

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480012666.3

[51] Int. Cl.

C07K 16/32 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月7日

[11] 公开号 CN 1784426A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[22] 申请日 2004.3.9

[21] 申请号 200480012666.3

[30] 优先权

[32] 2003.3.10 [33] JP [31] 063648/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/003048 2004.3.9

[87] 国际公布 WO2004/081050 日 2004.9.23

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.10

[71] 申请人 三共株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 市川公久 高桥秀 我妻利纪

福地圭介 平井岳大

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 王景朝

权利要求书 3 页 说明书 59 页 序列表 9 页
附图 5 页

[54] 发明名称

以癌特异性抗原为靶的抗体

[57] 摘要

本发明涉及使用癌基因的癌检测方法、癌症治疗药和/或具有预防效果的化合物的筛选方法、以及癌症治疗药和/或预防用药物组合物。即本发明提供以人 *oculospanin* 基因的表达为指标的癌的检测方法, 以及含有特异性识别人 *oculospanin* 基因、对于癌细胞具有细胞毒活性的抗体的药物组合物。

1. 抗体，该抗体与人 **oculospanin** 特异性结合，对于表达该蛋白质的细胞具有细胞毒活性。

2. 抗体，该抗体与含有序列表中 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质和/或含有序列表中 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质特异性结合，对于表达该蛋白质的细胞具有细胞毒活性。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体，其特征在于：细胞毒活性为抗体依赖性细胞毒活性。

4. 权利要求 1 或 2 的抗体，其特征在于：细胞毒活性为补体依赖性细胞毒活性。

5. 权利要求 1 或 2 的抗体，其特征在于：细胞毒活性为补体依赖性细胞介导细胞毒活性。

6. 权利要求 1 或 2 的抗体，其特征在于：细胞毒活性为诱导编程性细胞死亡。

7. 权利要求 1-6 中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为单克隆抗体。

8. 权利要求 7 的抗体，其特征在于：所述抗体由小鼠杂交瘤 O3B8-2C9-4F3 (FERM BP-08627) 生产。

9. 权利要求 1-8 中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为人源化抗体。

10. 权利要求 1-7 中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为完全人抗体。

11. 权利要求 1-10 中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为 IgG 抗体。

12. 癌的检测方法，该方法包含下述步骤 1)-4)：

1) 由受试者采集检体，由该检体提取总 RNA 组分的步骤、

2) 由正常人采集检体，由该检体提取总 RNA 组分的步骤、

3) 测定来自上述步骤 1) 的总 RNA 组分和来自上述步骤 2) 的总 RNA 组分中的下述 a) 或 b) 中任一项的多核苷酸表达量的步骤：

a) 含有含序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸，

b) 与含有与上述 a) 的多核苷酸互补的核苷酸序列的多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸、

4) 分析由上述步骤 3)测定来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分的多核苷酸表达量的差异, 检测上述步骤 1)的受试者的癌的步骤。

13. 癌的检测方法, 该方法包含下述步骤 1)-3):

5 1) 测定由受试者采集的检体中含有序列表 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质和/或含有序列表中 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质的表达量的步骤、

2) 测定由正常人采集的检体中至少任意一种上述步骤 1)所述的蛋白质的表达量的步骤、

10 3) 分析由上述步骤 1)检测的蛋白质的表达量与由上述步骤 2)测定的该蛋白质的表达量的差异, 检测受试者的癌的步骤。

14. 权利要求 12 或 13 中任一项的方法, 其特征在于: 所述癌为皮肤癌。

15 15. 权利要求 12 或 13 中任一项的方法, 其特征在于: 所述癌为黑素瘤。

16. 权利要求 12、14 和 15 中任一项的方法, 其特征在于: 测定多核苷酸的表达量的方法为 RNA 印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法、RT-PCR、RNA 酶保护测定或连缀测定。

20 17. 权利要求 12、14 和 15 中任一项的方法, 其特征在于: 测定多核苷酸的表达量的方法是使用通过含有来自检体的互补的 DNA 群或该 DNA 群各 DNA 的部分序列的 DNA 制备的基因芯片或阵列。

18. 权利要求 13-15 中任一项的方法, 其特征在于: 蛋白质表达量的测定方法是使用与该蛋白质特异性结合的抗体或配体。

25 19. 权利要求 13-15 中任一项的方法, 其特征在于: 蛋白质表达量的测定方法为蛋白质印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法或固相化酶联免疫定量法(ELISA 法)。

20. 癌检测试剂盒, 该癌检测试剂盒包含选自下述 1)-3)的至少一种或以上:

30 1) 用于特异性扩增含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸的 15-30 个碱基长度的连续的寡核苷酸引物、

2) 用于与含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸在严谨条件下杂交、并检测该多核苷酸的 15 个核苷酸或以上的

连续的多核苷酸探针、

3) 固定有含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸的固相化试样。

21. 癌检测试剂盒, 该癌检测试剂盒包含下述 1)和 2)的至少一种:

5 1) 与含有序列表 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质和/或含有序列表中 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质特异性结合, 用于检测该蛋白质的抗体、

2) 可与上述 1)的抗体结合的二次抗体。

22. 权利要求 20 或 21 的试剂盒, 其特征在于: 所述癌为皮肤癌。

10 23. 权利要求 20 或 21 的试剂盒, 其特征在于: 所述癌为黑素瘤。

24. 癌症治疗用药物组合物, 其特征在于: 该组合物含有权利要求 1-11 的抗体的至少任意一种。

15 25. 癌症治疗用药物组合物, 该组合物包括具有与序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列或与该序列的部分序列互补的核苷酸序列的寡核苷酸。

26. 权利要求 24 或 25 中任一项的药物组合物, 其特征在于: 所述癌为皮肤癌。

27. 权利要求 24 或 25 中任一项的药物组合物, 其特征在于: 所述癌为黑素瘤。

20

以癌特异性抗原为靶的抗体

技术领域

- 5 本发明涉及可用于癌症治疗的抗体、特征为含有该抗体作为有效成分的癌症治疗用药物组合物、癌的检测方法、癌检测试剂盒。

背景技术

10 已知肿瘤细胞根据细胞的种类而表达特有的抗原蛋白质(以下可称为肿瘤相关抗原)。因此,人们尝试研究以该肿瘤相关抗原为靶,开发针对肿瘤的新型治疗方法。已知对于肿瘤相关抗原显示特异性抗原-抗体反应的单克隆抗体可以诱导各种机体免疫反应(抗体依赖性细胞介导细胞毒活性(ADCC)、补体依赖性细胞毒活性(CDC)等),攻击癌细胞,诱导细胞死亡,因此,能够开发出对肿瘤治疗有用的单克隆抗体。

15 但是,已知对肿瘤的治疗有效的单克隆抗体仅限于转移性乳癌、急性骨髓性白血病、难治性慢性淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤等几种肿瘤,人们希望获得可用于其它肿瘤的治疗的单克隆抗体。

20 为了获得对肿瘤的治疗有效的单克隆抗体,通过对在肿瘤细胞中特异性表达的蛋白质进行鉴定,获得以该蛋白质为抗原的单克隆抗体,这是有效的方法。

人 *oculospanin* 是作为表达序列标志(EST)克隆,由在视网膜色素上皮和眼球脉络膜中表达的基因获得的蛋白质(Molecular Vision, (2002)8, 25-220)。人 *oculospanin* 基因具有 1068 bp 的开放阅读框,人 *oculospanin* 含有 355 个氨基酸,由 DNA 序列推定的分子量为 36.4 kDa,人 *oculospanin* 与肿瘤的关系尚不明确。

发明内容

30 本发明发现了在癌中特异性表达的基因,其目的在于提供:通过检测该基因的表达而检测癌的方法,该检测方法中使用的癌检测试剂盒,与该基因的表达产物特异性结合、具有细胞毒活性的抗体,含有该抗体作为有效成分的癌症治疗用药物组合物。

本发明人在探索在人的癌组织中特异性表达的基因的过程中，发现：功能尚不明确的人 *oculospanin* 基因的表达量在黑素瘤细胞中显著增加，从而提供了使用该基因的癌的检测方法、癌检测试剂盒以及含有抗人 *oculospanin* 抗体的癌症治疗用药物组合物，完成了本发明。

5 即，本发明包含：

(1) 抗体，该抗体与人 *oculospanin* 特异性结合，对于表达该蛋白质的细胞具有细胞毒活性；

(2) 抗体，该抗体与含有序列表中 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质和/或含有序列表中 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质特异性结合，对于表达该蛋白质的细胞具有细胞毒活性；

10 (3) (1)或(2)的抗体，其特征在于：细胞毒活性为抗体依赖性细胞介导细胞毒活性；

(4) (1)或(2)的抗体，其特征在于：细胞毒活性为补体依赖性细胞毒活性；

15 (5) (1)或(2)的抗体，其特征在于：细胞毒活性为补体依赖性细胞介导细胞毒活性；

(6) (1)或(2)的抗体，其特征在于：细胞毒活性为诱导编程性细胞死亡；

(7) (1)-(6)中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为单克隆抗体；

20 (8) (7)的抗体，其特征在于：所述抗体由小鼠杂交瘤 O3B8-2C9-4F3 (FERM BP-08627)生成；

(9) (1)-(8)中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为人源化抗体；

(10) (1)-(7)中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为完全人抗体；

25 (11) (1)-(10)中任一项的抗体，其特征在于：所述抗体为 IgG 抗体；

(12) 癌的检测方法，该方法包含下述步骤 1)-4)：

1) 由受试者采集检体，由该检体提取总 RNA 组分的步骤、

2) 由正常人采集检体，由该检体提取总 RNA 组分的步骤、

3) 测定来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分中下述 a)或 b)中任一项的多核苷酸表达量的步骤：

a) 含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸，

b) 与含有与上述 a)的多核苷酸互补的核苷酸序列的多核苷酸在严

谨条件下杂交的多核苷酸、

4) 分析由上述步骤 3)测定来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分之间的多核苷酸表达量的差异, 检测上述步骤 1)的受试者的癌的步骤;

5 (13) 癌的检测方法, 该方法包含下述步骤 1)-3):

1) 对由受试者采集的检体中含有序列表 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质和/或含有序列表中 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质的表达量进行测定的步骤、

2) 测定由正常人采集的检体中至少任意一种上述步骤 1)所述的蛋白质的表达量的步骤、

3) 分析由上述步骤 1)检测的蛋白质的表达量与由上述步骤 2)测定的该蛋白质的表达量的差异, 检测受试者的癌的步骤;

(14) (12)或(13)中任一项的方法, 其特征在于: 所述癌为皮肤癌;

(15) (12)或(13)中任一项的方法, 其特征在于: 所述癌为黑素瘤;

15 (16) (12)、(14)和(15)中任一项的方法, 其特征在于: 测定多核苷酸的表达量的方法为 RNA 印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法、RT-PCR、RNA 酶保护测定或连缀转录测定;

(17) (12)、(14)和(15)中任一项的方法, 其特征在于: 测定多核苷酸的表达量的方法是使用通过 DNA 制备的基因芯片或阵列, 其中所述 DNA 含有来自检体的、互补的 DNA 群或该 DNA 群的各 DNA 的部分序列;

(18) (13)-(15)中任一项的方法, 其特征在于: 蛋白质表达量的测定方法是使用与该蛋白质特异性结合的抗体或配体;

25 (19) (13)-(15)中任一项的方法, 其特征在于: 蛋白质表达量的测定方法为蛋白质印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法或固相酶联免疫定量法(ELISA 法);

(20) 癌检测试剂盒, 该癌检测试剂盒包含选自下述 1)-3)的至少一种:

30 1) 用于特异性扩增含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸的 15-30 个碱基长度的连续的寡核苷酸引物、

2)与含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸在严谨条件下杂交, 用于检测该多核苷酸的 15 个核苷酸或以上的连续

的多核苷酸探针、

3) 固定有含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸的固相化试样;

5 (21) 癌检测试剂盒, 该癌检测试剂盒包含下述 1)和 2)的至少一种:

1) 与含有序列表 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质和/或含有序列表中 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质特异性结合, 用于检测该蛋白质的抗体、

2) 可与上述 1)的抗体结合的二次抗体;

10 (22) (20)或(21)的试剂盒, 其特征在于: 所述癌为皮肤癌;

(23) (20)或(21)的试剂盒, 其特征在于: 所述癌为黑素瘤;

(24) 癌症治疗用药物组合物, 其特征在于: 该组合物含有(1)-(11)的抗体的至少任意一种;

15 (25) 癌症治疗用药物组合物, 该组合物包括具有与序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列或与该序列的部分序列互补的核苷酸序列的寡核苷酸;

(26) (24)或(25)中任一项的药物组合物, 其特征在于: 所述癌为皮肤癌;

20 (27) (24)或(25)中任一项的药物组合物, 其特征在于: 所述癌为黑素瘤。

附图简述

25 图 1 的上图是表示各种细胞株内人 *oculospanin* 基因的表达量的图表。图 1 的下图是表示健康人皮肤样本和黑素瘤样本中人 *oculospanin* 基因的表达量的图表。

图 2 的上图是表示健康人皮肤样本和来自皮肤组织的黑素瘤样本中人 *oculospanin* 基因的表达量的图表。图 2 的下图是表示健康人皮肤样本和来自淋巴结组织的黑素瘤样本中人 *oculospanin* 基因的表达量的图表。

30 图 3 是表示来自健康人淋巴结样本和来自淋巴结组织的黑素瘤样本中人 *oculospanin* 基因的表达量的图表。

图 4 是表示人 *oculospanin* 基因产物在 NIH3T3 细胞中的表达的

图。

图 5 是表示使用了人 *oculospanin* 表达细胞的抗人 *oculospanin* 抗体的抗体依赖性细胞毒活性的图。

5 实施发明的最佳方案

本说明书中，具有癌症治疗效果的化合物是指具有抑制癌的生长的活性、使癌缩小的活性的化合物。本说明书中，“癌”和“肿瘤”以相同的含义使用。本说明书中，术语“基因”不仅指 DNA，也包含其 mRNA、cDNA 及其 cRNA。因此，本发明中的“人 *oculospanin* 基因”包含人 *oculospanin* 的 DNA、mRNA、cDNA 和 cRNA。本说明书中，术语“多核苷酸”以与“核酸”相同的含义使用，也包含 DNA、RNA、探针、寡核苷酸和引物。本说明书中，“多肽”与“蛋白质”未加区别地使用。本说明书中，“RNA 组分”是指含有 RNA 的组分。本说明书中，“细胞”也包含动物个体内的细胞、培养细胞。本说明书中，“细胞癌化”是指细胞丧失对接触抑制现象的感受性或者显示支架非依赖性增殖等，显示细胞的异常生长，将所述显示异常生长的细胞称为“癌细胞”。本说明书中，与人 *oculospanin* 所具有的细胞的癌化活性等具有同等机能的蛋白质也称为人 *oculospanin*。本发明中的术语癌基因(Oncogene)除癌基因之外，也包含癌前期基因、原癌基因。

本发明中的“细胞毒”是指以任意的形式导致细胞病理性变化，不限于直接的外伤，指 DNA 切断或碱基二聚体的形成、染色体的切断、细胞分裂装置的损伤、各种酶活性的降低等所有细胞结构或机能上的损伤。本发明中的“细胞毒活性”是指引起上述细胞毒。

本发明中，“在严谨的条件下杂交”是指在 68℃、在市售的杂交溶液 ExpressHyb 杂交溶液(Clontech 公司制造)中进行杂交，或者是使用固定有 DNA 的滤膜、在 0.7-1.0 M NaCl 存在下、在 68℃ 下进行杂交，然后在 68℃ 使用 0.1-2 倍浓度的 SSC 溶液(1 倍浓度 SSC 溶液含有 150 mM NaCl、15 mM 柠檬酸钠)进行清洗，由此可进行鉴定的条件或在与其同等的条件下杂交。

30

1. 人 *oculospanin*

(1) 人 *oculospanin* 基因特异性表达的确证

对人 *oculospanin* 基因在人的各种细胞株群中基因表达量进行分析, 结果本发明人发现: 与其它组织相比, 在黑素细胞中显示显著高的表达量, 并且, 与正常的黑素细胞相比, 在黑素瘤中的表达量显著增加。例如, 比较黑素细胞、成淋巴细胞、格利雅细胞、上皮细胞之间人 *oculospanin* 的表达量, 本发明人所发现在黑素细胞中表达量显著高, 另外, 将正常的皮肤细胞与黑素瘤中的人 *oculospanin* 表达量进行比较, 则黑素瘤中人 *oculospanin* 表达量显著高。因此可认为人 *oculospanin* 与细胞的癌化和/或癌细胞的增殖有关。即, 通过测定人 *oculospanin* 在各细胞和/或各组织中的表达量, 可以判定起因于人 *oculospanin* 过量表达而发生的癌变和/或癌细胞的增殖的状态。上述癌例如有皮肤癌、特别是黑素瘤。只要是人 *oculospanin* 的表达量比在其它组织中有显著增殖的癌, 也可以适用于皮肤癌以外的癌。

人 *oculospanin* 基因的开放阅读框(ORF)的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO.1 所示, 其氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.2 所示。人 *oculospanin* 的 cDNA 在 GenBank 中以 *Homo sapiens oculospanin (OCSP) mRNA* (登录号: NM_0.31945) 注册, 注册于 GenBank 的 cDNA 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO.3 所示, ORF 表示为 SEQ ID NO.3 中核苷酸编号 65-1129。另外, 与注册于 GenBank 的人 *oculospanin* 的氨基酸序列同一的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.4 所示。人 *oculospanin* 的氨基酸序列也包括含有 1 个或多个氨基酸置换、缺失、附加的氨基酸序列, 与人 *oculospanin* 具有同等生物活性的蛋白质。

2. 癌的检测方法

人 *oculospanin* 在癌细胞、特别是黑素瘤中可见高表达, 因此可认为与细胞、特别是皮肤细胞的癌化和/或癌细胞的增殖有关。“检体”是指可由受试者或临床检体等中得到的血液、体液、前列腺、精巢、阴茎、膀胱、肾脏、口腔、咽头、口唇、舌、牙龈、鼻咽头、食道、胃、小肠、大肠、结肠、肝脏、胆囊、胰脏、鼻、肺、骨骼、软骨组织、皮肤、乳房、子宫、卵巢、脑、甲状腺、淋巴结、肌肉、脂肪组织等组织或排泄物等的试样, 但本发明中更优选皮肤或淋巴结。

(1) 利用人 *oculospanin* 基因的表达量的癌检测方法

利用人 *oculospanin* 基因的表达量的癌检测方法是具体包含以下

步骤 1)-4)的方法。

1) 由受试者采集检体, 由该检体提取总 RNA 组分的步骤;

2) 由正常人采集检体, 由该检体提取总 RNA 组分的步骤;

3) 测定上述步骤 1)的总 RNA 组分和上述步骤 2)的总 RNA 组分
5 中人 *oculospanin* 基因表达量的步骤;

4) 由上述步骤 3)测定来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述
步骤 2)的总 RNA 组分之间的基因表达量, 分析其表达量的差, 检测
上述步骤 1)的受试者的癌的步骤。

以下具体说明各步骤。

10 a) 步骤 1) 由受试者采集检体, 由该检体提取总 RNA 组分的步
骤;

由检体提取总 RNA 组分时, 可采取以下方法回收细胞, 然后迅
速地转移至 RNA 提取步骤。所述方法有: 将通过符合适当的实验伦
理基准的方法获得的、来自人的组织用 RNA 提取溶剂(例如苯酚等含
15 有具有使 RNA 酶失活的作用的成分的溶剂)直接溶解, 或者不破坏该
组织的细胞用刮棒小心刮取, 或者使用胰蛋白酶等蛋白质分解酶平稳
地从组织中提取细胞等方法。

RNA 提取方法可以采用硫氰酸胍·氯化铯超速离心法、硫氰酸
胍·热酚法、盐酸胍法、酸性硫氰酸胍·苯酚·氯仿法(Chomczynski, P.
20 and Sacci, N., Anal. Biochem. (1987), 162, 156-159)等, 优选酸性硫氰
酸胍·苯酚·氯仿法。还可以按照试剂所附说明书使用市售的 RNA
提取试剂(例如 ISOGEN (Nippon Gene 制造)、TRIZOL 试剂(Gibco
BRL 制造))等。

根据需要, 进一步优选将所得总 RNA 组分纯化为只有 mRNA 以
25 备使用。纯化方法没有特别限定, 例如可以将 mRNA 吸附于生物素
化的低聚(dT)探针上, 再利用生物素/链霉抗生物素之间的键, 在固定
有链霉抗生物素的顺磁珠上捕捉 mRNA, 洗涤操作, 然后通过洗脱
mRNA 来纯化 mRNA。还可以采用使 mRNA 吸附于低聚(dT)纤维素
柱上, 接着将其洗脱、纯化的方法。不过, 本发明的方法中, 这些 mRNA
30 的纯化步骤不是必须的, 只要可检测出作为检测对象的多核苷酸的表
达, 可以将总 RNA 组分用于以后的步骤。

b) 步骤 2) 由正常人采集检体, 由该检体提取总 RNA 组分的步

骤;

本发明中, 正常人是指没有癌症的人。是否为正常人, 可以测定人 *oculospanin* 的浓度, 看其浓度是否在预先确定的正常人的值的数值范围内来判定, 通过预先研究人 *oculospanin* 的表达量与正常人的癌的形成率的相关关系, 通过测定由受试者采集的检体中的人 *oculospanin* 表达量, 即可以判定受试者是否为正常人。从正常人体内制备总 RNA 组分的步骤可以与上述步骤 1) 同样地进行。

c) 步骤 3) 测定上述步骤 1) 的总 RNA 组分和上述步骤 2) 的总 RNA 组分中人 *oculospanin* 基因表达量的步骤;

这里, 人 *oculospanin* 基因的表达量以与含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、或者含有与序列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列的多核苷酸在严谨条件下杂交的多核苷酸的表达量来表示。

对于人 *oculospanin* 基因的表达量的测定方法——使用固相化试样的测定方法以及其它几种测定方法进行说明。

(a) 使用固相化试样的测定方法

(i) 固相化试样

固相化试样例如有以下。

① 基因芯片:

