

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4900884号
(P4900884)

(45) 発行日 平成24年3月21日 (2012. 3. 21)

(24) 登録日 平成24年1月13日 (2012. 1. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 35/12 (2006. 01)

C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 35/12

C 1 2 N 5/00 2 O 2 L

A 6 1 K 39/00 H

請求項の数 19 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-516288 (P2002-516288)
 (86) (22) 出願日 平成13年7月30日 (2001. 7. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2001/006526
 (87) 国際公開番号 W02002/010369
 (87) 国際公開日 平成14年2月7日 (2002. 2. 7)
 審査請求日 平成20年2月26日 (2008. 2. 26)
 (31) 優先権主張番号 特願2000-231814 (P2000-231814)
 (32) 優先日 平成12年7月31日 (2000. 7. 31)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 304058240
 株式会社グリーンペプタイド
 福岡県久留米市百年公園 1 番 1 号 福岡バ
 イオインキュベーションセンター 4 0 2 号
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (72) 発明者 伊東 恭悟
 佐賀県三養基郡基山町けやき台 2 丁目 2 5
 番地 9 号

審査官 長谷川 茜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍抗原

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 ～ 4 4 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 2】

配列表の配列番号 4 5 ～ 4 7 及び配列番号 4 9 ～ 5 3 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 3】

配列表の配列番号 1 ～ 4 4 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号 4 5 ～ 4 7 及び配列番号 4 9 ～ 5 3 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドからなる医薬

【請求項 4】

配列表の配列番号 1 ～ 4 4 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号 4 5 ～ 5 3 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する癌ワクチン。

【請求項 5】

配列表の配列番号 1 ～ 4 4 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号 4 5 ～ 5 3 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有し、膵臓癌、大腸癌、若しくは胃癌の治療に用いられる癌ワクチン。

【請求項 6】

配列表の配列番号 1～44 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号 45～53 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する細胞傷害性 T 細胞の誘導剤。

【請求項 7】

配列表の配列番号 1～44 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号 45～53 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを使用することを特徴とする人の生体外での細胞傷害性 T 細胞の誘導方法。

10

【請求項 8】

配列表の配列番号 1～47 及び配列番号 49～53 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項 9】

配列表の配列番号 54～56 及び配列番号 58～62 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項 10】

配列表の配列番号 54～56 及び配列番号 58～62 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドが細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識される、ポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

20

【請求項 11】

請求項 8～10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖を含有する組換えベクター。

【請求項 12】

請求項 8～10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖を含有する発現組換えベクター。

【請求項 13】

請求項 8～10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖を含有する組換えベクター若しくは発現組換えベクターにより形質転換された形質転換体。

30

【請求項 14】

請求項 8～10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖を含有する発現組換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 に記載のポリペプチドまたは請求項 2 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項 16】

請求項 1 に記載のペプチド若しくは請求項 2 に記載のポリペプチドおよび／または HLA-A2 と相互作用して少なくとも HLA-A2 拘束性細胞傷害性 T 細胞による該ペプチド若しくは該ポリペプチドの認識を増強する化合物、および／または請求項 8～10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求項 1 に記載のペプチド、請求項 2 に記載のポリペプチド、請求項 8～10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、請求項 11 若しくは 12 に記載の組換えベクター若しくは発現組換えベクター、請求項 13 に記載の形質転換体、または請求項 15 に記載の抗体のうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

40

【請求項 17】

請求項 3 に記載の医薬、請求項 4 若しくは請求項 5 に記載の癌ワクチン、または請求項 6 に記載の細胞傷害性 T 細胞の誘導剤からなる癌疾患治療剤。

50

【請求項 18】

請求項 1 に記載のペプチド若しくは請求項 2 に記載のポリペプチドまたは請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法。

【請求項 19】

請求項 1 に記載のペプチド若しくは請求項 2 に記載のポリペプチドまたは請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法に使用する試薬キットであって、請求項 1 に記載のペプチド、請求項 2 に記載のポリペプチド、請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または請求項 15 に記載の抗体を少なくとも 1 つ以上含んでなる試薬キット。

【発明の詳細な説明】

10

技術分野

本発明は、腫瘍抗原に関し、さらに詳しくは腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞により認識されるペプチドまたはポリペプチド、該ペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ペプチドまたは該ポリペプチドに対する抗体、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ペプチドおよび／または該ポリペプチドからなる細胞傷害性 T 細胞誘導剤、およびこれらの 1 種以上を含む医薬組成物、並びに該ポリペプチドの製造方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドを用いる細胞傷害性 T 細胞の誘導方法、該ペ

20

背景技術

生体における癌の排除には免疫系、特に細胞傷害性 T 細胞 (C y t o t o x i c T L y m p h o c y t e) (以下、CTL と略称することもある) が重要な役割を果たしている。癌患者の腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示す細胞傷害性 T 細胞の浸潤が認められている (A r c h . S u r g . , 1 2 6 : 2 0 0 ~ 2 0 5 , 1 9 9 0) 。この腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞の標的分子 (腫瘍抗原) は、メラノーマにおいて初めて発見された。腫瘍細胞内で生成された腫瘍抗原は、細胞内で分解されて 8 ~ 1 1 個のアミノ酸からなるペプチド (腫瘍抗原ペプチド) になり、主要組織適合性抗原であるヒト白血球抗原 (H L A) 分子と結合して腫瘍細胞表面上に提示される。細胞傷害性 T 細胞は H L A と腫瘍抗原ペプチドとからなる複合体を認識して腫瘍細胞を傷害する。すなわち、細胞傷害性 T 細胞は H L A 拘束性に腫瘍抗原ペプチドを認識する。

30

H L A は細胞膜抗原であり、ほとんど全ての有核細胞上に発現している。H L A はクラス I 抗原とクラス II 抗原に大別されるが、細胞傷害性 T 細胞により抗原ペプチドとともに認識される H L A はクラス I 抗原である。H L A クラス I 抗原はさらに H L A - A 、 H L A - B 、 H L A - C 等に分類され、それらの遺伝子は多型に富むことが報告されている。H L A - A 亜領域の多型の 1 つである H L A - A 2 対立遺伝子 (a l l e l e) は、アフリカ黒人の約 2 3 % 、中国人の約 5 3 % 、日本人の約 4 0 % 、北アメリカコーカサス人の約 4 9 % 、および南アメリカコーカサス人の約 3 8 % でみられる。

40

ここにおいて、腫瘍抗原とは腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導し得る、腫瘍細胞が有する蛋白質、ポリペプチド、またはペプチドを意味する。また腫瘍抗原ペプチドとは、該腫瘍抗原が腫瘍細胞内で分解されて生じるペプチドであり、H L A 分子と結合して細胞表面上に提示されることにより腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導または活性化し得るペプチドを意味する。さらに、腫瘍抗原が有する腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導し得るアミノ酸配列の部位を腫瘍抗原エピトープ (腫瘍抗原決定基) という。

近年、細胞傷害性 T 細胞により認識されうる腫瘍抗原をコードする多くの遺伝子が、ヒトの癌細胞の c D N A から同定されている (S c i e n c e , 2 5 4 : 1 6 4 3 ~ 1 6 4 7 , 1 9 9 1) (J . E x p . M e d . , 1 8 3 : 1 1 8 5 ~ 1 1 9 2 , 1 9 9 6) (J . I m m u n o l . , 1 6 3 : 4 9 9 4 ~ 5 0 0 4 , 1 9 9 9) 。これらは、H E R / n e

50

u (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:432~436, 1995)、変異cdk (Science, 269:1281~1284, 1995)、そして変異CASP-8 (J. Exp. Med., 186:785~793, 1997)等であり、増殖性細胞および悪性形質転換体中に含まれる。

また、腫瘍拒絶抗原遺伝子やT細胞抗原レセプター(TCR)等の特異免疫に関与する分子が、過去10年において、メラノーマ、食道癌、およびその他の癌で同定されてきており、進行癌または転移性癌のペプチドによる特異的免疫療法が検討されてきている。

現在欧米では、腫瘍抗原投与により癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされており、メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原gp100ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン-2(IL-2)を静脈注射投与すると、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている(Nature Medicine, 4:321, 1998)。このように腫瘍抗原は、ワクチンとして利用することにより、有効な癌治療効果を期待できる。

しかしながら、同定されている腫瘍抗原はメラノーマ由来のものが多く、発病頻度の高い上皮性の癌や腺癌、例えば膵臓癌についてのこのような特異的免疫療法に関する研究はほとんど報告されていない。膵臓癌は、世界における癌による死因の最たるものの一つであり、米国では年間約27,000人、欧州では約50,000人が膵臓癌によって死亡している。この膨大な数の死因は、主に、有効な治療法の欠如、診断の困難性、そしてこの癌の活動性によるものである。膵臓癌患者のほんの1~4%が病気を克服しているにすぎず、発病率と死亡率が実質的に同一である。それゆえ、新治療手法、例えば特異的免疫療法の開発が期待されている。

さらに、癌の多様性を考えた場合、全ての癌細胞において同一の腫瘍抗原が同程度発現されているとは考えられない。もちろん、単一の腫瘍抗原を用いて細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法によっても、該腫瘍抗原を有する癌の治療効果は得られる。しかし、癌の治療において腫瘍抗原に特異的な細胞傷害性T細胞を誘導・活性化し、かつ癌の多様性に対応して高い治療効果を得るためには、癌の多様性に応じた数多くの新たな腫瘍抗原を発見し利用することが重要である。

発明の開示

本発明の一態様は、配列表の配列番号1から配列番号44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。

本発明の一態様は、配列表の配列番号45から配列番号53のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

本発明の一態様は、配列表の配列番号1から配列番号44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号45から配列番号53のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる1種以上のペプチドまたはポリペプチドからなる医薬である。

本発明の一態様は、配列表の配列番号1から配列番号44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号45から配列番号53のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる1種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する癌ワクチンである。

本発明の一態様は、配列表の配列番号1から配列番号44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号45から配列番号53のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる1種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有し、膵臓癌、大腸癌、若しくは胃癌の治療に用いられる癌ワクチンである。

本発明の一態様は、配列表の配列番号1から配列番号44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号45から配列番号53のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる1種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する細胞傷害性T細胞の誘導剤である。

本発明の一態様は、配列表の配列番号1から配列番号44のいずれか1に記載のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列からなるペプチドおよび配列表の配列番号 4 5 から配列番号 5 3 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを使用することを特徴とする細胞傷害性 T 細胞の誘導方法である。

本発明の一態様は、配列表の配列番号 1 から配列番号 5 3 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。

本発明の一態様は、配列表の配列番号 5 4 から配列番号 6 2 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。

本発明の一態様は、配列表の配列番号 5 4 から配列番号 6 2 のいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドが細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識される、ポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。

10

本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドである。

本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または該ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを含有する組換えベクターである。

本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または該ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを含有する発現組換えベクターである。

20

本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または該ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター若しくは発現組換えベクターにより形質転換された形質転換体である。

本発明の一態様は、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または該ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを含有する発現組換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、前記ポリペプチドの製造方法である。

本発明の一態様は、前記ペプチドまたは前記ポリペプチドを免疫学的に認識する抗体である。

30

本発明の一態様は、前記ペプチド若しくは前記ポリペプチドおよび／または H L A - A 2 と相互作用して少なくとも H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞による該ペプチド若しくは該ポリペプチドの認識を増強する化合物、および／または前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、前記ペプチド、前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、前記組換えベクター若しくは発現組換えベクター、前記形質転換体、または前記抗体のうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法である。

本発明の一態様は、前記ペプチド若しくは前記ポリペプチドおよび／または H L A - A 2 と相互作用して少なくとも H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞による該ペプチド若しくは該ポリペプチドの認識を増強する化合物、および／または前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、前記ペプチド、前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、前記組換えベクター若しくは前記発現組換えベクター、前記形質転換体、または前記抗体のうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法により得られた化合物である。

40

本発明の一態様は、前記ペプチド若しくは前記ポリペプチドの少なくとも 1 つに対する H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞による認識を増強する化合物、または前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物である。

本発明の一態様は、前記ペプチド、前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチドまたはその相補鎖、前記組換えベクター若しくは前記発現組換えベクター、前記形質転換体、前記抗

50

体、および前記化合物のうちの少なくとも1つを含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物である。

本発明の一態様は、前記医薬、前記癌ワクチン、前記細胞傷害性T細胞の誘導剤、または前記医薬組成物の癌疾患への使用である。

本発明の一態様は、前記ペプチド若しくは前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法である。

本発明の一態様は、前記ペプチド若しくは前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法に使用する試薬キットであって、前記ペプチド、前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または前記抗体を少なくとも1つ以上含んでなる試薬キットである。

10

本発明の一態様は、前記ペプチド若しくは前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法に使用する試薬キットであって、前記ペプチド、前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または前記抗体を少なくとも1つ以上含んでなる試薬キットの癌疾患検査への使用である。

発明を実施するための最良の形態

本発明者は、膵臓癌の特異的免疫療法に使用し得る腫瘍拒絶抗原遺伝子および該遺伝子がコードする腫瘍抗原を同定するために、大腸癌患者からHLA-A2と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A2拘束性・腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を樹立し（以下この細胞をOK-CTLpと呼ぶこともある）、この腫瘍特異的細胞傷害性T細胞（CTL）に認識され得る腫瘍抗原をコードする遺伝子を、遺伝子発現クローニング法を用いて、ヒト膵臓腺癌細胞株であるPanc-1細胞のcDNAライブラリーから単離・同定した。また、SEREX（Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries）法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11910-11813, 1995）で腫瘍抗原をコードしている遺伝子として同定されたものから、上記同様にCTLに認識され得るものを同定した。さらに、得られた遺伝子にコードされる腫瘍抗原に基づいて、腫瘍抗原エピトープを有するペプチドを見い出した。

20

本明細書においては、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドのうち長鎖ペプチドをポリペプチドという。例えばタンパク質も本明細書においてはポリペプチドに含まれる。また、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチドを、単にペプチドという。

30

またここで、「認識する（recognize）」とは、認識するものが、認識される対象を他の物質と見分けて認知し、例えば認知した対象に結合することを意味する。特に、本明細書において、CTLが腫瘍細胞あるいは腫瘍抗原ペプチドを認識するとは、CTLがHLAにより提示された腫瘍抗原ペプチドにT細胞受容体を介して結合することを意味する。「活性化する」とは、ある活性若しくは作用を有するものまたは状態を、さらに増強するまたは作動させることを意味する。特に、本明細書において、CTLが活性化するとは、CTLがHLAにより提示された抗原を認識することにより、IFN- γ を産生すること、あるいはCTLが認識した標的細胞に対し細胞傷害性を示すことを意味する。「誘導する」とは、ある活性若しくは作用をほとんど持たないものまたは状態から、該活性若しくは該作用を発生させることを意味する。特に、本明細書において、抗原特異的なCTLを誘導するとは、インビトロあるいはインビボにおいて、ある抗原を特異的に認識するCTLを分化および／または増殖させることを意味する。また、本明細書において細胞傷害性T細胞の誘導剤とは、ある抗原を特異的に認識するCD8陽性T細胞が存在しないあるいは非常に低い割合でしか存在しない状態から、該抗原を認識する細胞傷害性T細胞が非常に多い割合で存在するような状態へと変化させる作用を示す薬剤を意味する。

40

（腫瘍抗原遺伝子、腫瘍抗原、および腫瘍抗原ペプチドの単離・同定）

本発明においてはまず、上記HLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞であるOK-CTLpをエフェクター細胞として用い、この細胞を活性化し得る腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて単離・同定した。すなわち、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1のcDN

50

AとHLA-A0207のcDNAとをCOS-7細胞に共遺伝子導入し、該導入遺伝子が発現された細胞のうち、OK-CTLpからのIFN- γ 産生を促進するものを選択することにより、CTLを活性化し得る腫瘍抗原をコードする遺伝子を同定した。具体的方法は、後述する実施例に示す。その結果、OK-CTLpによりHLA-A2拘束性に認識される7個のcDNAクローンが得られた。

また、ヒト膵臓腺癌細胞株CFPAC-1のcDNAライブラリーからSEREX法により検出されて既に報告されている腫瘍抗原をコードする遺伝子(Biochem. Biophys. Res. Commun., 281:936-944, 2001)から、HLA-A2拘束性にCTLを活性化し得る2つの腫瘍抗原をコードする遺伝子、KM-PA-2およびKM-PA-4を上記同様の方法により見出した。SEREX法は腫瘍抗原の検出に用いることができる方法であるが、同方法で検出された1,500種余りの腫瘍抗原のうち細胞性および液性免疫を惹起し得る腫瘍抗原として同定されたものはMAGE-1、チロシナーゼ、およびNY-ESO-1のみである。この様に、SEREX法により腫瘍抗原として同定されたものであってもCTLを活性化し得るとは限らない。上記腫瘍抗原遺伝子、KM-PA-2およびKM-PA-4がHLA-A2拘束性にCTLを活性化し得ることは、本発明において初めて見い出された。

上記のPanc-1細胞から得られた7個のcDNAクローンは全て、完全なオープンリーディングフレーム(ORF)を含むものであった。これら遺伝子の塩基配列をサンガー法(チェインターミネーター法)により決定し、該塩基配列からアミノ酸配列を推定した。これらの塩基配列および推定アミノ酸配列について、GenBank等の既存のデータベースに対して相同性検索を行ったところ、下記に示すような遺伝子と高い相同性はあるものの、これらは新規な塩基配列を有するcDNAであった。相同性のある既知遺伝子についても腫瘍抗原としての機能は報告されていない。なお、得られた7個のcDNAクローン(クローン1~7)のうちクローン3は、上記遺伝子発現クローニング法で得た当初のクローンがWolf-Hirschhorn syndrome candidate

2蛋白質(WHSC2)の遺伝子と高い相同性が認められたものの塩基配列が5'末端領域において25bp短かったので、その完全長のcDNAをPanc-1細胞のcDNAライブラリーから、³²P標識当該クローンをプローブとして用いて標準的コロニーハイブリダイゼーション法で得たものである。以下、上記クローン1~7が由来したPanc-1細胞の遺伝子をそれぞれ遺伝子1~7と呼ぶ。また、各遺伝子がコードするアミノ酸配列からなるポリペプチドを遺伝子産物1~7と呼ぶこともある。これら各遺伝子がコードする推定アミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号45~51に、その塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号54~60に示した。上記遺伝子1~6は平成12年6月12日に、遺伝子7は平成12年8月2日に、国立遺伝子研究所・日本DNAデータバンク(DDBJ)に登録された(表1)。

KM-PA-2およびKM-PA-4についても、表1に示す相同性の高い遺伝子が既に報告されている(Biochem. Biophys. Res. Commun., 281:936-944, 2001)。KM-PA-2およびKM-PA-4の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号52および配列番号53に、推定アミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号61および配列番号62に示した。

10

20

30

40

表 1

遺伝子			遺伝子がコードする ポリペプチド			相同性の高い遺伝子
	塩基長 (bp) [DDBJ アクセシ ョン番号]	配 列 番 号		アミ ノ 酸 長	配 列 番 号	[GenBank アクセシ ョン番号]
1	1775 [AB044550]	54	PP 1	270	45	ubiquitin-conjugated enzyme variant Kua (UBE2V) [AF155120]
2	2097 [AB044547]	55	PP 2	589	46	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRPL) [NM001533]
3	2243 [AB044549]	56	PP 3	549	47	Wolf-Hirschhorn Syndrome candidate 2 protein (WHSC2) [AK001304]
4	831 [AB044548]	57	PP 4	118	48	eIF-4E-binding protein 1 (EIF4EBP1) [NM004095]
5	2404 [AB044546]	58	PP 5	779	49	partial putative mitogen activated protein kinase kinase kinase (ppMAPkkk) [AJ242724]
6	6707 [AB044545]	59	PP 6	1087	50	2',5'-oligoadenylate synthetase 3 (2-5 OAS3) [NM006187]
7	769 [AB046744]	60	PP 7	216	51	cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) [U37012]
KM-PA-2	2039 [AB060694]	61	PP KM-PA-2	634	52	KIAA0124 gene [D50914] human homologue of mouse block of proliferation 1(Bop1) [BC005160]
KM-PA-4	1822	62	PP KM-PA-4	142	53	coactosin-like protein (CLP) [L54057]

遺伝子1の塩基配列は、GenBank（アクセシオン番号：AF155120）に登録されたユビキチン結合酵素異型体Kua（UBE2V）遺伝子のものと高い相同性が認められた。遺伝子1がコードする推定アミノ酸（aa）長は、わずかにUBE2V遺伝子のものより長かった（第109～111位の3個のaa）。UBE2Vの機能については、現在まで報告されていない。

遺伝子2の塩基配列は、異種核リボ核蛋白質L遺伝子〔heterogeneous nuclear ribonucleoprotein（HNRPL）遺伝子、アクセシオン番号：NM001533〕のものと高い相同性が認められた。しかし、推定されるアミノ酸長は、N末端第1～31位においてHNRPL遺伝子よりわずかに長かった。HNRPL遺伝子産物は、異種性の核リボ核蛋白質複合体であり、mRNA前駆体が細胞質内

10

20

30

40

50

で受けるプロセシングのための基質を提供するものである。

遺伝子3の塩基配列は、GenBank（アクセッション番号：AK001304）に登録されたWolf-Hirschhorn syndrome candidate 2蛋白質（WHSC2）の遺伝子と高い相同性が認められた。このWHSC2遺伝子は、第4染色体短腕の部分欠損に起因する精神的・発育的障害によって特定される多発性奇形症候群であるWHSの表現型（phenotype）において、何らかの機能を有するとされている。

遺伝子4の塩基配列は、eIF-4E結合蛋白質1遺伝子（EIF4EBP1、アクセッション番号：NM004095）のものと高い相同性が認められた。EIF4EBP1遺伝子産物は、4E-BP1のインシュリン依存性リン酸化を開始する翻訳開始因子として知られ、活性のあるcap結合性複合体の形成を可能にする。

10

遺伝子5の塩基配列は、GenBankに登録された部分的に推定されたマイトジェン活性化蛋白質キナーゼ キナーゼ キナーゼ（ppMAPkkk、アクセッション番号：AJ242724）遺伝子のものと相同性が認められた。遺伝子5がコードする推定アミノ酸配列は、登録されたppMAPkkk遺伝子（その機能の報告は未だ無い）のものと比較して、N末端において230aaそしてC末端において258aa長かった。

遺伝子6の塩基配列は、6,707bpからなり、2',5'-オリゴアデニレート合成酵素3遺伝子（2-5 OAS3遺伝子、アクセッション番号：NM006187）と相同性が認められたが、第18位、第159位、第249位、第287位、第288位、第316位、第393-第398位、および第984位における合計13aaが異なっていた。2-5 OAS3は、IFN誘導蛋白質として知られ、微生物感染に対する免疫防御において重要な機能を有する。

