGTC AAGGACAGTCTTAGTGCTAGTGAAGTGACCTCAACTGTGTACAACACTG
650      660      670      680      690      700
ss.u41060

ss.DNA164647      660      670      680      690      700      710
TCTCTGAAGGAACCTCCTTTCTAGAGCAATAGAGACTCCCAAGCCCTGGAAACTCTTCC
*****
TCTCTGAAGGAACCTCCTTTCTAGAGCAATAGAGACTCCCAAGCCCTGGAAACTCTTCC
710      720      730      740      750      760
ss.u41060

```

FIG. 3A-2

```

ss.DNA164647      720 730 740 750 760 770
CCAAAGATGTAAGCAGCTCCACTCCACCAGTGTACATCAAAGAGCCGGGTGAGCCGGC
*****
CCAAAGATGTAAGCAGCTCCACTCCACCAGTGTACATCAAAGAGCCGGGTGAGCCGGC
770 780 790 800 810 820
ss.DNA164647      780 790 800 810 820 830
TGGCTGGTAGGAAACAATAATGAACTGTGAGTGAGCCCGAAAGGCTTATGTATTCCA
*****
TGGCTGGTAGGAAACAATAATGAACTGTGAGTGAGCCCGAAAGGCTTATGTATTCCA
830 840 850 860 870 880
ss.DNA164647      840 850 860 870 880 890
GAAACACAAATGAAATCCCTCAGGAGTGTTCATATGCATCAAAGCTACTGACATCTCATG
*****
GAAACACAAATGAAATCCCTCAGGAGTGTTCATATGCATCAAAGCTACTGACATCTCATG
890 900 910 920 930 940
ss.DNA164647      900 910 920 930 940 950
GCATGGGCATCCAGGTTCCGGTGAATGCAACAGAGTTCAACTATCTGTCCAGCCATCA
*****
GCATGGGCATCCAGGTTCCGGTGAATGCAACAGAGTTCAACTATCTGTCCAGCCATCA
950 960 970 980 990 1000
ss.DNA164647      960 970 980 990 1000 1010
TCACCCAAATTTGATGCTAGATCTTGTCTGATTCATACAAGTGAAAGAAGGCTGAAATCC
*****
TCACCCAAATTTGATGCTAGATCTTGTCTGATTCATACAAGTGAAAGAAGGCTGAAATCC
1010 1020 1030 1040 1050 1060
ss.DNA164647      1020 1030 1040 1050 1060 1070
CTCCAAAGACCTATTTCATTACAATAGCCCTGGGTTGGTGGTTTATAGCCATTTCCATCA
*****
CTCCAAAGACCTATTTCATTACAATAGCCCTGGGTTGGTGGTTTATAGCCATTTCCATCA
1070 1080 1090 1100 1110 1120
ss.u41060

```

FIG.-3A-3

【 3 A - 4 】

```

1080      1090      1100      1110      1120      1130
TCAGTTCCCTGTCCTGCTGGGGGTTATCTAGTGCCTCTCATGAATCGGGTGTTTTCA
*****
SS.DNA164647
SS.u41060
TCAGTTCCCTGTCCTGCTGGGGGTTATCTAGTGCCTCTCATGAATCGGGTGTTTTCA
1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
1140      1150      1160      1170      1180      1190
AATTTCCTGAGTTCCCTGTTGGACTGGCCGTTGGACTTTGAGTGGTATGCTTTT
*****
SS.DNA164647
SS.u41060
AATTTCCTGAGTTCCCTGTTGGACTGGCCGTTGGACTTTGAGTGGTATGCTTTT
1190      1200      1210      1220      1230      1240
1200      1210      1220      1230      1240      1250