可使用将以数据库上的 EST(表达序列标志)序列或 mRNA 序列为基础合成的反义寡核苷酸固相化的基因芯片。这样的基因芯片可以使用 Affymetrix 公司制造的基因芯片(Lip Shutz, R.J.等., Nature Genet. (1999), 21, supplement, 20-24), 但并不限于此, 可以按照公知的方法制备。对来自人细胞的 mRNA 进行分析时, 优选来自人的基因芯片, 例如可以使用 Affymetrix 公司制造的人 U95 系列或 U133 系列。但是并不限于此, 例如也可以使用来自近缘种动物的芯片。

② 固相化有由人总 RNA 或由特定的组织得到的总 RNA 制备的 cDNA 或 RT-PVR 产物的阵列或膜滤器:

上述 cDNA 或 RT-PCR 产物如下获得: 以人的 EST 数据库等序列信息为基础制备引物, 通过该引物实施反转录酶促反应或 PCR 来克隆。该 cDNA 或 RT-PCR 产物也可以利用扣除法(Diatchenki, L, 等, Proc. Natl. Acad. Sci, USA (1996) 93, 6025-6030)、差别显示法(Liang, P.,

等, *Nucleic Acids Res.*, (1992) 23, 3685-3690)等, 预先选择有肿瘤的人和没有肿瘤的人之间表达量不同的总 RNA。阵列或滤膜还可以使用市售的产品(例如 IntelliGene: Takara Bio 公司制造等)。还可以使用市售的点样仪(例如 GMS417 arrayer: Takara Bio 公司制造等), 通过固相化来制备上述 cDNA 或 RT-PCR 产物。

(ii) 探针的制备和分析

标记探针可以不使用特定的 mRNA 克隆, 而使用将所表达的全部的 mRNA 进行了标记的探针。用于制备探针的起始材料可以使用未经纯化的 mRNA, 优选使用由上述的方法纯化的 Poly(A)+RNA。以下, 对使用各种固相化试样时的标记探针的制备方法和检测、分析方法进行说明。

① Affymetrix 公司制造的基因芯片:

根据 Affymetrix 公司制造的基因芯片所附的说明书(Affymetrix 公司表达分析技术手册)制备生物素标记的 cRNA 探针。接着根据 Affymetrix 公司制造的基因芯片所附的说明书(表达分析技术手册), 使用 Affymetrix 公司制造的分析装置(GeneChip Fluidics Station 400)进行杂交和分析, 检测抗生物素蛋白发光并进行分析。

② 阵列:

通过反转录酶促反应, 由 Poly(A)⁺RNA 制备 cDNA 时, 需要标记 cDNA, 以便可检测出 cDNA, 用荧光染料标记时, 通过加入用荧光染料(例如 Cy3、Cy5 等)标记的 d-UTP 等来荧光标记 cDNA。此时, 如果用不同的染料分别标记来自黑素瘤细胞的 Poly(A)⁺RNA 和来自对照细胞的 Poly(A)⁺RNA, 则在之后杂交时可以将两者混合使用。例如使用 Takara Bio(株)生产的阵列时, 可以按照该公司的说明进行杂交和洗涤, 用荧光信号检测仪(例如 GMS418 阵列扫描仪(Takara Bio(株)制造等)检测荧光信号, 然后进行分析。不过, 所使用的阵列并不限于市售的产品, 可以自制, 也可以是特别制备的。

③ 膜滤器:

通过逆转录酶反应, 由 Poly(A)⁺RNA 制备 cDNA 时, 可以通过加入放射性同位素(例如 d-CTP 等)制备标记探针, 再按照常规方法进行杂交, 使用例如市售的膜滤器制造的微阵列——Atlas system (Clontech 公司制造)进行杂交和清洗, 然后使用分析装置(例如 Atlas Image:

Clontech 公司制造等)进行检测、分析。

上述①-③中任一项的方法都是同一批次的固相化试样上进行来自人各种组织的探针杂交。此时，除所使用的探针不同以外，杂交的其它条件均相同。使用荧光标记探针时，如果用分别不同的荧光染料标记探针，则一个固相化试样上可以一次与两种探针的混合物杂交，并可以读取荧光强度(Brown, P.O.等., Nature Genet., (1999) 21, supplement, p. 33-37)。

(b) 其它测定方法

除上述以外的测定方法有：扣除克隆法(参照实验医学别册 新基因工程手册、羊土社发行(1996), 32-35 页)、差别显示法(基础生化学实验法 4 核酸·基因实验 II. 应用编、东京化学同人(2001), 125-128 页)、使用报道基因的方法(氯霉素乙酰转移酶(例如使用 pCAT3-Basic 载体: Promega 公司制造)、 β -半乳糖苷酶(例如使用 p β gal-Basic: Promega 公司制造)、分泌型碱性磷酸酶(例如使用 pSEAP2-Basic: Clontech 公司制造)、绿色荧光蛋白(例如使用 pEGFP-1 : Clontech 公司制造)), 但不限于这些。

步骤 4) 由上述步骤 3)测定来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分的基因表达量, 分析其表达量的差, 检测上述步骤 1)的受试者的癌的步骤。

来自正常人的检体和来自受试者的检体之间人 *oculospanin* 表达量的差异进行分析, 可以判定: 在人 *oculospanin* 的表达量显著增加的检体中, 癌、特别是皮肤癌、更进一步, 黑素瘤存在的可能性高, 可以检测出癌。表达量显著增加例如是指使用 Affymetrix 公司的 *microarray Suite Ver. 3.0* 进行分析时, 来自黑素瘤细胞的基因的平均差异值比正常黑素细胞显著增加的情况。

另外, 测定人 *oculospanin* 基因的浓度, 分析其浓度是否在预先确定的正常人的值的数值范围, 超过预先确定的正常人的值的数值范围, 则判定为有癌, 由此可检测癌, 并且通过预先研究人 *oculospanin* 的表达量与正常人的癌的形成率的相关关系, 通过测定由受试者采集的检体中人 *oculospanin* 的表达量, 可以判定受试者是否为正常人。

(3) 利用人 *oculospanin* 的表达量(蛋白质表达量)的癌检测方法

具体来说, 利用人 *oculospanin* 的表达量的癌的检测方法是包含

以下步骤 1)-3)的方法。

- 1) 测定由受试者采集的检体中人 *oculospanin* 表达量的步骤、
- 2) 测定由正常人采集的检体中上述 1)的蛋白质的表达量的步骤、
- 3) 对由上述步骤 1)测定的蛋白质的表达量与由上述步骤 2)测定的该蛋白质的表达量的差异进行分析, 检测受试者的癌的步骤。

以下, 具体说明各步骤。

a) 步骤 1) 测定由受试者采集的检体中人 *oculospanin* 表达量的步骤:

(a) 由检体制备蛋白质测定用试样

10 检体可如下制备: 根据需要进行高速离心, 除去不溶性的物质, 然后如下制成 ELISA/RIA 用试样、蛋白质印迹用试样。

ELISA/RIA 用试样例如可直接使用回收的皮肤或淋巴结, 或者使用用缓冲液适当稀释后的物质。蛋白质印迹用(电泳用)试样例如可直接使用皮肤或淋巴结的提取液, 或者用缓冲液稀释, 与含有 SDS-聚丙烯酰胺电泳用的 2-巯基乙醇的样品缓冲液(Sigma 公司制造)混合。进行斑点/狭线印迹时, 例如可以使用印迹装置等, 使回收的皮肤或淋巴结提取液本身、或者用缓冲液稀释后的物质直接吸附于膜上。

(b) 试样的固相化

为了特异性检测由上述得到的试样中的蛋白质, 可通过免疫沉降法、利用配体的键合的方法等使其沉淀, 不经固相化即可检测, 也可以使要检测的该试样固相化。使蛋白质固相化时, 在蛋白质印迹法、斑点印迹法或狭线印迹法中使用的膜可以是硝基纤维素膜(例如 BioRad 公司制造等)、尼龙膜(例如 Hybond-ECL (Amersham Pharmacia 公司制造)等)、棉膜(例如 blot absorbent filters (BioRad 公司制造)等)、或者聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(BioRad 公司制造)等)等。

25 为了通过 ELISA 法/RIA 法进行蛋白质的检测·定量, 可以在专用的 96 孔板(例如 Immunoplate·Maxisorp (Nunc 公司制造)等)中加入试样或其稀释液(例如用含 0.05%叠氮化钠的磷酸缓冲生理盐水(以下称为“PBS”)稀释后的产物), 在 4℃-室温下过夜, 或在 37℃静置 1-3 小时, 使蛋白质吸附于孔内底面并固相化。

30 抗人 *oculospanin* 抗体可采用常规方法(例如参照新生化学实验讲座 1、蛋白质 1、389-397 页、1992), 通过将人 *oculospanin* 或选自人

oculospanin 的氨基酸序列的任意多肽免疫动物，采集机体内生成的抗体并纯化来获得。另外，按照公知的方法(例如 Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody, p.365-367, 1980, Prenum Press, N, Y.)，通过使生成抗人 oculospanin 抗体的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合，构建杂交瘤，获得单克隆抗体。

作为抗原的人 oculospanin 可以通过基因操作，使人 oculospanin 基因在宿主细胞中生成来获得。具体来说，制备可表达人 oculospanin 基因的载体，将其导入宿主细胞，使该基因表达，然后纯化表达的人 oculospanin。

(c) 人 oculospanin 表达量的测定

人 oculospanin 的表达量以含有序列表中 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质的表达量表示。

表达量的测定可以使用上述抗人 oculospanin 抗体，采用蛋白质印迹法或斑点/狭线印迹法等公知的方法测定。

b) 步骤 2) 测定由正常人采集的检体中上述 1)的蛋白质的表达量的步骤：

由正常人采集的检体中的人 oculospanin 表达量的测定可采用与上述步骤 1)同样的方法进行。

c) 步骤 3) 对由上述步骤 1)测定的蛋白质的表达量与由上述步骤 2)测定的该蛋白质的表达量的差异进行分析，检测受试者的癌的步骤：

对来自正常人的检体和来自受试者的检体之间人 oculospanin 的表达量的差异进行分析，可以判定：在人 oculospanin 表达量显著增加的检体中，癌、特别是皮肤癌、更进一步、黑素瘤存在的可能性高，可以检测出癌。

另外，测定人 oculospanin 的浓度，分析其浓度是否在预先确定的正常人的值的数值范围，超过预先确定的正常人的值的数值范围，则判定为有癌，由此可检测癌，通过预先研究人 oculospanin 表达量与正常人的癌的形成率的相关关系，通过测定由受试者采集的检体中人 oculospanin 的表达量，可以判定受试者是否为正常人。

3. 人 oculospanin 基因和人 oculospanin 的鉴定

人 *oculospanin* 基因和人 *oculospanin* 在人的正常组织间，在黑素细胞中表达量显著增加，并且，与正常黑素细胞相比，在黑素瘤中表达量显著增加。

研究人 *oculospanin* 的机能的方法是：首先，通过集落杂交法等公知的方法，从来自表达人 *oculospanin* 的细胞的 cDNA 文库中获得全长 cDNA。将该全长 cDNA 导入小鼠或人细胞中，使其高表达，研究是否对细胞产生影响。

为了使 cDNA 在动物个体内表达，可以采用将所得全长 cDNA 整合到病毒载体中施用于动物的方法。通过病毒载体导入基因的方法例如有将 cDNA 整合到反转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、痘苗病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒等 DNA 病毒、或 RNA 病毒中整合并导入的方法。其中优选使用反转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、痘苗病毒的方法。

非病毒性的基因导入方法有：将表达质粒直接施用于肌肉内的方法(DNA 疫苗法)、脂质体法、脂转染法、微量注射法、磷酸钙法、电穿孔法等，其中，优选 DNA 疫苗法、脂质体法。

将全长 cDNA 导入来自人、小鼠、大鼠等的肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、或肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、皮肤细胞等，使其高表达，可以对培养细胞进行各目标细胞所具有的机能、具体地说，糖或脂质的产生或摄取、或者调节糖原的积蓄等糖脂质代谢的机能，或者对于细胞的形态有什么样的影响的研究。相反，还可以将要试验的基因的总 RNA 的反义核酸导入细胞，研究这对各目标细胞的机能或形态有什么样的影响。

将全长 cDNA 导入动物或细胞时，将该 cDNA 整合到含有适当的启动子和与表达有关的序列的载体中，由该载体转化宿主细胞。脊椎动物细胞的表达启动子通常可以具有位于要表达的基因的上游的启动子、RNA 的剪切位点、聚腺苷酸化位点和转录终止序列等，还可以根据需要具有复制起点。该表达载体的例子有：具有 SV40 的早期启动子的 pSV2dhfr (Subramani, S.等., Mol. Cell. Biol., (1981), 1, 854-864 页)、反转录病毒载体 pLNCX、pLNSX、pLXIN、pSIR (Clontech 公司制造)、粘粒载体 pAxCw (Takara Bio 公司制造)等，但不限于此。该表达载体可以通过二乙基氨基乙基(DEAE)-葡聚糖法(Luthman, H

and Magnusson, G. (1983), *Nucleic Acids Res.* 11, p.1295-1308)、磷酸钙-DNA 共沉淀法(Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973), *Virology*, 52, p.456-457)和电脉冲穿孔法(Neumann, E.等., (1982), *EMBO J.* 1, p.841-845)等, 整合到猴的细胞 COS 细胞(Gluzman, Y. (1981), *Cell* 23, 175-182, (ATCC CRL-1650))或中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞, (ATCC CCL-61))的二氢叶酸还原酶缺失细胞株(Urlaub, G. and Chasin, L. A., *Proc., Natl. Acad. Sci, USA* (1980) 77, 4126-4220 页)等中, 但不限于此。可以获得上述所需的转化体。

在正常动物中, 通过基因操作可以制备使目标基因高表达的转基因动物, 研究对细胞的形态有什么样的影响。相反, 可以在具有黑素瘤的动物中制备对象基因遭到破坏的敲除动物, 判定细胞的状态。

4. 人 *oculospanin* 基因和/或人 *oculospanin* 基因检测试剂盒

人 *oculospanin* 基因和/或人 *oculospanin* 可以使用选自以下 1)-5) 的至少一种的试剂盒进行检测。

1) 用于使含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的多核苷酸特异性扩增的 15-30 个碱基长度的连续的寡核苷酸引物;

2) 与含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的多核苷酸在严谨条件下杂交的、用于检测该多核苷酸的 15 个核苷酸或以上的连续的多核苷酸探针;

3) 固定了含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的多核苷酸的固相化试样;

4) 与含有序列表中 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列的蛋白质特异性结合、用于检测该蛋白质的抗体;

5) 可与上述 4) 的抗体结合的二次抗体。

上述 1) 的引物可以根据人 *oculospanin* 基因的核苷酸序列(序列列表中 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列), 使用市售的引物设计软件(例如 Wisconsin GCG package Version 10.2)等, 按照常规方法, 容易地设计并扩增。例如为了扩增含有序列表中 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的多核苷酸, 上述引物可以使用含有序列表中 SEQ ID NO.5 所示核苷酸序列的寡核苷酸与含有序列表中 SEQ ID NO.6 所示核苷酸序列的寡核苷酸的组合。另外, 上述 2) 的探针是与人 *oculospanin* 特异性杂交

的多核苷酸，为 100-1500 个碱基长度，优选 300-600 个碱基长度。这些引物或探针可由适当的标记进行标记(例如酶标记、放射性标记、荧光标记等)，也可以附加接头。

上述 3)的固相化试样可通过将上述 2)的探针固定在玻璃板、尼龙膜等固相上来制备。这样的固相化试样的制备方法已经在“2. 癌的检测方法”一项中的“(1) 利用人 *oculospanin* 基因的表达量的癌的检测方法”项下“(1) 使用固相化试样的测定方法”中进行了说明，例如有基因芯片、cDNA 阵列、寡聚体矩阵(oligo-array)、膜滤器等。

本发明的试剂盒还可以含有耐热性 DNA 聚合酶、dNTP (dATP、dCTP、GTP、dTTP 的混合物)和缓冲液。耐热性 DNA 聚合酶的例子有 Taq DNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶(宝酒造社制造)、Tth DNA 聚合酶、PfuDNA 聚合酶等。缓冲液根据所使用的 DNA 聚合酶来选择，根据需要，可以添加 Mg^{2+} 等。

上述 4)和 5)的抗体可通过上述“2. 癌的检测方法”一项中的“(3) 利用人 *oculospanin* 表达量(蛋白质表达量)的癌的检测方法”项或“5. 抗人 *oculospanin* 抗体的制备”项的方法制备。该抗体可由适当的标记进行标记(例如酶标记、放射性标记、荧光标记等)。

本发明的试剂盒可用于检测人 *oculospanin* 基因和/或人 *oculospanin* 的检测，也可用于判定有无癌、抑制癌的增殖的物质的筛选。

5. 抗人 *oculospanin* 抗体的制备

(1) 抗原的制备

用于制备抗人 *oculospanin* 抗体的抗原：人 *oculospanin* 或其含有至少 6 个连续的部分氨基酸序列的多肽、或者向其中附加任意的氨基酸序列或载体的衍生物。

人 *oculospanin* 可以从人的肿瘤组织或肿瘤细胞中直接纯化使用，还可以通过体外合成人 *oculospanin*、或者通过基因操作在宿主细胞中生成而获得。具体的基因操作中，将人 *oculospanin* 整合到可表达的载体中，然后在含有转录或翻译所必需的酶、底物和能量物质的溶液中合成，或者通过转化其它的原核生物或真核生物的宿主细胞使人 *oculospanin* 表达，由此可得到该蛋白质。人 *oculospanin* 的 cDNA 的

核苷酸序列记载于文献(Graeme Wistow, Steven L. Bernstein, M. Keith Wyatt, Robert N. Fariss, Amita Behal, Jeffrey W. Touchman, Gerard Bouffard, Don Smith, and Katherine Peterson (2002), Expressed sequence tag analysis of human RPE/choroids for the NEIBank Project: 5 Over 6000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants, Molecular Vision 8:205-220), 在 GenBank 中以登录号 NM_031945 注册,其 ORF 记载于序列表的 SEQ ID NO.1 中。人 oculospanin 的 cDNA 可通过所谓的 PCR 法获得,所述 PCR 法例如是:以表达人 oculospanin 的 cDNA 文库为模板,使用特异性扩增人 oculospanin cDNA 的引物 10 进行聚合酶链反应(以下称为“PCR”)“参照 Saiki, R. K.,等., (1988), Science 239, 487-49”。

多肽的体外合成例如有: Roche Diagnostics 公司制造的 rapid translation system(RTS), 但不限于此。以使用 RTS 的情况为例,其合成是:将目标基因克隆到由 T7 启动子控制的表达载体中,将其添加 15 到体外反应系统中,则最初通过 T7RNA 聚合酶,模板 DNA 转录为 mRNA,然后通过大肠杆菌溶解液中的核糖体等进行翻译,在反应液中合成目标多肽(Biochemica, 1, 20-23 (2001), Biochemica, 2, 28-29 (2001))。

原核细胞的宿主例如有大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌 20 (*Bacillus subtilis*)等。将目标基因转化这些宿主细胞内时,用含有来自与宿主相适应的种的复制子、即复制起点和调节序列的质粒载体转化宿主细胞。载体优选具有可使转化细胞具有表现型选择性的序列的载体。

例如,大肠杆菌常用 K12 菌株等,载体通常使用 pBR322 或 pUC 25 系的质粒,但并不限于这些,可以使用任何公知的各种菌株和载体。

对于大肠杆菌,启动子有:色氨酸(trp)启动子、乳糖(lac)启动子、色氨酸-乳糖(tac)启动子、脂蛋白(lpp)启动子、多肽链延伸因子 Tu (tufB) 启动子等,任何启动子都可用于目标多肽的生产。

枯草杆菌例如优选 207-25 菌株,载体优选使用 pTUB 228 (Ohmura, 30 K.等., (1984), J. Biochem. 95, 87-93)等,但不限定于这些。通过连接编码枯草杆菌 α -淀粉酶的信号肽序列的 DNA 序列,也可以在菌体外进行分泌表达。

真核细胞的宿主细胞包含脊椎动物、昆虫、酵母等的细胞，脊椎动物细胞例如常使用猴的细胞 COS 细胞(Gluzman, Y. (1981), Cell 23, 175-182、ATCC CRL-1650)、小鼠成纤维细胞 NIH3T3 (ATCC No. CRL-1650)或中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞、ATCC CCL-61)的二氢叶酸还原酶缺失细胞株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980), Proc., Natl. Acad. Sci, USA 77, 4126-4220 页)等，但不限于此。

脊椎动物的表达启动子可以具有通常位于要表达的基因上游的启动子、RNA 的剪切位点、聚腺苷酸化位点和转录终止序列等，还可根据需要具有复制起点。该表达载体的一个例子有：具有巨细胞病毒早期启动子的 pCDNA 3.1 (Invitrogen 公司制造)、具有 SV40 的早期启动子的 pSV2dhfr (Subramani, S.等., (1981), Mol. Cell. Biol. 1, 854-864)等，但不限于这些。

以使用 COS 细胞或 NIH3T3 细胞作为宿主细胞的情况为例，其中表达载体可以使用具有 SV40 复制起点，在 COS 细胞或 NIH3T3 细胞中可自主增殖，且具备转录启动子、转录终止信号和 RNA 剪切位点的表达载体。该表达载体可通过 DEAE-葡聚糖法(Luthman, H and Magnusson, G. (1983), Nucleic Acids Res. 11, p.1295-1308)、磷酸钙-DNA 共沉淀法(Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973), Virology, 52, p.456-457)、以及电脉冲穿孔法(Neumann, E.等., (1982), EMBO J. 1, p.841-845)等，整合到 COS 细胞或 NIH3T3 细胞中，即可得到上述所需的转化细胞。另外，使用 CHO 细胞作为宿主细胞时，可以将表达载体和可表达发挥抗生素 G418 抗性标志机能的 neo 基因的载体例如如 pRSVneo (Sambrook, J. 等., (1989): Molecular Cloning A Laboratory Manual "Cold Spring Harbor Laboratory, NY)或 pSX2neo (Southern, P. J., and Berg, P. (1982), J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341)等共转染，通过选择 G418 抗性集落来获得稳定生产目标多肽的转化细胞。

上述得到的转化体可按照常规方法进行培养，通过该培养，可在细胞内或细胞外生产目标多肽。该培养所使用的培养基可以根据所采用的宿主细胞，适当选择常用的各种培养基，例如如果是上述 COS 细胞，则可以使用在 RPMI1640 培养基或 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(以下称为“DMEM”)等培养基中根据需要添加胎牛血清等血清成