20

遺伝子7の塩基配列は、Human cleavage and polyadenylation specificity factor（CPSF、アクセッション番号：U37012）（ヒトの分裂およびポリアデニル化特異性因子）の第3701~4463位と相同性が認められたが、アミノ酸配列が約1226aa短かった。

遺伝子KM-PA-2の塩基配列は、KIAA0124およびmouse block of proliferation 1（Bop1）のヒトホモログと高い相同性を有していた。KIAA0124遺伝子では第1466位の塩基がグアニン（G）であり、そのため第465位のアミノ酸残基がヒスチジン（H）であるが、遺伝子KM-PA-2ではそれぞれアデニン（A）およびアルギニン（R）である。

30

遺伝子KM-PA-4の塩基配列および該遺伝子がコードするアミノ酸配列は、coactosin-like protein（CLP）と同一であった。

腫瘍抗原をコードする上記9つの遺伝子から腫瘍抗原ペプチドを得るために、上記遺伝子のコードするアミノ酸配列に基づいてペプチドを設計して合成した。遺伝子7については、該遺伝子がより長い塩基配列からなる遺伝子の一部であると考えられるので、該遺伝子と相同性の高い遺伝子（CPSF）がコードするアミノ酸配列由来のペプチドも設計し合成した。HLA-A2に結合可能な腫瘍抗原ペプチドには、そのアミノ酸配列にモチーフ（規則的配列）があることが知られている。そこで、まずHLA-A2に結合し得るモチーフ（規則的配列）を有するペプチドについて文献（J. Immunol., 152:163, 1994）（Immunogenetics, 41:178, 1994）検索し、得られたモチーフに適合するそれぞれ異なる9~11merのペプチドを上記遺伝子がコードするアミノ酸配列に基づいて設計し合成した。各ペプチドのCTLによる認識は、OK-CTLpまたはこれを限界希釈法によりクローン化して得た数種のOK-CTLクローンをを用い、これらCTLから産生されるIFN-γを指標として測定した。OK-CTLクローンは上記遺伝子1~7のいずれかを認識する細胞であるが、OK-CTLpは遺伝子1~7のいずれをも認識することから複数の種類の腫瘍抗原を認識する細胞集団であることが判明した。そこでOK-CTLクローンをを用いてペプチドのCTL活性化能を検討するときは、検討するペプチドに対して該ペプチドをコードする遺伝子産物を認識するクローンをを用いた。合成したペプチドのうち44個のペプチド（配列表の配列番号1~4

40

50

4) (表2および表3)が、OK-CTL pまたはOK-CTLクローンにより認識され、CTLからのIFN- γ 産生を促進した。これらのペプチドのうちP1～P5、P6～P9、P10～P13、P14およびP15、P16～P18、並びにP19は、それぞれ遺伝子1、遺伝子2、遺伝子3、遺伝子4、遺伝子5、並びに遺伝子6がコードするアミノ酸配列の部分配列からなるペプチドであり、それぞれの遺伝子と相同性の高い遺伝子、UBE2V、HNPR L、WHSC2、EIF4-EBP1、ppMAPkkk、および2-5 OAS3にもコードされている。また、P25、P26、P27、P28、P30およびP31は、遺伝子7および該遺伝子と相同性の高い遺伝子CPSFがコードするアミノ酸配列の部分配列からなるペプチドである。P20、P21、P22、P23、P24、P29、およびP32は、CPSFに特異的なアミノ酸配列の部分配列からなる。

表 2

番号	ペプチドの 由来	アミノ酸配列 の位置	アミノ酸配列	配列表の 配列番号
P 1	遺伝子 1 (UBE2V)	43 - 51	RLQEWCSVI	1
P 2		64 - 73	LLLLARWEDT	2
P 3		85 - 93	LIADFLSGL	3
P 4		201 - 209	LLQDWHVIL	4
P 5		208 - 216	ILPRKHHRI	5
P 6	遺伝子 2 (HNRPL)	140 - 148	ALVEFEDVL	6
P 7		404 - 412	CLYGNVEKV	7
P 8		443 - 451	FMFGQKLV	8
P 9		501 - 510	NVLHFFNAPL	9
P10	遺伝子 3 (WHSC2)	103 - 111	ASLSDPWV	10
P11		141 - 149	ILGELREKV	11
P12		157 - 165	MLPLECQYL	12
P13		267 - 275	TLLRKERV	13
P14	遺伝子 4 (EIF-4EBP1)	51 - 59	RHHYDRKFL	14
P15		52 - 60	HHYDRKFLM	15
P16	遺伝子 5 (ppMAPkkk)	290 - 298	QILKGLLFL	16
P17		294 - 302	GLLFLHTRT	17
P18		432 - 440	DLLSHAFFA	18
P19	遺伝子 6 (2-5 OAS3)	666 - 674	QQLCVYWTV	19
P20	C P S F	285 - 293	SLLYLNQSV	20
P21	C P S F	250 - 258	KVHPVIWSL	21
P22	C P S F	534 - 542	DMWTVIAPV	22
P23	C P S F	882 - 890	QLGQGGLKV	23
P24	C P S F	392 - 400	LLLKYTEKL	24
P25	遺伝子 7	1367 - 1375	TMLPHHAGL	25
P26	遺伝子 7	1296 - 1304	LLRRADFHV	26
P27	遺伝子 7	1401 - 1409	ELNRYLYL	27
P28	遺伝子 7	1358 - 1366	LLMLQNALT	28
P29	C P S F	797 - 805	YQLPDWRLV	29
P30	遺伝子 7	1359 - 1368	LMLQNALTMT	30
P31	遺伝子 7	1358 - 1367	LLMLQNALT	31
P32	C P S F	456 - 465	TQLATYSFEV	32

10

20

30

40

表3

番号	ペプチド の由来	アミノ酸配列の 位置	アミノ酸配列	配列表の 配列番号
P 33	KM-PA-2	29 ~ 38	LEWYDDFPHV	33
P 34		115 ~ 124	FSGDVMIHVP	34
P 35		172 ~ 180	WAQEDPNAV	35
P 36		179 ~ 188	AVLGRHKMHV	36
P 37		326 ~ 335	RLWEVATARC	37
P 38		348 ~ 356	VAWNPSPAV	38
P 39		585 ~ 593	DLLQNPLLVP	39
P 40		586 ~ 595	LLQNPLLVPV	40
P 41		612 ~ 621	VIFHPTQPWV	41
P 42	KM-PA-4	15 ~ 24	NLVRDDGSAV	42
P 43		57 ~ 65	RLFAFVRFT	43
P 44		104 ~ 113	VVQNFAKEFV	44

これら腫瘍抗原ペプチドは、HLA-A2によって細胞表面に提示されており、ペプチド特異的OK-CTLクローン上に発現されているT細胞受容体(TCR)により認識される。遺伝子1およびUBE2V、遺伝子2およびHNPRIL、または遺伝子6および2-5 OAS3由来のペプチドは、TCR・Vβ8.1、TCR・Vβ3.2、またはTCR・Vβ14を発現しているOK-CTLクローンにより認識されるものであった。また、遺伝子3およびWHSC2、遺伝子4およびEIF4EBP1、または遺伝子5およびppMAPkkk由来のペプチドは、それぞれTCR・Vβ13.1、TCR・Vβ8.1、またはTCR・Vβ18を発現しているOK-CTLクローンにより認識されるものであった。

また、遺伝子1およびUBE2V、遺伝子2およびHNPRIL、並びに遺伝子6および2-5 OAS3由来のペプチドを認識するOK-CTLクローンの各2つは、それぞれ異なった相補性決定領域3(CDR3)(HLAクラスI分子の溝上の抗原エピトープへの結合性を担う要素)を有するTCRを発現していた。遺伝子3およびWHSC2、遺伝子4およびEIF4EBP1、並びに遺伝子5およびppMAPkkk由来のペプチドを認識するOK-CTLクローンもそれぞれ異なったCDR3を有するTCRを発現していた。

さらに、OK-CTLpによって認識される上記44個のペプチドはそれぞれ、OK-CTLpを得た大腸癌患者の自己末梢血単核細胞(以下、PBMCと略すこともある)、および/またはHLA-A0201⁺癌患者(膵臓癌患者、大腸癌患者、および胃癌患者)のPBMCから、HLA-A2拘束性腫瘍特異的CTLをインビトロで誘導した。癌患者末梢血単核細胞から誘導された上記CTLは、HLA-A2⁺腫瘍細胞を用量依存的に溶解(lysis)した。しかし、HLA-A2⁻腫瘍細胞REF-LC-MS並びにHLA-A⁺ではあるが正常細胞由来の自己EBV-B細胞およびPHAで刺激したT細胞は溶解しなかった。さらに、上記CTLは、刺激に用いたペプチドと同じペプチドをパルスしたT2細胞に対して用量依存的に細胞傷害性を示した。

上記の検討により、OK-CTLpを活性化することのできる44個の腫瘍抗原ペプチドが得られ、さらにこれらのペプチドが膵臓癌、大腸癌、および/または胃癌患者由来のPBMCからHLA-A2拘束性腫瘍特異的CTLを誘導し得ることを確認した。また、膵臓腺癌細胞株Panc-1と大腸腺癌細胞株SW620の両方が、OK-CTLpおよび上記ペプチドでPBMCから誘導されたCTLにより認識されることが判明した。この結果は、膵臓癌および大腸癌が、宿主のCTLによって認識される同じ腫瘍抗原エピトープを共有していることを示唆する。

(ポリペプチドおよびペプチド)

本発明に係るポリペプチドは、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得られた上記遺伝子

10

20

30

40

50

1～7またはヒト膵臓腺癌細胞株C F P A C－1から得られた遺伝子K M－P A－2若しくはK M－P A－4がそれぞれコードするアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、好ましくは配列表の配列番号45～53のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。これらのポリペプチドは、腫瘍抗原としてC T Lを誘導および／または活性化するために使用できる。また、該ポリペプチドは腫瘍抗原エピトープを特定し腫瘍抗原ペプチドを得るための材料として用いることもできる。

本発明に係るペプチドは、上記ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、例えばH L A－A 2拘束性モチーフに適合するものを設計し、該設計されたペプチドからC T Lにより認識されるもの、例えばC T Lを活性化および／または誘導するものを選択することにより得ることができる。本発明においてペプチドは、H L A－A 2と結合して抗原提示細胞表面上に提示され、かつC T Lにより認識される腫瘍抗原エピトープとしての性質を有するものであればよく、少なくとも約5個以上、好ましくは約7個以上、さらに好ましくは9個乃至10個のアミノ酸残基からなるペプチドである。特に好ましくは、配列表の配列番号1～44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。これらのペプチドは、腫瘍抗原ペプチドとして、H L A－A 2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導および／または活性化するために使用できる。

上記ポリペプチドまたはペプチドは、C T Lを誘導および／または活性化するために単独で使用してもよいし、2つ以上を組み合わせ使用してもよい。上記のようにC T Lは種々の抗原を認識する複数の細胞集団であることから、好ましくはこれらを2つ以上組み合わせ用いることが推奨される。

また、このように特定されたポリペプチドまたはペプチドに1乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入等の変異を導入したものであって、少なくともH L A－A 2拘束性C T Lにより認識されるポリペプチドまたはペプチドも本発明の範囲に包含される。欠失、置換、付加、または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術（Science, 219:666, 1983）を利用することができる。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質（物性、活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基若しくはカルボキシル基等を修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

（ポリヌクレオチド）

本発明に係るポリヌクレオチドは、上記のようにヒト膵臓腺癌細胞株P a n c－1またはヒト膵臓腺癌細胞株C F P A C－1から得られた遺伝子1～7またはK M－P A－2若しくはK M－P A－4であって、配列表の配列番号54～62のいずれか1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。また、該ポリヌクレオチドは、配列表の配列番号1～44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列番号45～53のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをそれぞれコードするものまたはその相補鎖であってもよい。さらに、上記ポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチドのアミノ酸配列中で腫瘍抗原エピトープをコードする領域に対応する少なくとも約15個以上、好ましくは約21～30個以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドおよびその相補鎖であってもよい。この有用なポリヌクレオチドの選択および塩基配列の決定は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して、発現ペプチドのC T L誘導能および／または活性化能の確認を行うことにより可能である。

さらに、上記ポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも本発明の範囲に包含される。ポリヌクレオチド分子としてDNA分子を代表例にとると、「DNA分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA分子」は、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual（コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989）等に記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリタイズする」とは、

例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ および 50% ホルムアミドの溶液中で 42°C にて加温した後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ の溶液中で 68°C にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。

上記ポリヌクレオチドは、HLA-A2を有する細胞で発現させたときに、HLA-A2拘束性のCTLを誘導および／または活性化することができる。また、上記ポリヌクレオチドは、その3'末端にポリ(A)〔poly(A)〕構造を有しているが、ポリ(A)の数は腫瘍抗原として作用するアミノ酸のコード部位に影響するものではなく、該ポリヌクレオチドの有するポリ(A)の数は特に限定されるものではない。

上記ポリヌクレオチドは、いずれも本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸としての試薬・標準品としても利用できる。

10

(組換えベクター)

上記ポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組み込むことにより、組換えベクターを得ることができる。用いるベクターDNAは、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等をあげることができる。また、目的により発現ベクターやクローニングベクター等を用いることができる。

20

組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等、とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製される。前記ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的ポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターを得ることができる。

30

(形質転換体)

上記ポリヌクレオチドが組み込まれたベクターDNAにより、自体公知の宿主、例えば大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、または動物細胞等を自体公知の方法で形質転換することにより形質転換体を得られる。形質転換を行う場合、より好ましい系としては遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法があげられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を用いることができる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年)等に記載されている標準的な方法により行うことができる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(ballistic introduction)および感染等をあげることができる。

40

(ポリペプチドまたはペプチドの製造)

上記形質転換体に導入するベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを提供可能である。上記ポリヌクレオチドが組み込まれた

50

発現ベクターDNAを導入した形質転換体は、各々の宿主に最適な自体公知の培養条件で培養される。培養は、形質転換体により発現される本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの作用、特に少なくともCTLを誘導および／または活性化する作用あるいは宿主中または宿主外に産生された該ペプチドまたはペプチド量を指標にして行ってもよいし、または培地中の形質転換体量を指標にして継代培養若しくはバッチ培養を行ってもよい。また、本発明に係るペプチドは、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば、ペプチド合成（丸善）1975年、“Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1996”が例示されるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの回収は、該ポリペプチド若しくは該ペプチドのCTL活性化作用を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、またはアフィニティクロマトグラフィー等の方法を組合せて、あるいは硫酸やアルコール等を用いる溶解度差に基づく分画手段により精製回収できる。より好ましくは、これらのアミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作製し、得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

（抗体）

本発明に係る抗体は、上記ポリペプチドまたはペプチドを抗原として用いて作製される。抗原は上記ポリペプチド若しくはペプチド自体でもまたはその断片でもよく、少なくとも5個、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸で構成される。上記ポリペプチドまたはペプチドに特異的な抗体を作製するためには、該ポリペプチドまたは該ペプチドに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが望ましい。このアミノ酸配列は、必ずしも該ポリペプチドまたは該ペプチドのアミノ酸配列と相同である必要はなく、該ポリペプチドまたは該ペプチドの立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的に該ポリペプチドまたは該ペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応により決定できる。

抗体を産生するためには、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば本発明に係るポリペプチドまたはペプチドをアジュバントの存在下または非存在下で単独または担体に結合して動物に投与し、体液性免疫および／または細胞性液等を誘導することにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、またはアルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得される。好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P3/X63-Ag8細胞等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化し、上記ポリペプチドまたはペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

かくして得られた上記ポリペプチドまたはペプチドを認識して結合し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、精製用抗体、試薬、または標識マーカ等として利用できる。

（スクリーニングおよび該スクリーニングにより得られた化合物）

上記ポリペプチドまたはペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組み合わせることによってCTLを誘

10

20

30

40

50

導および／または活性化し得る物質のスクリーニングに有効な手段を提供する。スクリーニング方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。例えば、実施例に示したように、腫瘍抗原ペプチドをパルスした抗原提示細胞によるCTLの活性化をCTLからのIFN- γ 産生量により測定する実験系を用いて、該実験系に被検物質を加えることにより、CTLを誘導および／または活性化する物質、並びに誘導および／または活性化を増強する物質等を選別することができる。この実験系はスクリーニング方法の1つを説明するものであり、本発明に係るスクリーニング方法はこれに限定されるものではない。

本発明は、上記スクリーニング方法によって得られた化合物も対象とする。該化合物は、本発明に係るポリペプチド若しくはペプチドおよび／またはHLA-A2と相互作用してCTLによる該ポリペプチドまたはペプチドの認識を増強する化合物、または本発明に係るポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物等でありうる。かくして選別された化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。

(医薬組成物)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドとして、HLA-A2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導および／または活性化するために使用することができる。すなわち、上記ポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とするCTLの誘導方法並びに上記ポリペプチドまたはペプチドを含有するCTLの誘導剤も、本発明の範囲に包含される。

また、本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき作製した組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換させた細胞、または該ポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体、該ポリペプチド若しくはペプチドおよび／またはHLA-A2と相互作用してCTLによる該ポリペプチド若しくはペプチドの認識を増強する化合物、または該ポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物を、単独または複数組み合わせて利用することによって、これらのうち少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供できる。

具体的には、例えば本発明に係るポリペプチドまたはペプチドからなる医薬、さらに本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを含有する医薬組成物は、いわゆる癌ワクチンとして使用することができる。このとき、細胞性免疫の活性化のために、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは適当なアジュバントの存在または非存在下で、単独で用いるかまたは担体に結合して用いる。担体は、それ自体が人体に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。剤形は、自体公知のポリペプチドまたはペプチドを製剤化する手段を応用して適宜選択できる。その投与量は、CTLによる当該ペプチドの認識の程度により変化するが、一般的には活性本体として0.01mg~100mg/日/成人ヒト、好ましくは0.1mg~10mg/日/成人ヒトである。これを数日乃至数月に1回投与する。

または、患者の末梢血より単核細胞画分を採取し、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドと共に培養し、CTLが誘導および／または活性化された該単核細胞画分を患者の血液中に戻すことによって、有効な癌ワクチン効果を得ることができる。培養するときの単核細胞濃度、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの濃度等の培養条件は、簡単な実験により決定することができる。また、培養時、インターロイキン2(IL-2)等のリンパ球増殖能を有する物質を添加してもよい。

癌ワクチンとして本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを使用する場合、1つのポリペプチドまたはペプチドのみでも癌ワクチンとして有効であるが、複数の種類の上記ポリペプチドまたはペプチドを組み合わせて使用することもできる。癌患者のCTLは複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であるため、1種類のポリペプチドまたはペプチドを癌ワクチンとして使用するより複数を組み合わせて癌ワクチンとして使用する方が、より高い効果が得られるときがある。

上記医薬、細胞傷害性T細胞の誘導剤、癌ワクチン、および医薬組成物は、いずれも癌疾患の治療、例えば膵臓癌、大腸癌または胃癌の治療において有用である。

また、本発明に係るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖も、癌疾患の、例えば膵臓癌、大腸癌、または胃癌の遺伝子治療のために有用である。これらポリヌクレオチドをベクターに担持させ、直接体内に導入する方法またはヒトから細胞を採取したのち体外で導入する方法があるが、いずれも利用できる。ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス等が知られているが、レトロウイルス系が推奨される。無論これらウイルスは複製欠陥性である。その投与量は、CTLによる該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの認識の程度により変化するが、一般的には本発明に係る腫瘍抗原ペプチドをコードするDNA含量として0.1 μg～100 mg/日/成人ヒト、好ましくは1 μg～50 mg/日/成人ヒトである。これを数日乃至数月に1回投与する。

(診断のための測定方法および試薬)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、並びに該ポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用可能である。また本発明は、これらのうちの1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットも提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチドまたはポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの発現または活性に関連した疾患の診断手段は、例えば当該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドとの相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在量を決定すること、および/または当該ポリペプチドまたはペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および/または当該ポリペプチドまたはペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。すなわち、本発明に係るポリペプチド若しくはペプチドまたはこれらをコードしている核酸を診断マーカーとして定性的にあるいは定量的に測定する。試料中の当該ポリペプチド若しくはペプチドまたはこれらをコードしている核酸の定量的または定性的な測定法は当業者に周知の方法を利用することができる。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等がある。また、核酸は、例えば増幅、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、RT-PCR、RNAアーゼ保護、ノーザンブロットティングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いてRNAレベルでの検出および定量することができる。

測定される試料として、個体由来の細胞、例えば血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等を挙げることができる。また、測定される核酸は、上記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCR若しくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを標識した上記ポリペプチドをコードするDNAにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定することができる。

上記測定法により本発明に係るポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの変異、減少、増加を検出することで、当該ポリペプチドに関連する疾患、例えば膵臓癌、大腸癌、または胃癌等の診断が可能となる。

実施例

以下に実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(HLA-A2拘束性CTLの樹立)

HLA-A2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球株は、大腸癌患者(HLA-A0207/3101、HLA-B46/51、HLA-Cw1)の腫瘍浸潤リンパ球(TI

10

20

30

40

50

L) から樹立した (Int. J. Cancer, 81: 459-466, 1999) (J. Immunol., 163: 4997-5004, 1999)。まず、大腸癌患者から得た TIL を 100 U/ml の組換えヒト・インターロイキン 2 (IL-2) を添加して 50 日以上長期培養した。培養 7 日毎に IL-2 活性化 TIL の一部を採取し、種々の腫瘍細胞または正常細胞と共に培養して、産生された IFN- γ の測定および該癌細胞からの ^{51}Cr 遊離試験によってその CTL 活性を検定した (J. Immunol., 163: 4997-5004, 1999)。IFN- γ の測定は、酵素免疫固相法 (ELISA) により行った。培養 58 日目に、HLA-A2 拘束性かつ腫瘍特異的に CTL 活性を示すサブラインの 1 つである OK-CTLp が得られた。得られた OK-CTLp は、CD3⁺CD4⁻CD8⁺ の表現型を有する 80% の細胞と、CD3⁺CD4⁺CD8⁻ の表現型を有する 20% の細胞とからなる細胞集団であった。この OK-CTLp をエフェクター細胞として用い、腫瘍細胞等の各種細胞を標的細胞として共に培養し、該標的細胞に対する細胞傷害性を ^{51}Cr 遊離試験により、また OK-CTLp の活性化を IFN- γ の産生を指標にしてそれぞれ測定し、その結果をそれぞれ図 1 および図 2 に示した。