TACACCTTCTCCACATTTCTCATGCAAGTCAACCACCATAGTCCATAGCCATGAAGAACCCAG
*****
SS.DNA164647
SS.u41060
TACACCTTCTCCACATTTCTCATGCAAGTCAACCACCATAGTCCATAGCCATGAAGAACCCAG
1250      1260      1270      1280      1290      1300
1260      1270      1280      1290      1300      1310
CAATGGAAATGAAAAGAGGACCCTTTCAGTCACTGTCTTCTCAAAACATAGAAGAAA
*****
SS.DNA164647
SS.u41060
CAATGGAAATGAAAAGAGGACCCTTTCAGTCACTGTCTTCTCAAAACATAGAAGAAA
1310      1320      1330      1340      1350      1360
1320      1330      1340      1350      1360      1370
GTGCCCTATTTTGTATCCACGGTGGAGGGTCTAACAGCTCTAGGAGCCCTGTATTTCAATGT
*****
SS.DNA164647
SS.u41060
GTGCCCTATTTTGTATCCACGGTGGAGGGTCTAACAGCTCTAGGAGCCCTGTATTTCAATGT
1370      1380      1390      1400      1410      1420
1380      1390      1400      1410      1420      1430
TTCTTGTGAACATGTCCCTCACATTTGATCAAAACAATTTAAAGATAAGAAAGAAAGAAATC
*****
SS.DNA164647
TTCTTGTGAACATGTCCCTCACATTTGATCAAAACAATTTAAAGATAAGAAAGAAAGAAATC
1430      1440      1450      1460      1470      1480

```

FIG.-3A-4



【 3 A - 6 】

ss.DNA164647 1800 1810 1820 1830 1840 1850  
 CTCACAGTCACAGCCAGCGCTACTCTCGGAGGAGCTGAAAGATGCGCGGCTCGCCACTT  
 \*\*\*\*\*  
 ss.u41060 1850 1860 1870 1880 1890 1900  
 CTCACAGTCACAGCCAGCGCTACTCTCGGAGGAGCTGAAAGATGCGCGGCTCGCCACTT  
 \*\*\*\*\*  
 ss.DNA164647 1860 1870 1880 1890 1900 1910  
 TGGCCYGGATGGTGATAATGGGTGATGGCCCTGCACAAATTCAGCGATGGCCTAGCAATTG  
 \*\*\*\*\*  
 ss.u41060 1910 1920 1930 1940 1950 1960  
 TGGCCYGGATGGTGATAATGGGTGATGGCCCTGCACAAATTCAGCGATGGCCTAGCAATTG  
 \*\*\*\*\*  
 ss.DNA164647 1920 1930 1940 1950 1960 1970  
 GTGCTGCTTTTACTGAAGGCTTATCAAGTGGTTAAAGTACTTCTGTGTGCTGTCTGTGTC  
 \*\*\*\*\*  
 ss.u41060 1970 1980 1990 2000 2010 2020  
 GTGCTGCTTTTACTGAAGGCTTATCAAGTGGTTAAAGTACTTCTGTGTGCTGTCTGTGTC  
 \*\*\*\*\*  
 ss.DNA164647 1980 1990 2000 2010 2020 2030  
 ATGAGTTGCCCTCATGAATTAGGTGACTTTCCTGTTCTACTAAAGGCTGACATGACCGTTA  
 \*\*\*\*\*  
 ss.u41060 2030 2040 2050 2060 2070 2080  
 ATGAGTTGCCCTCATGAATTAGGTGACTTTCCTGTTCTACTAAAGGCTGACATGACCGTTA  
 \*\*\*\*\*  
 ss.DNA164647 2040 2050 2060 2070 2080 2090  
 AGCAGGCTGTCCTTTATAATGCATTCAGCCCATGCTGGCGTATCTTGGAAATGGCAACAG  
 \*\*\*\*\*  