分而得的培养基。

通过上述培养，转化体的细胞内或细胞外生产的重组蛋白可以通过利用该蛋白质的物理性质或化学性质等的各种公知的分离操作法进行分离、纯化。该方法的具体例子有：通过通常的蛋白质沉淀剂进行的处理，超滤，分子筛色谱(凝胶过滤)、吸附色谱、离子交换色谱、亲和层析、高效液相色谱(HPLC)等各种液相色谱，透析法，以上的组合等。通过使所表达的重组蛋白与含有6个残基的组氨酸连接，可以以镍亲和柱进行高效纯化。通过将上述方法组合，可以简便地、大量地制备高收率、高纯度的目标多肽。

10 (2) 抗人 oculospanin 单克隆抗体的制备

与人 oculospanin 特异性结合的抗体的例子是与 oculospanin 特异性结合的单克隆抗体，其获得方法如下。

制备单克隆抗体时，通常必须有下述的操作步骤。即，

- 15 (a) 作为抗原使用的生物体高分子的纯化、
- (b) 通过向动物注射抗原进行免疫，然后采集血液，检测其抗体效价，确定脾脏摘出时间，然后制备抗体生成细胞的步骤、
- (c) 骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”)的制备、
- (d) 抗体生成细胞与骨髓瘤的细胞融合、
- (e) 生成目标抗体的杂交瘤群的选别、
- 20 (f) 分离成单一细胞克隆(克隆)、
- (g) 根据情况，进行用于大量制备单克隆抗体的杂交瘤的培养、或者对移植了杂交瘤的动物的饲养、
- (h) 对上述制备的单克隆抗体的生理活性及其结合特异性的探讨，或者作为标记试剂的特性检定等。

25 以下，按照上述步骤详述单克隆抗体的制备方法，但该抗体的制备方法并不受此限制，例如也可以使用脾细胞以外的抗体生成细胞和骨髓瘤。

(a) 抗原的纯化

30 抗原可以使用以上述方法制备的人 oculospanin 或其一部分。也可以由人 oculospanin 表达重组细胞制备的膜组分或人 oculospanin 表达重组细胞本身、以及使用本领域周知的方法进行化学合成的本发明的蛋白质的部分肽作为抗原使用。

(b) 抗体生成细胞的制备

将在步骤(a)中得到的抗原与弗氏完全或不完全佐剂、或者钾明矾等助剂混合，以此作为免疫原，对实验动物进行免疫。实验动物可以随意使用公知的杂交瘤制备方法中使用的动物。具体来说，例如可以使用小鼠、大鼠、山羊、绵羊、牛、马等。从与摘出的抗体生成细胞融合的骨髓瘤细胞的容易获得性等角度考虑，优选以小鼠或大鼠作为被免疫动物。对于实际使用的小鼠和大鼠的系统没有特别限定，当为小鼠时，例如可以使用 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HTI、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB、129 等，当为大鼠时，例如可使用 Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer 等。这些小鼠和大鼠例如可由日本 Clea、日本 Charles River、日本 SLC、The Jackson Laboratories 等实验动物饲养销售商购得。其中，如果考虑到与后述骨髓瘤细胞的融合适性，特别优选小鼠采用 BALB/c 系统，大鼠采用 low 系统作为被免疫动物。另外，考虑到抗原在人和小鼠之间的同源性，优选使用排除自身抗体的机体功能下降的小鼠，即优选使用自身免疫疾病小鼠。这些小鼠或大鼠在免疫时的周龄优选 5-12 周龄，进一步优选 6-8 周龄。

用人 oculospanin 或其重组体对动物进行免疫时，例如可采用 Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield Illinois (1964) 等中详细记载的公知的方法。如果具体给出这些免疫方法中适合本发明的方法，则例如如下。即，首先将作为抗原的膜蛋白组分或表达抗原的细胞施用于动物的皮内或腹腔内。为了提高免疫效率，优选两者结合使用，前半期进行皮内施用，后半期或只在最后进行腹腔内施用，这样可特别提高免疫效率。抗原施用时间根据被免疫动物的种类、个体差异等而不同，通常优选抗原施用次数为 3-6 次、施用间隔为 2-6 周，进一步优选施用次数为 3-4 次、施用间隔为 2-4 周。过度增加施用次数，则浪费抗原，另外施用间隔过大，则因动物的老化而导致细胞的活性降低，不优选。抗原的施用量根据动物的种类、个体差异等而不同，通常为 0.05-5 ml、优选

0.1-0.5 ml 左右。追加免疫自上述的抗原施用 1-6 周后、优选 2-4 周后、进一步优选 2-3 周后进行。该追加免疫的时期比第 6 周迟，或者比第 1 周还早，则追加免疫效果小。进行追加免疫时的抗原施用量根据动物的种类、大小等而不同，例如为小鼠时，通常为 0.05-5 ml，优选 0.1-0.5 ml，进一步优选 0.1-0.2 ml 左右。不必要的大量施用不仅使免疫效果降低，对于被免疫动物也不好。

自上述追加免疫 1-10 天后、优选 2-5 天后、进一步优选 2-3 天后，无菌操作，由被免疫动物摘出含有抗体生成细胞的脾细胞或淋巴细胞。此时测定抗体效价，将抗体效价足够高的动物作为抗体生成细胞的供给源使用，这样可以提高以后的操作效率。这里使用的抗体效价的测定方法有 RIA 法、ELISA 法、荧光抗体法、被动血凝法等各种公知的技术，从检测灵敏度、迅速性、准确性和操作自动化的可能性等角度考虑，更优选 RIA 法或 ELISA 法。

关于本发明中的抗体效价的测定，例如 ELISA 法可通过以下的顺序进行。首先将纯化或部分纯化的抗原吸附于 ELISA 用 96 孔板等固相表面，再用与抗原无关的蛋白质、例如牛血清白蛋白(以下称为“BSA”)覆盖未吸附抗原的固相表面，洗涤该表面后，使其接触作为第一抗体的、分步稀释的试样(例如小鼠血清)，使上述抗原与试样中的单克隆抗体结合。再加入作为第二抗体的酶标记的抗小鼠抗体的抗体，使其与小鼠抗体结合，洗涤后加入该酶的底物，底物分解、显色，测定由此导致的吸光度的变化，计算抗体效价。

来自这些脾细胞或淋巴细胞的抗体生成细胞的分离可按照公知的方法(例如 Kohler 等., Nature, 256, 495, 1975; Kohler 等., Eur J. Immunol., 6, 511, 1977; Milstein 等., Nature, 266, 550, 1977; Walsh, Nature, 266, 495, 1977)进行。例如，当为脾细胞时，可采用将细胞细细切碎，用不锈钢网过滤，然后使其悬浮于 Eagle 极限必需培养基(MEM)，分离抗体生成细胞这样的常规方法。

(c) 骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”)的制备

对于在细胞融合中使用的骨髓瘤细胞没有特别限制，可以由公知的细胞株中适当选择使用。不过，考虑到从融合细胞中选择杂交瘤时的便利性，优选使用该选择步骤已得到确立的 HGPRT(次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)缺失株。即为来自小鼠的 X63-Ag8(X63)、NSI-

Ag4/1(NS1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、P2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、F0、S149/5XXO、BU.1 等, 来自大鼠的 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3)等, 来自人的 U266AR(SKO-007)、GM1500·GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、
5 8226AR/NIP4-1(NP41)等。这些 HGPRT 缺失株例如可由美国菌种保藏中心(ATCC)购得。

这些细胞株在适当的培养基、例如 8-氮鸟嘌呤培养基[RPMI-1640 培养基中加入谷胺酰胺、2-巯基乙醇、巯基霉素以及胎牛血清(以下称为“FCS”), 在得到的培养基中加入 8-氮鸟嘌呤而得的培养基]、Iscove
10 改良 Dulbecco 培养基(以下称为“IMDM”)、或 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(以下称为“DMEM”)继代培养, 但在细胞融合之前 3-4 天起在正常培养基[例如含有 10% FCS 的 ASF104 培养基(味之素(株)制造)]继代培养, 融合当天要确保 2×10^7 或以上的细胞数。

(d) 细胞融合

15 抗体生成细胞与骨髓瘤细胞的融合可以按照公知的方法(Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A., and Mayer, M.M. Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964)等), 在不会极度降低细胞的存活率的条件下适当实施。这样的方法例如可以采用在聚乙二醇等高浓度聚合物溶液中将抗体生成细胞与骨髓瘤细胞混合的化学方法、利用电刺激的物理方法等。其中, 上述化学方法的具体例子如下所示。即, 使用聚乙
20 二醇作为高浓度聚合物溶液时, 在分子量为 1500-6000、优选 2000-4000 的聚乙二醇溶液中、在 30-40℃、优选 35-38℃ 的温度下将抗体生成细胞和骨髓瘤细胞混合 1-10 分钟、优选 5-8 分钟。
25

(e) 杂交瘤群的选择

对于由上述融合细胞得到的杂交瘤的选择方法并没有特别限制, 通常使用 HAT (次黄嘌呤·氨基嘌呤·胸苷)选择法[Kohler 等., Nature, 256, 495 (1975); Milstein 等, Nature 266, 550 (1977)]。该方法对于使用
30 在氨基嘌呤中不能存活的 HGPRT 缺失细胞株的骨髓瘤细胞得到杂交瘤时有效。即, 通过将未融合细胞和杂交瘤在 HAT 培养基上培养, 可以选择性地只使同时对氨基嘌呤也具有抗性的杂交瘤存活, 且使其

增殖。

(f) 分离为单一细胞克隆(克隆)

杂交瘤的克隆方法例如可以使用甲基纤维素法、软琼脂糖法、有限稀释法等公知的方法(例如参照 Barbara, B.M. and Stanley, M.S.:
5 Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1980))。该克隆方法是: 稀释至孔板的每一个孔中含有 1 个杂交瘤进行培养的有限稀释法、在软琼脂培养基中培养并回收集落的软琼脂法、通过显微操作器一个个挑取细胞进行培养的方法、通过细胞分选仪分离 1 个细胞的“分选克隆”等。这些方法
10 中, 特别优选有限稀释法。该方法中, 在微孔板上接种来自大鼠胚胎的成纤维细胞株、或者正常小鼠脾细胞、胸腺细胞、腹水细胞等的饲养细胞。另一方面, 预先将杂交瘤在培养基中稀释为 0.2-0.5 个/0.2 ml, 分别向各孔中加入 0.1 ml 该稀释的杂交瘤悬浮液, 每隔一定期间(例如每隔 3 天)将约 1/3 的培养基更换成新的培养基, 持续培养 2 周左右,
15 这样可使杂交瘤的克隆增殖。

在确认具有抗体效价的孔中, 例如将通过有限稀释法进行的克隆过程重复 2-4 次, 将稳定后可确认具有抗体效价的细胞株选择为抗人
oculospanin 单克隆抗体生成杂交瘤细胞株。将这样克隆的杂交瘤细胞株之一命名为 O3B8-2C9-4F3, 于 2004 年 2 月 17 日保藏于独立行政
20 法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心(日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6), 保藏号为 FERM BP-08627。

(g) 通过培养杂交瘤制备单克隆抗体

通过培养这样选择的杂交瘤, 可以高效获得单克隆抗体, 但优选培养之前对要生成目标单克隆抗体的杂交瘤进行筛选。该筛选可采用
25 已知的方法。

本发明的抗体效价的测定例如可根据 ELISA 法, 按照以下的顺序进行。首先, 将纯化或部分纯化的人 oculospanin 或者表达人 oculospanin 的细胞吸附于 ELISA 用 96 孔板等固相表面, 再用与抗原无关的蛋白质、例如牛血清白蛋白(以下称为“BSA”)覆盖未吸附抗原的固相表面, 洗涤该表面后, 使其接触作为第一抗体的、分步稀释的试样(例如小鼠血清), 使上述抗原与试样中的抗 oculospanin 抗体结合。再加入作为第二抗体的酶标记的抗小鼠抗体的抗体, 使其与小鼠

抗体结合，洗涤后加入该酶的底物，底物的分解、显色，通过测定由此导致的吸光度的变化等计算抗体效价。这样的筛选可以在上述杂交瘤克隆之后进行，也可以在之前进行。

5 由以上的方法得到的杂交瘤可以在液氮中或 80℃ 以下的冷冻库中以冷冻状态保存。

克隆终止的杂交瘤可以将培养基由 HT 培养基转换成正常培养基进行培养。大量培养可以通过使用大型培养瓶的旋转培养或滚动培养进行。使用凝胶过滤等本领域技术人员周知的方法纯化该大量培养中的上清，由此可得到与本发明蛋白质特异性结合的单克隆抗体。向相同系统的小鼠(例如上述 BALB/c)或 Nu/Nu 小鼠的腹腔内注射杂交瘤，使该杂交瘤增殖，由此可以得到大量含有本发明的单克隆抗体的腹水。腹腔内施用时，事先(3-7天前)施用 2,6,10,14-四甲基十五烷(pristine)等矿物油，则可得到更大量的腹水。例如预先向与杂交瘤相同系统的小鼠腹腔内注射免疫抑制剂，使 T 细胞失活，20 天后，使 10^6 - 10^7 个杂交瘤克隆细胞悬浮于不含有血清的培养基中(0.5 ml)，并腹腔内施用，通常在腹部膨胀、腹水积存时由小鼠采集腹水。通过该方法，可得到与培养液中相比约为 10 倍或以上浓度的单克隆抗体。

由上述方法得到的单克隆抗体例如可通过 Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)记载的方法纯化。即硫酸铵盐析法、凝胶过滤法、离子交换色谱法、亲和层析法等。这些方法中，通过将硫酸铵盐析法重复 3-4 次、优选 3-6 次，可以纯化单克隆抗体。但是该方法中，纯化单克隆抗体的收率极低。因此，通过对进行了 1-2 次硫酸铵分级法的粗提纯单克隆抗体进行至少一种、优选两种选自凝胶过滤法、离子交换色谱法、亲和层析法等的方法，可以以高收率获得高纯度纯化的单克隆抗体。硫酸铵盐析法与其它方法的组合和顺序有：a) 硫酸铵盐析法-离子交换色谱法-凝胶过滤法、b) 硫酸铵盐析法-离子交换色谱法-亲和层析法、c) 硫酸铵盐析法-凝胶过滤法-亲和层析法等，为了高纯度且高收率获得单克隆抗体，特别优选上述 c) 的组合。

30 作为简便的纯化方法，可以利用市售的单克隆抗体纯化试剂盒(例如 MabTrap GII 试剂盒；Pharmacia)等。

上述所得单克隆抗体对人 oculospanin 具有高的抗原特异性。

(h) 单克隆抗体的检定

上述所得单克隆抗体的同型和亚类的确定可如下进行。首先鉴定法有乌赫特朗尼氏法 (Ouchterlony)、ELISA 法或 RIA 法。乌赫特朗尼氏法简便, 但单克隆抗体浓度低时需要浓缩操作。而采用 ELISA 法或 RIA 法时, 将培养上清直接与吸附有抗原的固相反应, 再使用作为第二抗体的与各种免疫球蛋白同型、亚类对应的抗体, 由此可以鉴定单克隆抗体的同型、亚类。另外, 作为更简便的方法, 还可以利用市售的鉴定用试剂盒(例如 Mouse Typer kit; BioRad 制造)等。

蛋白质的定量可通过由福林-酚试剂法、以及 280 nm 下的吸光度[1.4(OD280)=免疫球蛋白 1 mg/ml]计算的方法进行。

(3) 人源化抗人 oculospanin 抗体的制备

免疫球蛋白 G (以下简称为“IgG”)由各 2 条分子量约为 23000 的轻多肽链(以下称为“轻链”)、分子量约为 50000 的重多肽链(以下称为“重链”)构成。重链、轻链都具有保留有含约 110 个残基的氨基酸序列的区的重复结构, 这些构成 IgG 的立体结构的基本单元(以下称为“结构域”)。重链和轻链分别由连续的 4 个和 2 个结构域构成。重链、轻链中, 氨基末端的结构域与其它的结构域相比, 各抗体分子间的氨基酸序列的变异大, 将该结构域称为可变域(以下称为“V 结构域”)。IgG 的氨基末端中, 重链、轻链的 V 结构域互补性结合, 形成可变区。而其它的结构域整体形成恒定区。各种动物种的恒定区都具有特征性序列, 例如小鼠 IgG 的恒定区与人 IgG 的恒定区不同, 因此小鼠 IgG 在人的免疫系统内被识别为异物, 结果, 发生人抗小鼠抗体(以下称为“HAMA”)应答(参照 Schrof 等., Cancer Res., 45, 879-85 (1985))。因此, 小鼠抗体不能反复施用于人。为将这样的抗体施用于人, 需要在保持抗体特异性的同时, 对抗体分子进行修饰, 以便不发生 HAMA 应答。

X 射线晶体结构分析结果表明: 通常, 上述结构域的结构是: 含有 3-5 条 β 链的反平行 β 片层双层重叠, 形成长圆筒状。可变区中, 重链、轻链的 V 结构域分别各集成 3 个环, 形成抗原结合部位。该各环被称为互补决定区(以下称为“CDR”), 其氨基酸序列的变异最显著。可变区 CDR 以外的部分通常具有保持 CDR 的结构的作用, 被称为“支架”。Kabat 等人收集众多重链、轻链的可变区的一级序列,

根据序列的保守性,制成了将一级序列分类为 CDR 和支架的表(Kabat 等, SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A.). 并将各支架分类为氨基酸序列具有共通特征的多个亚群。还发现人与小鼠之间存在对应的支架。

5 由上述 IgG 的结构特征有关的研究,人们提出以下的人源化抗体的制备方法。

研究初期阶段,人们提出了将来自小鼠抗体的可变区与来自人的恒定区连接而成的嵌合抗体(参照 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984)). 但是,这样的嵌合抗体依然含有很多非人氨基酸残基,因此在特别长时间施用,可能诱导 HAMA 应答(参照 Begent 10 等., Br. J. Cancer, 62, 487, (1990)).

关于进一步减少有可能对人表达 HAMA 应答的来自非人哺乳动物的氨基酸残基的方法,有人提出了只将 CDR 部分整合到来自人的抗体中的方法(参照 Nature, 321, 522-525, (1986)), 但通常为了对抗原 15 保持免疫球蛋白活性,只移植 CDR 是不够的。

另一方面, Chothia 等人采用 X 射线晶体结构分析数据,于 1987 年发现了:

(i) CDR 的氨基酸序列中存在与抗原直接结合的部位和保持 CDR 自身结构的部位, CDR 的立体结构被分类为多种典型的模式(规范结 20 构);

(ii) 规范结构的分类不仅由 CDR, 也由支架部分特定位置的氨基酸种类确定(参照 J. Mol. Biol., 196, 901-917, (1987))。

根据以上认识,采用 CDR 移植法时,除 CDR 的序列之外,一部分支架的氨基酸残基也显示了移植到人抗体中的必要性(参照日本特表 25 平 4-502408 号)。

通常,具有要移植 CDR 的来自非人哺乳动物的抗体被定义为“供体”,移植 CDR 的一侧的人抗体被定义为“受体”,本发明也依从该定义。

实施 CDR 移植法时要考虑的是尽可能保留 CDR 的结构,保持免疫球蛋白分子的活性。为了实现该目的,需要注意以下两点:

(i) 选择属于哪一种亚群的受体;

(ii) 从供体的支架中选择哪一种氨基酸残基。

Queen 等人提倡：当供体支架的氨基酸残基符合以下基准的至少其中之一时，该氨基酸与 CDR 序列一起移植到受体的设计方法(参照日本特表平 4-502408)。

5 (a) 受体的支架区中的氨基酸在其位置上为稀少，供体的对应的氨基酸在受体的上述位置上为普通。

(b) 该氨基酸紧邻一个 CDR。

(c) 在立体免疫球蛋白模型中，该氨基酸在 CDR 的约 3Å 以内具有支链原子，并且可与抗原或与人源化抗体 CDR 相互作用。

10 编码本发明的抗人 oculospanin 单克隆抗体的重链或轻链的 DNA 如下获得：由生产上述抗人 oculospanin 单克隆抗体的杂交瘤细胞制备 mRNA，通过反转录酶将该 mRNA 转换为 cDNA，然后分别分离编码该抗体的重链或轻链的 DNA。

15 进行 mRNA 提取时，可以采用硫氰酸胍·热酚法、硫氰酸胍-盐酸胍法等，优选硫氰酸胍·氯化铯法。由细胞制备 mRNA，则通过以下的方法实施：首先制备总 RNA，使用低聚(dT)纤维素或低聚(dT)胶乳珠等 Poly(A)⁺RNA 纯化用载体，由该总 RNA 进行纯化的方法；或者使用该载体，由细胞溶胞产物直接纯化的方法。总 RNA 的制备方法可以采用碱蔗糖密度梯度离心法[参照 Dougherty, W. G. and Hiebert, E. (1980) *Virology* 101, 466-474]、硫氰酸胍·酚法、硫氰酸胍·三氯化铯法、苯酚·SDS 法等，优选使用硫氰酸胍和氯化铯的方法[参照 Chirgwin, J. M.,等. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299]。

20 可以以如上得到的 Poly(A)⁺RNA 为模板，通过反转录酶促反应合成单链 cDNA 链，然后由该单链 cDNA 合成双链 cDNA。该方法可采用 S1 核酸酶法[参照 Efstratiadis, A.,等. (1976) *Cell*, 7, 279-288]、Gubler/Hoffmann 法[参照 Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) *Gene* 25, 263-269]、Okayama/Berg 法[参照 Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170]等，本发明中，优选以单链 cDNA 为模板进行聚合酶链反应(以下称为“PCR”)[参照 Saiki, R. K.,等. (1988) *Science* 239, 487-49]的所谓 RT-PCR 法。

30 将这样得到的双链 cDNA 整合到克隆载体中，将所得重组载体导入大肠杆菌等微生物中进行转化，可以以四环素抗性或胺苄青霉素抗性等为指标，选择转化体。大肠杆菌的转化可通过 Hanahan 法[参照

Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580], 即、向氯化钙、氯化镁或氯化铷共存而制备的感受态细胞中加入该重组 DNA 载体的方法实施。使用质粒作为载体时, 必须具有上述抗药性基因。也可以使用质粒以外的克隆载体、例如 λ 系的噬菌体等。