得られた OK-CTLp は図 1 および図 2 に示すように、HLA-A0201⁺Panc-1 膵臓腺癌細胞および SW620 大腸腺癌細胞、HLA-A0206⁺KE3 食道鱗状細胞癌 (SCC) 細胞、並びに HLA-A0207⁺CA9-22 口部 SCC 細胞を認識して、IFN- γ を産生し、かつ十分な細胞傷害性を示した。しかし、HLA-A2⁻腫瘍細胞である QG56 肺腺癌細胞、RERF-LC-MC 肺腺癌細胞、COLO320 大腸腺細胞、並びに正常細胞由来の自己エプスタインバーウイルス形質転換 B 細胞 (EBV-B) およびフィトヘマグルチニン (PHA) 芽球化自己 T 細胞 (Autologous PHA-blastoid T Cells) に対しては細胞傷害性を示さなかった。また、OK-CTLp は試験した全ての HLA-A2⁺腫瘍細胞 (HLA-A0201⁺の R27 乳腺癌細胞、HAK-2 原発性肝細胞癌細胞、SK-MEL-5 メラノーマ細胞、および SF126 星状細胞腫細胞、HLA-A0206⁺の PC9 肺腺癌細胞、並びに HLA-A0207⁺の 1-87 肺腺癌細胞および OMC-4 頸部 SCC 細胞) を溶解した。その CTL 活性は、抗 HLA クラス I モノクローナル抗体 (mAb)、抗 CD8 mAb または抗 HLA-A2 mAb によって阻害されたが、他の mAb によっては阻害されなかった (図 2)。このことから、OK-CTLp が HLA-A2 拘束性に上記腫瘍細胞を認識して細胞傷害性を示すことが確認された。

なお、上記腫瘍細胞の HLA クラス I 対立遺伝子の遺伝子型は、既報 (J. Immunol., 163: 4997-5004, 1999) に開示されている。また上記患者の HLA クラス I の抗原型は、末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて従来の方法で決定した。さらに、HLA-A2 サブタイプは、配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ法と直接 DNA 配列決定法 (direct DNA sequencing) によって決定した。OK-CTLp の表面表現型は、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識した抗 CD3 mAb、抗 CD4 mAb、または抗 CD8 mAb (ニチレイ)、または抗 TCR $\alpha\beta$ mAb (WT31, Becton Dickinson) による直接免疫蛍光分析によって分析した。また、OK-CTLp の HLA 拘束性および特異性を検定するために用いた抗体は、抗 HLA クラス I mAb (W6/32, IgG2a)、抗 HLA-A2 mAb (BB7.2, IgG2b)、抗 CD8 mAb (Nu-Ts/c, IgG2a)、抗 HLA クラス I mAb (H-DR-1, IgG2a)、および抗 CD4 mAb (Nu-Th/i, IgG1) である。抗 CD13 mAb (MCS-2, IgG2a) および抗 CD14 mAb (JML-H14, IgG1) は、アイソタイプ適合コントロール mAb として使用した。

実施例 2

(腫瘍抗原をコードする cDNA クローンの単離・同定)

OK-CTLp によって認識される Panc-1 腫瘍細胞の腫瘍抗原をコードする遺伝子は、既知の遺伝子発現クローニング法 (J. Immunol., 163: 4997-5004, 1999) に準拠して単離・同定した。まず、Panc-1 腫瘍細胞の poly (

10

20

30

40

50

A) $^{+}$ RNAをcDNAに転換してSal Iアダプターにライゲーションし、発現ベクターpCMV-SPORT-2 (Invitrogen社製) に挿入した。

HLA-A0207、HLA-A2402、またはHLA-A2601のcDNAを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって得て、真核細胞発現ベクターpCR3 (Invitrogen社製) にクローン化した。

上記プラスミドDNAプールまたはPanc-1細胞cDNAライブラリーのクローン200ngと、HLA-A0207cDNAの200ngとを、100 μ lのOpti-MEM (Invitrogen社製) 中で30分間混合した。この混合物の50 μ lをCOS-7細胞(5×10^3)に加え96ウェルU底型マイクロカルチャープレート(Nunc社製) 中で6時間インキュベーションして共遺伝子導入した。次いで10% FCSを含むRPMI-1640培地を加えて2日間培養し、OK-CTLp (5×10^4 細胞) を各ウェルに添加した。さらに18時間インキュベーションした後、上清の100 μ lを採り、産生されたIFN- γ の測定をELISA法により行った。この時、遺伝子導入をしていないCOS-7細胞を標的としてOK-CTLpによるIFN- γ 産生を検討し、産生されたIFN- γ の値をバックグラウンドとして各測定値から減算した。その結果、OK-CTLにより認識されて該OK-CTLのIFN- γ 産生を促進する7個のcDNAクローンが得られた。

得られた7個のcDNAクロンの塩基配列決定は、DNAシーケンシングキット(Perkin-Elmer社製)を用い、ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer社製) を使用して、ジデオキシヌクレオチドシーケンシング法により行った。さらに、各クロンがコードするアミノ酸配列を塩基配列により推定した。また、これらのクロンの塩基配列について、GenBankを用いて相同性検索を行った。その結果は上記表1に示した。なお、得られた7個のcDNAクローン(クローン1~7)のうちクローン3は、上記遺伝子発現クローニング法で得た当初のクロンの塩基配列が相同性の高いWHSC2遺伝子と比較して5'末端領域において25bp短かったので、その完全長のcDNAをPanc-1細胞のcDNAライブラリーから、³²P標識当該クロンをプローブとして用いて標準的コロニーハイブリダイゼーション法で得たものである。

図3(A)および図3(B)に示したように、クローン1~7はそれぞれOK-CTLにより認識され、OK-CTLのIFN- γ 産生を促進した。しかし、HLA-A0207cDNAと陰性コントロールとして使用したcDNAクロンとを共遺伝子導入したCOS-7細胞、またはcDNAクローン1~7のいずれか1つとHLA-A2402若しくはHLA-A2601のcDNAとを共遺伝子導入したCOS-7細胞は、OK-CTLpに認識されず、IFN- γ は産生されなかった。また、cDNAクローン1~6の濃度を変えて、100ngのHLA-A0207またはHLA-A2402cDNAとCOS-7細胞に共遺伝子導入したところ、用量依存的にOK-CTLによるIFN- γ 産生が観察された〔図4の(A)~(F)〕。

また、これら遺伝子のmRNA発現をノーザンブロット分析により検討したところ、遺伝子5を除いて同様の発現パターンがみられた。これら遺伝子は、癌細胞でも正常細胞でも普遍的に発現されているが、Panc-1細胞、SW620細胞、およびCA9-22細胞等の腫瘍細胞での発現レベルはPHAで刺激したT細胞やエプスタインバーウイルスで形質転換されたB細胞(EBV-B)等の正常細胞での発現より有意に高かった。遺伝子5のmRNA発現が本実験条件で殆ど検知できなかったのは、³²P標識したクローン5を用いたコロニーハイブリダイゼーションによっても約 1×10^6 cDNAライブラリーから3個のクローンしか得られないように、遺伝子5の発現が稀であるためと考えられる。

実施例3

(OK-CTLクロンの樹立)

腫瘍抗原を認識して活性化されるCTLは、複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であると考えられるので、上記のOK-CTLpを限界希釈培養(0.3、0.5、1、2およ

10

20

30

40

50

び4細胞／ウェル）によりクローン化してOK-CTLクローンを得た（J. Immunol., 163:4997-5004, 1999）。これらのクローンは、上記7個のcDNAクローンのいずれかの100ng／ウェルとHLA-A0207 cDNAの100ng／ウェルとを共遺伝子導入したCOS-7細胞または腫瘍細胞と、細胞比1:1で培養し、そのIFN- γ 産生能を測定することによりCTL活性を有するクローンを選択したものである。まず、親株OK-CTL pから、限界希釈培養によって300個のCTLクローンを得た。そのうち80個のCTLクローンが、HLA-A2拘束性腫瘍特異的CTL活性を示し、かつCD3⁺CD4⁻CD8⁺およびTCR $\alpha\beta$ ⁺の表現型を発現するCTLクローンであった。それらのうち、2個、3個、1個、3個、2個、および4個のCTLクローンが、それぞれクローン1、クローン2、クローン3、クローン4、クローン5、およびクローン6を発現したCOS-7細胞に対して反応性を示した。すなわち、CTLクローンにより、認識する腫瘍抗原が異なることがわかった。表4に典型的な15個のCTLクローンについてデータを示した。このことから、OK-CTL p、すなわち癌患者のCTLは複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であることが示唆された。

表4

CTLクローン	COS-7細胞にHLA-A0207 cDNAと共に発現させたcDNA						Panc-1
	クローン	クローン	クローン	クローン	クローン	クローン	
	1 (UBE2V)	2 (HNRPL)	3 (WHSC2)	4 (EIF4EBP1)	5 (ppMAPkkk)	6 (2-5 OAS3)	
						cDNA なし	
2-2-H3	<u>110</u>	0	0	0	0	0	340
2-1-H12	<u>134</u>	0	0	0	0	0	264
1-2-D7	0	<u>200</u>	0	0	0	0	235
1-2-D12	0	<u>>1000</u>	0	0	0	0	>1000
4-1-H8	0	<u>133</u>	0	0	0	0	84
4-2-A11	0	0	<u>100</u>	0	0	0	725
0.5-1-H12	0	0	0	<u>>1000</u>	0	0	>1000
0.5-1-D6	19	0	0	<u>118</u>	0	13	448
4-2-B3	0	0	0	<u>95</u>	0	0	100
2-1-F4	0	0	0	0	<u>>1000</u>	0	>1000
0.5-1-H2	0	0	0	0	<u>81</u>	0	122
0.5-1-D7	27	34	0	0	0	<u>110</u>	304
0.5-2-A4	0	0	0	0	0	<u>113</u>	>1000
1-2-D1	21	0	22	44	0	<u>61</u>	78
2-2-B4	0	0	0	0	0	<u>>1000</u>	>1000

実施例4

（腫瘍抗原ペプチドの調製およびそのCTL誘導活性）

実施例2で得られたHLA-A2拘束性にCTLを誘導し得る7つの腫瘍抗原遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドを得るために、HLA-A2に結合し得るモチーフ（規則的配列）を有するペプチドについて文献（J. Immunol., 152:163, 1994）（Immunogenetics, 41:178, 1994）検索し、得られたモチーフに基づいて、上記遺伝子1～7がコードするアミノ酸配列並びにこれらと高い相同性を有するUBE2V、HNRPL、WHSC2、EIF4EBP1、ppMAPkkk、2-5OAS3、およびCPSFのアミノ酸配列から、それぞれ異なる9～11merのペプチ

ドを設計し、自体公知の方法で合成した。得られたペプチドの純度はいずれも70%以上であった。

HLA-A0201分子へのペプチドの結合活性は、T2細胞変異株を用いて試験した(Cancer Res., 54:1071-1076, 1994)。T2細胞は、TAP欠損のため、HLA-A2分子がペプチドと結合しない形で細胞表面に発現している。まず、合成したペプチド(10 μM)とT2細胞とを26℃で3時間インキュベーションし、次いで5%CO₂-95%Airの条件下37℃で3時間インキュベーションして、該ペプチドがHLA-A2により細胞表面上に表出されたT2細胞を得た。この細胞を抗HLA-A2mAb(BB7.2)とインキュベーションし、R-フィコエリスリン(phycoerythrin)を結合したF(ab')₂ウサギ抗マウス・イムノグロブリン(Ig)(DAKO社製)で染色し、FACScan(Beckton Dickinson社製)で発現パターンを分析することにより、ペプチドの結合したHLA-A0201分子が細胞表面上に発現されていることが確認できた。

CTLによるペプチドの認識を試験するために、それぞれのペプチド(10 μM)で予めパルスしたT2細胞を標的細胞(T)として用い、OK-CTLp若しくはOK-CTLクローンをエフェクター細胞(E)として用いて、標的細胞とエフェクター細胞とを18時間インキュベーションして上清を回収し、上清中のIFN-γをELISAで測定した。エフェクターとしてOK-CTLpを用いるときはE/T比を10:1とし、OK-CTLクローンをを用いるときは2:1として試験を行った。また、OK-CTLクローンをを用いてペプチドのCTL活性化能を検討するときは、検討するペプチドに対して該ペプチドをコードする遺伝子産物を認識するクローンをを用いた。ペプチドをパルスしていないT2細胞に対するOK-CTLpまたはOK-CTLクローンのIFN-γ産生をバックグラウンドとして各測定値から減算し、結果を図5～図10に示した。図5、図6、図7、図8、図9、および図10はそれぞれ、遺伝子1およびUBE2V、遺伝子2およびHNRP L、遺伝子3およびWHSC2、遺伝子4およびEIF4EBP1、遺伝子5およびppMAPkkk、並びに遺伝子6および2-5 OAS3由来のペプチドについての結果を示す。

さらに、T2細胞とインキュベーションするときの各ペプチドの濃度を変えてCTLクローン活性化能を検討し、各ペプチドが用量依存性にCTLクローンを活性化し得ることを見出した。遺伝子1およびUBE2V、遺伝子2およびHNRP L、遺伝子3およびWHSC2、遺伝子4およびEIF4EBP1、遺伝子5およびppMAPkkk、並びに遺伝子6および2-5 OAS3由来のペプチドの代表的な例をそれぞれ図11の(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、および(F)に示す。また、遺伝子7およびCPSF由来のペプチドについては表5に示す。表5においてEBV由来のペプチドおよびインフルエンザウイルス由来のペプチドは、CTLを活性化し得る陽性コントロールである。これらの結果、上記表2に示すペプチドがOK-CTLpおよび/またはOK-CTLクローンを活性化してIFN-γを産生させ得ることが判明した。

10

20

30

表 5

ペプチド	I F N - γ 産 生 (pg/ml)			
	ペプチド濃度			
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M	50 μ M
インフルエンザウイルス 由来	0	93	693	35
EBV 由来	119	390	371	117
P20	344	643	0	34
P21	428	501	81	195
P22	254	1027	431	407
P23	6360	0	345	160
P24	728	検出限界以上	103	2
P25	69	1569	25	122
P26	141	418	1239	0
P27	352	889	250	0
P28	898	検出限界以上	0	144
P29	0	検出限界以上	86	362
P30	88	7001	検出限界以上	検出限界以上
P31	443	検出限界以上	検出限界以上	314

実施例 5

(ペプチドによる癌患者末梢血単核細胞からの C T L 誘導)

実施例 4 において、O K - C T L p または O K - C T L クローンから I F N - γ 産生を促進し得たペプチドのうち P 1 ~ P 1 9 について、癌患者末梢血単核細胞からの C T L 誘導能を検討した。ペプチドで C T L を誘導する方法は、既知の方法に準じた (J. Exp. Med., 187:277-288, 1998) (Cancer Res., 59:4056-4063, 1999)。まず、O K - C T L p を得た大腸癌患者由来の自己末梢血単核細胞 (P B M C) をペプチド (10 μ M) と共にインキュベーションした。この細胞を、培養 7 日目および 14 日目に、同じペプチド 10 μ M で 2 時間パルスして放射線照射 (30 グレイ) した自己 P B M C を抗原提示細胞 (A P C) として用いて再刺激した。培養 21 日目に、細胞を回収して、表面表現型について試験した。さらにこの細胞の種々の標的細胞に対する認識を、該標的細胞と共に培養したときに産生される I F N - γ を E L I S A で測定し、これを指標として検討した。標的細胞としては、H L A - A 2 + 腫瘍細胞である S W 6 2 0 細胞、C A 9 - 2 2 細胞、および P a n c - 1 細胞を用いた。結果を表 6 に示す。

10

20

30

表 6

各種標的細胞に対する認識における 末梢血単核細胞の I F N - γ 産生 (pg/ml)							
ペプチド	MFI	QG56 (HLA- A26/26)	RERF-LC-MS (HLA- A11/11)	COLO320 (HLA- A24/24)	SW620 (HLA- A0201/24)	CA9-22 (HLA- A0207/24)	Panc-1 (HLA- A0201/11)
P 1	571	0	26	50	235	81	492
P 2	607	0	0	5	53	0	0
P 3	910	0	0	44	188	58	289
P 4	1008	0	0	0	60	0	0
P 5	637	0	0	38	500	96	638
P 6	819	0	8	40	344	863	527
P 7	783	0	0	0	344	0	54
P 8	499	0	26	0	142	165	186
P 9	832	0	27	0	194	98	339
P 10	504	0	0	0	108	130	163
P 11	1089	0	0	0	893	62	>1000
P 12	780	0	0	40	46	0	197
P 13	656	0	15	0	151	95	115
P 14	591	0	0	0	112	184	265
P 15	789	0	32	0	199	219	502
P 16	887	0	0	0	0	147	113
P 17	660	0	0	0	>1000	>1000	691
P 18	657	29	0	0	>1000	70	>1000
P 19	775	0	30	66	55	48	105
ペプチド なし	491	0	0	36	0	0	17

19個のペプチドのうち、P 1、P 3、P 5、P 6、P 8、P 9、P 10、P 11、P 13、P 14、P 15、P 17、またはP 18を用いてインビトロで刺激したPBMCは、HLA-A2⁺腫瘍細胞であるSW620細胞、CA9-22細胞、およびPanc-1細胞を認識して有意なレベルのIFN- γ を産生した。しかし、当該PBMCは、HLA-A2⁻腫瘍細胞をほとんど認識しなかった。また、P 2、P 4、P 7、P 12、P 16も、HLA-A2⁺腫瘍細胞のいずれかを認識するCTLを誘導した。P 19で刺激したPBMCは、HLA-A2を発現する腫瘍細胞のみでなく他のHLAを発現する腫瘍細胞をも認識した。これらCTLからのIFN- γ 産生は、抗HLAクラスI mAb、抗CD8 mAb、または抗HLA-A2 mAbによって阻害されたが、他のmAbでは阻害され

なかった。さらに、2人のHLA-A0201⁺患者（膵臓癌患者および大腸癌患者）の血液から末梢血単核細胞（PBMC）を調製して、ペプチドによるCTL誘導の検討を行ったところ、同様の結果が得られた。すなわち、上記のペプチドは患者末梢血単核細胞からHLA-A2拘束性CTLを誘導し得ることが判明した。HLA-A0201分子へのペプチド結合親和性は、HLA-A2分子の比平均蛍光強度（MFI）（relative mean fluorescence intensity）として表した。陽性または陰性コントロールのMFIは、各々898または490であった。ペプチドのHLA-A0201分子への結合親和性は、ペプチドによるCTLの誘導とは相関していないと考えられる。

さらに、これら19個のペプチドについて、それらのCTL活性化能を⁵¹Cr遊離試験

による標的細胞に対する傷害性を指標として直接的に確認した。まず、上記CTLが誘導されたPBMCをさらに、自己のAPC、IL-2、および対応するペプチドの存在下で再培養して増殖させた。再培養の約21～28日目にPBMCを回収し、その細胞傷害性をIFN- γ の測定と6時間の ^{51}Cr 遊離試験とにより再試験した。結果を図12～図17に示す。これらのペプチドで刺激した癌患者のPBMCは、HLA-A2⁺腫瘍細胞を溶解した(lysis)。しかし、HLA-A2⁻腫瘍細胞RERF-LC-MS並びにHLA-A2を発現しているが正常細胞由来の自己EBV-B細胞およびPHAで刺激したT細胞は溶解しなかった。ただし、ペプチドP14、P15、およびP17で刺激したPBMCは、自己EBV-B細胞に対する細胞傷害性も示した。また、P19で刺激したPBMCは、自己EBV-B細胞に対する傷害性が高かった。さらに、これらのペプチドで刺激したPBMCは、PBMCの刺激に用いたペプチドと同一のペプチドをパルスしたT2細胞に対してペプチドの用量依存的に細胞傷害性を示した。代表的な例を図18の(A)～(E)に示す。これらのことから、上記ペプチドが癌患者の末梢血単核細胞からHLA-A2拘束性に細胞傷害性を示すCTLを誘導し得ることが判明した。

10

実施例6

(ペプチドによる癌患者末梢血単核細胞からのCTL誘導)

実施例4で得た腫瘍抗原ペプチドのうち、遺伝子7およびCPSF由来のペプチドP20～P32のうち、純度が95%以上の6個のペプチド(P21、P22、P24、P26、P30、およびP32)についてヒト末梢血単核細胞(PBMC)からのインビトロでのCTL誘導能を、IFN- γ 産生を指標にして検討した。用いたPBMCは、16人のHLA-A2陽性の癌患者(膵臓癌4人、胃癌7人、および大腸癌5人)並びに6人の健康人の末梢血からそれぞれ常法通り調製した。まず、PBMCの 1×10^5 個を96ウェルU底型マイクロカルチャープレート(Nunc社製)の各ウェルに加え、10 μM の上記各ペプチドと共に200 μl の培養培地中でインキュベーションした。培地は45%RPMI-1640、45%AIM-V(Invitrogen社)、10%牛胎児血清(FCS)、100U/mlのヒト・インターロイキン-2、および0.1 μM MEMノンエッセンシャル・アミノ酸溶液(Invitrogen社)からなる。培養4日目および7日目に半量の培地を除き、対応する各ペプチドを含む上記組成の培地と交換した。培養10日目に細胞を回収して洗浄し、対応する各ペプチドをパルスしたT2細胞と反応させ、産生されるIFN- γ 量を測定した。

20

30

また、ペプチドで刺激して10日間培養した上記細胞をさらに10日間培養し、得られた細胞のPan-1膵臓腺癌細胞(HLA-A2)に対する細胞傷害性を、E/T比10:1における標準的な6時間の ^{51}Cr 遊離試験で測定し、得られた結果を%特異的溶解で表した(表7)。同時にHLA-A2⁻腫瘍細胞であるSSTW-9腫瘍細胞に対する細胞傷害性を測定してバックグラウンドとし、上記結果から減算した。

その結果、P21、P22、P23、P26、P30、およびP32によるPBMCからの各ペプチドに特異的なHLA-A2拘束性CTL誘導が、上記16人の癌患者のうちそれぞれ31%(5/16)、38%(6/16)、25%(4/16)、31%(5/16)、44%(7/16)、および7%(1/16)の患者で認められた。また、P21およびP22により、健康人PBMCからのCTL誘導が、それぞれ50%(3/6)および33%(2/6)で認められたが、他のペプチドは健康人のPBMCからはCTLを誘導しなかった(表7)。また、ペプチドを用いて癌患者PBMCから誘導された上記CTLは、Pan-1膵臓腺癌細胞の他にも、HLA-A2⁺腫瘍細胞であるSW620大腸腺癌細胞(HLA-A2/A24)およびKWS胃腺癌細胞(HLA-A2)に対する細胞傷害性を示したが、HLA-A2⁻腫瘍細胞であるSSTW9胃腺癌細胞(HLA-A24)やHLA-A2を発現している腫瘍細胞ではないPHA芽球化T細胞およびEBV形質転換B細胞は溶解しなかった。上記CTLによる腫瘍細胞の認識は、抗HLAクラスI mAb、抗CD8 mAb、または抗HLA-A2 mAbによって阻害されたが、他のmAbでは阻害されなかった。