 ss.u41060 2090 2100 2110 2120 2130 2140  
 AGCAGGCTGTCCTTTATAATGCATTCAGCCCATGCTGGCGTATCTTGGAAATGGCAACAG  
 \*\*\*\*\*  
 ss.DNA164647 2100 2110 2120 2130 2140 2150  
 GAATTTTCATTTGGTCATTATGCTGAAAATGTTCTATGTGGATATTTGCACCTACTGCTG  
 \*\*\*\*\*  
 ss.u41060 2150 2160 2170 2180 2190 2200  
 GAATTTTCATTTGGTCATTATGCTGAAAATGTTCTATGTGGATATTTGCACCTACTGCTG  
 \*\*\*\*\*

FIG.-3A-6



2520 2530 2540 2550 2560 2570 2620  
 TATTCTATCTTGGAGATAAAATCTGTATGTGCAATTCACCGGTATFACAGTTTATTATG  
 \*\*\*\*\*  
 TATTCTATCTTGGAGATAAAATCTGTATGTGCAATTCACCGGTATFACAGTTTATTATG  
 2570 2580 2590 2600 2610 2620  
  
 2580 2590 2600 2610 2620 2630  
 TAAACAAGAGATTGGCATGACATGTTCTGTATGTTTCAGGGAAAATGCTTTAATGCT  
 \*\*\*\*\*  
 TAAACAAGAGATTGGCATGACATGTTCTGTATGTTTCAGGGAAAATGCTTTAATGCT  
 2630 2640 2650 2660 2670 2680  
  
 2640 2650 2660 2670 2680 2690  
 TTTTCAAGAACAACACACAGTTATTCCTAFACTGGATTTAGGTCCTCGAAGAACTGCTGG  
 \*\*\*\*\*  
 TTTTCAAGAACAACACACAGTTATTCCTAFACTGGATTTAGGTCCTCGAAGAACTGCTGG  
 2690 2700 2710 2720 2730 2740  
  
 2700 2710 2720 2730 2740 2750  
 TGTTTAGGAATAAGAATGTGCATGAAGCCATAAATACCAAGAAAGCTAFACTGAATTTA  
 \*\*\*\*\*  
 TGTTTAGGAATAAGAATGTGCATGAAGCCATAAATACCAAGAAAGCTAFACTGAATTTA  
 2750 2760 2770 2780 2790 2800  
  
 2760 2770  
 AGCAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:3)  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*  
  
 2810 2820 2830 2840 2850 2860  
 AGCAAGAAATAAAGSAGAAAAGAGAAGAACTCTGAGAAATTTGGGAGGCATAGATCTTAT  
  
 2870 2880 2890 2900 2910 2920  
 AAAAAACAAAAATTTGTTGTAATTTAGAGGGGAGAAATTTAGAAATTAAGTATAAAAAGG

FIG.-3A-8

【 3A - 9】

SS.u41060	CAGAAATTAGTAGAGTACATTTCATTTAAACATTTTGTCCAGGATTTATTCCTCCGTAATAAAC	2930	2940	2950	2960	2970	2980
SS.u41060	GTAGTGAGCACCTCCTCATATACATAAATAGTGTACATTTAACTTTGTATAAATACAGAAATCT	2990	3000	3010	3020	3030	3040
SS.u41060	AAATRYATTAATGAATTCAAGCAATATACACACTTGACCAGAAATTTGGAATTTCAAAATG	3050	3060	3070	3080	3090	3100
SS.u41060	TTCGTCCGGTTATATACCAGATGAGTACAGTAGTAGTTTATGTATCACCAGACTGGGT	3110	3120	3130	3140	3150	3160
SS.u41060	TATTGCCAAGTTATATATCACCCAAAAGCTGTATGACTGGATGTTCTCGTTACCTGGTTTA	3170	3180	3190	3200	3210	3220
SS.u41060	CAAAATTACAGAGTAGTAAAACTTTGTATATATATAGAGGATATTAAACTACACTAAGTA	3230	3240	3250	3260	3270	3280