5 由上述得到的转化细胞株中选择具有编码目标抗人 *oculospanin* 单克隆抗体的各亚单元的 cDNA 的细胞株, 该方法可以采用例如下示的各种方法。由上述 RT-PCR 法特异性扩增目标 cDNA 时, 可以省略这些操作。

(a) 使用聚合酶链反应的方法

10 要了解目标蛋白质的氨基酸序列的全部或部分时, 则合成与该氨基酸序列的一部分对应的有义链和反义链的寡核苷酸引物, 将它们组合, 进行聚合酶链反应[参照 Saiki, R. K., 等. (1988) *Science* 239, 487-49], 扩增编码目标抗人 *oculospanin* 抗体重链或轻链亚单元的 DNA 片段。这里所使用的模板 DNA 例如可使用通过反转录酶促反应, 由
15 生产抗人 *oculospanin* 单克隆抗体的杂交瘤的 mRNA 合成的 cDNA。

这样制备的 DNA 片段可以利用市售的试剂盒, 直接整合到质粒载体中, 也可以将该片段用 ^{32}P 、 ^{35}S 或生物素等标记, 使用其作为探针, 进行集落杂交或噬菌斑杂交, 由此可以选择目标克隆。

20 例如, 研究本发明的抗人 *oculospanin* 单克隆抗体各亚单元的部分氨基酸序列的方法优选采用以下方法: 使用电泳或柱层析等周知的方法分离各亚单元, 然后利用自动蛋白质测序仪(例如岛津制备所(株)制造的 PPSQ-10)等, 分析各亚单元的 N 末端氨基酸序列。

由如上得到的目标转化细胞株采集编码抗人 *oculospanin* 单克隆抗体蛋白质各亚单元的 cDNA 的方法可按照公知的方法[参照 Maniatis, T., 等. (1982) in "*Molecular Cloning A Laboratory Manual*" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.]实施。例如可以通过从细胞中分离相当于载体 DNA 的组分, 从该质粒 DNA 中切取编码目标亚单元的 DNA 区来进行。

(b) 使用合成寡核苷酸探针的筛选方法

30 要了解目标蛋白质的氨基酸序列的全部或部分时(该序列可以是多个连续的特异性序列即可, 也可以是目标蛋白质的某一区), 合成与该氨基酸序列对应的寡核苷酸(此时可以采用参考密码子使用频率而推测

的核苷酸序列、或将推断的核苷酸序列组合的多个核苷酸序列，当为后者时，使其含有次黄嘌呤核苷，则可以减少其种类)，以此为探针(用³²P、³⁵S 或生物素等标记)，使其与变性固定有转化细胞株的 DNA 的硝基纤维素滤膜杂交，分选得到的阳性细胞株。

5 这样得到的 DNA 的序列的确定例如可通过 Maxam - Gilbert 的化学修饰测序法[参照 Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) in "Methods in Enzymology" 65, 499-576]或双脱氧核苷酸链终止法[参照 Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276]等来实施。

近年来，使用荧光染料的自动碱基序列确定系统得到普及(例如
10 PerkinElmer Japan 公司制造的测序机器人“CATALYST 800”和 373A 型 DNA 测序仪等)。

通过利用这样的系统，可以效率良好且安全地进行 DNA 核苷酸序列的确定操作。由这样确定的本发明的 DNA 的各核苷酸序列以及重链和轻链的各 N 末端氨基酸序列数据，可以确定本发明的单克隆抗
15 体的重链和轻链的全部氨基酸序列。

免疫球蛋白的重链和轻链都含有可变区和恒定区，可变区进一步含有互补决定区(以下称为“CDR”；重链·轻链各 3 处)以及与它们相邻连接的支架区(重链·轻链各 4 处)。

其中，恒定区的氨基酸序列与抗原的种类无关，在免疫球蛋白亚
20 类相同的抗体间是共通的。另一方面，已知可变区、特别是 CDR 的氨基酸序列是各抗体所特有的，通过对很多抗体的氨基酸序列数据进行比较研究，可知：CDR 的位置、支架序列的长度在属于相同亚群的抗体亚单元之间大致类似[参照 Kabat, E. A.,等. (1991) in "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. II": U.S. Department of
25 Health and Human Services]。因此例如通过将抗人 oculospanin 单克隆抗体的抗体重链和轻链的各氨基酸序列与它们公知的氨基酸序列数据进行比较，可以确定各氨基酸序列中的 CDR 或支架区和恒定区的位置。已知 FRH₁、即重链最 N 末端一侧的支架区的链长比常规(30 个氨基酸)短，例如该支架区有最小为 18 个氨基酸的例子[参照前述的
30 Kabat 等人的文献]。因此，本发明的抗体中，在无损抗人 oculospanin 抗体的机能的条件下，重链 N 末端的支架区的链长可以为 18 个氨基酸或以上、30 个氨基酸或以下，优选 30 个氨基酸。

对与上述确定的轻链或重链的各 CDR 相同的氨基酸序列、或者具有其中连续的部分氨基酸序列的肽进行人工改性操作, 使该 CDR 接近在抗人 oculospanin 抗体分子中形成的立体结构, 由此可以单独使其具有与人 oculospanin 的结合活性[例如参照美国专利第 5331573 号公报]。因此, 这样的经改性的、与 CDR 相同的氨基酸序列、或具有其中连续的部分氨基酸序列的肽也包含在本发明的分子中。

制备使氨基酸序列中的任意一个或两个或以上的氨基酸缺失而得到的变异体时, 可以按照盒式突变法[参照岸本利光、“新生化学实验讲座 2·核酸 III 重组 DNA 技术” 242-251]等进行。

上述各种 DNA 例如可以按照磷酸三酯法[Hunkapiller, M.,等. (1984) Nature 310, 105-111]等常规方法, 通过核酸的化学合成来制备。所需氨基酸的密码子是公知的, 其选择可以随意, 例如, 可以考虑所使用的宿主的密码子的使用频率, 按照常规方法确定。这些核苷酸序列密码子的部分变异可以按照常规方法、通过利用含有编码所需变异的合成寡核苷酸的引物进行的位点专一性诱变导入法(位点专一诱变法)[参照 Mark, D.F.,等. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666]等进行。

某种 DNA 是否与编码本发明的抗人 oculospanin 单克隆抗体的重链或轻链的 DNA 杂交, 这例如可以照随机引物法[参照 Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132, 6-13]或切口平移法[参照 Maniatis, T.,等. (1982) in "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.]等, 使用用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 等标记的探针 DNA, 通过下述的实验来研究该 DNA。

首先, 将要研究的 DNA 吸附于例如硝基纤维素膜或尼龙膜等上, 再根据需要进行碱变性等处理, 然后通过加热或紫外线等固相化。将该膜浸于含有 $6\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$ 为 0.15 M 氯化钠、 0.015 M 柠檬酸三钠溶液)和 5% Denhardt 溶液、 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)的预杂交溶液中, 在 55°C 保温 4 小时或以上, 然后将之前制备的探针加入到同样的预杂交溶液中, 使最终比活性为 $1\times 10^6\text{ cpm/ml}$, 在 60°C 保温过夜。然后将膜在室温下用 $6\times\text{SSC}$ 洗涤 5 分钟, 将该操作重复多次, 再用 $2\times\text{SSC}$ 洗涤 20 分钟, 然后进行放射自显影。

利用上述的方法, 可以由任意的 cDNA 文库或基因组文库分离与

编码本发明的人源化抗人 oculospanin 抗体的重链或轻链的 DNA 杂交的 DNA [参照 Maniatis, T., 等. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.]。

5 通过将如上得到的各 DNA 分别整合到各表达载体中, 可以导入原核生物或真核生物宿主细胞中, 可使各基因在这些宿主细胞中表达。表达方法可以按照与上述[5. 抗人 oculospanin 抗体的制备]项中的“(1) 抗原的制备”的方法相同的方法进行。

10 在转化体的细胞内或细胞外生产的、含有抗人 oculospanin 抗体蛋白质的组分可以通过利用该蛋白质的物理性质或化学性质等的各种公知的蛋白质分离操作法进行分离、纯化。所述方法具体例如可采用由通常的蛋白质沉淀剂进行的处理, 超滤, 分子筛色谱(凝胶过滤)、吸附色谱、离子交换色谱、亲和层析、高效液相色谱(HPLC)等各种色谱, 透析法以及它们的组合等。

15 为了将抗人 oculospanin 小鼠单克隆抗体人源化, 必须设计可变区的氨基酸序列, 使所确定的 CDR 序列全体和 FR 序列的一部分氨基酸残基移植到人抗体中。该设计按照以下的方法进行。

以往, 进行人源化设计时, 受体的亚群的选择指针选择需要考虑以下两点:

20 a) 几乎直接使用具有天然的氨基酸序列的公知的人抗体的重链、轻链的天然组合、

b) 保留重链、轻链所属的亚群的组合, 但重链、轻链分别使用来自不同的人抗体, 与供体的重链、轻链氨基酸序列的相同性高的氨基酸序列或共有序列。

25 本发明中, 可以按照上述进行, 但也可以采用与其不同的 c) 的方法。

30 c) 不考虑亚群的组合, 从人抗体的一级序列文库中选择与供体 FR 相同性最高的重链、轻链的 FR。通过这些选择方法, 供体和受体之间的 FR 部分的氨基酸的相同性至少可以为 70%或以上。通过采用该方法, 可以更减少由供体移植的氨基酸残基的数, 可以减少 HAMA 应答诱导。

对于由抗体分子的一级序列预测三级结构的操作(以下将该操作称为“分子建模”), 其预测精度是有限度的, 对于该供体所属的亚群中

仅偶尔出现的氨基酸残基的作用无法充分确定。按照 Queen 等人的方法，判断在所述位置上应选择供体、受体哪一种的氨基酸残基，这通常是困难的。c)的选择法可以显著减少这样进行判断的情况。

5 本发明人通过提供用于鉴定来自供体的 FR 的氨基酸的新型方法，可进一步改良该人源化方法。其中，所述来自供体的 FR 的氨基酸对于保持供体的 CDR 的结构和机能很重要。

选择了轻链和重链各自的人受体分子之后，选择由供体的 FR 移植的氨基酸残基的方法如下所示。

10 将供体和受体的氨基酸序列并列比较，当在两者的 FR 相应的位置上氨基酸残基不同时，必须决定要选择哪一种残基，该选择中，必须在无损来自供体的 CDR 的立体结构的条件下进行选择。

Queen 等人在上述日本特表平 4-502408 号中提倡：FR 上的氨基酸残基符合以下要件的至少其中之一时，要将该氨基酸残基与 CDR 序列一起移植到受体的方法：

15 1) 受体的人 FE 区中的氨基酸在该位置较少，供体所对应的氨基酸在受体的上述位置为普通；

2) 该氨基酸紧邻一个 CDR；

3) 在立体免疫球蛋白模型中，预测该氨基酸可以在 CDR 的约 3Å 以内具有支链原子，并且可以与抗原或人源化抗体 CDR 相互作用。

20 这里，2)所示的残基常显示 3)的性质，因此本发明中，要删除该 2)的要件，另外新设置 2 种要件。即，本发明中，对于与 CDR 一起移植的供体的 FR 上的氨基酸残基，当为

a) 受体的 FR 中的氨基酸在该位置为稀少，供体的该对应的氨基酸在该位置为普通；

25 b) 在立体结构模型中，可以预想该氨基酸与 CDR 的构成氨基酸原子和抗原或要移植的 CDR 环相互作用；

c) 该位置是规范分类决定残基；

d) 该位置构成重链和轻链的接触面；

时，可以由供体的 FR 移植该氨基酸残基。

30 a)的要件中，按照上述 Kabat 的表，对于相同亚类的抗体，将在该位置以 90%或以上的频率出现的氨基酸定义为“普通”，将以低于 10%的频率出现的氨基酸定义为“稀少”。

c)的要件中,对于是否是“该位置为规范分类决定残基”,可以按照上述 Chothia 的表决定。

关于 b)、d)的要件,必须预先进行抗体可变区的分子建模。关于分子建模用软件,只要是市售的,可以采用任何一种,可优选使用 AbM(Oxford Molecular Limited 公司制造)。

分子建模的预测精度是有一定限度的,因此,本发明中,通过参照各种抗体可变区的 X 射线结晶分析的实验结果,将由分子建模得到的结构预测的准确度分为 2 个阶段。

本发明中,在由 AbM 等分子建模软件构建的可变区的立体结构中,两个原子间的距离比各自的范德瓦尔斯半径的和再加上 0.5\AA 的值还短时,则推定该两个原子间为范德瓦尔斯接触。主链和支链的酰胺氮、羰基氧等极性原子间距离比氢键的平均距离 2.9\AA 再加上 0.5\AA 的距离还短时,可以推定它们之间存在氢键。并且,具有相反的电荷的原子间比 2.85\AA 再加上 0.5\AA 的距离短时,可以推定它们之间形成离子对。

另一方面,由各种抗体可变区的 X 射线晶体结构分析的实验结果可知:与亚群无关,可见与 CDR 高频率接触的 FR 上的位置在轻链上特定为 1、2、3、4、5、23、35、36、46、48、49、58、69、71、88 号的位置,在重链上为 2、4、27、28、29、30、36、38、46、47、48、49、66、67、69、71、73、78、92、93、94、103 号的位置(数字均表示前述 Kabat 等人的文献中定义的氨基酸序号。以下也同样)。适用与分子建模同样的基准时,在公知的三分之二的抗体可变区中可见这些位置的氨基酸残基与 CDR 的氨基酸残基的接触。基于以上认识,b)的“在立体结构模型中,可以预想该氨基酸与 CDR 的构成氨基酸原子和抗原或要移植的 CDR 环的相互作用”是指以下的要件。

分子建模中,可预见 FR 和 CDR 具有接触的可能性的 FR 的位置与 X 射线晶体分析中高频率检测出 FR 和 CDR 的接触的任何位置一致时,则供体的氨基酸残基的移植优先。

除此之外,不考虑该要件 b)。

d)的“该位置构成重链和轻链的接触面”是指以下的要件。由各种抗体可变区的 X 射线晶体结构分析的实验结果可知:在轻链上 36、38、43、44、46、49、87、98 号的氨基酸残基,在重链上 37、39、45、

47、91、103、104 号的氨基酸残基可见进行高频率的重链-轻链之间的接触。分子建模中，可预见重链-轻链之间接触的可能性、且其位置与上述的任意位置一致时，则供体的氨基酸残基的移植优先。除此以外的情况不考虑该要件 d)。

5 编码本发明的人源化抗人 oculospanin 抗体的重链和轻链可变区的 DNA 可通过以下的方法制备。

例如，化学合成含有 60-70 个核苷酸的该 DNA 的部分核苷酸序列的多个多核苷酸片段，使其在有义侧和反义侧互相不同，然后将各多核苷酸片段退火，通过 DNA 连接酶结合，可得到具有编码所需人源化抗人 oculospanin 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA 的 DNA。

其它方法还有：从人淋巴细胞中分离编码受体可变区的全部氨基酸序列的 DNA，按照本领域所周知的方法对编码 CDR 的区进行核苷酸置换，导入限制酶切序列。用相应的限制酶切断该区，然后合成编码供体 CDR 的核苷酸序列，通过 DNA 连接酶结合，可得到具有编码所需人源化抗人 oculospanin 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA。

本发明中，优选以下所述的重叠延伸 PCR 法(Horton 等., Gene, 77, 61-68, (1989))，可得到具有编码所需人源化抗人 oculospanin 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA。

即，将分别编码要连接的 2 种氨基酸序列的 2 种 DNA 作为(A)和(B)。化学合成在(A)的 5'一侧退火的 20-40 个核苷酸的有义引物(以下，将该引物称为(C))、和在(B)的 3'一侧退火的 20-40 个核苷酸的反义引物(以下，将该引物称为(D))。再将(A)的 3'一侧的 20-30 个核苷酸和在(B)的 5'一侧的 20-30 个核苷酸连接，合成嵌合型有义引物(以下将该引物称为(E))和与其互补的反义引物(以下将该引物称为(F))。以含有(A)的适当的载体 DNA 为底物，通过进行使用有义引物(C)和嵌合型反义引物(F)的 PCR，可得到(A)的 3'末端附加有(B)的 5'末端一侧的 20-30 个核苷酸的 DNA (将该新得到的 DNA 称为(G))。同样，以含有(B)的适当的载体 DNA 为底物，通过进行使用反义引物(D)和嵌合型有义引物(E)的 PCR，可得到(B)的 5'末端附加有(A)的 3'末端一侧的 20-30 个核苷酸的 DNA (将该新得到的 DNA 称为(H))。这样得到的(G)和(H)在(G)的 3'一侧的 40-60 个核苷酸和(H)的 5'一侧的 40-60 个核苷酸中保持互补的核苷酸序列。将扩增的(G)和(H)混合进行 PCR 时，

在第 1 次的变性反应中, (G)和(H)成为单链, 之后的退火反应中, 几乎所有的 DNA 都恢复原状, 但一部分 DNA 在互补的核苷酸序列区形成退火的杂 DNA 双链。之后的延伸反应中, 突出的单链部分得到修复, 可得到(A)与(B)连接的嵌合型 DNA (以下将该 DNA 称为(I))。再
5 以该(I)为底物, 使用有义引物(C)和反义引物(D)进行 PCR, 由此可扩增(I)。本发明中, 可以将编码抗人 oculospanin 单克隆抗体的重链和轻链的 CDR 区的 DNA 和编码人免疫球蛋白 IgG 的 FR 区的 DNA、以及编码人免疫球蛋白 IgG 的分泌信号的 DNA 分别作为(A)和(B)一个个进行上述的连接反应。

10 所需的氨基酸的密码子是公知的, 其选择也可以是任意的, 例如可以考虑所使用的宿主的密码子的使用频率, 按照常规方法确定。这些核苷酸序列密码子的一部分变异可以按照常规方法, 利用含有编码所需变异的合成寡核苷酸的引物, 根据位点专一突变(参照 Mark, D.F., 等.(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666)等进行。因此, 化学合成各引物时, 通过预先导入点突变设计各引物, 可以得到编码所需
15 抗人 oculospanin 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA。

将这样得到的本发明的各 DNA 分别整合到表达载体中, 由此可转化原核生物或真核生物。并且, 通过向这些载体导入适当的启动子和表现型有关的序列, 可以使各基因在各宿主细胞中表达。

20 通过上述方法, 可以容易地以高收率、高纯度制备重组抗人 oculospanin 抗体。

(4) 抗人 oculospanin 完全人抗体的制备

完全人抗体是指只具有来自人的染色体的抗体的基因序列的人抗体。抗人 oculospanin 完全人抗体可以采用以下方法获得: 使用人抗体生成小鼠的方法, 其中所述人抗体生成小鼠具有含人抗体 H 链和 L
25 链的基因的人染色体片段(参照 Tomizuka, K.等., Nature Genetics, 16, p.133-143, 1997; Kuroiwa, Y.等., Nuc. Acids Res., 26, p.3447-3448, 1998; Yoshida, H.等., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K.等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 722-727, 2000 等)、获得从人抗体文库选择的来自噬菌体展示的人抗体的方法(参照 Wormstone, I. M.等., Investigative
30

Ophthalmology & Visual Science. 43(7), p.2301-8, 2002; Carmen, S.等., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 1 (2), p.189-203, 2002; Siriwardena, D.等., Ophthalmology, 109(3), p.427-431, 2002 等).