40

表 7

PBMCの由来	IFN- γ 産生 (pg/ml) / %特異的溶解					
	P21	P22	P23	P26	P30	P32
膵臓癌患者	1	0	0	0	0	0
	2	7	38 / 37	41 / 53	35 / 36	12
	3	0	0	0	0	0
	4	543 / 12	8	72 / 10	77 / 20	73 / 11
胃癌患者	5	0	0	0	53 / 11	0
	6	0	0	0	0	0
	7	0	0	46 / 10	0	0
	8	5	0	0	11	146 / 18
	9	1500< / 27	0	0	8	92
	10	0	0	0	0	46 / 26
	11	136 / 18	0	0	0	0
大腸癌患者	12	0	92 / 28	71 / 18	0	0
	13	0	179	138 / 10	0	41 / 12
	14	66 / 11	80 / 19	48	0	33 / 10
	15	0	5	14	40 / 12	0
	16	140	0	0	45	68
健常人	HD1	0	0	0	0	0
	HD2	0	0	13	0	0
	HD3	58	0	8	0	14
	HD4	5	0	6	0	0
	HD5	224	0	83	13	0
	HD6	97	14	45	0	0

実施例 7

(腫瘍抗原をコードする cDNA クロンの単離・同定)

膵臓腺癌細胞株 CFPAC-1 の cDNA ライブラリーから SEREX (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11910-11813, 1995) により検出され既に報告されている腫瘍抗原をコードする遺伝子 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 281:936-944, 2001) から、実施例 2 と同様の方法で、HLA-A2 拘束性に CTL を活性化し得る 2 つの腫瘍抗原遺伝子、KM-PA-2 および KM-PA-4 を見出した。まず、KM-PA-2、KM-PA-4、KM-PA-5、KM-PA-14、KM-PA-15、および KM-PA-18 をコードする cDNA クロンをそれぞれ EcoRI および XhoI で消化した pBluescript ベクターに組み込み、pCMV-SPORT2 に挿入した。これら cDNA を濃度を変えてそれぞれ HLA-A0207 または HLA-A2402 とともに COS-7 細胞に共発現させた。この COS-7 細胞を標的細胞として、OK-CTLp とともにインキュベーションした。その結果、KM-PA-2 または KM-PA-4 と HLA-A0207 とを共遺伝子導入した COS-7 細胞が、OK-CTLp からの IFN- γ 産生を遺伝子の用量依存的に誘導した [図 19 の (A) および (B)]。SEREX 法は、腫瘍抗原の検出に用いることができる方法であるが、同方法で検出された 1,500 種余りの腫瘍抗原のうち細胞性および液性免疫を惹起し得る腫瘍抗原として同定されたものは MAGE-1、チロシナーゼ、および NY-

ESO-1のみである。従って、SEREX法により同定された腫瘍抗原をコードする遺伝子であってもCTLを活性化し得るとは限らない。上記腫瘍抗原遺伝子、KM-PA-2およびKM-PA-4がHLA-A2拘束性にCTLを活性化し得ることは、本発明において初めて見いだされた。

実施例 8

(腫瘍抗原ペプチド調製および癌患者PBMCからのCTL誘導活性)

実施例7で得られた腫瘍抗原遺伝子KM-PA-2およびKM-PA-4由来の腫瘍抗原ペプチドを得るために、KM-PA-2およびKM-PA-4がコードするアミノ酸配列に基づいて実施例4と同様にそれぞれ異なる9~10merのペプチドを設計して自体公知の方法で合成した。

合成したペプチドについて、OK-CTLpを得た大腸癌患者末梢血単核細胞からのCTL誘導能を実施例6と同様に検討した。その結果、図20の(A)および(B)に示すように、KM-PA-2由来のペプチドP33~P41(配列表の配列番号33~41)およびKM-PA-4由来のペプチドP42~P44(配列表の配列番号42~44)のいずれかを用いてインビトロで刺激したPBMCは、該PBMCの刺激に用いたペプチドに対応するペプチドをパルスしたT2細胞〔図20(A)および(B)の左図〕、またはHLA-A2⁺腫瘍細胞であるPanc-1細胞〔図20(A)および(B)の右図〕を認識してIFN- γ を産生した。しかし、HLA-A2⁻腫瘍細胞にはほとんど反応しなかった。これらのことから、上記12個のペプチドはいずれも癌患者PBMCからHLA-A2拘束性に抗原特異的なCTLを誘導し得ること、また誘導されたCTLはHLA-A2拘束性に上記ペプチドを認識してIFN- γ を産生することが判明した。さらに、ペプチドにより誘導されたこれらCTLの細胞傷害性を⁵¹Cr遊離試験により実施例6と同様に直接的に確認した。その結果の代表例を図21に示す。図21に示したようにP35、P39、またはP40により癌患者PBMCから誘導されたCTLは、HLA-A2⁺腫瘍細胞であるPanc-1細胞およびYPK-3細胞を溶解した(lysis)。しかし、HLA-A2⁻腫瘍細胞PaCa-2、EBV-B細胞株OKAB2、およびPHAで刺激したT細胞は溶解しなかった。すなわち、上記のペプチドが癌患者の末梢血単核細胞からHLA-A2拘束性に細胞傷害性を示すCTLを誘導できることが確認できた。また、OK-CTLpを得た大腸癌患者以外の癌患者、例えば膵臓癌患者から得たPBMCからも、上記ペプチドによりCTLが誘導された。

実施例 9

上記ペプチドを認識するCTLクローンの細胞表面に発現しているTCRの表現型(Phenotype)を決定するため、実施例3で得た各CTLクローン 5×10^6 個からRNAzol TMB(TEL-TEST社製)を用いてそれぞれの全RNAを得た。cDNAを、First Strand cDNA synthesisのためのSuperScriptTM Preamplification System(Invitrogen社製)を使用して調製した。一本鎖cDNAを、22種類の異なったV β プライマー(V β 1~20)と3'C β プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅した。PCRは94℃で1分間の変性、58℃で2分間のアニーリング、72℃で3分間の伸長を1サイクルとして35サイクル行った。PCR産物は、プラスミドpCR2に挿入し、TAクローニングシステム(Invitrogen社製)を使用して大腸菌に形質転換し、コロニーの選択を行い、得られたコロニーからプラスミドを調製してcDNAの配列決定を行った。

その結果、UBE2Vおよび遺伝子1由来のペプチド、HNPR Lおよび遺伝子2のペプチド、並びに2-5 OAS3および遺伝子6由来のペプチドに反応する各2つのCTLクローンが、それぞれTCR $\cdot$ V β 8.1、TCR $\cdot$ V β 3.2、およびTCR $\cdot$ V β 14を発現していた。また、WHSC2および遺伝子3由来のペプチド、EIF4EBP1および遺伝子4由来のペプチド、並びにppMAPkkkおよび遺伝子5由来のペプチドを認識するCTLクローンは、それぞれ、TCR $\cdot$ V β 13.1、TCR $\cdot$ V β 8.1、およびTCR $\cdot$ V β 18を発現していた(表8-1および表8-2)。

また、UBE2Vおよび遺伝子1由来のペプチド、HNRPLおよび遺伝子2のペプチド、並びに2-5 OAS3および遺伝子6由来のペプチドを認識する各2つのCTLクローンは、それぞれ異なった相補性決定領域3 (CDR3) (HLAクラスI分子の溝上の抗原エпитープへの結合性を担う要素) を有するTCRを発現していた。WHSC2および遺伝子3由来のペプチド、EIF4EBP1および遺伝子4由来のペプチド、並びにppMAPkkkおよび遺伝子5由来のペプチドを認識するCTLクローンもそれぞれ異なったCDR3を有するTCRを発現していた。各CDR3のアミノ酸配列は表6に下線で示したアミノ酸配列である。

表8-1

CTLクローン	エピトープ	Vβ	Dβ	Jβ	Cβ
2-2-H3	UBE2V 43-51	8.1	2.1	2.3	2
2-1-H12	UBE2V 43-51	8.1	2.1	2.3	2
1-2-D7	HNRPL 140-148	3.2	1.1	2.7	2
1-2-D12	HNRPL 140-148	3.2	1.1	2.7	2
4-2-A11	WHSC2 103-111	13.1	2.1	2.7	2
4-2-B3	EIF4EBP1 51-59	8.1	1.1	1.1	1
0.5-1-H2	ppMAPkkk 432-440	18	1.1	1.1	1
1-2-D1	2-5 OAS3 666-674	14	2.1	2.3	2
2-2-B4	2-5 OAS3 666-674	14	2.1	2.3	2

表8-2

CTLクローン	Vβ	Dβ *	Cβ
2-2-H3	IYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMP NASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS	<u>SLGLAGGEQFFGPGTRLTVL</u>	EDLKNVPPE
2-1-H12	IYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMP NASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS	<u>SLGLAGGEQFFGPGTRLTVL</u>	EDLKNVPPE
1-2-D7	VSREKKERFSLILESASTNQTSY LCAS	<u>SLDRSYEQYFGPGTRLTVT</u>	EDLKNVPPE
1-2-D12	VSREKKERFSLILESASTNQTSY LCAS	<u>SLDRSYEQYFGPGTRLTVT</u>	EDLKNVPPE
4-2-A11	QGEVPGNGYNSRSTTEDFPLRLLS AAPSQTSVYFCAS	<u>SYGGGSSYEQYFGPGTRLTVT</u>	EDLKNVPPE
4-2-B3	IYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMP NASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS	<u>SRVSGEAFGGGTRLTVV</u>	EDLKNVPPE
0.5-1-H2	DESGMPKERFSAEFPKEGPSILRI QQVVRGDSAAVYFCAS	<u>SPTELDTAEAFGGGTRLTVV</u>	EDLKNVPPE
1-2-D1	VSRKEKRNFPILIESPSPNQTSY FCAS	<u>GGSTDTQYFGPGTRLTVL</u>	EDLKNVPPE
2-2-B4	VSRKEKRNFPILIESPSPNQTSY FCAS	<u>GGSTDTQYFGPGTRLTVL</u>	EDLKNVPPE

産業上の利用の可能性

本発明により、H L A－A 2 拘束性の細胞傷害性 T 細胞を誘導せしめることができ、膵臓癌、大腸癌、および胃癌等の特異的免疫療法が可能となる。H L A－A 2 対立遺伝子は、アフリカ黒人の 2 3 %、中国人の 5 3 %、日本人の 4 0 %、北アメリカコーカサス人の 4 9 %、および南アメリカコーカサス人の 3 8 %で見られる。従って、本発明は、癌治療において多大な貢献を期待し得る。また、本発明は、膵臓癌細胞、大腸癌細胞、および胃癌等の T 細胞による認識に関する分子の基礎的研究にも多大に寄与するものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Itoh, Kyogo
 <120> Tumor antigen
 <130> GP01-1024
 <140>
 <141> 10
 <150> JP P2000-231814
 <151> 2000-07-31
 <160> 62
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 9 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 peptide having an ability to activate HLA-A2
 restricted Cytotoxic T lymphocytes
 <400> 1
 Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile 30
 1 5
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed 40
 peptide having an ability to activate HLA-A2
 restricted Cytotoxic T lymphocytes
 <400> 2
 Leu Leu Leu Leu Ala Arg Trp Glu Asp Thr
 1 5 10

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

10

<400> 3
Leu Ile Ala Asp Phe Leu Ser Gly Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 4
Leu Leu Gln Asp Trp His Val Ile Leu
1 5

30

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

40

<400> 5
Ile Leu Pro Arg Lys His His Arg Ile
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 6

Ala Leu Val Glu Phe Glu Asp Val Leu

1

5

10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

20

<400> 7

Cys Leu Tyr Gly Asn Val Glu Lys Val

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 8

Phe Met Phe Gly Gln Lys Leu Asn Val

1

5

40

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 9

Asn Val Leu His Phe Phe Asn Ala Pro Leu
1 5 10

<210> 10

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 10

20

Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 11

Ile Leu Gly Glu Leu Arg Glu Lys Val
1 5

<210> 12

40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 12

Met Leu Pro Leu Glu Cys Gln Tyr Leu

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 13

Thr Leu Leu Arg Lys Glu Arg Gly Val

1

5

20

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

30

<400> 14

Arg Ile Ile Tyr Asp Arg Lys Phe Leu

1

5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 15

Ile Ile Tyr Asp Arg Lys Phe Leu Met

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed 10
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 16

Gln Ile Leu Lys Gly Leu Leu Phe Leu

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 17

Gly Leu Leu Phe Leu His Thr Arg Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed 40
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 18

Asp Leu Leu Ser His Ala Phe Phe Ala

1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

10

<400> 19
Gln Gln Leu Cys Val Tyr Trp Thr Val
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 20
Ser Leu Leu Tyr Leu Asn Gln Ser Val
1 5

30

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

40

<400> 21
Lys Val His Pro Val Ile Trp Ser Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 22

Asp Met Trp Thr Val Ile Ala Pro Val

1

5

10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

20

<400> 23

Gln Leu Gly Gln Gly Asn Leu Lys Val

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 24

Leu Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Lys Leu

1

5

40

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 25

Thr Met Leu Pro His His Ala Gly Leu

1

5

<210> 26

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 26

20

Leu Leu Arg Arg Ala Asp Phe His Val

1

5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 27

Glu Leu Leu Asn Arg Tyr Leu Tyr Leu

1

5

<210> 28

40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 28

Leu Leu Met Leu Gln Asn Ala Leu Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 29

Tyr Gln Leu Pro Asp Trp Arg Leu Val

1 5

20

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

30

<400> 30

Leu Met Leu Gln Asn Ala Leu Thr Thr Met

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 31

Leu Leu Met Leu Gln Asn Ala Leu Thr Thr

1	5	10	
<210>	32		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Description of Artificial Sequence:Designed peptide having an ability to activate HLA-A2 restricted Cytotoxic T lymphocytes		10
<400>	32		
	Thr Gln Leu Ala Thr Tyr Ser Phe Glu Val		
	1 5 10		
<210>	33		
<211>	10		20
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Description of Artificial Sequence:Designed peptide having an ability to activate HLA-A2 restricted Cytotoxic T lymphocytes		
<400>	33		
	Leu Glu Trp Tyr Asp Asp Phe Pro His Val		30
	1 5 10		
<210>	34		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Description of Artificial Sequence:Designed peptide having an ability to activate HLA-A2 restricted Cytotoxic T lymphocytes		40
<400>	34		
	Phe Ser Gly Asp Val Met Ile His Pro Val		
	1 5 10		

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

10

<400> 35
Trp Ala Gln Glu Asp Pro Asn Ala Val
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 36
Ala Val Leu Gly Arg His Lys Met His Val
1 5 10

30

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

40

<400> 37
Arg Leu Trp Glu Val Ala Thr Ala Arg Cys
1 5 10

<210> 38
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 38

Val Ala Trp Asn Pro Ser Pro Ala Val

1

5

10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

20

<400> 39

Asp Leu Leu Gln Asn Pro Leu Leu Val

1

5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 40

Leu Leu Gln Asn Pro Leu Leu Val Pro Val

1

5

10

40

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 41

Val Ile Phe His Pro Thr Gln Pro Trp Val
1 5 10

<210> 42

10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 42

20

Asn Leu Val Arg Asp Asp Gly Ser Ala Val
1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 43

Arg Leu Phe Ala Phe Val Arg Phe Thr
1 5

<210> 44

40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide having an ability to activate HLA-A2
restricted Cytotoxic T lymphocytes

<400> 44

Val Val Gln Asn Phe Ala Lys Glu Phe Val
 1 5 10

<210> 45

<211> 270

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 45

Met Ala Gly Ala Glu Asp Trp Pro Gly Gln Gln Leu Glu Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Asp Glu Ala Ser Cys Cys Arg Trp Gly Ala Gln His Ala Gly Ala Arg
 20 25 30

Glu Leu Ala Ala Leu Tyr Ser Pro Gly Lys Arg Leu Gln Glu Trp Cys
 35 40 45

20

Ser Val Ile Leu Cys Phe Ser Leu Ile Ala His Asn Leu Val His Leu
 50 55 60

Leu Leu Leu Ala Arg Trp Glu Asp Thr Pro Leu Val Ile Leu Gly Val
 65 70 75 80

Val Ala Gly Ala Leu Ile Ala Asp Phe Leu Ser Gly Leu Val His Trp
 85 90 95

Gly Ala Asp Thr Trp Gly Ser Val Glu Leu Pro Ile Val Gly Lys Ala
 100 105 110

30

Phe Ile Arg Pro Phe Arg Glu His His Ile Asp Pro Thr Ala Ile Thr
 115 120 125

Arg His Asp Phe Ile Glu Thr Asn Gly Asp Asn Cys Leu Val Thr Leu
 130 135 140

Leu Pro Leu Leu Asn Met Ala Tyr Lys Phe Arg Thr His Ser Pro Glu
 145 150 155 160

40

Ala Leu Glu Gln Leu Tyr Pro Trp Glu Cys Phe Val Phe Cys Leu Ile
 165 170 175

Ile Phe Gly Thr Phe Thr Asn Gln Ile His Lys Trp Ser His Thr Tyr
 180 185 190

Phe Gly Leu Pro Arg Trp Val Thr Leu Leu Gln Asp Trp His Val Ile
 195 200 205

Leu Pro Arg Lys His His Arg Ile His His Val Ser Pro His Glu Thr
 210 215 220

Tyr Phe Cys Ile Thr Thr Gly Trp Leu Asn Tyr Pro Leu Glu Lys Ile
 225 230 235 240

Gly Phe Trp Arg Arg Leu Glu Asp Leu Ile Gln Gly Leu Thr Gly Glu
 245 250 255

10

Lys Pro Arg Ala Asp Asp Met Lys Trp Ala Gln Lys Ile Lys
 260 265 270

<210> 46

<211> 589

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 46

Met Ser Arg Arg Leu Leu Pro Arg Ala Glu Lys Arg Arg Arg Arg Leu
 1 5 10 15

Glu Gln Arg Gln Gln Pro Asp Glu Gln Arg Arg Arg Ser Gly Ala Met
 20 25 30

Val Lys Met Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Tyr Tyr
 35 40 45

30

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Ala Pro Lys Arg Leu Lys Thr Asp
 50 55 60

Asn Ala Gly Asp Gln His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala
 65 70 75 80

Gly Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asn Tyr Asp Asp Pro His
 85 90 95

Lys Thr Pro Ala Ser Pro Val Val His Ile Arg Gly Leu Ile Asp Gly
 100 105 110

40

Val Val Glu Ala Asp Leu Val Glu Ala Leu Gln Glu Phe Gly Pro Ile
 115 120 125

Ser Tyr Val Val Val Met Pro Lys Lys Arg Gln Ala Leu Val Glu Phe
 130 135 140

Glu Asp Val Leu Gly Ala Cys Asn Ala Val Asn Tyr Ala Ala Asp Asn 145	150	155	160	
Gln Ile Tyr Ile Ala Gly His Pro Ala Phe Val Asn Tyr Ser Thr Ser 165	170	175		
Gln Lys Ile Ser Arg Pro Gly Asp Ser Asp Asp Ser Arg Ser Val Asn 180	185	190		
Ser Val Leu Leu Phe Thr Ile Leu Asn Pro Ile Tyr Ser Ile Thr Thr 195	200	205		10
Asp Val Leu Tyr Thr Ile Cys Asn Pro Cys Gly Pro Val Gln Arg Ile 210	215	220		
Val Ile Phe Arg Lys Asn Gly Val Gln Ala Met Val Glu Phe Asp Ser 225	230	235	240	
Val Gln Ser Ala Gln Arg Ala Lys Ala Ser Leu Asn Gly Ala Asp Ile 245	250	255		20
Tyr Ser Gly Cys Cys Thr Leu Lys Ile Glu Tyr Ala Lys Pro Thr Arg 260	265	270		
Leu Asn Val Phe Lys Asn Asp Gln Asp Thr Trp Asp Tyr Thr Asn Pro 275	280	285		
Asn Leu Ser Gly Gln Gly Asp Pro Gly Ser Asn Pro Asn Lys Arg Gln 290	295	300		
Arg Gln Pro Pro Leu Leu Gly Asp His Pro Ala Glu Tyr Gly Gly Pro 305	310	315	320	30
His Gly Gly Tyr His Ser His Tyr His Asp Glu Gly Tyr Gly Pro Pro 325	330	335		
Pro Pro His Tyr Glu Gly Arg Arg Met Gly Pro Pro Val Gly Gly His 340	345	350		
Arg Arg Gly Pro Ser Arg Tyr Gly Pro Gln Tyr Gly His Pro Pro Pro 355	360	365		40
Pro Pro Pro Pro Pro Glu Tyr Gly Pro His Ala Asp Ser Pro Val Leu 370	375	380		
Met Val Tyr Gly Leu Asp Gln Ser Lys Met Asn Gly Asp Arg Val Phe 385	390	395	400	

Asn Val Phe Cys Leu Tyr Gly Asn Val Glu Lys Val Lys Phe Met Lys
 405 410 415

Ser Lys Pro Gly Ala Ala Met Val Glu Met Ala Asp Gly Tyr Ala Val
 420 425 430

Asp Arg Ala Ile Thr His Leu Asn Asn Asn Phe Met Phe Gly Gln Lys
 435 440 445

Leu Asn Val Cys Val Ser Lys Gln Pro Ala Ile Met Pro Gly Gln Ser
 450 455 460

10

Tyr Gly Leu Glu Asp Gly Ser Cys Ser Tyr Lys Asp Phe Ser Glu Ser
 465 470 475 480

Arg Asn Asn Arg Phe Ser Thr Pro Glu Gln Ala Ala Lys Asn Arg Ile
 485 490 495

Gln His Pro Ser Asn Val Leu His Phe Phe Asn Ala Pro Leu Glu Val
 500 505 510

20

Thr Glu Glu Asn Phe Phe Glu Ile Cys Asp Glu Leu Gly Val Lys Arg
 515 520 525

Pro Ser Ser Val Lys Val Phe Ser Gly Lys Ser Glu Arg Ser Ser Ser
 530 535 540

Gly Leu Leu Glu Trp Glu Ser Lys Ser Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly
 545 550 555 560