SS.u41060	TCATTTGATTCGATTCAGAAAAGTACTTTTGATATCTCTCAGTGTCTCAGTGTCTCAGTGTCTC	3290	3300	3310	3320	3330	3340
SS.u41060	GAGCAATTCCTTTATATACGGTACTGTAGCCATAC TAGGCCCTGTCTGTGGCATTCCTCTA	3350	3360	3370	3380	3390	3400
SS.u41060	GATGTTTCTTTTACACAAATAAATTCCTTATATATCAGCTTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA	3410	3420	3430	3440	3450	3460
SS.u41060	A (SEQ ID NO:1)						

FIG.-3A-9

p1.164647	10	20	30	40	50	60
	MARKLSVILLITFALSVTNPLHELKAAAFPTTEKISPWESGINVDLAISTROYHLQQL					
	*****					
p1.H00961	10	20	30	40	50	60
	MARKLSVILLITFALSVTNPLHELKAAAFPTTEKISPWESGINVDLAISTROYHLQQL					
	*****					
p1.164647	70	80	90	100	110	120
	FYRYGENNSLVEGFRKLLQNIIGDKIKRIHIIHDDHSDHEHSDHEHSDH					
	*****					
p1.H00961	70	80	90	100	110	120
	FYRYGENNSLVEGFRKLLQNIIGDKIKRIHIIHDDHSDHEHSDHEHSDH					
	*****					
p1.164647	130	140	150	160	170	180
	EHSDHSHHHAASGKKNKALCPDHDSDSSGKDPNRSQKGAHRPEHAGRRNVKD					
	*****					
p1.H00961	130	140	150	160	170	180
	EHSDHSHHHAASGKKNKALCPDHDSDSSGKDPNRSQKGAHRPEHAGRRNVKD					
	*****					
p1.164647	190	200	210	220	230	240
	SVSASEVTSTVYNTVSEGTHFLEIETPRPGKLPKDVSSSTPPSVTSKRSVRLAGRKT					
	*****					
p1.H00961	190	200	210	220	230	240
	SVSASEVTSTVYNTVSEGTHFLEIETPRPGKLPKDVSSSTPPSVTSKRSVRLAGRKT					
	*****					
p1.164647	250	260	270	280	290	300
	NEVSEPRKGFMYSRNTNENPQECFNASKLLTSHGMGIQVPLNATEFNILCPAIINQIDA					
	*****					
p1.H00961	250	260	270	280	290	300
	NEVSEPRKGFMYSRNTNENPQECFNASKLLTSHGMGIQVPLNATEFNILCPAIINQIDA					
	*****					
p1.164647	310	320	330	340	350	360
	RSCLLHTSEKKAIEIPPKTYSLQIANVGGFIAISIIISFLSLLGVILVPLMNRVFFKLLSF					
	*****					
p1.H00961	310	320	330	340	350	360
	RSCLLHTSEKKAIEIPPKTYSLQIANVGGFIAISIIISFLSLLGVILVPLMNRVFFKLLSF					
	*****					
p1.164647	370	380	390	400	410	420
	LVALAVGTLSGDAFLHLLPHSHASHHSHSHEEPAMENKRGPLFSLSSQNIIESAYFDS					
	*****					
p1.H00961	370	380	390	400	410	420
	LVALAVGTLSGDAFLHLLPHSHASHHSHSHEEPAMENKRGPLFSLSSQNIIESAYFDS					
	*****					

FIG.\_4-1

【図4-2】

p1.164647 430 440 450 460 470 480  
 TWKGLTALGGLYFMFLVEHVLTLIKQFKKKKQKPPENDDDDVEIKKQLSKYESQLSTN  
 \*\*\*\*\*  
 TWKGLTALGGLYFMFLVEHVLTLIKQFKKKKQKPPENDDDDVEIKKQLSKYESQLSTN  
 420 430 440 450 460 470

p1.164647 490 500 510 520 530 540  