5 验证这样制备的重组抗人 **oculospanin** 抗体与人 **oculospanin** 特异性结合的方法例如优选与对小鼠免疫时进行的抗体效价评价同样的 **ELISA** 法。

6. 含有抗人 **oculospanin** 抗体的药物

10 由按照上述的“5. 抗人 **oculospanin** 抗体的制备”项中记载的方法得到的抗人 **oculospanin** 抗体中可以得到中和人 **oculospanin** 生物活性的抗体或特异性毒害表达人 **oculospanin** 的癌细胞的抗体。这些抗体抑制生物体内的人 **oculospanin** 的生物活性、即抑制细胞的癌化，因此可以作为药物、特别是作为癌症治疗剂使用。体外的抗人 **oculospanin** 抗体导致的人 **oculospanin** 生物活性中和的活性例如可以通过过量表达人 **oculospanin** 的细胞中的癌化抑制活性来测定。例如，可以对过量表达人 **oculospanin** 的小鼠成纤维细胞株 **NIH3T3** 进行培养，以各种浓度向培养系中添加抗人 **oculospanin** 抗体，测定对转化灶形成、集落形成和球形增殖的抑制活性。体外的抗人 **oculospanin** 抗体导致的癌细胞的毒活性例如可通过抗人 **oculospanin** 抗体对过量表达人 **oculospanin** 的细胞所显示的抗体依赖性细胞毒活性、补体依赖性细胞毒活性或补体依赖细胞介导性毒活性测定。例如对过量表达人 **oculospanin** 的 **293T** 细胞进行培养，以各种浓度向培养系中添加抗人 **oculospanin** 抗体，再添加小鼠脾细胞，测定培养适当的时间后对人 **oculospanin** 过量表达细胞的细胞死亡诱导率。利用实验动物的体内抗人 **oculospanin** 抗体对癌的治疗效果例如可以将该抗人 **oculospanin** 抗体施用过量表达人 **oculospanin** 的转基因动物，测定癌细胞的变化。

30 这样得到的中和人 **oculospanin** 生物活性的抗体或特异性毒害表达人 **oculospanin** 的癌细胞的抗体可用作药物、特别是以癌症治疗为目的的药物组合物，或者用作上述疾病的免疫学诊断的抗体。癌的种类优选皮肤癌或皮肤癌的一种——黑素瘤，但不限于这些。

本发明也提供药物组合物，该药物组合物含有治疗有效量的抗人 ocuospanin 抗体与药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或助剂。

5 本发明的药物组合物中可接受的制剂所用的物质优选施用量、施用浓度对于被施用药物组合物者为非毒性。

10 本发明的药物组合物可以含有用以改变、维持或保持 pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、颜色、灭菌性、稳定性、溶解率、释放率、吸收率、渗透率的制剂用物质。制剂用物质可例举以下：甘氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸等氨基酸类，抗菌剂，抗坏血酸、硫酸钠或亚硫酸氢钠等抗氧化剂，磷酸、柠檬酸、硼酸缓冲液、碳酸氢盐、Tris-盐酸溶液等缓冲剂，甘露醇、甘氨酸等填充剂，乙二胺四乙酸(EDTA)等螯合剂，咖啡因、聚乙烯吡咯烷、 β -环糊精、羟丙基- β -环糊精等络合剂，葡萄糖、甘露糖或糊精等增量剂，单糖类、二糖类、葡萄糖、甘露糖或糊精等其他碳水化合物，着色剂，15 芳香剂，稀释剂，乳化剂，聚乙烯吡咯烷等亲水聚合物，低分子量多肽、盐形成离子对、苯扎氯胺、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙烯基醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、chlorhexidine、山梨酸或过氧化氢等防腐剂，甘油、丙二醇或聚乙二醇等溶剂，甘露醇或山梨醇等糖醇，悬浮剂，PEG，脱水山梨醇酯、聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80 等聚山梨醇酯，Triton、氯丁三醇(tromethamine)、卵磷脂或胆甾醇等表面活性剂，蔗糖、山梨醇等稳定剂，氯化钠、氯化钙、甘露糖醇-山梨糖醇等弹性增强剂，输送剂，稀释剂，赋形剂和/或药25 学上的助剂。这些制剂用的物质的添加量优选相对于抗人 ocuospanin 抗体的重量为 0.01-100 倍、特别优选 0.1-10 倍添加量。制剂中的优选的药物组合物的组成可由本领域技术人员根据适用疾病、适用施用形式等适当决定。

30 药物组合物中的赋形剂或载体可以是液体，也可以是固体。适当的赋形剂或载体可以是通常用于注射用水或生理盐水、人工脑脊髓液或非经口施用的其它物质。也可以将中性的生理盐水或含有血清白蛋白的生理盐水用作载体。药物组合物中可以含有 pH 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液或 pH 4.0-5.5 的乙酸缓冲液或山梨醇或其它化合物。本发明的药物组合物可以以所选择的组成、以所需的纯度、以适当的药剂形式、

以冻干品或液体储备。含有抗人 *oculospanin* 抗体的药物组合物可以以使用蔗糖等适当的赋形剂制成冻干品的形式成型。

本发明的药物组合物可以制备成非经口施用，也可以制备成经口的消化道吸收用。制剂的组成和浓度可由施用方法决定，本发明的药物组合物中所含的抗人 *oculospanin* 抗体对人 *oculospanin* 的亲合性、即对于与人 *oculospanin* 的解离系数(Kd 值)，亲合性越高(Kd 值低)，则可减少对人的给药量，越可发挥药效，因此基于该结果，可以确定本发明的药物组合物对人的给药量。在将人型抗人 *oculospanin* 抗体施用于人时，给药量可以是在 1-30 天每天施用 0.1-100 mg/kg。

本发明的药物组合物的形式有：包括输液在内的注射剂、栓剂、经鼻剂、舌下剂、透皮吸收剂等。

7. 直接相互作用的物质的探讨

本发明的另外一个实施方案包含：为了获得抑制人 *oculospanin* 活动的物质而以该蛋白质的立体结构为基础进行药物设计的方法。这样的方法作为合理性药物设计法而为人所知，可用于高效抑制或活化酶活性等的机能，与配体、辅助因子、或 DNA 的结合等的化合物的探索。已知这样的例子有已经上市的抗 HIV 剂——蛋白酶抑制剂。对于本发明的人 *oculospanin* 的立体结构分析，可以利用 X 射线结晶分析或核磁共振法等通常已知的方法。并且为了探索抑制人 *oculospanin* 机能的物质，也可以进行利用计算机药物设计(CADD)的设计。已知其例子有：有望作为慢性关节类风湿治疗的新型基因新药的、抑制 AP-1 的功能的低分子化合物(国际专利申请公开 WO99/58515 号)等。通过这样的方法，通过与人 *oculospanin* 直接结合、或者抑制人 *oculospanin* 与其它因子的相互作用，可获得抑制人 *oculospanin* 机能的物质。

另一种实施方案涉及伴随本发明的人 *oculospanin* 的多肽、即人 *oculospanin* 的伙伴蛋白。即，本发明涉及调节人 *oculospanin* 活性的伙伴蛋白的筛选。

该筛选方法的一个方案包含：使受试蛋白试样与人 *oculospanin* 接触，选择与人 *oculospanin* 结合的蛋白质的步骤。这样的方法例如有：使用纯化的人 *oculospanin*，进行与其结合的蛋白质的亲和纯化的方法。以下例举一个具体方法的例子：以含有 6 个组氨酸的序列作为

亲和标志，与人 *oculospanin* 融合，将其与细胞提取液(预先用镍-琼脂糖柱置换，取直接通过该柱的组分)在 4℃温育 12 小时，然后向该混合物中另行加入镍-琼脂糖载体，在 4℃温育 1 小时。用清洗缓冲液充分洗涤镍-琼脂糖，然后加入 100 mM 咪唑，使与人 *oculospanin* 特异性结合的细胞提取液中的蛋白质溶出并纯化，确定其结构。这样，直接与人 *oculospanin* 结合的蛋白质，以及不具有与人 *oculospanin* 的结合活性、但其亚单元直接与人 *oculospanin* 结合的蛋白质形成复合体，可以纯化间接与人 *oculospanin* 结合的蛋白质[实验医学别册、生物手册系列 5 “转录因子研究法” 215-219 页 (羊土社发行)]。

另外一种方法可以通过 Far-Western 印迹法[实验医学别册、“新基因工学手册” 76-81 (羊土社发行)]或使用酵母或哺乳类动物的双杂交系统法[实验医学别册、“新基因工学手册” 66-75 (羊土社发行)；“Checkmate 哺乳动物双杂交系统”(Promega 公司制造)]进行克隆，但并不限于这些方法。

这样，如果可以得到与人 *oculospanin* 直接或间接相互作用的伙伴蛋白的 cDNA，则可用于抑制人 *oculospanin* 与该伙伴蛋白的相互作用的物质的功能性筛选。具体来说，例如制备人 *oculospanin* 与谷胱甘肽硫转移酶的融合蛋白，使其与用抗谷胱甘肽硫转移酶抗体包裹的微孔板结合，然后，使生物素化的该伙伴蛋白与该融合蛋白接触，通过链霉亲和素蛋白化碱性磷酸酶检测与该融合蛋白的结合。添加生物素化的该伙伴蛋白时，也添加受试物质，选择促进或抑制融合蛋白与该伙伴蛋白结合的物质。该方法可以获得与融合蛋白直接作用的物质或与该伙伴蛋白直接作用的物质。

融合蛋白与该伙伴蛋白的结合是间接的，当有任何的其它因子介入时，例如在含有该因子的细胞提取液存在下，同样地进行上述测试。这种情况下，也可以用于与该因子作用的物质的选择。

所得伙伴蛋白具有抑制人 *oculospanin* 的机能的活性时，可以按照已述的应用人 *oculospanin* 基因的表达载体的实验方法，进行抗癌剂、例如可用于前列腺癌的治疗剂的候选物质的筛选。所得伙伴蛋白具有抑制人 *oculospanin* 的机能的活性时，具有编码上述抑制因子的核苷酸序列的多核苷酸可以用于癌基因治疗。

这样的多核苷酸例如可如下获得：分析经鉴定的抑制因子的氨基

酸序列，合成含有编码该氨基酸序列的核苷酸序列的寡核苷酸探针，进行 cDNA 文库或基因组文库的筛选。另外，具有人 oculospanin 机能抑制活性的肽来自随机合成的人工肽文库时，可以化学合成含有编码该肽的氨基酸序列的核苷酸序列的 DNA。

5 基因治疗中，将编码这样得到的抑制因子的基因整合到例如病毒载体中，使具有该重组病毒载体的病毒(无毒化处理)感染患者。患者体内产生抗癌基因，具有癌细胞增殖的抑制机能，因此可以治疗癌症。

10 将基因治疗剂导入细胞内的方法可以适用利用病毒载体的基因导入方法、或非病毒性基因导入方法(日经科学、1994 年 4 月号，20-45 页、实验医学增刊，12 (15) (1994))的任何方法。

15 通过病毒载体导入基因的方法例如有：反转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、痘苗病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒、辛德毕斯病毒等 DNA 病毒或 RNA 病毒中整合并导入编码抑制因子或其突变体的 DNA 的方法。其中特别优选使用反转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、痘苗病毒的方法。非病毒性的基因导入方法有：将表达质粒直接施用于肌肉内的方法(DNA 疫苗法)、脂质体法、脂转染法、微量注射法、磷酸钙法、电穿孔法等，其中，特别优选 DNA 疫苗法、脂质体法。

20 为了使基因治疗剂实际发挥药物作用，有将 DNA 直接导入体内的体内法和由人取得某种细胞，在体外将 DNA 导入该细胞，将该细胞重新植回体内的来自体内的离体实验法(日经科学，1994 年 4 月号，20-45 页，月刊药事，36(1)，23-48 (1994)、实验医学增刊，12 (15) (1994))。

25 例如该基因治疗剂通过体内法施用，可根据疾病、症状等，由静脉、动脉、皮下、皮内、肌内等适当的施用途径施用。体内法施用，该基因治疗剂通常制成注射剂等，也可以根据需要加入常用的载体。制成脂质体或膜融合脂质体(仙台病毒-脂质体)的形式时，可制成混悬剂、冷冻剂、离心浓缩冷冻剂等脂质体制剂。

30 与序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列或与该序列的部分序列互补的核苷酸序列可用于所谓的反义治疗。反义分子可以使用与序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的一部分互补、通常含有 15-30 mer 的 DNA，或者其硫代磷酸酯、磷酸甲酯或吗

5 淋并衍生物等稳定的 DNA 衍生物, 2'-O-烷基 RNA 等稳定的 RNA 衍生物。通过进行微量注射、脂质体胶囊化, 或者利用具有反义序列的载体使其表达等本发明的技术领域周知的方法, 可将这样的反义分子导入到细胞中。这样的反义疗法对于因序列 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列所编码的蛋白质的活性增加过多而引起的疾病的治疗有效。

可用于含有上述反义寡核苷酸的药物的组合物可通过医药上可接受的载体的混合等公知的方法制备。这样的载体和制备方法的例子记载于 Applied Antisense Oligonucleotide Technology (1998 Wiley-Liss, Inc.)。含有反义寡核苷酸的制剂可以是其本身或与适当的药理学上可接受的赋型剂、稀释剂等混合, 通过片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂或糖浆剂等经口、或通过注射剂、栓剂、贴剂或外用剂等非经口施用。这些制剂可通过使用以下的添加剂, 按照周知的方法制备: 赋型剂(例如乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇等糖衍生物); 玉米淀粉、马铃薯淀粉、 α 淀粉、糊精等淀粉衍生物; 结晶纤维素等纤维素衍生物; 阿拉伯树胶; 葡聚糖; 普鲁兰等有机系赋型剂; 以及轻质硅酸酐、合成硅酸铝、硅酸钙、甲基硅铝酸镁等硅酸盐衍生物; 磷酸氢钙等磷酸盐; 碳酸钙等碳酸盐; 硫酸钙等硫酸盐等无机系赋型剂)、润滑剂(例如硬脂酸、硬脂酸钙、硬脂酸镁等硬脂酸金属盐; 滑石粉; 胶态二氧化硅; 蜂蜡、鲸蜡等蜡类; 硼酸; 己二酸; 硫酸钠等硫酸盐; 乙二醇; 富马酸; 苯甲酸钠; DL 亮氨酸; 月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁等月桂基硫酸盐; 硅酸酐、硅酸水合物等硅酸类; 以及上述淀粉衍生物)、粘剂(例如羟丙基纤维素、羟丙甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、以及与上述赋型剂同样的化合物)、崩解剂(例如低取代羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、内部交联羧甲基纤维素钠等纤维素衍生物; 羧甲基淀粉、羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮等化学改性淀粉、纤维素类)、乳化剂(例如膨润土、V 字胶等胶性粘土; 氢氧化镁、氢氧化铝等金属氢氧化物; 月桂基硫酸钠、硬脂酸钙等阴离子表面活性剂; 苯扎氯铵等阳离子表面活性剂; 以及聚氧乙烷基醚、聚氧乙烷脱水山梨醇脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等非离子表面活性剂)、稳定剂(对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等对羟基苯甲酸酯类; 氯丁醇、苧醇、苯乙醇等醇类; 苯扎氯铵; 苯酚、甲酚等

酚类；硫柳汞；脱氢乙酸；以及山梨酸)、矫味矫臭剂(例如通常使用的甜味剂、酸味剂、香料等)、稀释剂等。

将本发明的化合物导入患者的方法除上述之外还可以使用胶态分散系。胶态分散系有望获得提高化合物的体内恒定性的效果、将化合物高效地输送到特定的脏器、组织或细胞的效果。胶态分散系可以是通常使用的，对此并没有限定，例如有以高分子复合物、纳米囊、微球、珠、以及水包油系乳化剂、胶束、混合胶束和包括脂质体的以脂质为基质的分散系，优选具有将化合物高效地输送到特定的脏器、组织或细胞的效果的多个脂质体、人工膜的小囊(Mannino 等., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen 等., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698)。

0.2-0.4 μm 大小范围的单层脂质体可以包被相当大比例的含有巨大分子的水性缓冲液，化合物被该水性内膜包封，可以以生物学活性的形式输送到脑细胞中(Fraley 等., *Trends Biochem. Sci.*, 1981, 6, 77)。脂质体的组成通常是将脂质、特别是磷脂、尤其是相转变温度高的磷脂与 1 种或多种胆固醇复合而成。可用作生产脂质体的脂质的例子包含磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、鞘脂类、磷脂酰乙醇胺、脑苷脂和神经节苷脂等磷脂酰化合物。特别有用的是二酰基磷脂酰甘油，这里，脂质部分含有 14-18 个碳原子、特别是 16-18 个碳原子并饱和(14-18 个碳原子链的内部没有双键)。代表性的磷脂包含磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。

包括脂质体的胶态分散系的打靶可以是被动的或主动的任何形式。被动打靶可利用脂质体原本的向含有血窦的脏器的网状内皮系统细胞中分布的倾向来实现。另一方面，主动的打靶例如有：将病毒的蛋白质外壳(Morishita 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1993, 90, 8474)、单克隆抗体(或其适当的结合部分)、糖、糖脂或蛋白质(或其适当的寡肽片段)等特定的配体与脂质体结合；或者除天然存在的局部部位以外，为了实现向脏器或细胞型中分布而改变脂质体的组成，由此修饰脂质体的方法等。打靶的胶态分散系的表面可以以各种方法修饰。在由脂质体打靶的传递系统中，为了在与脂质的双分子层紧密相伴中保持目标配体，脂基可以被摄入到脂质体的脂质双分子层中。为

了使脂链与目标配体结合，可以使用各种连接基团。与在所需的细胞上明显地发现**有本发明的寡核苷酸的输出的特定细胞表面分子结合的目标配体**例如可以是(1) 与在所需的细胞中明显表达传输的特定的细胞受体结合的激素、生长因子或其适当的寡肽片段；或者(2) 与目标细胞上明显发现的抗原性表型特异性结合的多克隆或单克隆抗体、或其适当的片段(例如 Fab; F(ab')₂)。2种或更多种的生物活性剂可以在单一的脂质体内部复合并施用。也可以将提高内容物在细胞内的稳定性和/或打靶的药物追加到胶态分散系。

其使用量根据症状、年龄等而不同，经口施用**时，每次施用的下限为 1 mg (优选 30 mg)，上限 2000 mg (优选 1500 mg)**；注射时，可以通过皮下注射、肌肉注射或静脉注射施用每次的下限为 0.1 mg (优选 5 mg)，上限为 1000 mg (优选 500 mg)。

以下例举实施例，详细、具体地说明本发明，但本发明并不限于这些实施例。下述实施例中，如无特别说明，关于基因操作的各项操作按照“分子克隆(Molecular Cloning)”(Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., published by Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)记载的方法进行，或者使用市售的试剂或试剂盒时，按照市受品的说明书使用。

20 [实施例 1] 在癌细胞中特异性表达的基因的选别

对于具有与序列 SEQ ID NO.1 部分重复的核苷酸序列的 EST 探针(Affymetrix GeneChip HG-133 probe 223795_at: Affymetrix 公司制造)，使用 Genelogic 公司制的数据库(GeneExpress Software System Release 1.4.2)进行表达数据分析。

25 对各种细胞株内的人 *oculospanin* 基因的表达量进行比较，结果 8 例黑素细胞与其它细胞株群、即 12 例血细胞系细胞样本、6 例格利雅细胞株样本、62 例上皮系细胞样本比较，进行了显著高的转录(P 值依次 <0.0001、=0.0007、<0.0001、图 1 上)。

接着，对来自组织的样本中的人 *oculospanin* 基因的表达量进行比较。对 66 例健康人皮肤样本以及 33 例黑素瘤样本进行转录量的比较，结果黑素瘤样本进行了显著高的转录(P 值 <0.0001: 图 1 下)。另外，对 66 例健康人皮肤样本和 12 例来自黑素瘤样本中皮肤组织的样

本进行比较, 结果, 黑素瘤样本进行了显著高的转录(P 值=0.0007: 图 2 上)。

另一方面, 对 66 例健康人皮肤样本和 12 例来自黑素瘤样本中淋巴结组织的样本进行比较, 结果, 黑素瘤样本进行了显著高的转录(P 值=0.0003: 图 2 下)。

对 13 例来自健康人淋巴结的样本和 12 例来自黑素瘤样本中淋巴结组织的样本进行比较, 结果, 黑素瘤样本进行了显著高的转录(P 值=0.0011: 图 3)。

10 [实施例 2] 人 *oculospanin* 基因的获得和表达质粒的构建

a) PCR 反应

可根据常规方法合成具有 5'-CACCATGGAGGAGGGGGAGAGGCC-3' (引物 1: 序列 SEQ ID NO.5) 和 5'-GCCCCGGGCGGGTTTGGCAGCGG-3' (引物 2: 序列 SEQ ID NO.5) 的序列, 以此作为 PCR 扩增人 *oculospanin* cDNA 的引物。引物 1 是人 *oculospanin* 基因的起始密码子上游附加作为 Kozak 序列的、有 4 个碱基 CACC 寡核苷酸, 是由在含有序列 SEQ ID NO.1 的核苷酸编号 1-23 的核苷酸序列的 5' 一侧附加有 4 个碱基序列 (CACC) 的碱基序列形成的寡核苷酸。该 CACC 序列在向克隆载体中 pENTR/D-TOPO 整合时与载体 3' 末端形成互补链, 因此可以向保持基因的方向性的载体中整合。引物 2 是由含有序列 SEQ ID NO.1 的核苷酸编号 1043-1065 的核苷酸序列的互补链形成的寡核苷酸。

PCR 反应使用 PLATINUM *Pfx* DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司制备), 按照所附说明书进行。具体来说, 向 0.1 μ l 所得第一链 cDNA 中添加各 1.5 μ l 的 10 pmol/ μ l 浓度的合成引物 1 和合成引物 2、5 μ l 10X *Pfx* 扩增缓冲液、1.5 μ l 10 mM dNTP Mix、1 μ l 50 mM MgSO₄、0.5 μ l PLATINUM *Pfx* DNA 聚合酶、10 μ l 10X PCRx 增强子溶液、28.9 μ l 灭菌纯净水, 制备 50 μ l PCR 反应溶液。PCR 反应通过 Peltier Thermal Cycler TPC-200 DNA Engine (MJ Research 公司制造) 进行。首先在 94 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟, 然后继续在 94 $^{\circ}$ C 加热 30 秒, 在 65 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟, 将上述温度循环进行 5 次, 接着将 94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 40 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分 20 秒的温度循环进行 5 次, 接着再将 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 40 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分 20

秒的温度循环进行 5 次,接着将 94℃30 秒、50℃40 秒、68℃1 分 20 秒的温度循环进行 35 次,最后在 68℃保温 10 分钟,然后在 4℃保存。关于目标 cDNA,将反应物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,确认 NM_031945 cDNA(1069 bp)的扩增后,使用 S.N.A.P. UV-Free Gel Purification Kit (Invitrogen 公司制备),按照所附说明书,由琼脂糖凝胶纯化 DNA。关于纯化的 cDNA 的浓度,使用 1D 图像分析软件 3.5 版本(1D Image Analysis Software Version 3.5) (柯达数码科学(Kodak Digital Science)EDAS290: 柯达公司制造),以 1kb DNA Ladder (Invitrogen 公司制造)为浓度标准品进行测定。

10 b) 人 oculospanin cDNA 向 pENTR/D-TOPO 载体的克隆

使用 pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen 公司制造),按照所附说明书,将由实施例 2a)得到的 NM_031945 cDNA 克隆到 pENTR/D-TOPO 载体中。将 NM_031945 cDNA 与 pENTR/D-TOPO 载体混合,在室温下温育 30 分钟,其中 pENTR/D-TOPO 载体在试剂盒所附的反应缓冲液中与拓扑异构酶结合。使用所得的反应物转化 OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen 公司制备),在含有 50 µg/ml 卡那霉素的 LB 琼脂培养基上培养。结果,选择显示卡那霉素抗性并生长的大肠杆菌集落,在含有 1 ml 50 µg/ml 卡那霉素的液体 TB 培养基中、在 37℃培养过夜,利用 Montage Plasmid Miniprep₉₆ Kit (Millipore)分离纯化质粒 DNA。对于所得质粒 DNA,使用 BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit,按照实际盒所附说明进行反应,然后通过 ABI PRISM 3100 DNA 测序仪(Applied Biosystems)进行核苷酸序列分析,从而确认 GenBank 中登录号(具有登录号 NM_031945 所示的核苷酸序列的开放阅读框的 cDNA (SEQ ID NO.1))被整合到了 pENTR/D-TOPO 载体中。

接着,使用 GATEWAY™ 系统向表达用载体 pcDNA3.1/DEST40 (Invitrogen)进行基因的转移。即,用 TE 缓冲液将 4 µl GATEWAY™ LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen 公司制备)、4 µl LR 反应缓冲液、0.3 µg pENTR/D-TOPO-NM_031945、0.3 µg pcDNA3.1/DEST40 制备成 20 µl,在 25℃反应 1 小时后,加入 2µl 蛋白酶 K 37℃反应 10 分钟。使用所得反应物转化大肠杆菌 OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen 公司制备),在含有 50 µg/ml 胺苄霉素