30

Phe Leu Asn His Tyr Gln Met Lys Asn Pro Asn Gly Pro Tyr Pro Tyr
 565 570 575

Thr Leu Lys Leu Cys Phe Ser Thr Ala Gln His Ala Ser
 580 585

<210> 47

<211> 549

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 47

Met Ala Ser Met Arg Glu Ser Asp Thr Gly Leu Trp Leu His Asn Lys
 1 5 10 15

Leu Gly Ala Thr Asp Glu Leu Trp Ala Pro Pro Ser Ile Ala Ser Leu

20	25	30	
Leu Thr Ala Ala Ile Ile Asp Asn Ile Arg Leu Cys Phe His Gly Leu			
35	40	45	
Ser Ser Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ala Val Ile Asp Asn Ile Arg Leu			
50	55	60	
Cys Phe His Gly Leu Ser Ser Ala Val Lys Leu Lys Leu Leu Leu Gly			
65	70	75	80
			10
Thr Leu His Leu Pro Arg Arg Thr Val Asp Glu Met Lys Gly Ala Leu			
85	90	95	
Met Glu Ile Ile Gln Leu Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val Leu			
100	105	110	
Met Val Ala Asp Ile Leu Lys Ser Phe Pro Asp Thr Gly Ser Leu Asn			
115	120	125	
			20
Leu Glu Leu Glu Glu Gln Asn Pro Asn Val Gln Asp Ile Leu Gly Glu			
130	135	140	
Leu Arg Glu Lys Val Gly Glu Cys Glu Ala Ser Ala Met Leu Pro Leu			
145	150	155	160
Glu Cys Gln Tyr Leu Asn Lys Asn Ala Leu Thr Thr Leu Ala Gly Pro			
165	170	175	
Leu Thr Pro Pro Val Lys His Phe Gln Leu Lys Arg Lys Pro Lys Ser			
180	185	190	30
Ala Thr Leu Arg Ala Glu Leu Leu Gln Lys Ser Thr Glu Thr Ala Gln			
195	200	205	
Gln Leu Lys Arg Ser Ala Gly Val Pro Phe His Ala Lys Gly Arg Gly			
210	215	220	
Leu Leu Arg Lys Met Asp Thr Thr Thr Pro Leu Lys Gly Ile Pro Lys			
225	230	235	240
			40
Gln Ala Pro Phe Arg Ser Pro Thr Ala Pro Ser Val Phe Ser Pro Thr			
245	250	255	
Gly Asn Arg Thr Pro Ile Pro Pro Ser Arg Thr Leu Leu Arg Lys Glu			
260	265	270	
Arg Gly Val Lys Leu Leu Asp Ile Ser Glu Leu Asp Met Val Gly Ala			

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

530

535

540

Met Thr Asn Val Ser
545

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 48

Met Ser Gly Gly Ser Ser Cys Ser Gln Thr Pro Ser Arg Ala Ile Pro
1 5 10 15

Ala Thr Arg Arg Val Val Leu Gly Asp Gly Val Gln Leu Pro Pro Gly
20 25 30

Asp Tyr Ser Thr Thr Pro Gly Gly Thr Leu Phe Ser Thr Thr Pro Gly
35 40 45

20

Gly Thr Arg Ile Ile Tyr Asp Arg Lys Phe Leu Met Glu Cys Arg Asn
50 55 60

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

Val Thr Ser Pro Ser Ser Asp Glu Pro Pro Met Glu Ala Ser Gln Ser
85 90 95

His Leu Arg Asn Ser Pro Glu Asp Lys Arg Ala Gly Gly Glu Glu Ser
100 105 110

30

Gln Phe Glu Met Asp Ile
115

<210> 49

<211> 779

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 49

Met Glu Pro Gly Arg Gly Ala Gly Pro Ala Gly Met Ala Glu Pro Arg
1 5 10 15

Ala Lys Ala Ala Arg Pro Gly Pro Gln Arg Phe Leu Arg Arg Ser Val
20 25 30

Val	Glu	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Pro	Gly	Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala		
35			40						45							
Pro	Gly	Pro	Gln	Pro	Pro	Gln	Pro	Leu	Gln	Arg	Arg	Val	Leu	Leu	Leu	
50			55						60							
Cys	Lys	Thr	Arg	Arg	Leu	Ile	Ala	Glu	Arg	Ala	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala	
65			70						75						80	
Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	
				85			90						95			
Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Pro	Glu	Pro	Val	Gly	Thr	Gln	Glu	Pro	Gly	Pro	
				100			105						110			
Asp	Pro	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Thr	Ala	Pro	Ala	Pro	Asp	Gly	Gly	
115			120						125							
Pro	Arg	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Thr	Val	Arg	Lys	Glu	Asp	Glu	Gly	Ala	
130			135						140							
Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Arg	Asp	Glu	Pro	Glu	
145			150						155						160	
Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Leu	Lys	Ala	Val	Ala	Thr	Ser	Leu	
				165			170						175			
Asp	Gly	Arg	Phe	Leu	Lys	Phe	Asp	Ile	Glu	Leu	Gly	Arg	Gly	Ser	Phe	
				180			185						190			
Lys	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Asp	Thr	Glu	Thr	Trp	Val	Glu	Val	Ala	
195			200						205							
Trp	Cys	Glu	Leu	Gln	Asp	Arg	Lys	Leu	Thr	Lys	Leu	Glu	Arg	Gln	Arg	
210			215						220							
Phe	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Met	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	His	Pro	Asn	Ile	
225			230						235						240	
Val	Arg	Phe	Tyr	Asp	Phe	Trp	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Gly	Lys	Arg	Cys	
				245			250						255			
Ile	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Leu	Met	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu	Lys	Thr	Tyr	
				260			265						270			
Leu	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Met	Lys	Pro	Lys	Val	Leu	Arg	Ser	Trp	Cys	
275			280						285							

Arg Gln Ile Leu Lys Gly Leu Leu Phe Leu His Thr Arg Thr Pro Pro
 290 295 300
 Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Cys Asp Asn Ile Phe Ile Thr Gly Pro
 305 310 315 320
 Thr Gly Ser Val Lys Ile Gly Asp Leu Gly Leu Ala Thr Leu Lys Arg
 325 330 335
 Ala Ser Phe Ala Lys Ser Val Ile Gly Thr Pro Glu Phe Met Ala Pro
 340 345 350
 Glu Met Tyr Glu Glu His Tyr Asp Glu Ser Val Asp Val Tyr Ala Phe
 355 360 365
 Gly Met Cys Met Leu Glu Met Ala Thr Ser Glu Tyr Pro Tyr Ser Glu
 370 375 380
 Cys Gln Asn Ala Ala Gln Ile Tyr Arg Lys Val Thr Cys Gly Ile Lys
 385 390 395 400
 Pro Ala Ser Phe Glu Lys Val His Asp Pro Glu Ile Lys Glu Ile Ile
 405 410 415
 Gly Glu Cys Ile Cys Lys Asn Lys Glu Glu Arg Tyr Glu Ile Lys Asp
 420 425 430
 Leu Leu Ser His Ala Phe Phe Ala Glu Asp Thr Gly Val Arg Val Glu
 435 440 445
 Leu Ala Glu Glu Asp His Gly Arg Lys Ser Thr Ile Ala Leu Arg Leu
 450 455 460
 Trp Val Glu Asp Pro Lys Lys Leu Lys Gly Lys Pro Lys Asp Asn Gly
 465 470 475 480
 Ala Ile Glu Phe Thr Phe Asp Leu Glu Lys Glu Thr Pro Asp Glu Val
 485 490 495
 Ala Gln Glu Met Ile Glu Ser Gly Phe Phe His Glu Ser Asp Val Lys
 500 505 510
 Ile Val Ala Lys Ser Ile Arg Asp Arg Val Ala Leu Ile Gln Trp Arg
 515 520 525
 Arg Glu Arg Ile Trp Pro Ala Leu Gln Pro Lys Glu Gln Gln Asp Val
 530 535 540

10

20

30

40

10

20

30

40

<211> 1087

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Asp Leu Tyr Ser Thr Pro Ala Ala Ala Leu Asp Arg Phe Val Ala
 1 5 10 15

Arg Lys Leu Gln Pro Arg Lys Glu Phe Val Glu Lys Ala Arg Arg Ala
 20 25 30

10

Leu Gly Ala Leu Ala Ala Ala Leu Arg Glu Arg Gly Gly Arg Leu Gly
 35 40 45

Ala Ala Ala Pro Arg Val Leu Lys Thr Val Lys Gly Gly Ser Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Thr Ala Leu Lys Gly Gly Cys Asp Ser Glu Leu Val Ile Phe
 65 70 75 80

20

Leu Asp Cys Phe Lys Ser Tyr Val Asp Gln Arg Ala Arg Arg Ala Glu
 85 90 95

Ile Leu Ser Glu Met Arg Ala Ser Leu Glu Ser Trp Trp Gln Asn Pro
 100 105 110

Val Pro Gly Leu Arg Leu Thr Phe Pro Glu Gln Ser Val Pro Gly Ala
 115 120 125

Leu Gln Phe Arg Leu Thr Ser Val Asp Leu Glu Asp Trp Met Asp Val
 130 135 140

30

Ser Leu Val Pro Ala Phe Asn Val Leu Gly Gln Ala Gly Ser Gly Val
 145 150 155 160

Lys Pro Lys Pro Gln Val Tyr Ser Thr Leu Leu Asn Ser Gly Cys Gln
 165 170 175

Gly Gly Glu His Ala Ala Cys Phe Thr Glu Leu Arg Arg Asn Phe Val
 180 185 190

40

Asn Ile Arg Pro Ala Lys Leu Lys Asn Leu Ile Leu Leu Val Lys His
 195 200 205

Trp Tyr His Gln Val Cys Leu Gln Gly Leu Trp Lys Glu Thr Leu Pro
 210 215 220

Pro Val Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Ile Phe Ala Trp Glu Gln Gly

225 230 235 240
 Cys Lys Lys Asp Ala Phe Ser Leu Ala Glu Gly Leu Arg Thr Val Leu
 245 250 255
 Gly Leu Ile Gln Gln His Gln His Leu Cys Val Phe Trp Thr Val Asn
 260 265 270
 Tyr Gly Phe Glu Asp Pro Ala Val Gly Gln Phe Leu Gln Arg Gln Leu
 275 280 285
 Lys Arg Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro Thr Trp Asp
 290 295 300
 Leu Gly Asn Gly Ala Ala Trp His Trp Asp Leu Leu Ala Gln Glu Ala
 305 310 315 320
 Ala Ser Cys Tyr Asp His Pro Cys Phe Leu Arg Gly Met Gly Asp Pro
 325 330 335
 Val Gln Ser Trp Lys Gly Pro Gly Leu Pro Arg Ala Gly Cys Ser Gly
 340 345 350
 Leu Gly His Pro Ile Gln Leu Asp Pro Asn Gln Lys Thr Pro Glu Asn
 355 360 365
 Ser Lys Ser Leu Asn Ala Val Tyr Pro Arg Ala Gly Ser Lys Pro Pro
 370 375 380
 Ser Cys Pro Ala Pro Gly Pro Thr Gly Ala Ala Ser Ile Val Pro Ser
 385 390 395 400
 Val Pro Gly Met Ala Leu Asp Leu Ser Gln Ile Pro Thr Lys Glu Leu
 405 410 415
 Asp Arg Phe Ile Gln Asp His Leu Lys Pro Ser Pro Gln Phe Gln Glu
 420 425 430
 Gln Val Lys Lys Ala Ile Asp Ile Ile Leu Arg Cys Leu His Glu Asn
 435 440 445
 Cys Val His Lys Ala Ser Arg Val Ser Lys Gly Gly Ser Phe Gly Arg
 450 455 460
 Gly Thr Asp Leu Arg Asp Gly Cys Asp Val Glu Leu Ile Ile Phe Leu
 465 470 475 480
 Asn Cys Phe Thr Asp Tyr Lys Asp Gln Gly Pro Arg Arg Ala Glu Ile

10

20

30

40

485					490					495						
Leu	Asp	Glu	Met	Arg	Ala	His	Val	Glu	Ser	Trp	Trp	Gln	Asp	Gln	Val	
500					505					510						
Pro	Ser	Leu	Ser	Leu	Gln	Phe	Pro	Glu	Gln	Asn	Val	Pro	Glu	Ala	Leu	
515					520					525						
Gln	Phe	Gln	Leu	Val	Ser	Thr	Ala	Leu	Lys	Ser	Trp	Thr	Asp	Val	Ser	
530					535					540					10	
Leu	Leu	Pro	Ala	Phe	Asp	Ala	Val	Gly	Gln	Leu	Ser	Ser	Gly	Thr	Lys	
545					550					555					560	
Pro	Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Cys	Gln	Glu	
565					570					575						
Gly	Glu	His	Lys	Ala	Cys	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Asn	Phe	Met	Asn	
580					585					590					20	
Ile	Arg	Pro	Val	Lys	Leu	Lys	Asn	Leu	Ile	Leu	Leu	Val	Lys	His	Trp	
595					600					605						
Tyr	Arg	Gln	Val	Ala	Ala	Gln	Asn	Lys	Gly	Lys	Gly	Pro	Ala	Pro	Ala	
610					615					620						
Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	Ile	Phe	Ala	Trp	
625					630					635					640	
Glu	Gln	Gly	Cys	Arg	Gln	Asp	Cys	Phe	Asn	Met	Ala	Gln	Gly	Phe	Arg	
645					650					655					30	
Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Gln	Gln	His	Gln	Gln	Leu	Cys	Val	Tyr	Trp	
660					665					670						
Thr	Val	Asn	Tyr	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Ala	Met	Arg	Met	His	Leu	Leu	
675					680					685						
Gly	Gln	Leu	Arg	Lys	Pro	Arg	Pro	Leu	Val	Leu	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	
690					695					700					40	
Thr	Trp	Asn	Val	Gly	His	Gly	Ser	Trp	Glu	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Ala	
705					710					715					720	
Ala	Ala	Leu	Gly	Met	Gln	Ala	Cys	Phe	Leu	Ser	Arg	Asp	Gly	Thr	Ser	
725					730					735						
Val	Gln	Pro	Trp	Asp	Val	Met	Pro	Ala	Leu	Leu	Tyr	Gln	Thr	Pro	Ala	

740	745	750	
Gly Asp Leu Asp Lys Phe Ile Ser Glu Phe Leu Gln Pro Asn Arg Gln 755	760	765	
Phe Leu Ala Gln Val Asn Lys Ala Val Asp Thr Ile Cys Ser Phe Leu 770	775	780	
Lys Glu Asn Cys Phe Arg Asn Ser Pro Ile Lys Val Ile Lys Val Val 785	790	795	800
Lys Gly Gly Ser Ser Ala Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp 805	810	815	10
Ala Asp Leu Val Val Phe Leu Ser Cys Phe Ser Gln Phe Thr Glu Gln 820	825	830	
Gly Asn Lys Arg Ala Glu Ile Ile Ser Glu Ile Arg Ala Gln Leu Glu 835	840	845	20
Ala Cys Gln Gln Glu Arg Gln Phe Glu Val Lys Phe Glu Val Ser Lys 850	855	860	
Trp Glu Asn Pro Arg Val Leu Ser Phe Ser Leu Thr Ser Gln Thr Met 865	870	875	880
Leu Asp Gln Ser Val Asp Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu 885	890	895	
Gly Gln Leu Val Ser Gly Ser Arg Pro Ser Ser Gln Val Tyr Val Asp 900	905	910	30
Leu Ile His Ser Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Tyr Ser Thr Cys Phe Thr 915	920	925	
Glu Leu Gln Arg Asp Phe Ile Ile Ser Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser 930	935	940	
Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Gln Cys Thr Lys Ile Ser 945	950	955	960
Lys Gly Arg Gly Ser Leu Pro Pro Gln His Gly Leu Glu Leu Leu Thr 965	970	975	40
Val Tyr Ala Trp Glu Gln Gly Arg Lys Asp Ser Gln Phe Asn Met Ala 980	985	990	
Glu Gly Phe Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Thr Gln Tyr Arg Gln Leu			

995	1000	1005	
Cys Ile Tyr Trp Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Lys Asp Lys Thr Val Gly			
1010	1015	1020	
Asp Phe Leu Lys Gln Gln Leu Gln Lys Pro Arg Pro Ile Ile Leu Asp			
1025	1030	1035	1040
Pro Ala Asp Pro Thr Gly Asn Leu Gly His Asn Ala Arg Trp Asp Leu			
	1045	1050	1055
			10
Leu Ala Lys Glu Ala Ala Ala Cys Thr Ser Ala Leu Cys Cys Met Gly			
	1060	1065	1070
Arg Asn Gly Ile Pro Ile Gln Pro Trp Pro Val Lys Ala Ala Val			
	1075	1080	1085
<210> 51			
<211> 216			20
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 51			
Met Lys Ser Ile Ser Leu Leu Arg Tyr Gln Glu Glu Ser Lys Thr Leu			
1	5	10	15
Ser Leu Val Ser Arg Asp Ala Lys Pro Leu Glu Val Tyr Ser Val Asp			
	20	25	30
			30
Phe Met Val Asp Asn Ala Gln Leu Gly Phe Leu Val Ser Asp Arg Asp			
	35	40	45
Arg Asn Leu Met Val Tyr Met Tyr Leu Pro Glu Ala Lys Glu Ser Phe			
	50	55	60
Gly Gly Met Arg Leu Leu Arg Arg Ala Asp Phe His Val Gly Ala His			
	65	70	75
			80
Val Asn Thr Phe Trp Arg Thr Pro Cys Arg Gly Ala Thr Glu Gly Leu			
	85	90	95
			40
Ser Lys Lys Ser Val Val Trp Glu Asn Lys His Ile Thr Trp Phe Ala			
	100	105	110
Thr Leu Asp Gly Gly Ile Gly Leu Leu Leu Pro Met Gln Glu Lys Thr			
	115	120	125

Tyr Arg Arg Leu Leu Met Leu Gln Asn Ala Leu Thr Thr Met Leu Pro
 130 135 140

His His Ala Gly Leu Asn Pro Arg Ala Phe Arg Met Leu His Val Asp
 145 150 155 160

Arg Arg Thr Leu Gln Asn Ala Val Arg Asn Val Leu Asp Gly Glu Leu
 165 170 175

Leu Asn Arg Tyr Leu Tyr Leu Ser Thr Met Glu Arg Ser Glu Leu Ala
 180 185 190

10

Lys Lys Ile Gly Thr Thr Pro Asp Ile Ile Leu Asp Asp Leu Leu Glu
 195 200 205

Thr Asp Arg Val Thr Ala His Phe
 210 215

<210> 52

20

<211> 634

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Ala Ser Ala Arg Ile Gly Asp Glu Tyr Ala Glu Asp Ser Ser Asp
 1 5 10 15

Glu Glu Asp Ile Arg Asn Thr Val Gly Asn Val Pro Leu Glu Trp Tyr
 20 25 30

30

Asp Asp Phe Pro His Val Gly Tyr Asp Leu Asp Gly Arg Arg Ile Tyr
 35 40 45

Lys Pro Leu Arg Thr Arg Asp Glu Leu Asp Gln Phe Leu Asp Lys Met
 50 55 60

Asp Asp Pro Asp Tyr Trp Arg Thr Val Gln Asp Pro Met Thr Gly Arg
 65 70 75 80

Asp Leu Arg Leu Thr Asp Glu Gln Val Ala Leu Val Arg Arg Leu Gln
 85 90 95

40

Ser Gly Gln Phe Gly Asp Val Gly Phe Asn Pro Tyr Glu Pro Ala Val
 100 105 110

Asp Phe Phe Ser Gly Asp Val Met Ile His Pro Val Thr Asn Arg Pro
 115 120 125

Ala Asp Lys Arg Ser Phe Ile Pro Ser Leu Val Glu Lys Glu Lys Val	
130 135 140	
Ser Arg Met Val His Ala Ile Lys Met Gly Trp Ile Gln Pro Arg Arg	
145 150 155 160	
Pro Arg Asp Pro Thr Pro Ser Phe Tyr Asp Leu Trp Ala Gln Glu Asp	
165 170 175	
Pro Asn Ala Val Leu Gly Arg His Lys Met His Val Pro Ala Pro Lys	10
180 185 190	
Leu Ala Leu Pro Gly His Ala Glu Ser Tyr Asn Pro Pro Pro Glu Tyr	
195 200 205	
Leu Leu Ser Glu Glu Glu Arg Leu Ala Trp Glu Gln Gln Glu Pro Gly	
210 215 220	
Glu Arg Lys Leu Ser Phe Leu Pro Arg Lys Phe Pro Ser Leu Arg Ala	20
225 230 235 240	
Val Pro Ala Tyr Gly Arg Phe Ile Gln Glu Arg Phe Glu Arg Cys Leu	
245 250 255	
Asp Leu Tyr Leu Cys Pro Arg Gln Arg Lys Met Arg Val Asn Val Asp	
260 265 270	
Pro Glu Asp Leu Ile Pro Lys Leu Pro Arg Pro Arg Asp Leu Gln Pro	
275 280 285	
Phe Pro Thr Cys Gln Ala Leu Val Tyr Arg Gly His Ser Asp Leu Val	30
290 295 300	
Arg Cys Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly Gln Trp Leu Val Ser Gly Ser	
305 310 315 320	
Asp Asp Gly Ser Leu Arg Leu Trp Glu Val Ala Thr Ala Arg Cys Val	
325 330 335	
Arg Thr Val Pro Val Gly Gly Val Val Lys Ser Val Ala Trp Asn Pro	40
340 345 350	
Ser Pro Ala Val Cys Leu Val Ala Ala Ala Val Glu Asp Ser Val Leu	
355 360 365	
Leu Leu Asn Pro Ala Leu Gly Asp Arg Leu Val Ala Gly Ser Thr Asp	
370 375 380	

10

20

30

40

<210> 53
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Met Ala Thr Lys Ile Asp Lys Glu Ala Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Leu
 1 5 10 15

Val Arg Asp Asp Gly Ser Ala Val Ile Trp Val Thr Phe Lys Tyr Asp 10
 20 25 30

Gly Ser Thr Ile Val Pro Gly Glu Gln Gly Ala Glu Tyr Gln His Phe
 35 40 45

Ile Gln Gln Cys Thr Asp Asp Val Arg Leu Phe Ala Phe Val Arg Phe
 50 55 60

Thr Thr Gly Asp Ala Met Ser Lys Arg Ser Lys Phe Ala Leu Ile Thr 20
 65 70 75 80

Trp Ile Gly Glu Asn Val Ser Gly Leu Gln Arg Ala Lys Thr Gly Thr
 85 90 95

Asp Lys Thr Leu Val Lys Glu Val Val Gln Asn Phe Ala Lys Glu Phe
 100 105 110

Val Ile Ser Asp Arg Lys Glu Leu Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ser Glu
 115 120 125

Leu Lys Lys Ala Gly Gly Ala Asn Tyr Asp Ala Gln Thr Glu 30
 130 135 140

<210> 54
 <211> 1775
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> polyA_site

<222> (1775)