 EEKVDTDRTTEGYLRADSQEPSHFDSQQPAVLEEEVMIHAHPQEVYNEYVPRGCKNKC  
 \*\*\*\*\*  
 EEKVDTDRTTEGYLRADSQEPSHFDSQQPAVLEEEVMIHAHPQEVYNEYVPRGCKNKC  
 480 490 500 510 520 530

p1.164647 550 560 570 580 590 600  
 HSHFHDTLGQSDDLLHHHDYHHILHHHQNHSHSQRYSREELKDGATLAWMVI  
 \*\*\*\*\*  
 HSHFHDTLGQSDDLLHHHDYHHILHHHQNHSHSQRYSREELKDGATLAWMVI  
 540 550 560 570 580 590

p1.164647 610 620 630 640 650 660  
 MGDGLHNFSDGLAIGAAFTTEGLSSGLSTSVAVFCHLPHLGDFAVLLKADMTVKQAVLY  
 \*\*\*\*\*  
 MGDGLHNFSDGLAIGAAFTTEGLSSGLSTSVAVFCHLPHLGDFAVLLKADMTVKQAVLY  
 600 610 620 630 640 650

p1.164647 670 680 690 700 710 720  
 NALSAMLAYLGMATGIFIGHYAENVSMWIFALTAGLFMYVALVDMVPEMLHNDASDHGCS  
 \*\*\*\*\*  
 NALSAMLAYLGMATGIFIGHYAENVSMWIFALTAGLFMYVALVDMVPEMLHNDASDHGCS  
 660 670 680 690 700 710

p1.164647 730 740 750  
 RWGYFFLQWAGMLLGFIMLLISIFEHKIVFRINF (SEQ ID NO:4)  
 \*\*\*\*\* \*  
 RWGYFFLQWAGMLLGFIMLLIPYLNKSC-SYKFLVKV (SEQ ID NO:2)  
 720 730 740 750

FIG.-4-2

【図5】

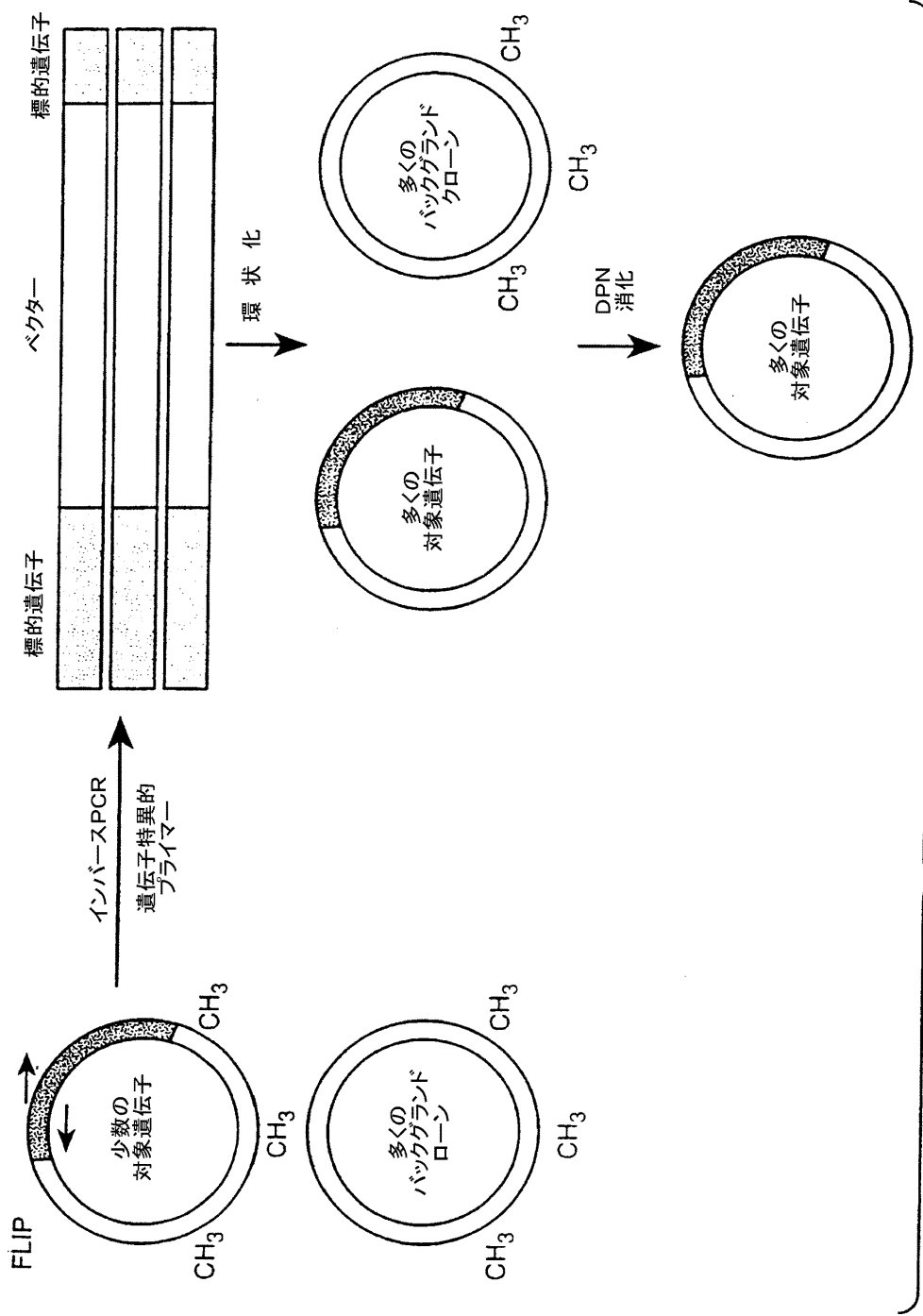


FIG. 5

【図6】

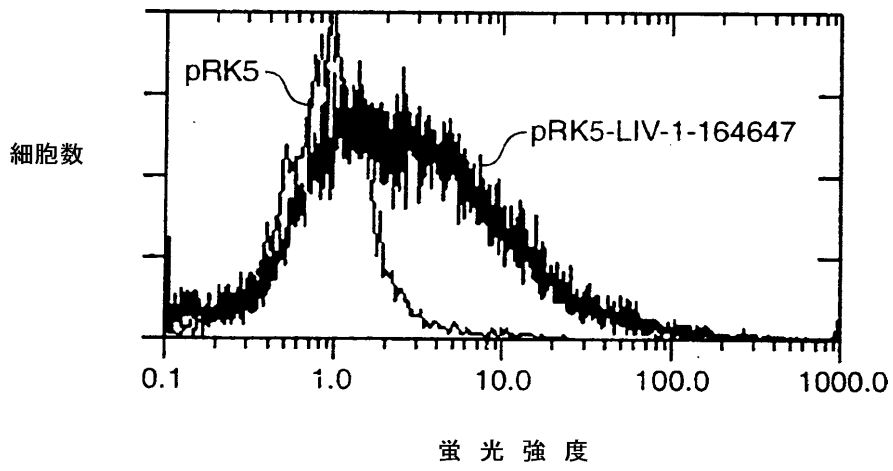


FIG.\_6

【図7】

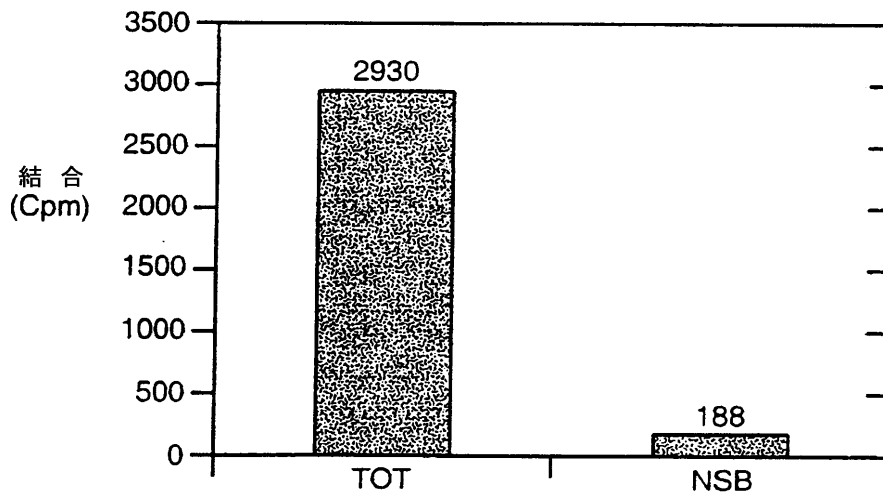


FIG.\_7

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/02622
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C07K14/705 C12N15/12 C07K16/18 G01N33/50 A61K38/16		
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 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBL, STRAND, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE ENTREZ NUCLEOTIDE 'Online! NCBI; Acc. No. U41060 (Version 1; GI:1256000), 6 April 1996 (1996-04-06) GREEN, C ET AL.: "Human Breast Cancer, estrogen regulated LIV-1 protein (LIV-1) mRNA, partial cds." XP002175106 cited in the application the whole document -&amp; DATABASE ENTREZ NUCLEOTIDE 'Online! NCBI; Acc. No. U41060 (Version 2; GI:12711792), 8 February 2001 (2001-02-08) GREEN, C ET AL.: "Human Breast Cancer, estrogen regulated LIV-1 protein (LIV-1) mRNA, complete cds." XP002175107 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-3, 8-13,17, 21-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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 <b>16 August 2001</b>		Date of mailing of the international search report <b>07/09/2001</b>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Steffen, P</b>