的 LB 琼脂培养基上培养。结果，选择显示胺苄霉素抗性并生长的大肠杆菌集落，在含有 100 ml 50 µg/ml 胺苄霉素的液体 TB 培养基中、在 37℃ 培养过夜，利用 Plasmid MAXI Kit (QIAGEN 公司制备) 分离纯化质粒 DNA (pcDNA3.1-DEST40-NM_031945)。

5

[实施例 3] 人 oculospanin 基因导入细胞并表达的人 oculospanin 基因产物的确认、以及作为免疫原的人 oculospanin 表达细胞的膜组分的制备

a) 质粒 pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 转染 NIH3T3 细胞

10

如下所述，将实施例 2 所得质粒 pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 转染 NIH3T3 细胞。对 NIH3T3 细胞的转染使用(株) Invitrogen 制备的 Lipofectamine™ 2000 试剂，通过脂转染进行。即，首先使细胞在 6 孔板中增殖至半汇合。将细胞用不含抗生素、含有 10% 胎牛血清的 DMEM 清洗，然后再加入 200 µl 不含抗生素、含有 10% 胎牛血清的 DMEM。接着，向 1.5 ml Eppendorf 离心管中加入 100 µl 无血清培养基(DMEM)、由上述方法回收的质粒 2 µg DNA (pcDNA3.1-DEST40-NM_031945)，混合。在另外的 1.5 ml Eppendorf 离心管中加入 96 µl 无血清培养基(DMEM)、4 µl Lipofectamine™ 2000 试剂并混合。将 DNA 溶液与 Lipofectamine 脂转染溶液混合，在室温下放置 20 分钟。然后将 DNA-Lipofectamine 混合液加到细胞中，在 37℃、5% CO₂ 下进行培养。4 小时后，向细胞中加入 1 ml 含有 10% 胎牛血清的 DMEM，在 37℃、5% CO₂ 下培养过夜。

15

20

b) pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 在 NIH3T3 细胞中表达的确认
回收上述得到的细胞培养物。将用不含 cDNA 的阴性对照或 pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 转染得到的 NIH3T3 细胞用 PBS (-) 缓冲液((株) Invitrogen 制备)清洗。将细胞溶解于含有 SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)用的 2-巯基乙醇的样品缓冲液(BioRad 公司制备)，使用 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶(e PAGEL E-T12.5L、ATTO (株)制备)，在还原条件下进行 SDS-PAGE。

25

30

电泳后，在转印缓冲液(192 mM 甘氨酸、20% 甲醇、25 mM Tris) 中，使用凝胶膜转印装置(Marysol 公司制造、NP7513)，在 4℃、120 分钟、200 mA 的条件下，将条带由聚丙烯酰胺凝胶上转印到聚偏氟

乙烯(PVDF)膜(Millipore 公司制备)上。

使用抗 V5 标记抗体((株) Invitrogen 制备), 对转印后的 PVDF 膜进行蛋白质印迹分析。即, 首先将 PVDF 膜用 blockace ((株)雪印制造)封闭(室温下 30 分钟, 1 次), 然后装入塑料袋(商品名 Hybribag、
5 Cosmo Bio (株)制造), 添加抗 V5 标记抗体(稀释 1000 倍)、5 ml blockace, 在室温下振荡 1 小时。1 小时后, 取出膜, 用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS(以下称为“0.05%吐温 20-PBS”)清洗(在室温下清洗 15 分钟, 清洗 1 次, 接着进行 2 次 5 分钟的清洗), 然后将膜转移到新的塑料袋中, 将辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG 抗体(Amersham
10 Pharmacia 制备)用 0.05%吐温 20-PBS 稀释为 5000 倍, 加入 30 ml 所得溶液, 在室温下振荡 1 小时。1 小时后, 取出膜, 用 0.05%吐温 20-PBS 按照 15 分钟×1 次、5 分钟×4 次清洗。清洗后, 将膜置于塑料薄膜上, 用 ECL 蛋白质印迹检测溶液(Amersham Pharmacia), 检测结合有抗 V5 标记抗体的条带(将膜置于塑料薄膜上, 在 ECL 蛋白质
15 印迹检测溶液中浸泡 1 分钟, 然后感光 X 射线胶片(1 分钟))。结果, 通过抗 V5 标记抗体, 检测出导入了 pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 质粒 DNA 得到的 NIH3T3 细胞的特异性条带(图 4)。

c) 质粒 pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 转染 BALB-3T3 细胞

将 BALB-3T3 细胞(美国菌种保藏中心 No.CCL-163)在 3 片装有
20 含 10%胎牛血清(Gibco 公司制备)(以下称为“CS”)的 Dulbecco 改性 Eagle 培养基(以下称为“DMEM”; 日水制药(株)制造)的细胞培养用培养皿(培养面积 500 cm²; 住友 Bakelite (株)制造)中、在 37℃、5% CO₂ 下培养至半汇合, 然后将 pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 转染 BALB-3T3 细胞。对 BALB-3T3 细胞的转染使用(株) Gene Therapy
25 Systems 制造的 GeneporTM 2 转染试剂, 通过脂转染进行。即, 用无血清培养基(DMEM)清洗细胞, 然后加入 500 ml 无血清培养基(DMEM)。接着在 50 ml Falcon tube 中加入 6 ml New DNA diluent、240 μg 按照上述方法回收的质粒 DNA (pcDNA3.1-DEST40-NM_031945), 混合。向另外的 50 ml Falcon tube 中加入 4.8 ml 无血
30 清培养基(DMEM)、和 1200 μl GeneporTM 2 试剂, 混合。将 DNA 溶液与 GeneporTM 2 溶液混合, 在室温下放置 20 分钟。然后将 DNA-GeneporTM 2 混合液加入到细胞中(4 ml/皿), 在 37℃、5% CO₂

下培养。4 小时后，向细胞中加入 50 ml/皿含 20% 牛血清的 DMEM，在 37℃、5% CO₂ 下培养过夜。

d) 细胞膜组分的制备

将由上述方法培养的细胞用 PBS (-) 缓冲液((株) Invitrogen 制备) 5 清洗。使用细胞刮(住友 bakelite (株) 制造)回收细胞，悬浮于 7 ml 5mM Tris 缓冲液 pH 8.0 中。在 4℃ 将细胞溶液放置 30 分钟。用 Dounce Type B 匀浆器(30 冲程)破碎细胞。用 1000 G 离心 10 分钟，回收上清。将上清用超速离心机(日立(株)制造)、以 78000 G 离心 100 分钟，回收沉淀。通过蔗糖密度梯度浓缩膜组分。即，将沉淀溶解于 0.3 ml 57% 10 蔗糖 0.25M Tris 缓冲液 pH 8.0 中。转换成超离心管，在该细胞溶液上倒入 3 ml 37.2% 的 57% 蔗糖 0.25M Tris 缓冲液 pH 8.0、1.5 ml 0.25 M 57% 蔗糖 0.25M Tris 缓冲液 pH 8.0。通过超速离心机以 75500G 离心 16 小时。由上方各回收 1 mL 管中的溶液。向各组分中添加 10 mL 5mM Tris 缓冲液 pH 8.0，以 78000G 超速离心 1 小时，回收沉淀。 15 向沉淀中加入 500 μL 5mM Tris 缓冲液 pH 8.0，用 Dounce Type B 匀浆器(10 冲程)使细胞溶液均匀。通过在表达确认一项中说明的蛋白质印迹法鉴定细胞膜组分，以此作为免疫原。

[实施例 4] 小鼠的免疫和细胞融合

20 (4-1) 免疫

将 1 ml 实施例 3 中所得人 oculosspanin 表达细胞的膜组分溶液(总蛋白质质量: 100 μg)腹腔内施用 4-10 周龄的 BALB/c 雌性小鼠(购自日本 SLC 公司)。2 周后将同样的膜组分溶液(20 μg 蛋白质/小鼠)腹腔内施用，进行追加免疫。

25 (4-2) 细胞融合

从追加免疫 3 天后的小鼠体内摘出脾脏，将其放入 10 ml 含有 20 mM HEPES 缓冲液(pH 7.3)、350 mg/ml 碳酸氢钠、0.05 mM β-巯基乙醇、50 单位/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素、300 μg/ml L-谷氨酸的无血清 RPMI 1640 培养基(10.4 g/l, RPMI 1640 "Nissui"(1)日水制药 30 (株)制造) (以下称为“无血清 RPMI 培养基”)中，用匙在筛网(细胞筛网: Falcon 公司制造)上捣碎。将通过筛网的细胞悬浮液离心，使脾细胞沉淀，然后将该细胞用无血清 RPMI 培养基清洗 2 次，悬浮

于无血清 RPMI 培养基, 测定细胞数。

同样将用含有 10% FCS (Gibco BRL 公司制备)的 ASF104 培养基 (味之素(株)制备) (以下称为“含血清 ASF 培养基”), 在 37℃、5%二氧化碳存在下进行培养的、细胞浓度不超过 1×10^8 细胞/ml 的骨髓瘤细胞 NS1 (美国菌种保藏中心 TIB-18)用无血清 RPMI 培养基清洗, 悬浮于无血清 RPMI 培养基中, 测定细胞数。

将相当于 3×10^7 个细胞的 NS1 细胞悬浮液与相当于 3×10^8 个细胞的脾细胞悬浮液混合, 离心后完全除去上清。以下的细胞融合操作是一边将装有沉淀的塑料离心管在装有温水的烧杯中保温在 37℃, 一边实施。一边用移液管的先端部搅拌沉淀, 一边向该沉淀中缓慢加入 1 ml 50% (w/v)聚乙二醇 1500 (Boehringer Mannheim 公司制造), 然后分两次缓慢加入 1 ml 预先加温至 37℃的无血清 RPMI 培养基, 再添加 7 ml 无血清 RPMI 培养基。离心后, 除去上清, 一边用移液管的先端部缓慢搅拌, 一边加入 10 ml 含 10% FCS 的次黄嘌呤·氨基喋呤·胸苷培养基(以下称为“HAT 培养基”; Boehringer Mannheim 公司制造)。再添加 20 ml 含 10% FCS 的 HAT 培养基, 然后向细胞培养用 96 孔板各分注 100 μ l/孔, 在 37℃、5%二氧化碳下培养。7-8 天后, 以 100 μ l/孔分别向培养基变黄色的孔中加入新的 HAT 培养基。将这样得到的融合细胞用于以下通过有限稀释法进行的筛选。

(4-3) 有限稀释

从 4-10 周龄的 BALB/c 雌性小鼠(购自日本 SLC 公司)体内摘出胸腺, 然后用匙在筛网(细胞筛网: Falcon 公司制造)上捣碎。将通过筛网的细胞用含 10% FCS 的次黄嘌呤·胸苷培养基(以下称为“HT 培养基”; Boehringer Mannheim 公司制造)清洗 2 次。将相当于 1 只小鼠的胸腺细胞悬浮于 30 ml 含 10% FCS 的 HT 培养基中, 以此作为饲养细胞液。将含有以上(4-2)得到的融合细胞的培养液根据细胞密度用饲养细胞液稀释为 10-100 倍, 再用饲养细胞液分阶段稀释, 使融合细胞的密度为 5 细胞/ml、1 细胞/ml、0.5 细胞/ml。将这样制备的各试样以 100 μ l/孔分注到细胞培养用微孔板中, 在 37℃、5%二氧化碳下培养 5 天。

(4-4) 选择

(4-4-1) 细胞 ELISA

人 oculospanin 表达细胞的维持培养可用在 RPMI 1640 培养基 (Invitrogen 公司制备) 中添加有 10% 胎牛血清 (Moregate Biotech 公司制备)、20 mM HEPES (Sigma 公司制备)、55 μ M 2-巯基乙醇 (Invitrogen 公司制备) 的培养基、在 37°C、5% CO₂ 下进行。将对数生长期的人 oculospanin 表达细胞以 2×10^4 个细胞/cm² 涂于细胞培养用烧瓶中，培养 3 天。将这样制备的人 oculospanin 表达细胞全部转移至 50 ml 管中，用 HITACHI himac CF8DL、以 1,000 rpm 离心 5 分钟 (离心条件 1)。除去上清，使人 oculospanin 表达细胞在培养基中悬浮，然后使用 4% 的台盼蓝溶液 (Sigma 公司制备) 计测活细胞数。在培养基中，制备人 oculospanin 表达细胞，使活细胞为 10^7 个细胞/ml，以 100 μ l/孔分注到 U 底 96 孔板。将 U 底 96 孔板用 HITACHI himac CF8DL、以 15000 rpm 离心 1 分钟 (离心条件 2)，用 200 μ l tip 抽去上清。敲击 U 底 96 孔板的侧面，使人 oculospanin 表达细胞悬浮，然后用冰冷却的培养基制备 10 μ g/ml、5 μ g/ml、2.5 μ g/ml 浓度的杂交瘤培养上清，将其以 100 μ l/孔添加。每隔 15 分钟，一边用孔板搅拌器 (Fujirebio 公司制备) 搅拌 U 底 96 孔板，一边在 4°C 反应 1.5 小时。反应终止后，用离心条件 2 离心 U 底 96 孔板，用 200 μ l tip 抽去上清。在 PBS (-) (日水制药公司制备) 中添加 5% 胎牛血清，将所得溶液 (PBS-5% FBS) 以 200 μ l/孔添加，用孔板搅拌器搅拌后，用离心条件 2 离心，用 200 μ l tip 抽去上清。之后再进行 2 次以上操作。敲击 U 底 96 孔板的侧面，使人 oculospanin 表达细胞悬浮，然后以 100 μ l/孔添加用冰冷却的 PBS-5% FBS 稀释成 500 倍的过氧化物酶标记抗人 IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories 公司制备)，用孔板搅拌器搅拌后，用离心条件 2 离心，用 200 μ l tip 抽去上清。之后以 200 μ l/孔加入 PBS-5% FBS，用孔板搅拌器搅拌后，用离心条件 2 离心，用 200 μ l tip 抽去上清。之后再进行 2 次以上操作。敲击 U 底 96 孔板的侧面，使人 oculospanin 表达细胞悬浮，然后以 100 μ l/孔添加室温下的过氧化物酶显色基质 (Nacalai Tesque 公司制备)，用孔板搅拌器搅拌 10 分钟。用离心条件 2 离心，然后以 50 μ l/孔将上清转移至平底 96 孔板，用读板仪 (1420 ARVO multilabel counter、PerkinElmer 公司制造) 测定 405 nm 的吸收。

(4-4-2) 流式细胞仪

将实施例 3 中得到的人 oculospanin 表达细胞在含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中、在 37℃、5%二氧化碳下培养、增殖，然后将制备成 1×10^7 个细胞/ml 的细胞悬浮液以 50 μ l/孔分注到 U 底 96 孔板 (Nunk 公司制造)，离心(90 \times g、4℃、10 分钟)。除去上清，加入 50 μ l/孔在上述(4-3)中培养的融合细胞的培养上清，搅拌，然后在冰上静置 1 小时，离心(90 \times g、4℃、10 分钟)除去上清。以 100 μ l/孔，用流式细胞仪用缓冲液(含有 5% FCS、0.04% (w/v)叠氮化钠的 PBS)清洗沉淀 2 次，然后加入 50 μ l 稀释为 500 倍的异硫氰酸荧光素(以下称为“FITC”)标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 IgG 组分(Organon Technica 公司制备)，以此作为二次抗体，在冰上静置 1 小时。离心(90 \times g、4℃、10 分钟)除去上清，然后以 100 μ l/孔，用流式细胞仪用缓冲液洗涤沉淀 2 次，添加 50 μ l 3.7%福尔马林溶液，在冰上静置 10 分钟，固定细胞。离心(90 \times g、4℃、10 分钟)除去上清，然后再次以 100 μ l/孔，用流式细胞仪用缓冲液洗涤，将沉淀以 100 μ l/孔悬浮于流式细胞仪用缓冲液，以此作为流式细胞仪用试样。用流式细胞仪(Epics Elite; Coulter 公司制造)测定各试样中的细胞 FITC 荧光强度(激发波长: 488 nm、检测波长: 530 nm)。结果，鉴别出显示比未添加融合细胞培养上清的人 oculospanin 表达细胞(FITC 荧光强度约为 0.3)的 FITC 荧光强度明显高(约 100-1000)的试样所对应的融合细胞。

20 (4-5) 克隆

对上述(4-4)中选择的细胞群，将上述(4-3)至(4-4)一系列的步骤重复 5 次，由此可得到生成单一的抗体的杂交瘤，其中所述抗体与人 oculospanin 表达细胞结合，但与导入前的细胞不结合。

25 [实施例 5] 人 oculospanin 单克隆抗体的纯化

将实施例 4 中制备的小鼠-小鼠杂交瘤在 1 L 含有 10% FCS 的 ASF 培养基中、在 37℃、5%二氧化碳下培养、增殖至 1×10^6 个细胞/ml。将培养液离心(1000 rpm、2 分钟)，舍去上清，将沉淀的细胞用无血清 ASF 培养基洗涤 1 次，然后再悬浮于 1 L 无血清 ASF 培养基中，在 37℃、5%二氧化碳下培养 48 小时。将培养液离心(1000 rpm、2 分钟)，回收上清，装入透析管(渗透极限分子量 12000-14000; Gibco BRL 公司制造)，以 10 倍量的 10 mM 磷酸钠缓冲液(pH 8.0)进行透析。使

用高效液相色谱装置(FPLC 系统; Pharmacia 公司制造), 按照以下的条件, 由该透析管内液粗提纯 IgG:

柱: DEAE-琼脂糖 CL-6B 柱(柱尺寸 10 ml; Pharmacia 制造)

溶剂: 10 mM 磷酸钠缓冲液(pH 8.0)

5 流速: 1 ml/分钟

洗脱: 1 M 氯化钠直线浓度梯度(0-50%、180 分钟)

将洗脱液分级分别取 5 ml, 通过使用人 oculospanin 蛋白质的 ELISA 法检测 oculospanin 抗体效价。首先, 将由实施例 3 中得到的人 oculospanin 表达细胞制备的膜组分溶液以 100 μ l/孔加入 ELISA 用
10 96 孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 然后舍去该溶液, 将各孔用 100 μ l/孔 PBS-吐温洗涤 3 次。接着, 加入 100 μ l/孔含有 2% 牛血清白蛋白的 PBS, 在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。用 100 μ l/孔 PBS-吐温洗涤 3 次之后, 加入 100 μ l 各洗脱组分, 在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。再用 100 μ l/孔 PBS-吐温洗涤 3 次, 之后以 100 μ l/孔添加用 PBS-吐温稀释 2000 倍的辣根过氧
15 化物酶标记抗小鼠免疫球蛋白抗体(Amersham 公司制造), 在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 用 100 μ l/孔 PBS-吐温洗涤 3 次。接着, 以 100 μ l/孔加入辣根过氧化物酶底物(BioRad 制造), 静置 5 分钟, 然后用读板仪测定各孔在 415 nm 的吸光度。

结果, 收集吸光度大的组分, 过 2 根抗体亲和纯化柱(Hitrap Protein
20 G 柱、柱体积 5 ml; Pharmacia 公司制造)。用 25 ml/柱的平衡缓冲液(20 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.0))洗涤柱内之后, 用 15 ml/柱的洗脱缓冲液(0.1 M 甘氨酸-盐酸(pH 2.7))洗脱抗体。各洗脱液流入装有 1.125 ml 1M Tris-盐酸(pH 9.0)的试管内, 洗脱结束后立即设置于离心管型超滤器(Centriprep 10; Grace Japan (株)制造)的上部, 以 3000 \times g、在 4 $^{\circ}$ C
25 离心 2 小时, 将该离心操作重复 5 次。第 5 次的离心进行至过滤器上部的液量为 0.5 ml, 以该过滤器上部残留的液体作为抗人 oculospanin 抗体试样。

[实施例 6] 细胞毒活性

30 测定抗体依赖性细胞毒活性作为生物活性的指标。

用台盼蓝染色法计数人 oculospanin 表达细胞(实施例 3), 然后用含有 10% 胎牛血清(Moregate 公司制造)的 RPMI 1640 培养基

(Invitrogen 公司制备、以下称为 RPMI 培养基)制成 1×10^6 细胞/ml。添加 2.5 μ l 双(乙酰氧基甲基)2,2':6'2''-terpyridine-6,6''-二羧酸 (BATDA 标记试剂、PerkinElmer 公司制造), 充分搅拌, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳存在下温育 30 分钟, 其中每间隔 5 分钟进行颠倒混合的操作。添加 10 ml RPMI 培养基, 搅拌后以 1500 rpm 离心 5 分钟, 再将
5 该洗涤操作重复 2 次。将这样得到的 BATDA 标记人 oculospanin 表达细胞再悬浮于 10 ml RPMI 1640 培养基, 向各园底 96 孔板中铺 50 μ l (5×10^3 细胞), 在 4 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟, 其中所述园底 96 孔板中预先添加有用 RPMI 1640 培养基制成 1 μ g/ml 的纯化抗人 oculospanin 抗体
10 或杂交瘤培养上清, 并在 4 $^{\circ}$ C 静置了 30 分钟。阴性对照孔中添加 RPMI 1640 培养基, 用以代替纯化抗人 oculospanin 抗体或杂交瘤培养上清。

效应细胞如下制备。将在 100 ng/ml 巨噬细胞集落刺激因子(Sigma 公司制备)存在下预先培养了 3 天的 J774A.1 细胞(大日本制药)用台盼
15 蓝染色法计数, 然后用 RPMI 培养基制成 1×10^6 细胞/ml。向之前的园底 96 孔板中各铺 100 μ l (1×10^5 细胞), 将孔板以 1500 rpm 离心 5 分钟, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳存在下温育 4 小时。阳性对照添加 1% TrionX-100, 以代替用于完全杀伤 BATDA 标记人 oculospanin 表达细胞的效应细胞。温育 4 小时后, 由各孔取 20 μ l 培养上清, 转移
20 至白色 96 孔板, 添加 200 μ l 铺溶液(PerkinElmer)。在室温下振荡 15 分钟, 测定时间分解荧光。

各孔的细胞死亡诱导率由以下的计算式计算。细胞死亡诱导率(%) = (各测试孔的计数-阴性对照孔的计数)/(阳性对照孔的计数-阴性对照孔的计数) \times 100

与只有 RPMI 1640 培养基的对照进行比较, 通过添加纯化小鼠抗
25 人 oculospanin 抗体或杂交瘤上清, 可见诱导了人 oculospanin 表达细胞的细胞死亡。