40

<400> 54

atctcgccgc ggttcgcgg ccctgccgcc gccgcnttt ngcagagcgc accgggccga 60
 tcggcgagtg ggccatggcg ggccgcgagg actggccggg ccagcagctg gagctggacg 120

```

aggacgaggc gtcttgttgc cgctggggcg cgcagcacgc cggggcccg gagctggctg 180
cgctctactc gccaggcaag cgcctccagg agtgggtgctc tgtgatcctg tgcttcagcc 240
tcacgcacca caacctgggc catctcctgc tgcctggccg ctgggaggac acacccctcg 300
tcatactcgg tgttgttga ggggtctca ttgctgactt cttgtctggc ctggtacact 360
ggggtgctga cacatggggc tctgtggagc tgccattgt ggggaaggct ttcacccgac 420
ccttcggga gcaccacatt gaccgacag ctatcacacg gcacgacttc atcgagacca 480
acggggacaa ctgcctgggt acactgctgc cgctgctaaa catggcctac aagttccgca 540
cccacagccc tgaagccctg gacagctat acccctggga gtgcttcgtc ttctgctga 600
tcattctcgg caccttcacc aaccagatcc acaagtggc gcacacgtac tttgggctgc 660
cacgtgggt caccctcctg caggactggc atgtcatcct gccacgtaaa caccatcgca 720
tccaccacgt ctacccacac gagacctact tetgcatcac cacaggetgg ctcaactacc 780
ctctggagaa gataggcttc tggcgacgcc tggaggacct catccagggc ctgacggggc 840
agaagcctcg ggcagatgac atgaaatggg ccagaagat caaataactt ctccgagcct 900
gctacctggt tgccaacctt ccctagcccc caaacgaag ccatctgcca aattccagcc 960
tctttgagct ggccctcca gatggagagg acatctcctg ggctgggccc aggtacccca 1020
gcccacccct catgacacag aatacttgag ccactgattt ttcatttctt ttttttttt 1080
tcctcggccc ctctcagcc acctgagttg ctctatctgc aagcctgact ctgccagcct 1140
cccctggtag agaggaggtt taccactcc ctgcacgct gccgtccctg ccccgctggg 1200
caagcccttc agtgtggctg gcgttggggc cagtgagttg cctctttccc tcttgtctg 1260
gcccagtggt tctggggagc cccaggcac acctaagcgt cgtggagcat tgttctgcca 1320
cagccctgca tactgacccc gggaggctgg gcagggtggac agcccagcc accaccttca 1380
gcctagcctg tcccccaagg atggtgaagc tcagcagggg tctgagggtg gccggccaga 1440
agaggctgga acctcctgct caagtctaga cccctacttc tctgctgccc ccacctgccc 1500
agagctgatg tttccaatac caagatgtct tcacagggca cagcccctgc agagcatctt 1560
ggtcatttgg aagaggacac ggtatccct ctggccagag tatgtcagag aaggaagagt 1620
agggttttt tgttttgtt ttttttaaag gtgcttgctt gtttaagtga aataatagaa 1680
agccttaata tcttttctgt aacacggagt aatattttta tgtcatgttt tggatgtaca 1740
taatatattt ataacaaagc agcaagagtc tactt 1775

```

10

20

30

```

<210> 55
<211> 2097
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> polyA_site
<222> (2097)

```

```

<400> 55
gccgcatgt cgcggaggct gctgccccgg gcggagaagc ggcgtcggcg gctggagcag 60
aggcagcagc cggacagca gcggaggcgg tcgggagcga tggatgaagat ggccggcgcg 120
ggcgccggag gcggcggtgg ccgctactac ggccggcgca gtgaggcgcg ccgggcccct 180
aagcggtcga agactgacaa cggcgcgac cagcacggag gcggcgcgcg tggcggtgga 240
ggagccgggg cgccggggcg cgccggcggt ggggagaact acgatgaccc gcacaaaacc 300
cctgcctccc cagttgtcca catcaggggc ctgattgacg gtgtggtgga agcagacctt 360
gtggaggcct tgcaggagtt tggaccatc agctatgtgg tggtaatgcc taaaaagaga 420
caagcactgg tggagtttga agatgtgttg ggggcttgca acgcagtga ctacgcagcc 480

```

40

gacaacccaaa tatacattgc tggtcaccca gcttttgtca actactctac cagccagaag 540
 atctcccgcc ctggggactc ggatgactcc cggagcgtga acagtgtgct tctctttacc 600
 atcctgaacc ccatttattc gatcaccacg gatgttcttt acactatctg taatccttgt 660
 ggccctgtcc agagaattgt cattttcagg aagaatggag ttcaggcgat ggtggaattt 720
 gactcagttc aaagtgccca gcgggccaag gcctctctca atggggctga tatctattct 780
 ggctgttgca ctctgaagat cgaatacgca aagcctacac gcttgaatgt gttcaagaat 840
 gatcaggata cttgggacta cacaaccccc aatctcagt gacaaggatga cctgggcagc 900
 aaccccaaca aacgccagag gcagccccct ctcttgggag atcaccgccg agaatatgga 960
 gggcccccag gtgggtacca cagccattac catgatgagg gctacgggcc cccccacct 1020
 cactacgaag ggagaaggat ggggtccacca gtgggggggc accgtcgggg cccaagtgcg 1080
 tacggccccc agtatgggca cccccaccc cctccccac caccgagta tggccctcac 1140
 gccgacagcc ctgtgctcat ggtctatggc ttggatcaat ctaagatgaa cggtgaccga 1200
 gtcttcaatg tcttctgctt atatggcaat gtggagaagg tgaaattcat gaaaagcaag 1260
 ccggggggccg ccatgttgga gatggctgat ggctacgctg tagaccgggc cattaccac 1320
 ctcaacaaca acttcatgtt tgggcagaag ctgaatgtct gtgtctccaa gcagccagcc 1380
 atcatgcctg gtcagtcata cgggttgga gacgggtctt gcagttacaa agacttcagt 1440
 gaatcccgga acaatcggtt ctccacccca gagcaggcag ccaagaaccg catccagcac 1500
 cccagcaacg tgctgcactt cttcaacgcc ccgctggagg tgaccgagga gaaattcttt 1560
 gagatctgcg atgagctggg agtgaagcgg ccatcttctg tgaaagtatt ctgaggcaaa 1620
 agtgagcgca gctcctctgg actgctggag tgggaatcca agagcgatgc cctggagact 1680
 ctgggcttcc tgaaccatta ccagatgaaa aacccaaatg gtccataccc ttacactctg 1740
 aagttgtgtt tctccactgc tcagcacgcc tcctaattag gtgcctagga agagtcccat 1800
 ctgagcagga agacatttct ctttcttcta tgccattttt tgtttttgtt atttgcaaaa 1860
 gatcttgtat tctttttttt tttttttttt ttttttaaat gctaggtttg tagaggctta 1920
 cttaacctta atggaaacgc tggaaatctg cagggggagg gaaaggggaa ctgttatctc 1980
 ccaagattaa ccttcacttt taaaaaatta ttggacatgt gaattttttt tttcctggtc 2040
 atacatttgg gctgcccatt tactcttggc ccatttcaat aaaattgttt ggaaaat 2097

10

20

<210> 56
 <211> 2243
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> polyA_site
 <222> (2243)

<400> 56
 atggcgtcca tgcgggagag cgacacgggc ctgtggctgc acaacaagct gggggccacg 60
 gacgagctgt angcgcggcc cagcatcgcg tccctgctca cggccgcaat catcgacaac 120
 atccgtctct gcttccatgg cctctcgctg gcgtccctgc tcacggccgc ggtcatcgac 180
 aacatccgtc tctgcttcca tggcctctcg tcggcagtga agctcaagtt gctacteggg 240
 acgtgcacc tcccgcggcg caggttgac gagatgaagg gcgcctaat ggagatcacc 300
 cagctcgcca gcctcgactc ggacccctgg gtgctcatgg tcgcccacat cttgaagtcc 360
 tttccggaca caggctcgct taacctggag ctggaggagc agaatcccaa cgttcaggat 420
 attttgggag aacttagaga aaaggtgggt gagtgtgaag cgtctgccat gctgccactg 480
 gagtgccagt acttgaacaa aaacgccctg acgaccctcg cgggaccctt cactcccccg 540

40

```

gtgaagcatt ttcagttaaa gcggaaaccc aagagcgcca cgtgcgggc ggagctgctg 600
cagaagtcca cggagaccgc ccagcagttg aagcggagcg ccggggtgcc cttccacgcc 660
aagggccggg ggctgctgcg gaagatggac accaccacc cactcaaagg catcccgaag 720
caggcgccct tcagaagccc caggcgccc agcgtcttca gcccacagg gaaccggacc 780
cccatccgc cttccaggac gctgctgcgg aaggaacgag gtgtgaagct gctggacatc 840
tctgagctgg atatggttgg cgtggcga gaggcgaagc ggagaaggaa gactctgat 900
gcggaggtgg tggagaagcc ggccaaggag gaaacggtgg tggagaacgc caccocggac 960
tacgcagccg gcctggtgtc cagcagaaa cttgggtccc tgaacaatga gcctgcgctg 1020
ccctccacga gctaccttcc ctccacgcc agcgtggttc ccgcctcctc ctacatcccc 1080
agctccgaga cggcccccagc ccatcttcc cgggaagcca gccgcccacc agaggagccc 1140
agcggccga gccccacgtt gccagcgcag ttcaagcagc gggcgcccat gtacaacagc 1200
ggcctgagcc ctgccacacc cagcctgcg gcgccacct cgcctctgac acccaccaca 1260
cctccggctg tcgccctac cactcagaca ccccgggttg ccatggtggc ccgcagacc 1320
caggccccctg ctcagcagca gcctaagaag aacctgtccc tcacgagaga gcagatgttc 1380
gctgcccagg agatgttcaa gacggccaac aaagtcacgc gggccgagaa gggcctcate 1440
ctgggcttca tggccggctc ccgagagaac ccgtgccagg agcaggggga cgtgatccag 1500
atcaagctga gcgagcacac ggaggacctg cccaaggcgg acggccaggg tagcacaacc 1560
atgctggtgg acacagtgtt tgagatgaac tatgccacgg gccagtggac gcgctcaag 1620
aagtacaagc ccatgaccaa tgttccttag aaccacctgc ctcacagctg gccgtcactt 1680
gtgggggtcc acgggacgat ggctttgcca gcttaaagta accggatggc ggacacctgg 1740
ccccgaggt ccccgccg ccgcctgct gctgaccag cctgttttaa gttctggatg 1800
catctctctg gggatatttg ggcttatttt taaaatttta atatgggttc ttttttgtgt 1860
gatttaagac actttttgga ctcaacgtta catttttgaa tgtagtaagt aaattaacca 1920
aaaaagttac aacttcttaa ttttagtgac agctctgcct gttagactct tactttttaa 1980
aatcttttct attttccctc gctggggcag tgccctccta ccccagggt tgaggggacc 2040
aagggtggcag ggtggtactg ggggtgcggc agggacaccc gaccacacca gagcgtggga 2100
gacggtgggc cttgtccctt gcctgtgct gcctgggagt tttgtattca tctttgtat 2160
agtgtggac atttaagaca gtctttgggt acctattttc attgtaaaac tatctgaacc 2220
attaaagtcg agcttttcta aag                                     2243

```

10

20

30

<210> 57

<211> 831

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> polyA_site

<222> (831)

40

<400> 57

```

gcgggagggc agcgagaggt tcgcggtgc agcgcacagg agaccatgtc cgggggcagc 60
agctgcagcc agacccaag ccgggccatc cccgccactc gccgggtggt gctcggcgac 120
ggcgtgcagc tcccgcccg ggactacagc acgaccccg gcggcacgct cttcagcacc 180
accccgggag gtaccaggat catctatgac cggaaattcc tgatggagtg tcggaactca 240
cctgtgacca aaacaccccc aagggatctg cccaccattc cgggggtcac cagcccttcc 300
agtgtagac ccccatgga agccagccag agccacctgc gcaatagccc agaagataag 360
cgggcgggcg gtgaagagtc acagtttgag atggacattt aaagcaccag ccatcgtgtg 420

```


gagcactacc aaggggcccc tcagggcctt cctgggagga gtcccaccag ccaggcetta 480
 tgaagtgat catactgggc aggcgttggc gtggggtcgg acaccccagc cttttctccc 540
 tcaactcagg cacttgcccc ctctcttcg tgaacaccag cagatacctc cttgtgcctc 600
 cactgatgca ggagctgcca ccccaagggg agtgaccctt gccagcacac cctgcagcca 660
 agggccagga agtggacaag aacgaacctt tccttcgaa tgatcagcag ttccagcccc 720
 tcgctgctgg gggcgcaacc acccttcct taggttgatg tgcttgggaa agctccctcc 780
 ccctccttcc ccaagagagg aaataaaaag caccttcgcc ctagggccaa g 831

<210> 58

10

<211> 2404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

cacgcgtaag cttgggcccc tcgaggatc ctctagagcg gccgccgaga cgtccccggc 60
 acgtgatgg agcccgggcg cggcgcgggg cccgcgggca tggcggagcc tcgggcgaag 120
 gcggcgcggc cggggcccca gcgctttctg cggcgcgagc tggtagagtc ggaccaggag 180
 gagccgcccg gcttggaggc agccgaggcg cggggccccg agcccccgca gccccctgcag 240
 cgccgggtgc ttctgctctg caagacgcgc cgcctcatcg cggagcgcgc ccgcgggacgc 300
 cccgccgccc ccgccccgc agcgttggtg gcgcagccgg gagcccccg agcccccgcg 360
 gacgccggcc ccgagcccgt gggcacgcag gagccccggc cggaccccat cgcagccgct 420
 gtcgaaaccg cgcctgcccc cgacggcggc cccagggagg aggcggcggc taccgtgagg 480
 aaggaggatg agggggcggc cgaggcgaag cctgagcccc ggcgactcg ccgggacgag 540
 cccgaagagg aggaggacga cgaggacgac ctcaaggccg tggccacctc tctggacggc 600
 cgcttctca agttcgacat cgagctgggc cgcggttctt tcaagacggt ctacaagggg 660
 ctggacacgg agacctgggt ggaggtggcc tgggtgagc tgcaggaccg gaagctcacc 720
 aagctggagc ggcagcggtt caaggaagag gctgagatgc tgaaggcct gcagacccc 780
 aacatcgtc gcttctacga cttctgggag tccagcgcca agggcaagcg gtgcattgtg 840
 ctggtgacgg agcttatgac ctcagggacg ctgaagacat acctgaagcg gttcaagggtg 900
 atgaagccca aggttctccg cagctggtgc cggcagatcc tgaaggcct gctgttctg 960
 cacacaagga cgccacccat catccaccga gacctgaaat gtgacaatat tttcatcacc 1020
 ggaccaactg ggtctgtgaa gattggcgac ttgggcctgg ccactctgaa aagagcgta 1080
 tttgccaaaa gtgtgatagg tactcccag ttcatggcg cagagatgta cgaggagcac 1140
 tacgatgagt ccgtggacgt ctatgccttt gggatgtgca tgctggagat ggccacctcg 1200
 gagtacccct actcggagt ccagaatgcg gccagatct accgcaaggt cacctgttgt 1260
 atcaagccgg ccagctttga gaaagtgcac gatcctgaaa tcaaggagat tattggggag 1320
 tgtatctgca aaaacaagga ggaaaggtac gagatcaaag acctgctgag ccacgcctc 1380
 ttgcagagg acacaggcgt gaggtggag ctgcggagg aggaccacgg caggaagtcc 1440
 acctcgccc tgaggctctg ggtggaagac cccaagaaac tgaagggaaa gccaaggac 1500
 aatggagvca tagagttcac cttecgacct gagaaggaga cgcggatga agtggcccaa 1560
 gagatgattg agtctggatt cttccacgag agtgacgtca agatcgtggc caagtccatc 1620
 cgtgaccgcg tggccttgat ccagtggcg cgggagagga tctggccccg gctgcagccc 1680
 aaggagcagc aggatgtggg cagcccgac aaggccagg gtccgcccgt gccctgcag 1740
 gtccaggtga cctaccatgc acaggctggg cagcccgggc caccagagcc cgaggagccg 1800
 gagccgacc agcacctcct gccacctacg ttgccgacca gcgccacctc cctggcctcg 1860
 gacagcacct tcgacagcgg ccagggtctt accgtgtact cagactcgca gagcagccag 1920
 cagagcgtga tgcttggctc ccttgccgac gcagcgccgt ccccgccca gtgtgtgtgc 1980

20

30

40

```

agccccctg tgagcgagg gcccgctctg ccgcagagcc tgccctcgt gggggcctac 2040
cagcagccca cggctgcacc tcctccgctg gccagccga caccctgcc gcaggctctg 2100
gccccacagc cgttggtccc cctccagccg gtccccccc acctgccacc gtacctggt 2160
ccagcctccc aggtgggggc ccccgctcag ctgaagcccc tccagatgcc acaggcgccc 2220
ctgcagccgc ttgctcaagt cctccgcag atgccccga ttctgttgt gcccccatc 2280
acgcccctgg cgggaatoga cggcctccct ccggccctcc cagacctgcc gaccgcgact 2340
gtgcctccc tgccaccacc tcagtatttc tctccagccg tgatcttgcc gagccggacg 2400
cgtg                                     2404

```

10

```

<210> 59
<211> 6707
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> polyA_site
<222> (6707)

```

```

<400> 59
cccaagtttg gggaagacag gaactgcagc gccctcccc gtttcacgcc acgcgcggga 60
ccgaggacct aggacctggc cagctgggcg tggttcggag agccgggagg gaaaacgaaa 120
ccagaaatcc gaaggccgcg ccagagccct gttccccctt gcatctgcgc cgggaggcca 180
tggacttgta cagcaccocg gccgctgcgc tggacagggt cgtggccaga aagctgcagc 240
cgcggaagga gttcgtagag aaggcgcggc gcgctctggg cgcctggcc gctgctctga 300
gggagcgcgg gggccgcctc ggtgctgctg ccccggggt gctgaaaact gtcaaggag 360
gtcctcggg ccggggcaca gctctcaagg gtggtgtga ttctgaacti gtcattctc 420
tcgactgctt caagagctat gtggaccaga gggccgcgcg tgcagagatc ctcagtgaga 480
tgccggcatc gctggaatcc tgggtgcaga acccagtcct tgggtctgaga ctcacgtttc 540
ctgagcagag cgtgcctggg gccctgcagt tccgcctgac atccgtagat cttgaggact 600
ggatggatgt tagcctggtg cctgccttca atgtcctggg tcaggccggc tccggcgta 660
aaccacagcc acaagtctac tctaccctcc tcaacagtgg ctgccaaggg ggcgagcatg 720
cggcctgctt cacagagctg cggaggaaact ttgtgaacat tcgcccagcc aagttgaaga 780
acctaatctt gctggtgaag cactggtacc accagggtgtg cctacagggg ttgtggaagg 840
agacgtgcc cccggtctat gccctggaat tgcctgacct cttcgctgg gagcagggt 900
gtaagaagga tgctttcagc ctagccgaag gcctccgaac tgcctgggc ctgatccaac 960
agcatcagca cctgtgtgtt ttctggactg tcaactatgg cttcgaggac cctgcagttg 1020
ggcagttctt gcagcggcag cttagagac ccaggcctgt gatcctggac ccagctgacc 1080
ccacatggga cctggggaat ggggcagcct ggcaactgga ttgtctagcc caggaggcag 1140
catcctgcta tgaccacca tgctttctga ggggatggg ggaccagtg cagtcttgga 1200
aggggcgggg ccttcacgt gctggatgct caggtttggg ccaccccatc cagctagacc 1260
ctaaccagaa gaccctgaa aacagcaaga gcctcaatgc tgtgtacca agagcaggga 1320
gcaaacctcc ctcatgccc gctcctggcc ccactggggc agccagcate gtccctctg 1380
tgccgggaat ggccctggac ctgtctcaga tccccacca ggagctggac cgcttcatcc 1440
aggaccacct gaagccgagc cccagttcc aggagcaggt gaaaaaggcc atcgacatca 1500
tcttgcgctg cctccatgag aactgtgttc acaaggcctc aagagtcagt aaagggggct 1560
catttggcgg gggcacagac ctaagggatg gctgtgatgt tgaactcatc atcttctca 1620
actgcttcac ggactacaag gaccaggggc cccgcgcgc agagatcctt gatgagatgc 1680

```

20

30

40

gagcgacgt agaactcctgg tggcaggacc aggtgccag cctgagcett cagtttcttg 1740
 agcagaatgt gcctgagget ctgcagttcc agctgggtgtc cacagccctg aagagctgga 1800
 cggatgttag cctgctgcct gccttcgatg ctgtggggca gctcagttct ggcaccaaac 1860
 caaatcccca ggtctactca aggtccctca ccagtggctg ccaggagggc gagcataagg 1920
 cctgcttctgc agagctgcgg aggaacttca tgaacattcg cctgtcaag ctgaagaacc 1980
 tgattctgct ggtgaagcac tggtagcgcc aggttgccgc tcagaacaaa ggaaaaggac 2040
 cagcccctgc ctctctgccc ccagcctatg ccctggagct cctcaccatc tttgcctggg 2100
 agcagggctg caggcaggat tgtttcaaca tggcccaagg cttccggacg gtgctggggc 2160
 tcgtgcaaca gcatcagcag ctctgtgtct actggacggt caactatagc actgaggacc 2220
 cagccatgag aatgcacett cttggccagc ttcgaaaacc cagaccctg gtctctggacc 2280
 ccgctgatcc cacttggaac gtggccacg gtagctggga gctgttgcc caggaagcag 2340
 cagcgctggg gatgcaggcc tgccttctga gtagagacgg gacatctgtg cagccctggg 2400
 atgtgatgcc agccctcctt taccaaacc cagctgggga ccttgacaag ttcacagtg 2460
 aatttctcca gcccaaccgc cagttcctgg ccaggtgaa caaggccgtt gataccatct 2520
 gttcattttt gaaggaanaac tgcctccgga attctccat caaagtgtc aagtggtca 2580
 aggggtggctc ttcagccaaa ggcacagctc tgcgaggccg ctcagatgcc gacctcgtg 2640
 tgttctctag ctgcttcagc cagttcactg agcagggcaa caagcgggccc gagatcatct 2700
 ccgagatccg agcccagctg gaggcatgtc aacaggagcg gcagttcgag gtcaagtttg 2760
 aagtctccaa atggggagaat ccccgctgc tgagcttctc actgacatcc cagacgatgc 2820
 tggaccagag tgtggacttt gatgtgctgc cagcctttga cgccctagcc cagctggtct 2880
 ctggctccag gccagctct caagtctacg tcgacctcat ccacagctac agcaatgogg 2940
 gcgagtactc cactgcttc acagagctac aacgggactt catcatctct cgccctacca 3000
 agctgaagag cctgatccgg ctggtgaagc actggtacca gcagtgtacc aagatctcca 3060
 aggggagagg ctccctaccc ccacagcagc ggctggaact cctgactgtg tatgcctggg 3120
 agcagggccg gaaggactcc cagtcaaca tggctgaggc ctccgcacg gtctctggagc 3180
 tggtcaccca gtaccgccag ctctgtatct actggacct caactacaac gccaaaggaca 3240
 agactgttgg agacttctcg aaacagcagc ttcagaagcc caggccctatc atcctggatc 3300
 cggctgacct gacaggcaac ctgggccaca atgcccgtg ggacctgctg gccaaaggaa 3360
 ctgcagcctg cacatctgcc ctgtgctgca tgggacggaa tggcatcccc atccagccat 3420
 ggccagtga ggctgtgtg tgaagttgag aaaatcagcg gtctactgg atgaagagaa 3480
 gatggacacc agccctcagc atgaggaaat tcagggtccc ctaccagatg agagagattg 3540
 tgtacatgtg tgtgtgagca catgtgtgca tgtgtgtgca cacgtgtgca tgtgtgtgtt 3600
 ttagtgaatc tgctctccca gctcacacac tccctgcct cccatggctt acacactagg 3660
 atccagactc catggtttga caccagcctg cgtttgcagc ttctctgtca cttccatgac 3720
 tctatcctca taccaccact gctgcttccc acccagctga gaatgcccc tctccctga 3780
 ctctctctg cccatgcaaa ttagctcaca tcttctctc tgctgcaatc catcccttc 3840
 tccattggc ctctccttgc caaatctaaa tactttatat agggatggca gagagttccc 3900
 atctcatctg tcagccacag tcatttggtg ctggctacct ggagccttat cttctgaagg 3960
 gttttaaaga atggccaatt agctgagaag aattatctaa tcaattagt atgtctgcca 4020
 tggatgcagt agaggaaagt ggtggtacaa gtccatgat tgattagcaa tgtctgcaat 4080
 ggatatggaa aaaagaaggt gcttgaggt ttacagtgt tatgtgggct attgaagagc 4140
 cctctgagct cggttgctag caggagagca tgcccatatt ggcttacttt gtctgccaca 4200
 gacacagaca gagggagtgg ggacatgcat gctatgggga ccctcttggt ggacacctaa 4260
 ttggatgcct cttcatgaga ggctccctt tcttcacct ttatgctgca ctctccctc 4320
 agtttacaca tcttgatgct gtggctcagt ttgccttct gaatttttat tgggtccctg 4380
 tttctctcc taacatgctg agattctgca tccccacag ctaaactgag ccagtggcca 4440
 aacaaccgtg ctcagcctgt ttctctctgc cctctagagc aaggccacc aggtccatcc 4500
 aggaggctct cctgacctca agtccaacaa cagtgtccac actagtcagg gttcagccca 4560