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 01/02622

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	--- DATABASE EMBL 'Online! EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE; Acc. No. AE000299, 29 January 1999 (1999-01-29) BLATTNER FR ET AL.: "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12" XP002175108 yhoM gene and corresponding protein ---	11,17
X	--- DATABASE EMBL 'Online! EUROPEAN INSTITUTE FOR BIOINFORMATICS; ACC. NO. AF062400, 12 November 1998 (1998-11-12) DEHESH, K: "Cuphea hookeriana thioesterase FatB1-1" XP002175109 amino acids 130-142 ---	19
X	--- TAYLOR K M ET AL: "The LIV-1 gene, implicated in metastatic breast cancer, codes for a histidine-rich transmembrane protein." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 80, no. SUPPL. 2, July 1999 (1999-07), page 24 XP001013344 Joint Meeting of the British Association for Cancer Research, the British Oncological Association, the Association of Cancer Physicians and the Royal College of Radiologists; Edinburgh, Scotland, UK; July 11-14, 1999 ISSN: 0007-0920 abstract ---	91,95
X	--- TAYLOR K M ET AL: "LIV-1 breast cancer protein belongs to a new family of histidine-rich transmembrane proteins with potential to control intracellular Zn <sup>++</sup> ." CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS, vol. 17, no. 9, 1999, page 758 XP001013451 VIII International Congress of the Metastasis Research Society; London, UK; September 24-27, 2000 ISSN: 0262-0898 abstract --- ---	91,92

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 01/02622

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	<p>TAYLOR K M: "LIV-1 breast cancer protein belongs to new family of histidine-rich membrane proteins with potential to control intracellular Zn<sup>2+</sup> homeostasis."            IUBMB LIFE,            vol. 49, no. 4, April 2000 (2000-04),            pages 249-253, XP001012651            ISSN: 1521-6543            the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>EL-TANANI MOHAMMED K K ET AL:            "Interaction between estradiol and growth factors in the regulation of specific gene expression in MCF-7 human breast cancer cells."            JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY,            vol. 60, no. 5-6, 1997, pages 269-276,            XP001013443            ISSN: 0960-0760            the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>EL-TANANI M K K ET AL: "Interaction between estradiol and CAMP in the regulation of specific gene expression."            MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY,            vol. 124, no. 1-2, 1996, pages 71-77,            XP001013445            ISSN: 0303-7207            the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>MANNING D L ET AL: "The role of four oestrogen-responsive genes, pLIV1, pS2, pSYD3 and pSYD8, in predicting responsiveness to endocrine therapy in primary breast cancer."            EUROPEAN JOURNAL OF CANCER,            vol. 29A, no. 10, 1993, pages 1462-1468,            XP001018909            ISSN: 0959-8049            the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>MANNING D L ET AL: "Oestrogen-regulated genes in breast cancer: Association of pLIV1 with lymph node involvement."            EUROPEAN JOURNAL OF CANCER,            vol. 30A, no. 5, 1994, pages 675-678,            XP001018910            ISSN: 0959-8049            the whole document</p> <p>---</p>	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/02622
--

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE EMBL 'Online! EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORIES; ACC. NO. AP001158, 15 February 2000 (2000-02-15) HATTORI, M ET AL.: "Homo sapiens 160,170 genomic DNA of 18q12." XP002175110 base pairs 32162-32227 -----	1-5

2

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 25-31, 54

Present claims 25-31 and 54 relate either to an isolated polypeptide, wherein the polypeptide binds to a monoclonal antibody, wherein the antibody binds to the same epitope to which a certain deposited antibody furnished with the present application binds or to a monoclonal antibody itself defined in this manner.