[实施例 7] 作为免疫原和抗体检测系统抗原的人 oculospanin 表达细胞及其膜组分的制备

30 a) 质粒 pEF/DEST51-NM_031945 的构建

使用 pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen 公司制造), 按照所附说明书, 将由实施例 2a) 得到的 NM_031945 cDNA 克

5 隆到 pENTR/D-TOPO 载体中。将 NM_031945 cDNA 与 pENTR/D-TOPO 载体混合，在室温下温育 30 分钟，其中 pENTR/D-TOPO 载体在试剂盒所附的反应缓冲液中与拓扑异构酶结合。使用所得的反应物转化 OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen 公司制备)，在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的 LB 琼脂培养基上培养。结果，选择显示卡那霉素抗性并生长的大肠杆菌集落，在含有 1 ml 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的液体 TB 培养基中、在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜，利用 Montage Plasmid Miniprep₉₆ Kit (Millipore 公司制备)分离纯化质粒 DNA。对于所得质粒 DNA，使用 BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready
10 Reaction Kit，按照试剂盒所附说明进行反应，然后通过 ABI PRISM 3100 DNA 测序仪(Applied Biosystems)进行核苷酸序列分析，从而确认 GenBank 登录号(具有登录号 NM_031945 所示的核苷酸序列的开放阅读框的 cDNA (SEQ ID NO.1))被整合到了 pENTR/D-TOPO 载体中。

15 接着，使用 GATEWAYTM 系统向表达用载体 pcDNA3.1/DEST40 (Invitrogen 公司制备)进行基因的转移。即，用 TE 缓冲液将 4 μl GATEWAYTM LR ClonaseTM Enzyme Mix (Invitrogen 公司制备)、4 μl LR 反应缓冲液、0.3 μg pENTR/D-TOPO-NM_031945、0.3 μg pcDNA3.1/DEST40 制备成 20 μl ，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。反应后，加入
20 2 μl 蛋白酶 K，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 分钟。使用所得反应物转化大肠杆菌 OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen 公司制备)，在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 胺苄霉素的 LB 琼脂培养基上培养。结果，选择显示胺苄霉素抗性并生长的大肠杆菌集落，在含有 100 ml 50 $\mu\text{g/ml}$ 胺苄霉素的液体 TB 培养基中、在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜，利用 Plasmid MAXI
25 Kit (QIAGEN 公司制备)分离纯化质粒 DNA (pcDNA3.1-DEST40-NM_031945)。

同样，使用 GATEWAYTM 系统向表达用载体 pEF/DEST51-NM_031945 (Invitrogen 公司制备)进行基因的转移。即，用 TE 缓冲液将 4 μl GATEWAYTM LR ClonaseTM Enzyme Mix (Invitrogen 公司制备)、4 μl LR 反应缓冲液、0.3 μg pENTR/D-TOPO-NM_031945、0.3 μg pEF/DEST51 制备成 20 μl ，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。反应后，加入 2 μl 蛋白酶 K，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 分钟。使用所得反应物转化大肠杆菌 OneShot

TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen 公司制备), 在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 胺苄霉素的 LB 琼脂培养基上培养。结果, 选择显示胺苄霉素抗性并生长的大肠杆菌集落, 在含有 100 ml 50 $\mu\text{g/ml}$ 胺苄霉素的液体 TB 培养基中、在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 利用 Plasmid MAXI Kit (QIAGEN 公司制备) 分离纯化质粒 DNA (pEF/DEST51-NM_031945)。

b) 质粒 pEF/DEST51-NM_031945 转染 BALB-3T3 细胞和 293T 细胞

将 BALB-3T3 细胞(理研 clone A31)在 330 片装有含 10% 牛血清 (Gibco 公司制备)(以下称为“BS”)的 Dulbecco 改性 Eagle 培养基(以下称为“DMEM”; SIGMA 公司制造)的细胞培养用 150 mm 培养皿(培养面积 148 cm^2 ; IWAKI 公司制造)中、在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养至半汇合, 然后将 pEF/DEST51-NM_031945 转染 BALB-3T3 细胞。对 BALB-3T3 细胞的转染使用(株) Gene Therapy Systems 制造的 GeneporterTM 2 转染试剂, 通过脂转染进行。即, 用无血清培养基 (DMEM) 清洗一次细胞, 然后加入 20 ml 无血清培养基(DMEM)。接着在 50 ml Falcon 管中加入 0.6 ml New DNA diluent、24 μg 按照上述方法回收的质粒 DNA (pEF/DEST51-NM_031945), 混合。向另外的 50 ml Falcon 管中加入 0.35 ml 无血清培养基(Opti-MEM I; GIBCO 公司制备)、和 84 μl GeneporterTM 2 试剂, 混合。将 DNA 溶液与 GeneporterTM 2 溶液混合, 在室温下放置 20 分钟。然后将 DNA-GeneporterTM 2 混合液加入到细胞中(1 ml/皿), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养。3 小时后, 交换为 20 ml/皿含 10% 牛血清的 DMEM, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养过夜。

另外, 将质粒 pEF/DEST51-NM_031945 如下导入 293T 细胞。向 293T 细胞的导入使用 LIPOFECTAMINE 2000 试剂(Invitrogen)进行。以 2.5×10^5 细胞/9.2 cm^2 的密度铺 293T 细胞, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养过夜。在 5 ml 聚丙烯制的管中, 将 10 μl LIPOFECTAMINE 2000 试剂与 250 μl OPTI-MEM I 低血清培养基(Invitrogen 公司)混合, 在室温下反应 5 分钟。在另外的 5 ml 聚丙烯制的管中, 将 4 μg 质粒 pEF/DEST51-NM_031945 与与 250 μl OPTI-MEM I 低血清培养基混合。将 LIPOFECTAMINE 溶液与 DNA 溶液混合, 在室温下反应 20 分钟。除去培养过夜的 293T 细胞的培养上清, 以 2 ml/9.2 cm^2 的比例

添加不含抗生素、含有 10%胎牛血清(Moregate 公司)的 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(Gibco 公司)。将 LIPOFECTAMINE-DNA 混合液添加到 293T 细胞, 在 37℃、5%二氧化碳下培养两天。

c) 细胞膜组分的制备(10 L)

5 将由上述方法培养的细胞用 PBS (-)缓冲液(大日本制药(株)制备)清洗。使用细胞刮(IWAKI公司制造)回收细胞, 悬浮于 230 ml 5mM Tris 缓冲液 pH 7.4 中。在 4℃ 将细胞溶液放置 30 分钟。用 Dounce Type B 匀浆器(50 冲程)破碎细胞。用离心机(KUBOTA 制造)以 1000 G 离心 10 分钟, 回收上清。

10 将上清用超速离心机(BECKMAN 制造)、以 78000 G 离心 100 分钟, 回收沉淀。向沉淀中加入 14 ml 57%蔗糖的 Tris 缓冲液, 覆盖, 以 78000G、通过 4℃ 下的蔗糖密度梯度离心 16 小时, 回收上层的膜组分。即, 向膜组分中添加 55 mL 5mM Tris 缓冲液 pH 7.4, 在 4℃、以 78000G 离心 60 分钟, 回收沉淀。向沉淀中加入 1500 μ l 5mM Tris
15 缓冲液 pH 7.4, 用 Dounce Type B 匀浆器(10 冲程)使细胞溶液均匀。通过在表达确认一项中说明的蛋白质印迹法鉴定细胞膜组分。

[实施例 8] 小鼠的免疫和细胞融合

a) 免疫

20 将 1×10^7 个实施例 7 中所得人 oculospanin 基因表达细胞腹腔内施用于 5 周龄的 BALB/c 雌性小鼠(购自日本 SLC 公司)。2、4、6、8 周后将同样的人 oculospanin 基因表达细胞(1×10^7 个细胞/小鼠)腹腔内施用, 进行追加免疫。

b) 细胞融合

25 从追加免疫 4 天后的小鼠体内摘出脾脏, 将其放入 10 ml 含有 10 mM HEPES 缓冲液(pH 7.4)、0.02 mg/ml 碳酸氢钠、300 μ g/ml L-谷氨酸的无血清 MEM 培养基(Eagle MEM 培养基 "Nissui" (1): 日水制药(株)制造 9.4 g/L) (以下称为 "无血清 MEM 培养基") 中, 用 21G' 注射针和镊子处理脾细胞。将该细胞悬浮液离心, 使脾细胞沉淀, 然
30 后将该脾细胞用无血清 MEM 培养基清洗 2 次, 悬浮于无血清 MEM 培养基, 测定细胞数。

另一方面, 将用含有 15% FBS (GIBCO 公司制备)、306 μ g/ml 谷

氨酸、0.05 mM β -巯基乙醇的骨髓瘤增殖培养基(以下称为“ME培养基”),在37℃、5%二氧化碳存在下进行培养的、细胞浓度不超过 1×10^6 细胞/ml的骨髓瘤细胞 SP2/0 同样用无血清 MEM 培养基清洗,悬浮于无血清 MEM 培养基中,测定细胞数。

- 5 将相当于 1/5 脾脏的细胞的 SP2/0 细胞悬浮液与全部脾细胞悬浮液混合,离心后完全除去上清。以下的细胞融合操作是在室温下、在装有沉淀的塑料离心管中实施的。一边振荡离心管,一边向该沉淀中缓慢添加 1 ml 40% (w/v) 聚乙二醇 4000 (Merck 公司制备),然后分 3 次缓慢加入 9 ml 预先加温至 37℃ 的无血清 MEM 培养基,离心后除
10 去上清,再一边用移液管的先端部缓慢搅拌,一边加入含 20% FBS 的次黄嘌呤·氨基喋呤·胸苷培养基(以下称为“HAT 培养基”;SIGMA 公司制造),使细胞数为 2.5×10^6 细胞/ml。向细胞培养用 96 孔板各分注 100 μ l/孔,在 37℃、7%二氧化碳下培养。1 天后,向全部的孔添加 100 μ l HAT 培养基,之后每隔 2、3 天更换。将这样得到的融合
15 细胞用于以下通过有限稀释法进行的筛选。

c) 有限稀释

- 将含有由上述 b) 得到的融合细胞的培养液用 HT 培养基(克隆 2ⁿ 次或以后改为 HY 培养基)分阶段稀释,使细胞的密度为 1 细胞/孔(10 细胞/ml)、5 细胞/孔(50 细胞/ml)。将这样制备的各试样以 100 μ l/孔
20 分注到 96 孔板中,在 37℃、7%二氧化碳下培养 10 天,其中所述 96 孔板已预先将 100 μ l HY 培养基分注到各孔中。

d) 选择

(d-1) ELISA

- 将实施例 7 所得细胞膜组分以 1 μ g/ml 分别分注 50 μ l/孔于 EIA96
25 孔板(COSTAR 公司制造)。在 4℃ 下放置 1 天,然后充分震荡孔板内的抗原液,舍去,在 PBS (-) 中添加 1% BSA,将所得溶液以 80 μ l/孔添加,将孔板覆盖,使用前于 4℃ 保存。使用时恢复至室温,用通入有含 0.1% 吐温 20 的 PBS (PBS-T) 的 Serawasher (Bio-Tec 公司制造) 将孔板洗涤 3 次。加入 50 μ l 细胞融合后经过 10-12 天的细胞培养上
30 清,以此作为一次抗体,在室温下静置 1 小时。一次抗体反应终止后,用 PBS-T 洗涤 3 次,向 PBS-T 中添加 0.5% BSA,将用所得溶液(抗体稀释液)稀释为 5000 倍的碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG 抗体(BIO

SOURCE 公司制备)分别添加 50 μl /孔, 在室温下静置 1 小时。二次抗体反应终止后, 将回复至室温的碱性磷酸酶用显色底物对磷酸硝基苯酯 $2\text{Na}_6\text{H}_2\text{O}$ (pNPP、和光纯药工业制备)以 1 mg/ml 的浓度溶解于 pNPP 缓冲液(97 ml/l 二乙醇胺、0.1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、pH 9.8), 以 100 μl /孔添加。读板仪(Nunc International 公司制造)测定 405 nm、630 nm 的吸光度。

d-2) 流式细胞仪

将实施例 7 中得到的 HEK293 培养细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中、在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳下培养、增殖, 转染后培养 24 小时, 然后将制备成 2×10^7 个细胞/ml 的细胞悬浮液以 50 μl /孔分注到 V 底 96 孔板(Corning 公司制造), 离心(1000 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分钟)。除去上清, 加入 50 μl /孔在上述 c)中培养的融合细胞的培养上清, 搅拌, 然后在冰上静置 0.75 小时, 离心(1000 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分钟)除去上清。以 150 μl /孔, 用流式细胞仪用缓冲液(含有 5% FBS 的 MEM)清洗沉淀 2 次, 然后加入 100 μl 稀释为 33 倍的异硫氰酸荧光素(以下称为“FITC”)标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 IgG 组分(和光纯药工业制备), 以此作为二次抗体, 在冰上静置 0.75 小时。离心(1000 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分钟)除去上清, 然后以 150 μl /孔, 用流式细胞仪用缓冲液洗涤沉淀 2 次, 将沉淀以 500 μl /孔悬浮于流式细胞仪用缓冲液, 以此作为流式细胞仪用试样。用流式细胞仪(FC500; BECKMAN 公司制造)测定各试样中的细胞 FITC 荧光强度(激发波长: 488 nm、检测波长: 530 nm)。结果, 鉴别出显示比未添加融合细胞培养上清的 HEK293 transient 表达细胞的 FITC 荧光强度高(约 100-1000)的试样所对应的融合细胞。

e) 克隆

对上述 d)中选择的细胞群, 将上述 c)至 d)一系列的步骤重复 2 次, 由此可得到生成单一的抗体的杂交瘤的几个克隆, 其中所述抗体与 HEK293 transient 表达细胞结合, 但与导入抗人 oculospanin 表达质粒前的细胞不结合。这样克隆的杂交瘤细胞株之一被命名为 O3B8-2C9-4F3, 于 2004 年 2 月 17 日保藏于日本独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心, 保藏号: FERM BP-08627。

[实施例 9] 抗人 oculospanin 单克隆抗体的纯化

将实施例 8 中制备的小鼠-小鼠杂交瘤悬浮于 HY 培养基, 浓度为 1×10^6 细胞/ml, 在 37℃、7%二氧化碳下静置 3 天。将这样得到的培养液离心(1600 rpm、5 分钟), 回收上清, 在以下的条件下进行 IgG 的纯化。

5 结合缓冲液: pH 7.0 (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

洗脱缓冲液: pH 3.0, 100 mM 甘氨酸-HCl

中和缓冲液: pH 9.0, 1M Tris-HCl

取所需量蛋白 G 载体(Amersham Biosciences 公司制备), 除去乙醇, 然后用超纯水清洗 2 次, 用结合缓冲液清洗 1 次, 加入结合缓冲液, 制成 50%凝胶浆。向杂交瘤上清中加入蛋白 G 凝胶浆, 在 4℃旋转过夜, 用结合缓冲液清洗 3 次。清洗后, 加入洗脱缓冲液, 洗脱抗体。洗脱液流入装有洗脱缓冲液的 1/10 量的中和缓冲液的管内。洗脱液进入样品离心管型超滤器(Amicon Ultrafree-MC: Millipore 公司制造)的上部, 在 4℃、以 $5000 \times g$ 离心 20 分钟, 将回收至过滤器下部的滤液除去, 添加洗脱液, 使过滤器上部的液量保持不低于 50 μl 。将洗脱液全部添加后, 一洗脱液的 3 倍的量加入 PBS (-), 与缓冲液交换, 以残留于该过滤器上部的液体作为抗人 oculospanin 抗体试样。

20 [实施例 10] 细胞毒活性

测定抗体依赖细胞毒活性作为生物活性的指标。用台盼蓝染色法计数实施例 7 中制备的人 oculospanin 表达细胞, 然后用含有 10%胎牛血清(Moregate 公司制造)的 RPMI 1640 培养基(Invitrogen 公司制备、以下称为 RPMI 培养基)制成 8×10^5 细胞/0.4ml, 添加 40 μl 铬-51 (铬酸钠、Amersham Bioscience 公司制造), 在 37℃、5%二氧化碳存在下温育 2 小时。添加 8 ml RPMI 培养基, 搅拌后以 1500 rpm 离心 5 分钟, 再将该洗涤操作重复 2 次。将这样得到的铬-51 标记人 oculospanin 表达细胞再悬浮于 4 ml RPMI 培养基, 各向园底 96 孔板中铺 50 μl (1×10^4 细胞), 在 4℃静置 30 分钟, 其中所述园底 96 孔板中预先添加有 50 μl 用 RPMI 培养基制成为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化抗人 oculospanin 抗体。阴性对照孔或背景测定孔中添加 RPMI 培养基, 用以代替纯化抗人 oculospanin 抗体。

效应细胞如下制备。即，按照常规方法由 BALB/c-nu/nu 小鼠(雌性、7 周龄)采集脾细胞，用台盼蓝染色法计数，然后用 RPMI 培养基制成 1.5×10^7 细胞/ml。向之前的园底 96 孔板中各铺 $100 \mu\text{l}$ (1.5×10^6 细胞)，将孔板以 1500 rpm 离心 5 分钟，在 37°C 、5%二氧化碳存在下温育 4 小时。阳性对照中添加 2% TrionX-100，以代替用于完全杀伤铬-51 标记人 oculospanin 表达细胞的效应细胞。背景测定用孔中添加 RPMI 培养基，以代替效应细胞。温育 4 小时后，由各孔取 $50 \mu\text{l}$ 培养上清，转移至 96-well Luma Plate (PerkinElmer 公司制造)。在 50°C 干燥过夜，通过微孔板闪烁计数器 (TopCourt NTX、PerkinElmer 公司制造) 测定各孔的铬-51 的量。

各孔的细胞死亡诱导率由以下的计算式计算。细胞死亡诱导率(%) = (各测试孔的计数-背景测定用孔的计数)/(阳性对照孔的计数-背景测定用孔的计数) $\times 100$

与阴性对照进行比较，通过添加纯化小鼠抗人 oculospanin 抗体，可见诱导了人 oculospanin 表达细胞的细胞死亡(图 5)。

产业实用性

本发明发现人 oculospanin 在黑素瘤中的表达量显著增加，提供使用该基因的癌的检测方法、癌的检测试剂盒，还提供具有对人 oculospanin 的细胞毒活性的抗体、含有该抗体的癌治疗用药物组合物。

序列表独立文本

SEQ ID NO.5: 人 oculospanin 扩增用 PCR 有义引物

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> 以癌特异性抗原为靶的抗体

<130> FP0408

<140>

<141>

<150> JP2003-063648

<151> 2003-03-10

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1065

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1065)

<223> 发明人: Ichikawa, Kimihisa; Takahashi, shu; Agatsuma Toshinori;
Fukuchi, Keisuke; Hirai Takehiro

<400> 1

atg gag gag ggg gag agg agc ccc tta ctg tcc cag gaa act gca ggc 48
Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly
1 5 10 15

cag aag ccc ctc tet gtg cac agg cca ccc acc tca ggc tgc cta ggt 96
Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly
20 25 30

cca gtg ccc agg gag gac cag gcg gag gcc tgg ggc tgc agc tgc tgt 144
Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys
35 40 45

ccc ccg gag acc aag cac cag gcc ttg agt ggc act ccc aag aaa gga 192
Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly
50 55 60

gcc tcc tgc tgc atc gac ccc cgc gaa gat gga gcc tct gtc aac gac 768
 Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp
 245 250 255

cag tgc ggc ttc ggg gtc ctg cgc ctg gat gcg gac gca gct cag aga 816
 Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg
 260 265 270

gtg gtg tac ctg gag ggc tgc ggc ccg ccg ctc cgg cgg tgg ctg cgc 864
 Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg
 275 280 285

gcg aac ctg gct gcc tcg ggc ggc tac gca atc gcg gtg gtg ctg ctg 912
 Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu
 290 295 300

cag ggc gcg gag ctc ctg ctg gcc gcc cgg cta ctc ggg gcc ctc gct 960
 Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala
 305 310 315 320

gcc cgc agt ggg gcg gcg tac ggc ccc gga gcg cgc ggg gag gac cgc 1008
 Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Arg Gly Glu Asp Arg
 325 330 335

gct ggc ccc cag agc ccc agc ccc ggc gcc ccg ccc gct gcc aaa ccc 1056
 Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro
 340 345 350

gcc cgg ggc 1065
 Ala Arg Gly
 355

<210> 2
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2
 Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly

Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg
 260 265 270

Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg
 275 280 285

Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu
 290 295 300

Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala
 305 310 315 320

Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Arg Gly Glu Asp Arg
 325 330 335

Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro
 340 345 350

Ala Arg Gly
 355

<210> 3

<211> 1601

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(1129)