10

20

30

40

gaaaacagaa agcactctag gaatcttagg cagaaaggga ttttatctaa atcactggaa 4620
 aggctggagg agcagaaggc agaggccacc actggactat tggtttcaat attagaccac 4680
 tgtagccgaa tcagaggcca gagagcagcc actgctactg ctaatgccac cactaccctt 4740
 gccatcactg ccccatatgg acaaaactgg agtcgagacc taggttagat tcttgcaacc 4800
 acaaacatcc atcagggatg gccagctgcc agagctgcgg gaagacggat cccacctccc 4860
 tttcttagca gaatctaaat tacagccaga cctctggctg cagaggagtc tgagacatgt 4920
 atgattgaat gggtgccaag tgccaggggg cggagtcccc agcagatgca tcttgccat 4980
 ctgttgctg gatgaggagg tgggtctatc tcagagggaag gaacaggaaa caaagaaagg 5040
 aagccactga acatcccttc tctgctccac aggagtgtct tagacagcct gactctccac 5100
 aaaccactgt taaaacttac ctgctaggaa tgctagattg aatgggatgg gaagagcctt 5160
 cctcattat tgtcattctt ggagagaggt gagcaacca gggaaagctc tctgattcac 5220
 ctagaacctg ttctctgccc tctttggctc agcctacaga gactagagta ggtgaaggga 5280
 cagaggacag ggcttctaat acctgtgcca tattgacagc ctccatccct gtccccatc 5340
 ttgggtgctga accaacgcta agggcacctt cttagactca cctcatcgat actgcctggt 5400
 aatccaaagc tagaactctc aggaccccaa actccacctc ttggattggc cctggctgct 5460
 gccacacaca tatccaagag ctcagggcca gttctgggtg gcagcagaga cctgctctgc 5520
 caagttgtcc agcagcagag tggccctggc ctgggcatca caagccagtg atgctcctgg 5580
 gaagaccagg tggcaggctg cagttgggta ccttccattc ccaccacaca gactctgggc 5640
 ctccccgcaa aatggctcca gaattagagt aattatgaga tgggtgggaac cagagcaact 5700
 caggtgcatg atacaaggag aggttgtcat ctgggtaggg cagagaggag ggcttgcctc 5760
 tctgaacagg ggtgtatttc attccaggcc ctcagtcttt ggcaatggcc accctgggtg 5820
 tggcatattg gccccactgt aacttttggg ggcttcccgg tctagccaca cctcggatg 5880
 gaaagacttg actgcataaa gatgtcagtt ctccctgagt tgattgatag gcttaatggt 5940
 caccctaaaa acaccacat atgcttttgc atggaaccag ataagttgac gctaaagtgc 6000
 ttatggaaaa atacacacgc aatagctagg aaaacacagg gaaagaagag ttctgagcag 6060
 ggcttagtct tagccaatat taaaacatac tatgaagcct ctgatactta aacagcatgg 6120
 cgctggtagc taaatagacc aatgcagtta ggtggctctt tccaagactc tggggaaaaa 6180
 agtagtaaaa agctaaatgc aatcaatcag caattgaaag ctaagtgaga gagccagagg 6240
 gcctccttgg tggtaaaaga gggttgcatt tottgccagc agaaggcaga gaaagtgaag 6300
 accaagtcca gaactgaatc ctaagaaatg caggactgca aagaaattgg tgtgtgtgtg 6360
 tgtgtgtgtg tgtttaattt ttaaaaagtt ttatttgaga tacaagtcaa taccataaag 6420
 ctctcaccct tctaaagtgt acaattcagt ggtgtgagta tattcataag atttatactt 6480
 ggtgtctatt cataagactt atatccagca tattcataac tagagccata tcacagatgc 6540
 attcatcata ataattccag acattttcat caccctaaaa ggaaaccctg aaaccatta 6600
 gcagtcattc cccattcctc caaccattc totoccta atccatagaac caccaatctg 6660
 ctgtgtatatt catctattgc caacatttca tataaatggc atcatac 6707

10

20

30

<210> 60
 <211> 769
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <221> polyA_site
 <222> (769)

<400> 60

gcgtcaagaa cttcatcctg gcagccgacg tcatgaagag catttcgctg ctgcgctacc 60
 aggaggaaag caagacgctg agcctggtgt cgcgggatgc caagcccctg gaggtgtaca 120
 gcgtggactt catggtggac aatgcccagc tgggttttct ggtgtctgac cgcgaccgca 180
 acctcatggt gtacatgtac ctgcccgaag ccaaggagag tttcgggggc atgcgcctgc 240
 tgcgtcgggc agacttccac gtgggtgccc acgtgaacac gttctggagg acccctgccc 300
 gggggggccac tgaagggtc agcaaaaagt cggctgtgtg ggagaataag cacatcacgt 360
 ggtttgccac cctggacggc ggcatcgggc tgcctgtgcc catgcaggag aagacctacc 420
 ggcggctgct gatgctgcag aacgcgtga ccaccatgct gccacaccac gccggcctca 480
 acccccgcgc ctcccgatg ctgcacgtgg accgcgcac cctccagaat gccgtgcgca 540
 acgtgctgga tggggagctg ctcaaccgct acctgtacct gagcaccatg gagcgcagcg 600
 agctagccaa gaagatcggc accacaccag acataatcct ggacgacttg ctggagacgg 660
 accgcgtcac cgcaccttc tagccccgtg gatccgtca ccaccagcac acggaactac 720
 ctcccacccc cttttgtac aaaacacaag gaaaaacatt ttttgcttg 769

10

<210> 61

<211> 2039

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> polyA_site

<222> (2039)

<400> 61

gagggccaca gtgggattaa aaagaccact gaggagcagg tgcaggccag cactccttgc 60
 ccgaggacag agatggcgag cgcgccgatt ggggatgagt atgcggagga cagctctgat 120
 gagggaggaca tccggaacac ggtgggcaac gtgcccttgg agtggtacga tgacttcccc 180
 cactgtgggt acgacctgga tggcaggcgc atctacaagc ccctgcggac ccgggatgag 240
 ctggaccagt tcttgacaa gatggacgat cctgactact ggccgaccgt gcaggacccg 300
 atgacagggc gggacctgag actgacgat gacgaggtgg ccctggtgcg gcgctgcag 360
 agtggccagt ttggggatgt gggcttcaac ccctatgagc cggctgtcga cttcttcagc 420
 ggggacgtca tgatccaccc ggtgaccaac cgcgcggccg acaagcgcag cttcatcccc 480
 tccctggtgg agaaggagaa ggtctctcgc atggtgcacg ccatcaagat gggctggatc 540
 cagcctcgcc ggccccgaga cccaccccc agcttctatg acctgtgggc ccaggaggac 600
 cccaacgcgc tgctcgggag ccacaagatg caagtacctg ctccaagct ggccctgcca 660
 ggccacgcgc agtcgtacaa cccacccct gaatacctgc tcagcgagga ggagcgttg 720
 gcgtgggaac agcaggagcc aggcgagagg aagctgagct ttttgccacg caagtcccc 780
 agcctgcggc cgtgcctgc ctacggagc ttcattccagg aacgcttcga gcgtgcctt 840
 gacctgtacc tgtgccacg gcagcgcaag atgagggtga atgtagacc tgaggacctc 900
 atccccaagc tgcctcgcc gagggacctg cagccctcc ccacgtgcca ggccctggtc 960
 tacaggggac acagtacct tgtccggtgc ctacgtgtct ctcctggggg ccagtggctg 1020
 gtttcaggct ctgacgacgg ctccctgcgg ctctgggagg tggccactgc ccgtgtgtg 1080
 aggactgttc ccgtgggggg cgtggtgaag agtgtggcct ggaacccag ccccgctgtc 1140
 tgctggtggt ctgcagccgt ggaggactcg gtctgtctgc tgaacccagc tctgggggac 1200
 cggctggtgg cgggcagcac agatcagctg ttgagcgcct tcgtcccgcc tgaggagccc 1260
 cccttgacgc cggcccgtg gctggaggcc tcagaggagg agcgccaagt gggcctgcgg 1320
 ctgcgcacct gccacgggaa gccagtgcg caggtgacct ggcacgggag tggggactac 1380

30

40

ctggccgtgg tgctggccac ccaaggccac acccaggtgc tgattcacca gctgagccgt 1440
 cgccgcagcc agagtccgtt ccgcccagc caccgacagg tgcagcgagt ggccttcac 1500
 cctgcccgcc ccttcctgtt ggtggcgtec cagcgcagcg tccgccteta ccacctgctg 1560
 cgccaggagc tcaccaagaa gctgatgccc aactgcaagt ggggtgtccag cctggcggtg 1620
 caccctgcag gtgacaacgt catctgtggg agctacgata gcaagctggt gtggtttgac 1680
 ctggatcttt ccaccaagcc atacaggatg ctgagacacc acaagaaggc tctgcgggct 1740
 gtggccttcc acccgcggtg cccactcttt gcgtcaggct cggacgacgg cagtgtcatc 1800
 gtctgccatg gcatggtgta caatgacctt ctgcagaacc ccttgctggt gcccgtaag 1860
 gtgctgaagg gacacgtgct gacccgagat ctgggagtg tggacgtcat cttccacccc 1920
 acccagccgt gggctcttct ctcgggggca gacgggactg tccgcctctt cactagctg 1980
 ttctgcctgc ctggggctgg ggtggtcgtg ctgaagtcaa cagagccttt acctgtgc 2039

10

<210> 62

<211> 1822

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> polyA_site

<222> (1822)

20

<400> 62

cggcctgcag ctgcgaggcg ccgcgtagcc gtccgccaccg ccgccagccc gtgcgcccctc 60
 ggcggtaccc gccgcgctcc catccccgcc gccggccagg ggcgcgctcg gccgccccgg 120
 acagtgtccc gctgcggctc cgcgcgatg gccaccaaga tcgacaaaga ggcttgccgg 180
 gcggcggtaca acctggtgcg cgacgacggc tcggccgtca tctgggtgac ttttaaatat 240
 gacggtcca ccatcgctcc cggcgagcag ggagcggagt accagcactt catccagcag 300
 tgcacagatg acgtccggtt gtttgccctt gtgcgcttca ccaccgggga tgccatgagc 360
 aagaggtcca agtttgccct catcacgtgg atcgggtgaga acgtcagcgg gctgcagcgc 420
 gccaaaaccg ggacggacaa gacctggtg aaggaggtcg tacagaattt cgctaaggag 480
 tttgtgatca gtgatcggaa ggagctggag gaagatttca tcaagagcga gctgaagaag 540
 gcgggggggag ccaattacga cggccagacg gagtaacccc agccccgcc acaccacccc 600
 ttgccaaagt catctgctg ctccccggg gagaggaccg ccggcctcag ctactagccc 660
 accagccac cagggagaag agaagccatg agaggcagcg ccgccaccc tgtgtccaca 720
 gccccacct tcccgttcc cttagaaccc tgccgtgtcc tatctcatga cgtcatgga 780
 acctctttct ttgatcttct tttctttt tccccctctt ttttgttcta aagaaaagtc 840
 attttgatgc aaggtcctgc ctgccatcag atccgaggtg cctcctgcag tgacctctt 900
 tcttggtatt tctcttcac gcgacgaggt ctgcctagt agatctgcat gacctcacgt 960
 tgctttccag agccccggc tattttgcca tctcagttt cctgggccct gcttctgtg 1020
 taccactgag gggcagctgg gccaggagct gtgcccgtg cctgcagcct tcataagcac 1080
 acacgtccat tccctactaa ggcccagacc tctgtgtatc tgccccgggc tccctcatcc 1140
 cactccatc cggagttgcc caagatgcat gtccagcata ggcaggattg ctcggtggtg 1200
 agaaggtag gtccggtcga gactgaataa gaagagataa aatttgctt aaaacttacc 1260
 tggcagtggc tttgctgcac ggtctgaaac cactgttcc caccctctg accgaaattt 1320
 ccttgtaga cagagaaggg caaaggtctt gagcccagag ttgacggagg gagtatttca 1380
 gggttcactt caggggctcc caaagcgaca agatcgtag ggagagaggc ccagggtggg 1440
 gactgggaat ttaaggagag ctgggaacgg atcccttagg ttcaggaagc ttctgtgcaa 1500

30

40

```

gctgcgagga tggcttgggc cgaagggttg ctctgccgc cgcgctagct gtgagctgag 1560
caaagccctg ggctcacage accccaaaag cctgtggctt cagtcctgcg tctgcaccac 1620
acaatcaaaa ggatcgtttt gttttgtttt taaagaaagg tgagattggc ttggttcttc 1680
atgagcacat ttgatatagc tctttttctg tttttccttg ctcatttcgt tttggggaag 1740
aaatctgtac tgtattggga ttgtaaagaa catctctgca ctcagacagt ttacagaaat 1800
aaatgttttt tttgtttt ag 1822

```

【図面の簡単な説明】

図1は、OK-CTLp (HLA-A0207/A3101) がHLA-A2拘束性に腫瘍細胞を溶解することを示す。

10

図2は、OK-CTLpによるヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1の認識とその結果としてのインターフェロン γ 産生が、HLA-A2拘束性であることを示す。

図3は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得たcDNAクローン1~6〔図中(A)〕およびクローン7〔図中(B)〕をそれぞれHLA-A2と共に発現させたCOS7細胞を、HLA-A2拘束性にOK-CTLpが認識することを示す。

図4は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得たcDNAクローン1~6が、用量依存的にOK-CTLpに認識されることを示す。図中、(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、および(F)はそれぞれ、UBE2V、HNRPL、WHSC2、EIF4EBP1、ppMAPkkk、および2-5 OAS3と高い相同性を有するcDNAクローン1~6をそれぞれHLA-A2と共に発現させたCOS7細胞を、HLA-A2拘束性にOK-CTLpが認識することを示す。また、図中の記号■は上記各腫瘍抗原遺伝子と共にHLA-A0207遺伝子を標的細胞で発現させたときのOK-CTLpにより産生されたインターフェロン γ 量を示し、◇は上記各腫瘍抗原遺伝子と共にHLA-A240遺伝子を標的細胞に発現させたときのOK-CTLpにより産生されたインターフェロン γ 量を示す。

20

図5は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得たUBE2Vと高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子1の遺伝子産物に由来する5つのペプチドを、OK-CTLpまたはOK-CTLクローンが認識することを示す。

図6は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得たHNRPLと高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子2の遺伝子産物に由来する4つのペプチドを、OK-CTLpまたはOK-CTLクローンが認識することを示す。

30

図7は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得たWHSC2と高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子3の遺伝子産物に由来する4つのペプチドを、OK-CTLpまたはOK-CTLクローンが認識することを示す。

図8は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得たEIF4EBP1と高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子4の遺伝子産物に由来する2つのペプチドを、OK-CTLpまたはOK-CTLクローンが認識することを示す。

図9は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得たppMAPkkkと高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子5の遺伝子産物に由来する3つのペプチドを、OK-CTLpまたはOK-CTLクローンが認識することを示す。

40

図10は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得た2-5 OAS3と高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子6の遺伝子産物に由来する1つのペプチドを、OK-CTLpまたはOK-CTLクローンが認識することを示す。

図11は、ヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1から得た腫瘍抗原遺伝子産物由来の腫瘍抗原ペプチドが用量依存的にOK-CTLクローンに認識されることを、代表的なペプチドについて示した図である。図中、(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、および(F)はそれぞれ、UBE2V、HNRPL、WHSC2、EIF4EBP1、ppMAPkkk、および2-5 OAS3と高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子1~6の遺伝子産物由来のペプチドがOK-CTLpに認識されることを示す。

図12は、UBE2Vと高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子1の遺伝子産物に由来する3

50

つのペプチドが、HLA-A2⁺腫瘍細胞に対する細胞傷害性を有するCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。図中の記号—■—はヒト膵臓腺癌細胞株Panc-1 (HLA-A0201/1101)を、—◆—はヒト大腸腺癌細胞株SW620 (HLA-A0201/2402)を、—○—はHLA-A2⁻肺腺癌細胞株REF-LC-MS (HLA-A1101/1101)を、—△—はEBV形質転換自己B細胞 (HLA-A0207/3101)を、—□—はPHA芽球化自己T細胞 (HLA-A0207/3101)を示す。これらの記号の説明は、下記図13から図17の説明に援用される。

図13は、HNRP Lと高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子2の遺伝子産物に由来する2つのペプチドが、HLA-A2⁺腫瘍細胞に対する細胞傷害性を有するCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。

10

図14は、WHSC2と高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子3の遺伝子産物に由来する2つのペプチドが、HLA-A2⁺腫瘍細胞に対する細胞傷害性を有するCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。

図15は、EIF4EBP1と高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子4の遺伝子産物に由来する2つのペプチドが、HLA-A2⁺腫瘍細胞に対する細胞傷害性を有するCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。

図16は、ppMAPkkkと高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子5の遺伝子産物に由来する1つのペプチドが、HLA-A2⁺腫瘍細胞に対する細胞傷害性を有するCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。

20

図17は、2-5 OAS3と高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子6の遺伝子産物に由来する1つのペプチドが、HLA-A2⁺腫瘍細胞に対する細胞傷害性を有するCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。

図18は、腫瘍抗原ペプチドが、HLA-A2拘束性に且つペプチド用量依存的に細胞傷害活性を示すCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。図中、(A)、(B)、(C)、(D)、および(E)はそれぞれ、UBE2V、HNRP L、WHSC2、EIF4EBP1、およびppMAPkkkと高い相同性を有する腫瘍抗原遺伝子1~6の遺伝子産物由来のペプチドが癌患者末梢血単核細胞からHLA-A2拘束性に該ペプチドを認識するCTLを誘導することを示す。図中の記号—■—は腫瘍抗原ペプチドを発現させたT2細胞、—◇—はPHA芽球化自己T細胞を示す。

30

図19は、ヒト膵臓腺癌細胞株CFPAC-1から得た腫瘍抗原遺伝子KM-PA-2〔図中(A)〕およびKM-PA-4〔図中(B)〕の遺伝子産物が、HLA-A2拘束性にOK-CTLにより認識されることを示す。

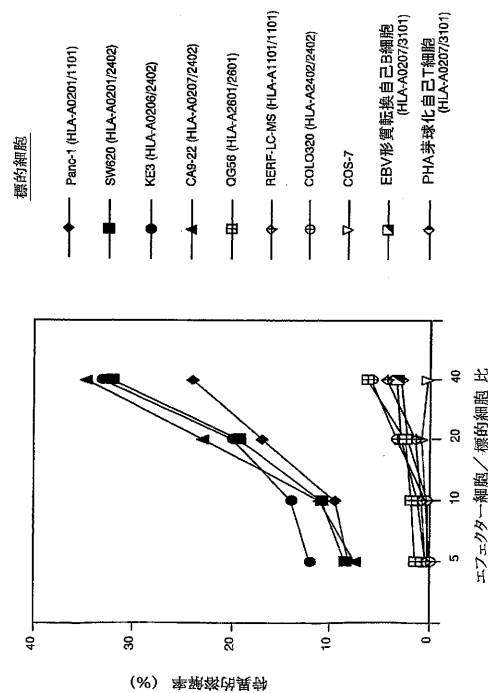
図20は、ヒト膵臓腺癌細胞株CFPAC-1から得た腫瘍抗原遺伝子KM-PA-2およびKM-PA-4由来のペプチド〔図中それぞれ(A)および(B)〕が、該PBM Cの刺激に用いたペプチドに対応するペプチドをパルスしたT2細胞〔図中(A)および(B)ともに左側の図〕およびHLA-A2⁺腫瘍細胞Panc-1〔図中(A)および(B)ともに右側の図〕に対する細胞傷害性を有するCTLを、癌患者末梢血単核細胞から誘導し得ることを示す。

図21は、ヒト膵臓腺癌細胞株CFPAC-1から得た腫瘍抗原遺伝子KM-PA-2由来のペプチドにより癌患者末梢血単核細胞から誘導されたCTLが、HLA-A2拘束性に腫瘍細胞を溶解することを示す。