Since the binding epitopes of the antibodies have not been precisely determined, arises here a lack of clarity and support within the meaning of Article 6 PCT, an this to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search not has been carried out for claims 25-31 and 54.

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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	45/00	A 6 1 P	1/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P	1/00		1/04	4 C 0 8 5
	1/04		11/00	4 H 0 4 5
	11/00		13/08	
	13/08		13/12	
	13/12		15/00	
	15/00		35/00	
	35/00	C 0 7 K	14/82	
C 0 7 K	14/82		16/32	
	16/32		16/46	
	16/46		19/00	
	19/00	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/19		1/21	
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/68	A
	15/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15		33/574	Z
	33/50		33/577	B
	33/53	C 1 2 P	21/08	
	33/574	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/577			B
// C 1 2 P	21/08		5/00	B

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 スミス, ヴィクトリア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010,  
 バーリンゲーム, ドゥワイト ロード 19

(72)発明者 ホンゴ, ジョーアン, エス.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061,  
レッド ウッド シティ, ショウ コ  
ート

(72)発明者 デ ソーバージュ, フレデリック  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,  
フォスター シティ, シューティング  
スター アイル 187

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36  
FB03  
4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 CA04  
DA02 DA06 DA12 GA05 HA14  
4B063 QA19 QQ03 QQ58 QR55 QS33  
QS35 QX07  
4B064 AG27 DA05 DA14  
4B065 AA26 AA72 AA90 AB01 BA01  
CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA13 AA14 AA19  
BA01 BA02 BA08 BA22 BA23  
CA18 CA53 CA56 CA59 MA02  
NA13 NA14 ZA592 ZA662  
ZA812 ZB262  
4C085 AA13 AA14 AA16 AA21 CC02  
CC04 CC05 CC21 CC23 EE01  
EE03  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41  
CA41 DA76 DA86 EA28 EA51

专利名称(译)	LIV-1相关蛋白，编码其的多核苷酸，及其用于治疗癌症的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003523207A</a>	公开(公告)日	2003-08-05
申请号	JP2001561030	申请日	2001-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ゴッダードオードリー ガーニーオースティンエル スミスヴィクトリア ホンゴジョーアンエス デソーバージュフレデリック		
发明人	ゴッダード,オードリー ガーニー,オースティン,エル. スミス,ヴィクトリア ホンゴ, ジョーアン,エス. デソーバージュ, フレデリック		
IPC分类号	G01N33/50 A61K A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P35/00 C07K C07K14/47 C07K14/82 C07K16/30 C07K16/32 C07K16/46 C07K19/00 C12N C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 C07K14/47 C07K14 /4748 C07K16/30 C07K2317/34 G01N33/57415 G01N33/57484		
FI分类号	A61K39/395.C A61K39/395.D A61K39/395.L A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P11 /00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/574.Z G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.B C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/GA05 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ58 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS35 4B063 /QX07 4B064/AG27 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26 4B065/AA72 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084 /AA14 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/MA02 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084 /ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA21 4C085 /CC02 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045 /EA28 4H045/EA51		
优先权	60/177951 2000-01-25 US 60/195761 2000-04-10 US		
其他公开文献	JP2003523207A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于治疗以LIV-1过表达为特征的疾病的组合物和方法。更具体地，该组合物用于治疗具有LIV-1的DNA和氨基酸序列，针对LIV-1的抗体以及LIV-1的过表达的哺乳动物，所述哺乳动物易患癌症或被诊断出患有癌症。关于方法。