<400> 3

cacagaggag ccagcgaacc tctccggcgc cctgttctgg ggcctttctg ttccagcgtc 60

aagg atg gag gag ggg gag agg agc ccc tta ctg tcc cag gaa act gca 109

Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala

1 5 10 15

ggc cag aag ccc ctc tct gtg cac agg cca ccc acc tca ggc tgc cta 157

Gly Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu

20 25 30

ggt cca gtg ccc agg gag gac cag gcg gag gcc tgg ggc tgc agc tgc 205

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gly | Pro | Val | Pro | Arg | Glu | Asp | Gln | Ala | Glu | Ala | Trp | Gly | Cys | Ser | Cys | | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| tgt | ccc | ccg | gag | acc | aag | cac | cag | gcc | ttg | agt | ggc | act | ccc | aag | aaa | 253 | |
| Cys | Pro | Pro | Glu | Thr | Lys | His | Gln | Ala | Leu | Ser | Gly | Thr | Pro | Lys | Lys | | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | | |
| gga | cca | gcc | cct | tcc | ctc | tcc | cca | ggg | agc | agc | tgc | gtc | aag | tat | ctg | 301 | |
| Gly | Pro | Ala | Pro | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Ser | Ser | Cys | Val | Lys | Tyr | Leu | | |
| | | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | | |
| atc | ttc | ctc | tcc | aac | ttc | ccc | ttc | tcc | ctg | ctg | ggg | ctg | ctg | gcc | ctg | 349 | |
| Ile | Phe | Leu | Ser | Asn | Phe | Pro | Phe | Ser | Leu | Leu | Gly | Leu | Leu | Ala | Leu | | |
| | 80 | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| gcc | atc | ggg | ctc | tgg | ggc | ctg | gct | gtc | aag | ggg | tct | ctg | gga | agt | gat | 397 | |
| Ala | Ile | Gly | Leu | Trp | Gly | Leu | Ala | Val | Lys | Gly | Ser | Leu | Gly | Ser | Asp | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | 110 | | |
| ctg | ggg | ggg | ccc | ctg | ccc | aca | gac | ccc | atg | ctg | ggg | ctg | gca | ctg | gga | 445 | |
| Leu | Gly | Gly | Pro | Leu | Pro | Thr | Asp | Pro | Met | Leu | Gly | Leu | Ala | Leu | Gly | | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | | | 125 | | |
| ggg | ctg | gtg | gtc | agc | gca | gcg | agc | ctg | gct | ggc | tgc | ctg | ggc | gcc | ctc | 493 | |
| Gly | Leu | Val | Val | Ser | Ala | Ala | Ser | Leu | Ala | Gly | Cys | Leu | Gly | Ala | Leu | | |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | | | | 140 | | |
| tgc | gag | aac | acc | tgc | ctg | tta | cgt | ggc | ttc | tcc | ggg | ggc | atc | ctt | gcc | 541 | |
| Cys | Glu | Asn | Thr | Cys | Leu | Leu | Arg | Gly | Phe | Ser | Gly | Gly | Ile | Leu | Ala | | |
| | | 145 | | | | | 150 | | | | | | | | 155 | | |
| ttc | ctg | gtg | ctt | gag | gcc | gtg | gcg | ggg | gcc | ctg | gtg | gtg | gcc | ctc | tgg | 589 | |
| Phe | Leu | Val | Leu | Glu | Ala | Val | Ala | Gly | Ala | Leu | Val | Val | Ala | Leu | Trp | | |
| | 160 | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | 175 | | |
| ggc | ccg | ctg | caa | gac | agc | ctg | gag | cac | acc | ctg | cgt | gtg | gcc | atc | gcc | 637 | |
| Gly | Pro | Leu | Gln | Asp | Ser | Leu | Glu | His | Thr | Leu | Arg | Val | Ala | Ile | Ala | | |
| | | | 180 | | | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| cac | tac | cag | gac | gac | cca | gac | ctg | cgc | ttc | ctc | ctc | gac | caa | gtc | cag | 685 | |
| His | Tyr | Gln | Asp | Asp | Pro | Asp | Leu | Arg | Phe | Leu | Leu | Asp | Gln | Val | Gln | | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | | | 205 | | |
| ctc | ggg | ctg | agg | tgc | tgc | gga | get | gcc | tcc | tac | cag | gac | tgg | cag | cag | 733 | |

Leu Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln
 210 215 220

aac ctg tac ttt aac tgc agc tcc ccc ggg gtg cag gcc tgc agc ctt 781
 Asn Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu
 225 230 235

ccc gcc tcc tgc tgc atc gac ccc cgc gaa gat gga gcc tct gtc aac 829
 Pro Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn
 240 245 250 255

gac cag tgc ggc ttc ggg gtc ctg cgc ctg gat gcg gac gca gct cag 877
 Asp Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln
 260 265 270

aga gtg gtg tac ctg gag ggc tgc ggc ccg ccg ctc cgg cgg tgg ctg 925
 Arg Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu
 275 280 285

cgc gcg aac ctg gct gcc tgc ggc ggc tac gca atc gcg gtg gtg ctg 973
 Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu
 290 295 300

ctg cag ggg gcg gag ctc ctg ctg gcc gcc cgg cta ctc ggg gcc ctc 1021
 Leu Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu
 305 310 315

gct gcc cgc agt ggg gog gcg tac ggc ccc gga gcg cac ggg gag gac 1069
 Ala Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala His Gly Glu Asp
 320 325 330 335

cgc gct ggc ccc cag agc ccc agc ccc ggc gcc ccg ccc gct gcc aaa 1117
 Arg Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys
 340 345 350

ccc gcc cgg ggc tga ggcacgccc cgaggtccga gaccgccacg cacagggata 1172
 Pro Ala Arg Gly
 355

cagggggcgc ctccgcccgg ctaaaaagcg ctgcctgcgc cgccgccgcc gctgatttc 1232

gctcgggctt cgggtgactt cgccgcagga cctaccagc togctcactt cgctcctcc 1292

gcgtccccc tgccagcccc caacgcaggg cgcccgccga agccacggga ctggcggggag 1352

gagcacgcgg ggccggagga aatcctggag ctgaccctca cctccgagcc cccaactccca 1412
 cccagcgcgc acagttccca cctcctgga cctccctccc ctggggcgc cacccttct 1472
 gggctcgtga tggtaggagct aaggtocagg cctctccctc ccgagtgcatt ttttggggag 1532
 atagtaaattg ttttattcgg gtgtatcatt catacagtaa agacaccaat cttcaaaaaa 1592
 aaaaaaaaaa 1601

<210> 4
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4
 Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly
 20 25 30
 Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys
 35 40 45
 Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly
 50 55 60
 Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu Ile
 65 70 75 80
 Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala
 85 90 95
 Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp Leu
 100 105 110
 Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly Gly
 115 120 125
 Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu Cys
 130 135 140
 Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala Phe
 145 150 155 160
 Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp Gly
 165 170 175
 Pro Leu Gln Asp Ser Leu Glu His Thr Leu Arg Val Ala Ile Ala His
 180 185 190
 Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu
 195 200 205

Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln Asn
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu Pro
 225 230 235 240
 Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp
 245 250 255
 Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg
 260 265 270
 Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg
 275 280 285
 Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu
 290 295 300
 Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala His Gly Glu Asp Arg
 325 330 335
 Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro
 340 345 350
 Ala Arg Gly
 355

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 针对 OSCP 的正义引物

<400> 5

caccatggag gaggggaga ggagccc

27

<210> 6

<211> 23

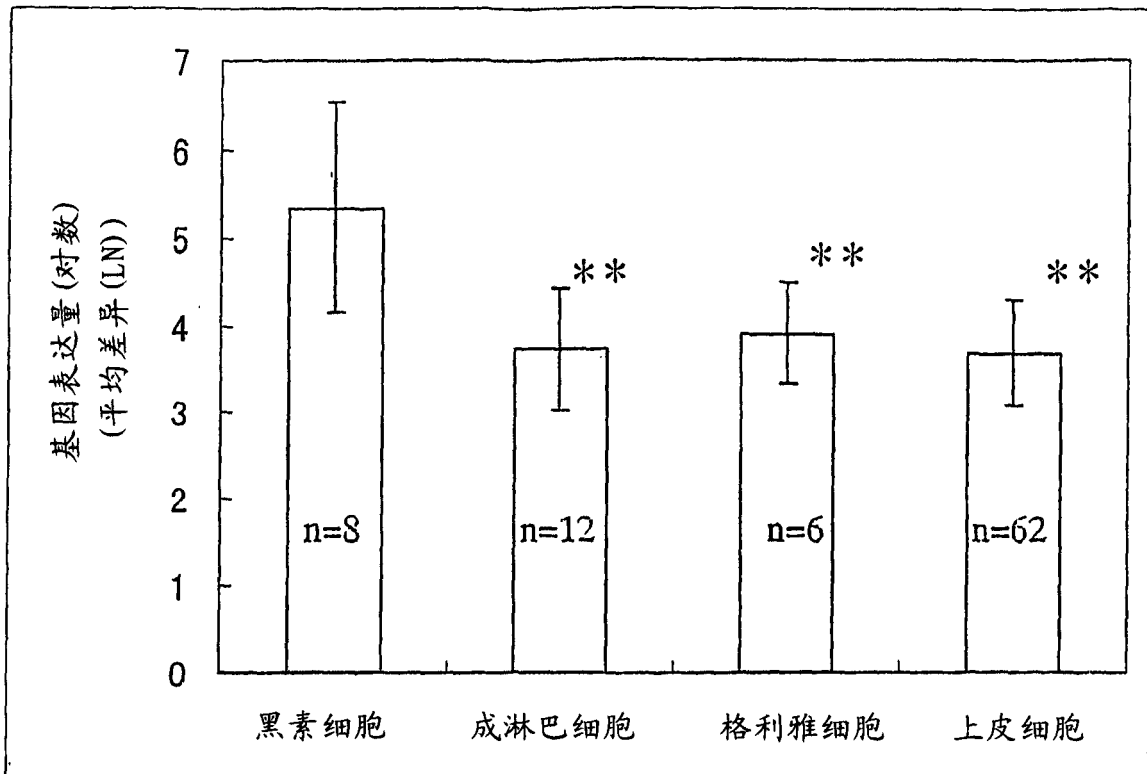
<212> DNA

<213> 人

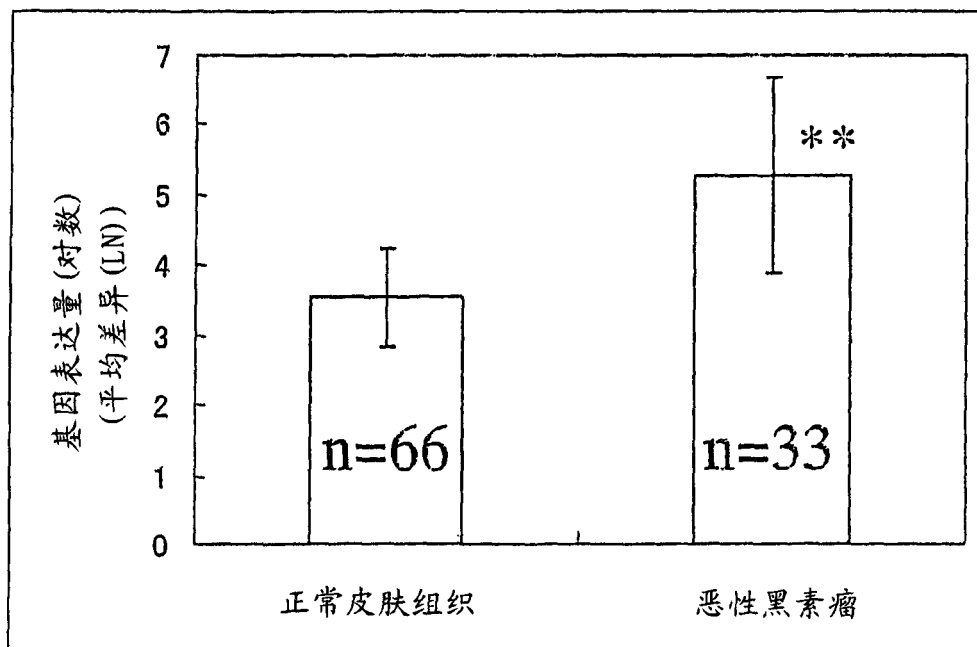
<400> 6

gccccgggag ggtttggcag cgg

23

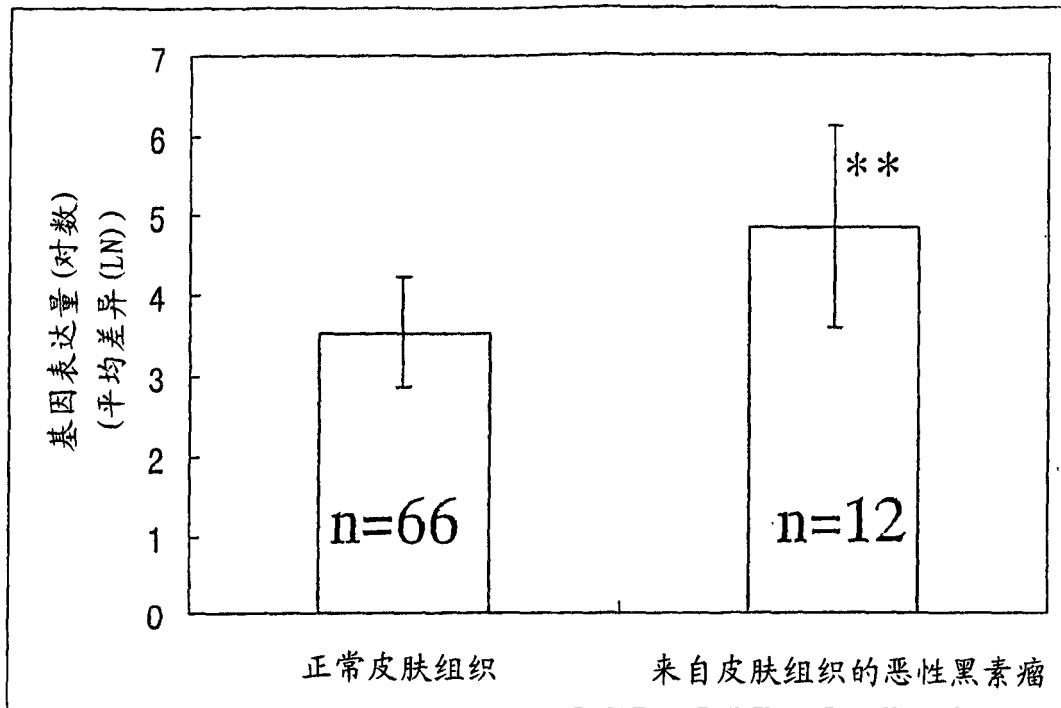


** : $p < 0.001$

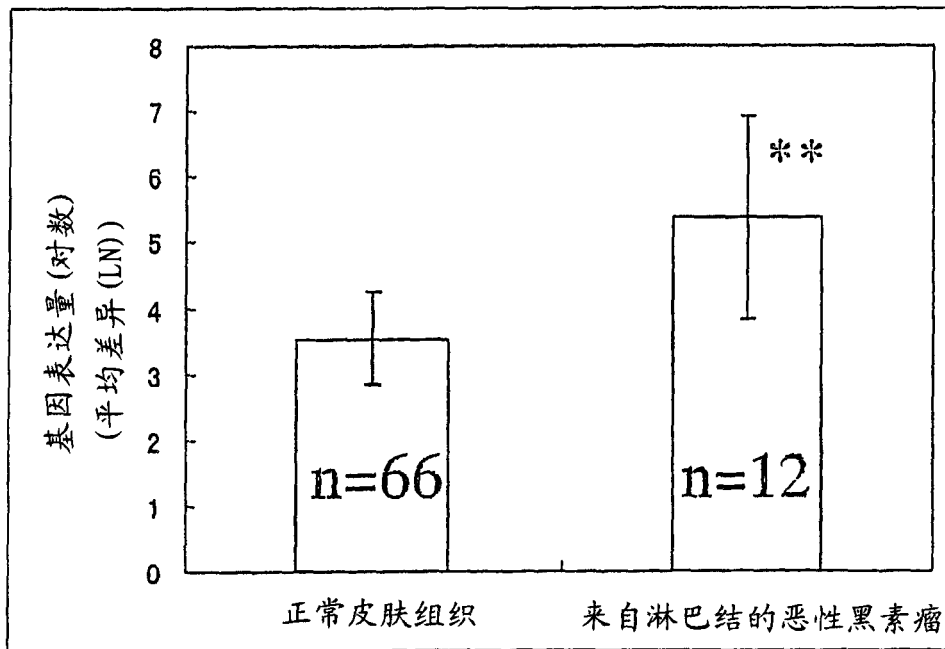


** : $p < 0.001$

图 1

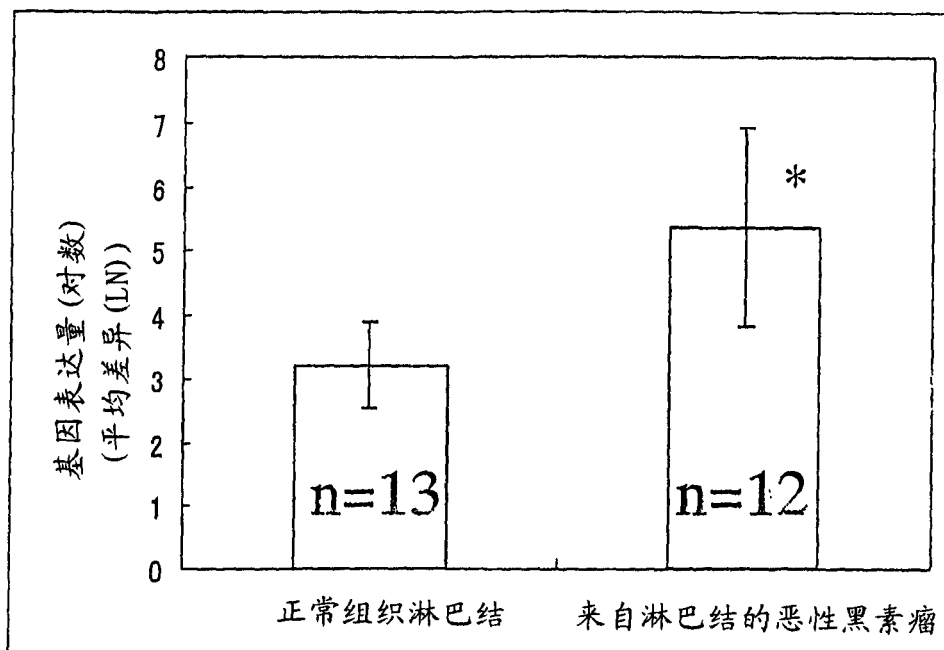


** : $p < 0.001$



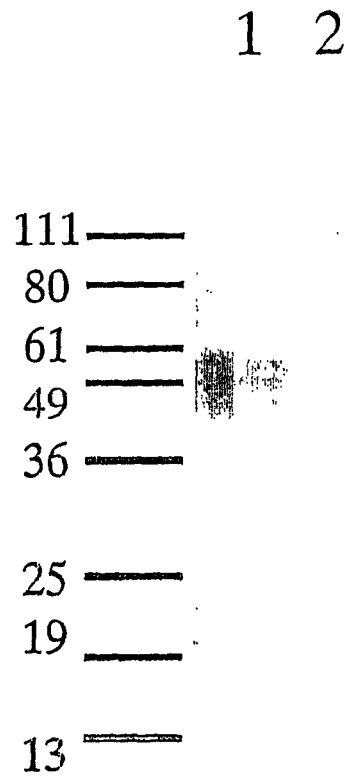
** : $p < 0.001$

图 2



*: $p < 0.01$

图 3



泳道1: 将pENTR/D-TOPO-NM_031945导入细胞
泳道2: 未进行任何导入的对照

图 4

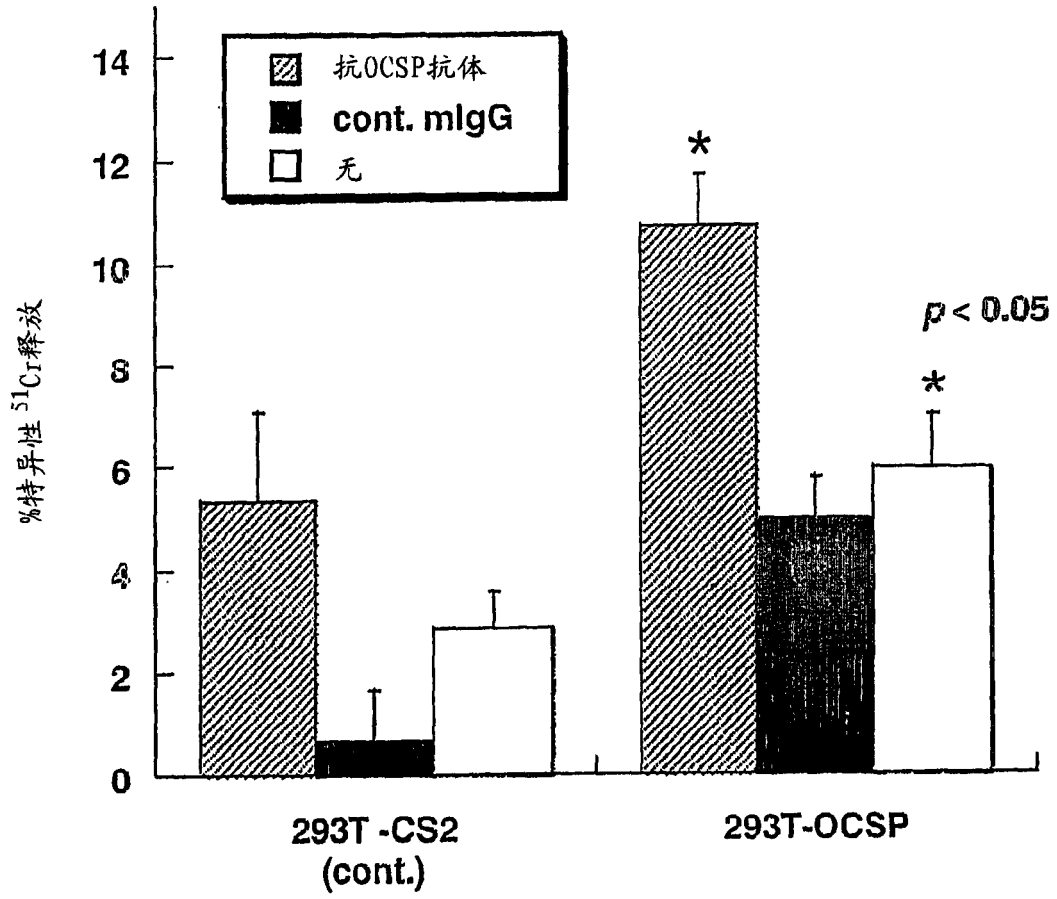


图 5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 以癌特异性抗原为靶的抗体 | | |
| 公开(公告)号 | CN1784426A | 公开(公告)日 | 2006-06-07 |
| 申请号 | CN200480012666.3 | 申请日 | 2004-03-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 株式会社三共 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 三共株式会社 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 三共株式会社 | | |
| [标]发明人 | 市川公久 高桥秀 我妻利纪 福地圭介 平井岳大 | | |
| 发明人 | 市川公久 高桥秀 我妻利纪 福地圭介 平井岳大 | | |
| IPC分类号 | C07K16/32 G01N33/53 A61K31/7088 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/30 C07K16/42 C12M1/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/574 G01N37/00 | | |
| CPC分类号 | A61P17/00 C07K16/30 C07K2317/732 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/158 | | |
| 代理人(译) | 郭文洁 王景朝 | | |
| 优先权 | 2003063648 2003-03-10 JP | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及使用癌基因的癌检测方法、癌症治疗药和/或具有预防效果的化合物的筛选方法、以及癌症治疗药和/或预防用药物组合物。即本发明提供以人oculospanin基因的表达为指标的癌的检测方法，以及含有特异性识别人oculospanin基因、对于癌细胞具有细胞毒活性的抗体的药物组合物。