40

【図 1】

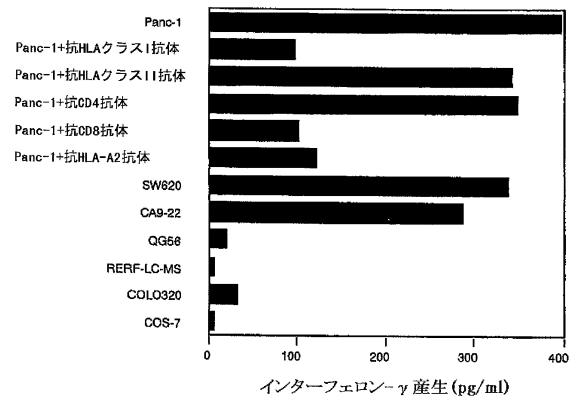
図 1



【図 2】

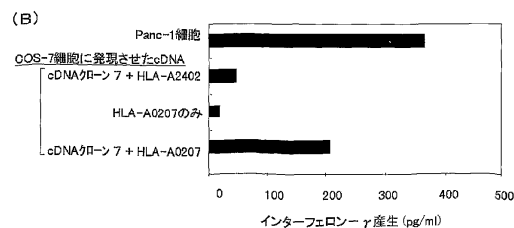
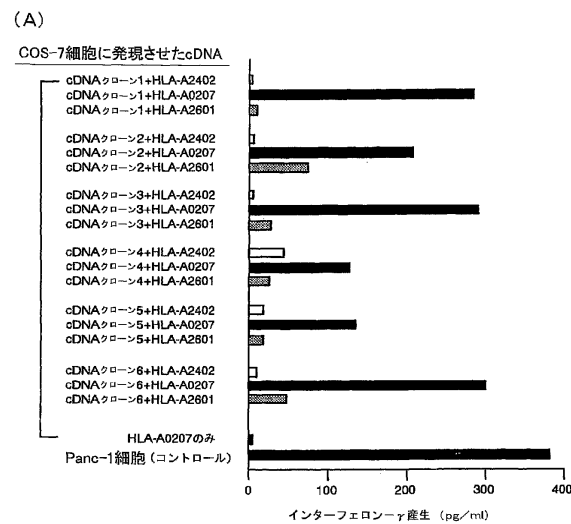
図 2

刺激細胞



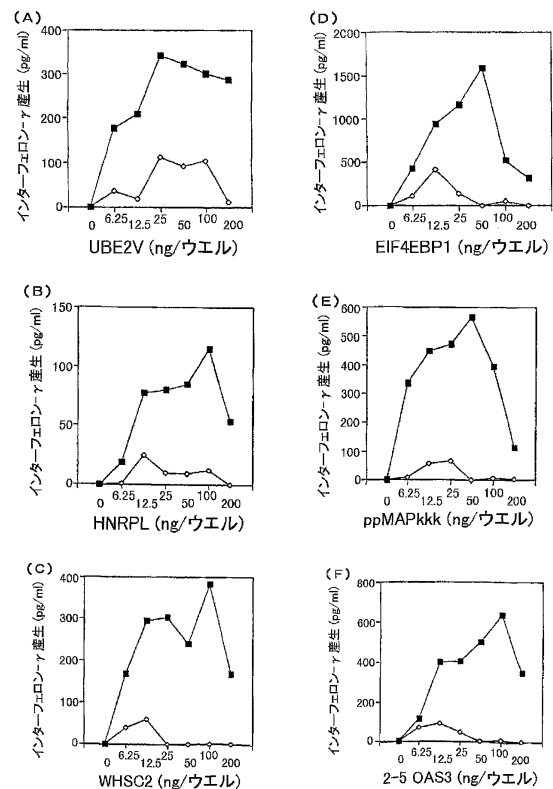
【図 3】

図 3



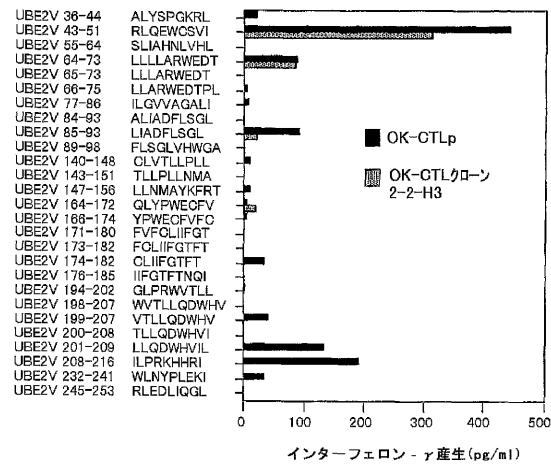
【図 4】

図 4



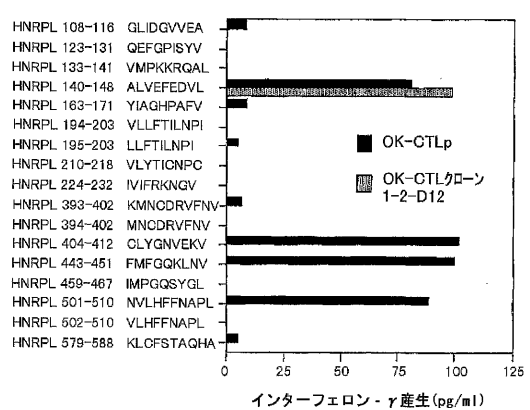
【図 5】

☒ 5



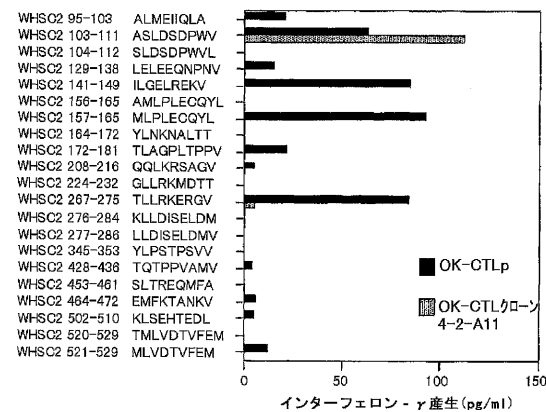
【図 6】

☒ 6



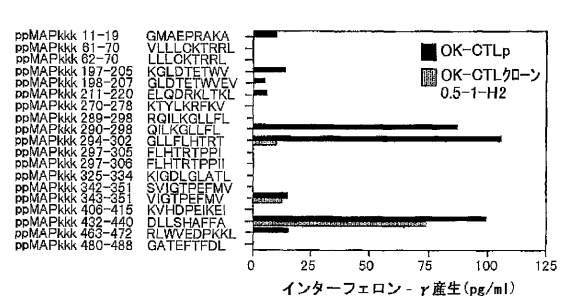
【圖 7】

図 7



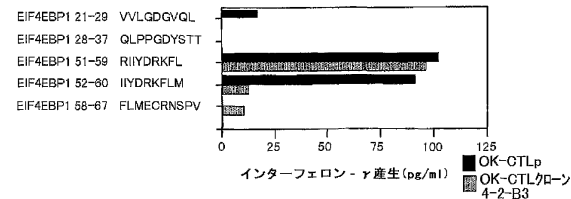
【図 9】

图 9



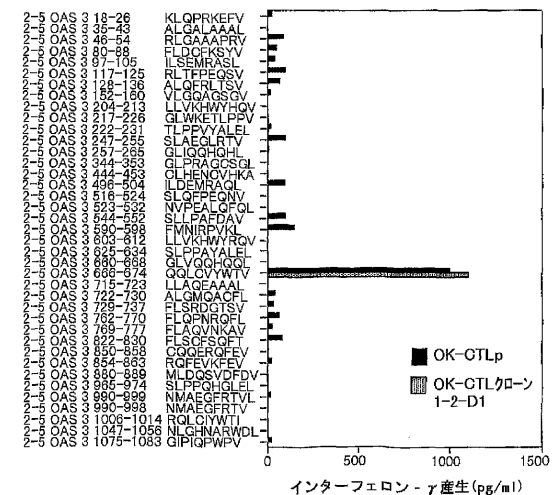
【図 8】

图 8



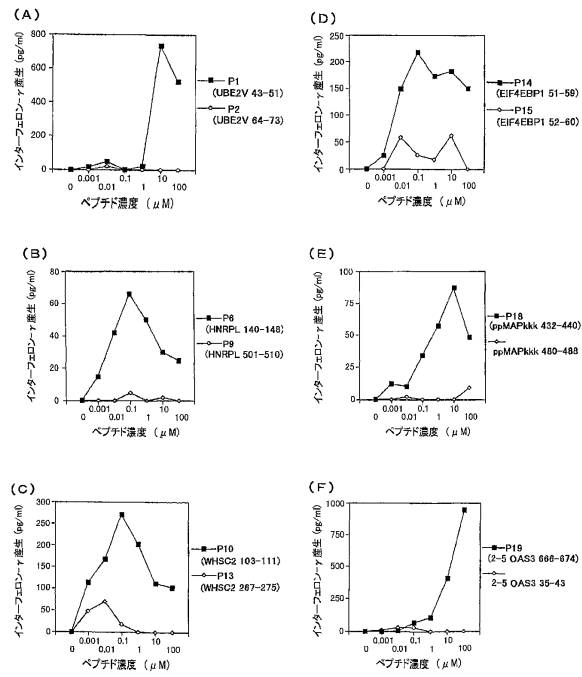
【図 10】

☒ 10



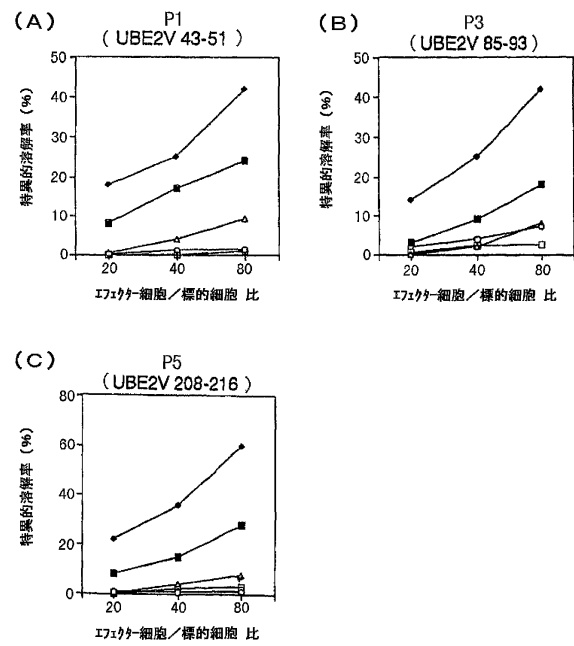
【図 1 1】

図 1 1



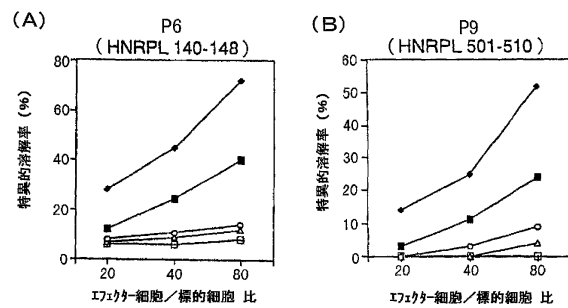
【図 1 2】

図 1 2



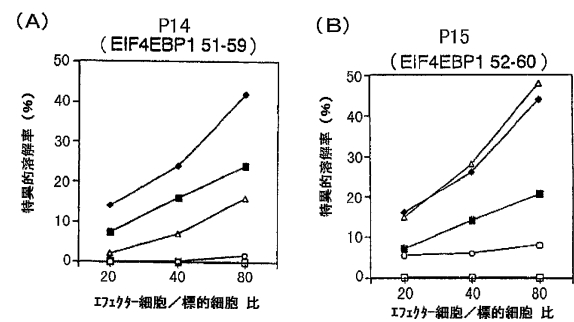
【図 1 3】

図 1 3



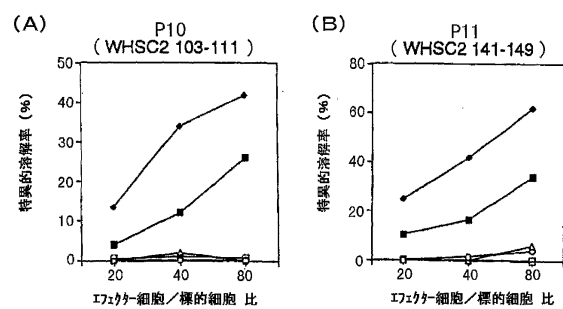
【図 1 5】

図 1 5



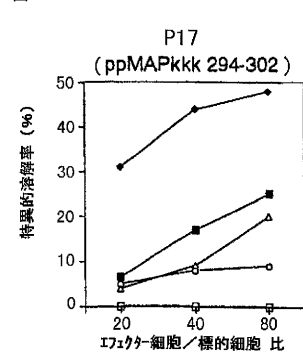
【図 1 4】

図 1 4



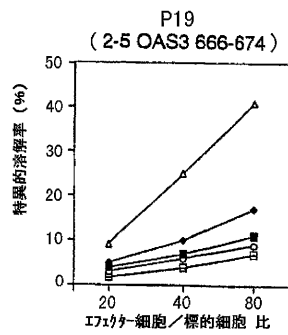
【図 1 6】

図 1 6



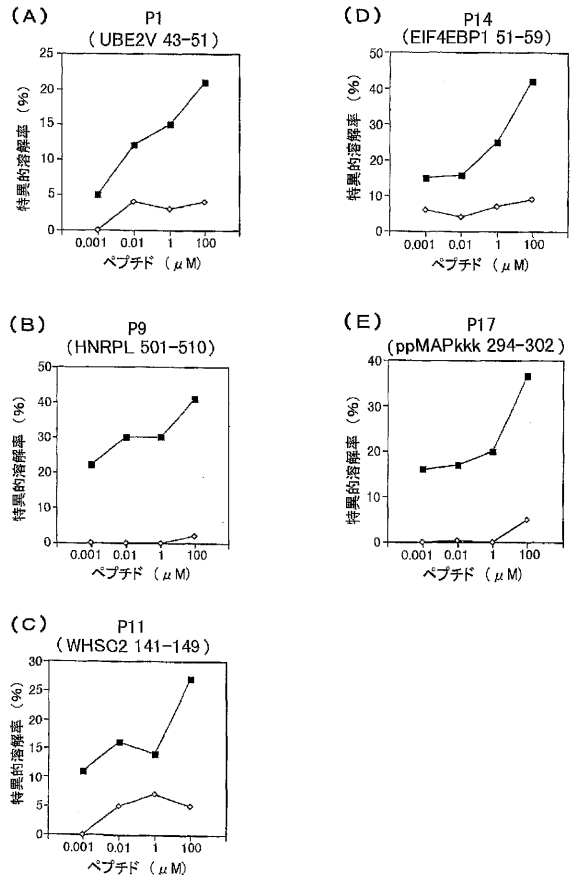
【図 17】

図 17



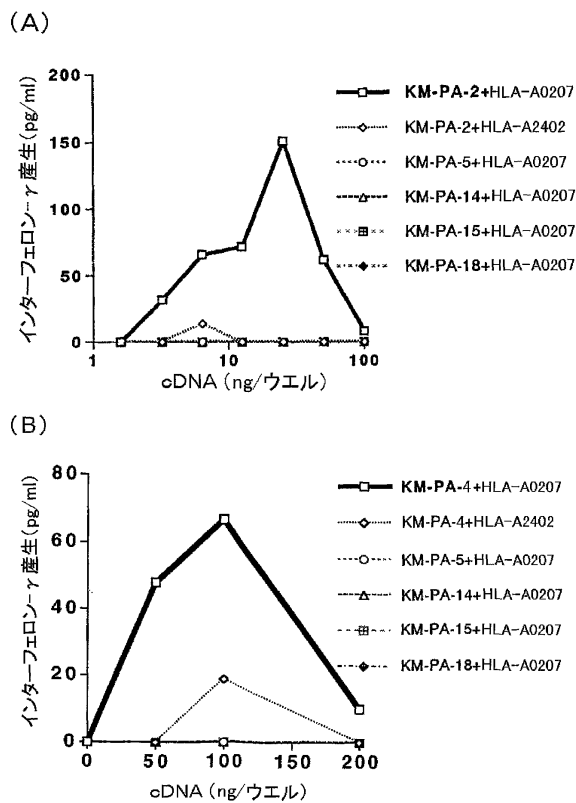
【図 18】

図 18



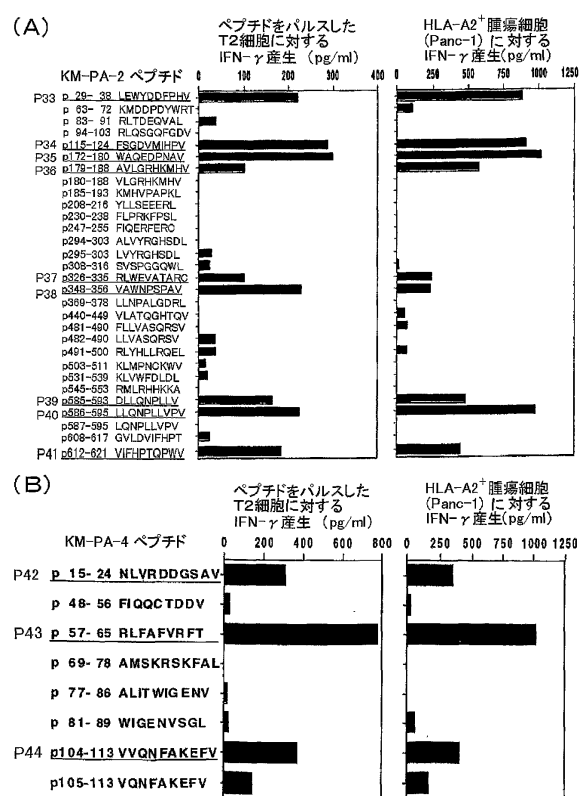
【図 19】

図 19

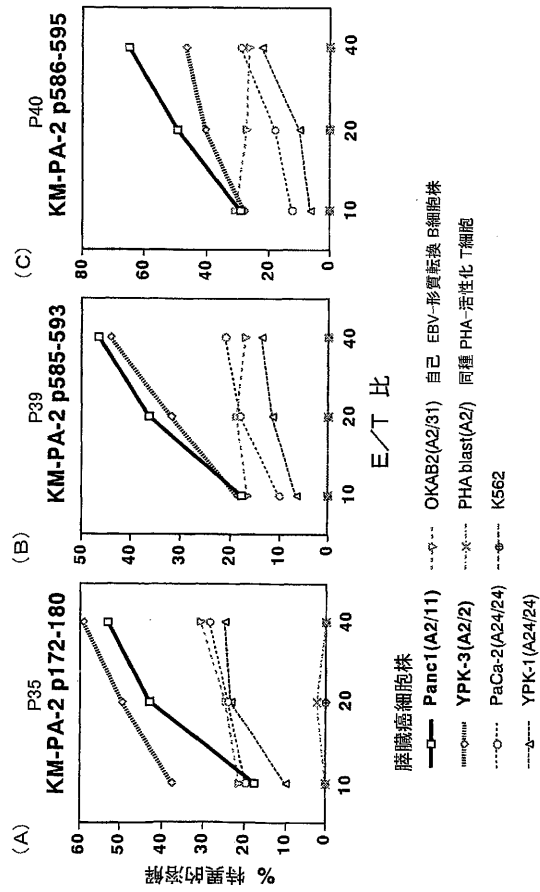


【図 20】

図 20



【図 2 1】
図 2 1



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)		A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/18	
C 0 7 K 14/82 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/32 (2006.01)		C 0 7 K 14/82	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 0 7 K 16/32	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	1 0 2
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M
A 6 1 K 35/56 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
A 6 1 K 35/66 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 K 35/76 (2006.01)		A 6 1 K 35/56	
		A 6 1 K 35/66	
		A 6 1 K 35/76	

- (56)参考文献 米国特許第0 5 8 7 4 2 3 1 (U S, A)
 国際公開第9 7 / 0 2 1 8 0 7 (W O, A 1)
 特開2 0 0 0 - 1 8 9 1 6 8 (J P, A)
 J. Cell Biol., 1 9 8 9 年, Vol.109, p.2575-2587
 GENES & DEVELOPMENT, 1 9 9 5 年, Vol.9, p.2672-2683
 Nagase T. et al., Definition: Hypothetical Protein KIAA0124, Database DDBJ/EMBL/GenBank [Online], 1 9 9 8 年 7 月1 5 日, Accession No. Q14137, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2494911?sat=old02&satkey=1353410>>

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C12N 15/00-15/90
 C07K 14/00-16/46
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 UniProt/GeneSeq
 医学・薬学予稿集全文データベース

专利名称(译)	肿瘤抗原		
公开(公告)号	JP4900884B2	公开(公告)日	2012-03-21
申请号	JP2002516288	申请日	2001-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	伊东恭悟		
申请(专利权)人(译)	伊藤KyoSatoru		
当前申请(专利权)人(译)	有限公司GreenPeptide		
[标]发明人	伊東恭悟		
发明人	伊東 恭悟		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/12 C12N5/0783 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 A61K35/56 A61K35/66 A61K35/76 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/47 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/53 A61P1/00 A61P1/18 C07K14/47 C07K14/4748		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA A61K31/7088 A61K35/12 C12N5/00.202.L A61K39/00.H A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.102 A61K37/02 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A A61K35/56 A61K35/66 A61K35/76		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	2000231814 2000-07-31 JP		
其他公开文献	JPWO2002010369A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

肿瘤抗原诱导和/或激活HLA-A2限制性肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞，其通过识别HLA-A2和肿瘤抗原肽，衍生自肿瘤抗原的肽或多肽，编码肽的多核苷酸或a激活而被激活。在其互补链多核苷酸中，提供了包含含有多核苷酸的重组载体的转化体。

遺伝子		遺伝子がコードする ポリペプチド		相同性の高い遺伝子		
	塩基長 (bp) [DDBJ アクセッション 番号]	配列 番号		アミノ 酸 長	配列 番号	[GenBank アクセッション番号]
1	1775 [AB044550]	54	PP 1	270	45	ubiquitin-conjugated enzyme variant Kua (U922V) [AF155120]
2	2097 [AB044547]	55	PP 2	589	46	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRPL) [NM001533]
3	2243 [AB044549]	56	PP 3	549	47	Wolf-Hirschhorn Syndrome candidate 2 protein (WHSC2) [AK001304]
4	831 [AB044548]	57	PP 4	118	48	eIF-4E-binding protein 1 (EIF4EBF1) [XM004095]
5	2404 [AB044546]	58	PP 5	779	49	partial putative mitogen activated protein kinase kinase kinase (ppMAPKkk) [AJ242724]
6	6707 [AB044545]	59	PP 6	1087	50	2',5'-oligoadenylate synthetase 3 (2-5 OAS3) [NM006187]
7	769 [AB046744]	60	PP 7	216	51	cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) [U37012]
KM-PA-2	2039 [AB060694]	61	PP KM-PA-2	634	52	KIAA0124 gene [D50914] human homologue of mouse block of proliferation 1(Bop1) [BC005160]
KM-PA-4	1822	62	PP KM-PA-4	142	53	coactosin-like protein (CLP) [L54057]